Epigenetske promjene i ekspresija proteina PTCH1, SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika

Karin-Kujundžić, Valentina

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:712210

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Valentina Karin-Kujundžić

Epigenetske promjene i ekspresija proteina PTCH1, SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Valentina Karin-Kujundžić

Epigenetske promjene i ekspresija proteina PTCH1, SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj rad je primio potporu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Republika Hrvatska, i Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj, pod ugovorom KK.01.1.1.01.0008, projekt "Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala".

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ljiljana Šerman

Neizmjerno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ljiljani Šerman na korisnim savjetima, nesebično pruženom znanju, stručnom vodstvu, posvećenosti, strpljenju, razumijevanju i velikoj podršci tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem patolozima s Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur i prof. dr. sc. Semiru Vraniću na patohistološkoj evaluaciji i imunohistokemijskoj analizi uzoraka seroznih karcinoma jajnika.

Želim zahvaliti svojim kolegicama i kolegama sa Zavoda za biologiju na pomoći i podršci te uvijek ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem i svim svojim prijateljima na podršci tijekom izrade ovog rada.

Svim članovima moje obitelji, a osobito roditeljima Antoniji i Borisu, sestrama Moniki i Darinki i bratu Luki neizmjerno zahvaljujem na podršci, pomoći, ljubavi i ohrabrivanju bez čega moj uspjeh ne bi bio moguć.

Posebno zahvaljujem svom suprugu Stipanu na izuzetnoj podršci, ljubavi i beskrajnom razumijevanju koje mi je pružio tijekom izrade ovog rada i koje mi pruža kroz život.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Rak jajnika 1

1.1.1. Etiologija i patogeneza 2

1.1.2. FIGO-klasifikacija 3

1.1.3. Histološka podjela 5

1.2. Serozni karcinomi jajnika 6

1.2.1. Serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti 7

1.2.2. Serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti 10

1.3. Signalni put Hedgehog 13

1.3.1. Patched 1 17

1.3.2. Sonic Hedgehog 20

1.3.3. Indian Hedgehog 23

1.3.4. Ostale komponente signalnog puta Hedgehog 24

1.4. Uloga signalnog puta Hedgehog u razvoju tumora 26

1.4.1. Genetske promjene 28

1.4.2. Epigenetske promjene 29

1.5. Signalni put Hedgehog u tumorima jajnika 30

2. HIPOTEZA 33

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 34

3.1. Opći cilj 34

3.2. Specifični ciljevi 34

4. MATERIJALI I METODE 35

4.1. Biološki materijali korišteni u istraživanju 35

4.1.1. Zdravo i tumorsko tkivo 35

4.1.2. Stanične linije 36

4.2. Kultura stanica 36

4.2.1. Odmrzavanje stanica 36

4.2.2. Presađivanje stanica 36

4.2.3. Zamrzavanje stanica 37

4.3. Imunohistokemija 38

4.4. Imunofluorescencija 40
4.5. Izolacija proteina iz stanica u kulturi 41
4.6. Western blot 42
4.7. Izolacija genomske DNA iz FFPE-tkiva 44
4.8. Izolacija genomske DNA iz stanica u kulturi 45
4.9. PCR ovisan o metilaciji 46
4.10. Statistička analiza 48
5. REZULTATI 49
5.1. Ekspresija proteina PTCH1 u seroznim karcinomima jajnika 49
5.1.1. Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u zdravom i tumorskom tkivu 49
5.1.2. Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 u zdravom i tumorskom tkivu 54
5.1.3. Ukupna ekspresija proteina PTCH1 u zdravom i tumorskom tkivu 57
5.1.4. Ekspresija proteina PTCH1 u staničnim linijama 61
5.1.5. Substanična lokalizacija proteina PTCH1 u staničnim linijama 66
5.2. Metilacija gena *PTCH1* u seroznim karcinomima jajnika 71
5.3. Ekspresija proteina SHh u seroznim karcinomima jajnika 72
5.3.1. Ukupna ekspresija proteina SHh u zdravom i tumorskom tkivu 73
5.3.2. Ekspresija proteina SHh u staničnim linijama 77
5.4. Metilacija gena *SHh* u seroznim karcinomima jajnika 79
5.5. Ekspresija proteina IHh u seroznim karcinomima jajnika 80
5.5.1. Ukupna ekspresija proteina IHh u zdravom i tumorskom tkivu 80
5.5.2. Ekspresija proteina IHh u staničnim linijama 84
5.6. Metilacija gena *IHh* u seroznim karcinomima jajnika 86
5.7. Korelacijska analiza ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravom i tumorskom tkivu 87
5.7.1. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti 87
5.7.2. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti 92
5.7.3. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravim jajnicima 96

5.7.4. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravim jajovodima 101
6. RASPRAVA 105
6.1. Uloga proteina PTCH1 u seroznim karcinomima jajnika..... 106
6.2. Uloga proteina SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika..... 110
6.3. Međusobna povezanost proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravom i tumorskom tkivu.....115
7. ZAKLJUČAK 118
8. SAŽETAK 119
9. SUMMARY 120
10. LITERATURA 121
11. ŽIVOTOPIS 147

POPIS KRATICA

ANG1/2	engl. *Angiopoietin 1/2*
ARID1A	engl. *AT-Rich Interacting Domain-Containing Protein 1A*
ATM	engl. *Ataxia Telangiectasia Mutated*
ATR	engl. *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*
β-ARR	engl. *β-Arrestin*
βTrCP	engl. *β-Transducin Repeat-Containing Protein*, E3 ubikvitin ligaza βTrCP
BCL2	engl. *B Cell Lymphoma 2*
BMP4	engl. *Bone Morphogenetic Protein 4*, koštani morfogenetski protein 4
BOC	engl. *Brother of CDO*
BRAF	engl. *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1*
BRCA1	engl. *Breast Cancer 1*
BRCA2	engl. *Breast Cancer 2*
BSA	engl. *Bovine Serum Albumin*, albumin goveđeg seruma
CA-MSC	engl. *carcinoma-associated mesenchymal stem cell*, mezenhimska matična stanica povezana s karcinomom
CA125	engl. *Cancer Antigen 125*, karcinomski antigen 125
CAF	engl. *cancer-associated fibroblast*, fibroblast povezan s tumorom
CCC	engl. *clear cell carcinoma*, svijetlostanični karcinom jajnika
CCND1/2	engl. *Cyclin D1/2*, gen za ciklin D1/2
CCNE1	engl. *Cyclin E1*, gen za ciklin E1
CDK12	engl. *Cyclin Dependent Kinase 12*
CDKN2A/B	engl. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/B*
CDO	engl. *Cell Adhesion Molecule-Related, Down-Regulated by Oncogenes*
CK1	engl. *Casein Kinase 1*
CpG	citozin-gvanin dinukleotidni kompleks

CRD	engl. *cysteine-rich domain,* domena bogata cisteinom
CSC	engl. *cancer stem cell*, tumorska matična stanica
CSMD3	engl. *CUB and Sushi Multiple Domains 3*
CTD	engl. *C-terminal domain,* C-terminalna domena
CTNNB1	engl. *Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1,* gen koji kodira protein β-katenin
DAB	engl. *3,3'-diaminobenzidine*
DHh	engl. *Desert Hedgehog*
DISP	engl. *Dispatched*
DMEM	engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	dimetilsulfoksid
DPBS	engl. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
EC	engl. *endometrioid carcinoma,* endometrioidni karcinom jajnika
ECD1	engl. *extracellular domain 1*, izvanstanična domena proteina PTCH1
ECD2	engl. *extracellular domain 2*, izvanstanična domena proteina PTCH1
EIF1AX	engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A X-Linked*
EMT	engl. *epithelial–mesenchymal transition,* epitelno-mezenhimska tranzicija
FBS	engl. *Fetal Bovine Serum*, fetalni goveđi serum
FFAR1	engl. *Free Fatty Acid Receptor 1*
FFPE	engl. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded,* fiksirano formalinom i uklopljeno u parafin
FIGO	franc. *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique,* Međunarodno udruženje ginekologa i opstetričara
GABRA6	engl. *Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Alpha 6*
GAS1	engl. *Growth Arrest-Specific 1*
G_i	engl. *G inhibitory protein*
GLI	engl. *Glioma-Associated Oncogene Homolog*
GLI1	engl. *Glioma-Associated Oncogene Homolog 1*

GLI-A	engl. *activator form of GLI*, aktivacijski oblik proteina GLI
GLI-FL	engl. *full-length GLI*
GLI-R	engl. *repressor form of GLI*, represorski oblik proteina GLI
GPCR	engl. *G-protein-coupled receptors*, receptori povezani s G-proteinom
GRK2	engl. *G Protein-Coupled Receptor Kinase 2*
GSK3β	engl. *Glycogen Synthase Kinase-3β*, glikogen sintaza kinaza-3β
HE4	engl. *Human Epididymis Protein 4*, humani epididimis protein 4
HER2	engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, gen koji kodira receptor za humani epidermalni faktor rasta 2
HGSC	engl. *high-grade serous ovarian carcinoma*, serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti
Hh	engl. *Hedgehog*
HHAT	engl. *Hedgehog acyltransferase*, Hedgehog aciltransferaza
HhC	C-terminalni produkt proteina Hh
HHIP	engl. *Hedgehog-Interacting Protein*
HhN	N-terminalni produkt proteina Hh
HhNp	zreli dvostruko modificirani protein Hh
HPF	engl. *high-power field*, vidno polje pod velikim povećanjem
IHh	engl. *Indian Hedgehog*
KIF3A	engl. *Kinesin Family Member 3A*
KIF7	engl. *Kinesin Family Member 7*
KRAS	engl. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog*
LGSC	engl. *low-grade serous ovarian carcinoma*, serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti
lnRNA	engl. *long non-coding RNA*, duge nekodirajuće RNA
LOH	engl. *loss of heterozygosity*, gubitak heterozigotnosti
LTCC	engl. *Live Tumor Culture Core*
MAPK	engl. *mitogen-activated protein kinase*, proteinska kinaza aktivirana mitogenom

MC	engl. *mucinous carcinoma*, mucinozni karcinom jajnika
MECOM	engl. *MDS1 and EVI1 Complex Locus*
miR34a	engl. *MicroRNA 34a*
miRNA	engl. *micro-RNA*, mikro-RNA
ML	engl. *middle loop*, srednja petlja
MMP9	engl. *Matrix Metallopeptidase 9*
MPSC	engl. *micropapillary serous borderline carcinoma*, mikropapilarni karcinom jajnika niskog malignog potencijala
mRNA	engl. *messenger RNA*, glasnička RNA
MSC	engl. *mesenchymal stem cell*, mezenhimska matična stanica
MSP	engl. *Methylation-Specific PCR*, PCR ovisan o metilaciji
MYC	engl. *MYC proto-oncogene*
NANOG	engl. *Nanog homeobox*
NF-κB	engl. *Nuclear Factor-κB*
NF1	engl. *Neurofibromin 1*
NPC1	engl. *Niemann-Pick C1*
NRAS	engl. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*
NTD	engl. *N-terminal domain*, N-terminalna domena
PCR	engl. *Polymerase Chain Reaction*, lančana reakcija polimerazom
PDGFR	engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*
PFA	engl. *paraformaldehyde*, paraformaldehid
PI3K	engl. *Phosphoinositide 3-Kinase*
PIK3CA	engl. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*, gen koji kodira fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaznu katalitičku podjedinicu alfa
PKA	engl. *Protein Kinase A*, protein kinaza A
PMSF	engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, fenilmetilsulfonil fluorid
PTCH1	engl. *Patched 1*

PTCH2	engl. *Patched 2*
PTEN	engl. *Phosphatase and Tensin Homolog*, gen koji kodira protein homolog fosfataze i tenzina
RAD51C	engl. *RAD51 Paralog C*
RB1	engl. *RB Transcriptional Corepressor 1*
Rho	engl. *Ras homologous*
RIPA	engl. *Radioimmunoprecipitation Assay*
RND	engl. *Resistance-Nodulation-Division*
rpm	engl. *revolutions per minute*, okretaji po minuti
SBD	engl. *sterol binding domain*
SBT	engl. *serous borderline tumor*, serozni tumor jajnika niskog malignog potencijala
SCUBE	engl. *Signal Peptide-CUB-EGF Domain-Containing Protein*
SHh	engl. *Sonic Hedgehog*
SMO	engl. *Smoothened*
SNAIL	gen za transkripcijski faktor SNAIL
SOX2	engl. *SRY (sex determining region Y)-box 2*
SSD	engl. *sterol-sensing domain*
STIC	engl. *serous tubal intraepithelial carcinoma*, serozni intraepitelni karcinom jajovoda
SUFU	engl. *Suppressor of Fused*
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TAE	engl. *Tris-Acetate-EDTA*
TBS	engl. *Tris-Buffered Saline*, Tris pufer
TERT	engl. *Telomerase Reverse Transcriptase*, telomerazna reverzna transkriptaza
TGF-β	engl. *Transforming Growth Factor-β*
TMD	engl. *transmembrane domain*, transmembranska domena
TP53	engl. *Tumor Protein p53*
TUCAN	engl. *Tumor Up-Regulated CARD-Containing Antagonist Of Caspase Nine*
USP9X	engl. *Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked*

VEGF	engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, gen za vaskularni endotelni faktor rasta
WHO	engl. *World Health Organization*, Svjetska zdravstvena organizacija
Wnt	engl. *Wingless/int1*
× g	engl. *times gravity*, puta gravitacija

1. UVOD

1.1. Rak jajnika

Rak jajnika osmi je po redu vodeći uzrok smrti povezanih s rakom kod žena te je po učestalosti treći najčešći ginekološki zloćudni tumor (1). U svijetu je 2018. godine od raka jajnika oboljelo 295 414, a umrlo 184 799 žena (1). Predviđa se da će do 2035. godine stope incidencije i mortaliteta značajno porasti, pri čemu će po godini biti 371 000 novooboljelih i 254 000 umrlih žena (2). Ukupno preživljenje bolesnica s rakom jajnika iznosi 45,6%, međutim, ono jako varira s obzirom na stadij bolesti. Petogodišnje preživljenje bolesnica s rakom jajnika u stadiju I iznosi 92,1%, u stadiju II oko 70%, dok kod bolesnica sa stadijem III i IV iznosi 25% (3). U Hrvatskoj je 2017. godine zabilježeno 398 novih slučajeva (Registar za rak Republike Hrvatske). U istoj godini je od raka jajnika, jajovoda i adneksa umrlo 330 žena. Omjer mortaliteta i incidencije kod ove vrste raka iznosi 0,75 što znači da od 100 oboljelih umre 75 žena (4).

Malo toga je poznato o ranim aspektima razvoja raka jajnika pa se faktori rizika primarno temelje na epidemiološkim faktorima kako bi se odredilo koje žene spadaju u rizičnu skupinu (5). Faktori rizika za razvoj bolesti su starija životna dob (pojavnost raka raste s dobi, a najviša je u dobi iznad 65 godina), rana prva menstruacija, karcinom jajnika u obitelji, neplodnost, nuliparitet, endometrioza, korištenje hormonske terapije u postmenopauzi, pretilost i genetski faktori, kao što su mutacije gena *BRCA1* (engl. *Breast Cancer 1*) i *BRCA2* (engl. *Breast Cancer 2*) te mutacije u genima za popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*) koje su povezane s Lynchovim sindromom (5-7). Trudnoća, dojenje, rađanje djeteta u kasnijoj životnoj dobi, podvezivanje jajovoda, hormonska kontracepcija te redovita fizička aktivnost smanjuju rizik od nastanka raka jajnika (5-7).

Rak jajnika jedan je od najvećih kliničkih izazova u ginekološkoj onkologiji. Budući da većina bolesnica nema nikakve simptome dok bolest ne metastazira i da ne postoje učinkovite metode probira, gotovo 90% slučajeva dijagnosticira se u uznapredovalom stadiju bolesti. Iz tog razloga, rak jajnika ima najvišu stopu smrtnosti od svih ginekoloških malignosti (8). Simptomi koji se javljaju su nespecifični i preklapaju se sa simptomima puno češćih poremećaja, kao što su dispepsija, sindrom iritabilnog crijeva, menstrualni poremećaji i

menopauza, što dodatno otežava ranu dijagnozu (9). Ranu dijagnozu otežava i činjenica da postoje različiti histološki podtipovi raka jajnika koji imaju različita biološka i klinička svojstva (3). Trenutno je, za dijagnozu raka jajnika, najučinkovitije kombinirano mjerenje serumskih biomarkera karcinomskog antigena 125 (engl. *Cancer Antigen 125*, CA125) i humanog epididimis proteina 4 (engl. *Human Epididymis Protein 4*, HE4) (10). Kod žena s povišenom razinom CA125 preporučuje se multimodalni pristup u dijagnozi uz korištenje transvaginalne sonografije (11).

1.1.1. Etiologija i patogeneza

Budući da se rak jajnika većinom dijagnosticira u uznapredovalom stadiju bolesti, jako malo se zna o ranim molekularnim i genetičkim promjenama koje pokreću transformaciju zdravih stanica u maligne. Etiologija epitelnih tumora jajnika je nejasna te se još uvijek ne zna točno podrijetlo nastanka tumorskih stanica. Postoje dva modela o podrijetlu nastanka malignih stanica: tradicionalni model prema kojem se karcinom jajnika razvija iz pokrovnog epitela jajnika, te novi model prema kojem se karcinomske stanice razvijaju iz epitela fimbrija jajovoda (5, 12). Oba modela su jednakovrijedna te se smatra da i jedno i drugo tkivo mogu biti ishodište karcinoma jajnika. To se može objasniti činjenicom da oba tkiva dijele isto embrionalno podrijetlo i iste okolišne uvjete (12). Također, karcinom jajnika može se razviti i iz peritoneuma, posebno kod pojedinih vrsta epitelnih tumora jajnika kao što je mucinozni i serozni karcinom jajnika (13).

Postoji nekoliko hipoteza koje pokušavaju objasniti patogenezu raka jajnika: hipoteza neprestanih ovulacija, gonadotropinska hipoteza, hormonalna hipoteza i upalna hipoteza (5, 14-20). Hipoteza neprestanih ovulacija pretpostavlja da oštećenja i oporavci pokrovnog epitela jajnika, uzrokovani neprestanim ovulacijama, povećavaju vjerojatnost nastanka malignih stanica budući da u tim procesima može doći do oštećenja DNA (14). Gonadotropinska hipoteza tvrdi da cirkulirajući gonadotropini stimuliraju epitel jajnika te na taj način potiču transformaciju normalnih stanica u maligne (15-16). Prema hormonalnoj hipotezi, spolni hormoni kao što su androgeni i estrogeni mogu direktno stimulirati epitel jajnika i na taj način povećati rizik od nastanka raka jajnika, dok progestini imaju protektivni učinak (5, 16-17). Upalna hipoteza pretpostavlja da upalni medijatori, bilo da su oslobođeni tijekom ovulacije ili tijekom patoloških stanja kao što su endometrioza ili upalna bolest

zdjelice, mogu oštetiti i epitel jajnika i epitel fimbrija jajovoda pogodujući na taj način nastanku raka jajnika (18-20). Budući da nijedna od hipoteza ne može u potpunosti objasniti mehanizme nastanka raka jajnika, vrlo je vjerojatno da patogeneza raka jajnika obuhvaća kompleksni skup isprepletenih bioloških procesa povezanih s ovulacijom, hormonalnim faktorima i upalom (5).

1.1.2. FIGO-klasifikacija

Različiti histološki tipovi raka jajnika nemaju isti odgovor na liječenje pa je precizna patohistološka dijagnoza nužna za pravilnu kategorizaciju i uspješno liječenje. Klinički stadij i prognoza bolesti određuju se prema klasifikaciji Međunarodnog udruženja ginekologa i opstetričara (franc. *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*, FIGO), pri čemu su se u obzir uzeli najrelevantniji prognostički parametri koji su isti kod svih tipova tumora (21-22). Budući da se rak jajnika, osim iz samog jajnika kao ishodišnog organa, može razviti i iz jajovoda i peritoneuma, i da tumori jajnika, jajovoda i peritoneuma dijele slična molekularna, morfološka i klinička svojstva (23), Međunarodno udruženje ginekologa i opstetričara je u siječnju 2014. godine revidiralo i objavilo novu službenu zajedničku klasifikaciju raka jajnika, jajovoda i peritoneuma (Tablica 1) (21).

Tablica 1. FIGO-klasifikacija za rak jajnika, jajovoda i peritoneuma. Uređeno prema (21).

FIGO-stadij		**Opis**
I		Tumor ograničen na jajnike ili jajovode
	IA	Tumor ograničen na jedan jajnik (s intaktnom čahurom) ili jajovod; bez tumora na površini jajnika ili jajovoda; bez malignih stanica u ascitesu ili peritonealnom ispirku
	IB	Tumor ograničen na oba jajnika (s intaktnim čahurama) ili jajovoda; bez tumora na površini jajnika ili jajovoda; bez malignih stanica u ascitesu ili peritonealnom ispirku
	IC	Tumor ograničen na jedan ili oba jajnika ili jajovoda s jednom od sljedećih osobitosti:
		IC1 Ruptura čahure tijekom operacije

		IC2	Ruptura čahure prije operacije ili prisustvo tumora na površini jajnika ili jajovoda
		IC3	Prisutne maligne stanice u ascitesu ili peritonealnom ispirku
II		Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika ili jajovoda uz širenje na zdjelicu, ili se radi o primarnom raku peritoneuma	
	IIA	Širenje i/ili implantacija tumora na maternicu i/ili jajnike i/ili jajovode	
	IIB	Širenje tumora na druga tkiva zdjelice	
III		Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika ili jajovoda ili se radi o primarnom raku peritoneuma s citološki ili histološki potvrđenim širenjem na peritoneum izvan zdjelice i/ili metastazama u retroperitonealnim limfnim čvorovima	
	IIIA	Metastaze u retroperitonealnim limfnim čvorovima uz ili bez prisustva mikroskopskih peritonealnih metastaza izvan zdjelice	
		IIIA1	Pozitivni samo retroperitonealni limfni čvorovi: - IIIA1(i): metastaze veličine do 10 mm - IIIA1(ii): metastaze veće od 10 mm
		IIIA2	Mikroskopske peritonealne metastaze izvan zdjelice uz zahvaćene ili nezahvaćene retroperitonealne limfne čvorove
	IIIB	Makroskopske peritonealne metastaze izvan zdjelice veličine do 2 cm s ili bez metastaza u retroperitonealim limfnim čvorovima	
	IIIC	Makroskopske peritonealne metastaze izvan zdjelice veće od 2 cm s ili bez metastaza u retroperitonealnim limfnim čvorovima (uključujući širenje tumora na čahuru jetre i čahuru slezene bez širenja u parenhim)	
IV		Prisutnost udaljenih metastaza, isključujući peritonealne metastaze	
	IVA	Pleuralni izljev s pozitivnim nalazom citološke pretrage	
	IVB	Parenhimske metastaze i metastaze na organima izvan trbušne šupljine (uključujući ingvinalne limfne čvorove i limfne čvorove koji se nalaze izvan trbušne šupljine)	

1.1.3. Histološka podjela

Prema anatomskim strukturama iz kojih nastaju, tumori jajnika mogu se podijeliti u tri velike skupine: tumori pokrovnog epitela jajnika, tumori spolnog tračka i tumori zametnih stanica (24). Tumori pokrovnog epitela jajnika nastaju iz epitelnih stanica te čine oko 60% svih tumora jajnika i oko 90% malignih tumora jajnika. Tumori spolnog tračka mogu se razviti iz teka stanica, stromalnih stanica, granuloza stanica ili Sertoli-Leydigovih stanica. Ovi tumori čine oko 8% svih tumora jajnika i oko 7% malignih tumora jajnika. Tumori zametnih stanica nastaju iz primordijalnih spolnih stanica te čine oko 25% svih tumora jajnika i oko 3-7% malignih tumora jajnika (24-25).

Epitelni tumori jajnika

Najčešći i najsmrtonosniji oblik raka jajnika su epitelni tumori jajnika (karcinomi jajnika). Epitelni tumori jajnika nisu homogena, već heterogena bolest s različitim histološkim svojstvima te različitim molekularnim i genetskim karakteristikama (26). Trenutno postoji najmanje pet različitih tipova epitelnih tumora jajnika, a to su: serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti (engl. *high-grade serous ovarian carcinoma*, HGSC; 70%), endometrioidni karcinomi (engl. *endometrioid carcinoma*, EC; 10%), svijetlostanični karcinomi (engl. *clear cell carcinoma*, CCC; 10%), mucinozni karcinomi (engl. *mucinous carcinoma*, MC; 3%) i serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti (engl. *low-grade serous ovarian carcinoma*, LGSC; <5%) (27). Osim što imaju različite molekularne i genetske karakteristike, navedeni karcinomi razlikuju se i prema epidemiološkim i genetičkim faktorima rizika, staničnom podrijetlu, patogenezi, prognozi i odgovoru na kemoterapiju (26).

Serozni karcinomi jajnika niskog (LGSC) i visokog (HGSC) stupnja malignosti detaljno su opisani u poglavlju 1.2.

Endometrioidni karcinomi jajnika (EC) čine oko 10% svih epitelnih tumora jajnika. Budući da se uglavnom dijagnosticiraju u ranom stadiju bolesti, ovi karcinomi imaju najbolju prognozu od svih epitelnih tumora jajnika (26, 28). Za EC je tipično da su dobro diferencirani i da imaju najmanje jednu od sljedećih karakteristika: žlijezde tipične za endometrioidni adenokarcinom, žarišta skvamozne diferencijacije i/ili adenofibromatoznu komponentu (28). Smatra se da nastaju iz endometrioze (29). Otprilike 15-20% žena oboljelih od EC-a ima i

endometriozu, dok oko 14% žena oboljelih od ovog raka simultano ima i karcinom endometrija maternice (30). Najčešće genetske promjene kod EC-a su mutacije gena *KRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *CTNNB1*, *ARID1A* i *TP53* (31).

Svijetlostanični karcinomi (CCC) također čine oko 10% svih epitelnih tumora jajnika te se većinom dijagnosticiraju u ranom stadiju bolesti zbog čega imaju dobru prognozu. Međutim, ako se dijagnosticiraju u uznapredovalom stadiju bolesti, tada imaju najlošiju prognozu od svih epitelnih tumora jajnika (26, 32). Tumorske stanice CCC-a nalikuju čavlićima (engl. *hobnail*) i imaju svijetlu citoplazmu po kojoj karcinom i nosi ime. CCC su uglavnom veliki tumori (mogu narasti više od 15 cm) koji mogu imati tubulocističnu, solidnu i papilarnu strukturu (33). Smatra se da, kao i EC, nastaju iz endometrioze kao ishodišne lezije, ali mogu se razviti i iz adenofibroma (34). Za CCC karakteristične su mutacije gena *ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS* i *PTEN* (33).

Mucinozni karcinomi (MC) najčešći su histološki tip karcinoma jajnika kod žena mlađih od 40 godina, dok ukupno čine samo 3% svih epitelnih tumora jajnika. Imaju jako dobru prognozu jer se u većini slučajeva rano dijagnosticiraju. Međutim, prognoza je loša ako se radi o uznapredovalom stadiju bolesti (35). Histološki gledano, MC imaju žljezdanu strukturu i stratificirane cilindrične stanice s jezgrama smještenim u bazalnom dijelu stanice i apikalnu citoplazmu ispunjenu sa sluzi koja je oskudna ili nedostaje u MC-u s visokim stupnjem malignosti (engl. *high-grade*) (34). Pretpostavlja se da nastaju iz benignih lezija ili tumora jajnika niskog malignog potencijala (engl. *borderline*) (36). Najčešće genetske promjene kod MC-a su mutacije gena *KRAS* i *TP53*, te amplifikacija gena *HER2* (37).

1.2. Serozni karcinomi jajnika

Serozni karcinomi jajnika čine oko tri četvrtine svih epitelnih tumora jajnika (27). S obzirom na nuklearnu atipiju i broj mitoza, dijele se na serozne karcinome jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) i serozne karcinome jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC). HGSC imaju izraženu nuklearnu atipiju i visok broj mitoza [>12 mitoza na 10 HPF (engl. *high-power field*, vidno polje pod velikim povećanjem, 400x)], dok LGSC imaju nižu nuklearnu atipiju i slabiju mitotičku aktivnost (≤12 mitoza na 10 HPF) (38). Iako su oba seroznog histološkog tipa, HGSC i LGSC dva su različita entiteta s različitom patogenezom, molekularnim i genetskim promjenama, podrijetlom nastanka i prognozom (26).

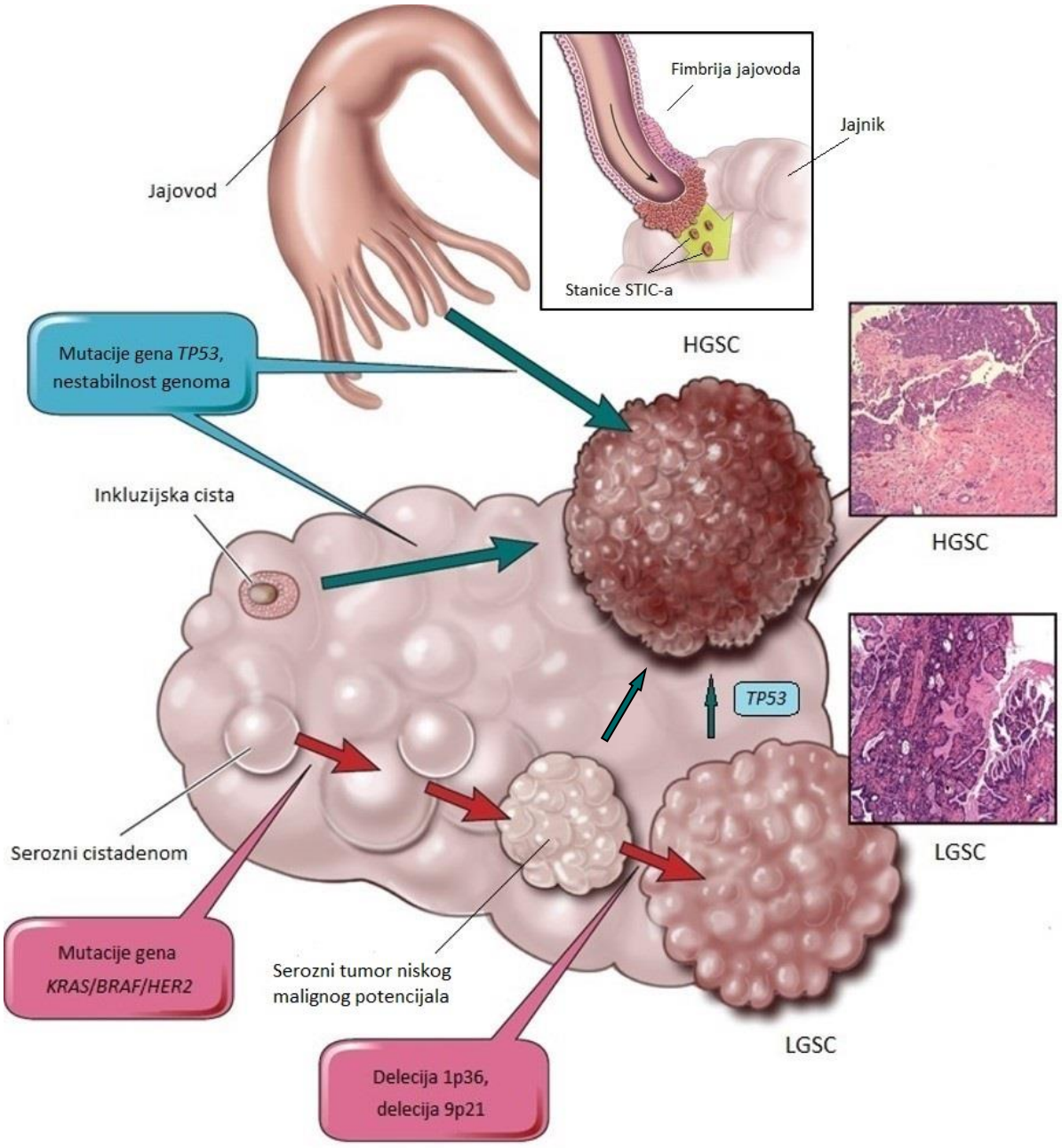
1.2.1. Serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti

Serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti jako su rijedak histološki tip tumora jajnika koji čine oko 2-3% svih epitelnih tumora jajnika te oko 5% seroznih karcinoma jajnika (28, 39). Većinom se dijagnosticiraju u uznapredovalom stadiju bolesti (FIGO-stadiji III i IV) i zahvaćaju oba jajnika (40-41). Srednja dob žena s dijagnozom LGSC-a je 45-57 godina (40). Petogodišnje preživljenje bolesnica oboljelih od ove bolesti iznosi 54,2%, dok je desetogodišnje preživljenje manje i iznosi 37,3% (41). Iako žene s LGSC-om žive duže od žena s HGSC-om, ukupno preživljenje je loše jer se tumor kasno dijagnosticira uz slab odgovor na standardnu kemoterapiju (42).

LGSC imaju papilarnu strukturu i tumorske stanice s malim pravilnim jezgrama koje imaju nisku mitotičku aktivnost. Oko stanica se nalazi varijabilna količina hijalinizirane strome sa psamomskim tjelešcima (26, 34). Za invazivnu komponentu LGSC-a tipične su mikropapilarne formacije i male kružne nakupine stanica koje su često okružene praznim prostorima ili pukotinama i nasumično invadiraju u stromu. Mikropapilarne formacije uglavnom nemaju fibrovaskularnu stromu, a ako je prisutna, onda je vrlo oskudna. Nekroza i velike multinuklearne stanice nisu karakteristične za LGSC (40).

Pretpostavlja se da LGSC nastaje dugotrajnom pretvorbom iz seroznog cistadenoma ili adenofibroma kao ishodišne lezije. Benigna ishodišna lezija prvo prelazi u tipični serozni tumor niskog malignog potencijala (engl. *serous borderline tumor*, SBT), zatim u neinvazivni mikropapilarni karcinom niskog malignog potencijala (engl. *micropapillary serous borderline carcinoma*, MPSC) te na kraju u invazivni mikropapilarni serozni karcinom, LGSC (Slika 1) (40, 43). Postepena progresija iz ishodišne lezije do malignog tumora karakteristična je za tumore tipa I kao što je LGSC (43). Uz LGSC, u tumore tipa I spadaju i mucinozni karcinomi, endometrioidni karcinomi niskog stupnja malignosti, svijetlostanični i tranzicionalni karcinomi. Ovi tumori obično se dijagnosticiraju u ranijoj fazi bolesti, najčešće su indolentnog ponašanja i imaju bolju prognozu od tumora tipa II (43).

Osim što se može razviti postepeno, LGSC može nastati i *de novo* bez prethodne lezije (39). Još se ne zna točno podrijetlo nastanka LGSC-a. Smatra se da se benigna ishodišna lezija razvija iz serozne inkluzijske ciste koja može nastati iz stanica pokrovnog epitela jajnika ili iz epitelnih stanica fimbrija jajovoda koje se tijekom ovulacije odvoje od epitela



Slika 1. Shematski prikaz razvoja seroznog karcinoma jajnika niskog (LGSC) i visokog stupnja malignosti (HGSC). LGSC se postepeno razvija iz seroznog cistadenoma, preko seroznog tumora niskog malignog potencijala (SBT) sve do malignog tumora. Za njega su karakteristične mutacije gena *KRAS*, *BRAF* i *HER2*, te delecije kromosomskih regija 1p36 i 9p21. HGSC može nastati direktno iz inkluzijske ciste ili seroznog intraepitelnog karcinoma jajovoda (STIC). Rijetko može nastati i iz LGSC-a ili SBT-a. Za HGSC su karakteristične mutacije gena *TP53* i nestabilnost genoma. Preuređeno i preuzeto iz (43).

jajovoda i migriraju u jajnike. Postoji teorija da inkluzijska cista može nastati i iz epitelnih stanica endometrija maternice koje se odvoje od endometrija i retrogradno putuju prema jajniku gdje se implantiraju (44-45). Inkluzijske ciste i epitelne stanice fimbrija jajovoda dijele slična morfološka i imunofenotipska svojstva (46). Hijerarhijskom klaster analizom (engl. *hierarchical cluster analysis*) ekspresije gena utvrđeno je da su epitel jajovoda, inkluzijske ciste, SBT i LGSC blisko povezani u jedan klaster u kojem se ne nalazi pokrovni epitel jajnika što upućuje na to da LGSC najvjerojatnije nastaje iz epitelnih stanica fimbrija jajovoda (47-48).

Najčešće genetske promjene kod LGSC-a su mutacije gena *KRAS* (engl. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog*), *BRAF* (engl. *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1*) i *HER2* (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), te delecije kromosomskih regija 1p36 i 9p21 (33, 49). Mutacije gena *KRAS*, *BRAF* i *HER2* međusobno su isključive (u tumoru se pojavljuje samo jedna od mutacija). Oko dvije trećine SBT-ova i LGSC-ova ima jednu od ovih mutacija. Mutacije gena *KRAS* i *BRAF* puno su češće od mutacija gena *HER2*. Tumori s *BRAF* mutacijom pokazuju bolju prognozu od tumora s *KRAS* mutacijom (26). Ako su u jajniku prisutni i SBT i benigni cistadenom, kod benignih cistadenoma mogu se detektirati mutacije gena *KRAS* i *BRAF*. Navedene mutacije su odsutne ako se radi o čistom cistadenomu što ukazuje na njihovu važnost u ranoj fazi razvoja LGSC-a (26, 50). *KRAS*, *BRAF* i *HER2* regulatori su proteinske kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK). Ako dođe do mutacije u jednom od ovih gena, signalni put MAPK se konstitutivno aktivira te dolazi do nekontrolirane proliferacije tumorskih stanica (51). Kod LGSC-a detektirane su i mutacije gena *NRAS*, *NF1*, *PIK3CA*, *FFAR1*, *USP9X* i *EIF1AX* koje također mogu pridonijeti progresiji tumora (39).

Delecije kromosomskih regija 1p36 i 9p21 česte su genetske promjene kod LGSC-a. U regiji 1p36 nalazi se nekoliko tumor supresorskih gena među kojima je *miR34a* (engl. *MicroRNA 34a*), dok se u regiji 9p21 nalazi lokus *CDKN2A/B* (engl. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/B*) koji kodira tri tumor supresorska proteina, p14, p16 i p15. Delecije regija 1p36 i 9p21 puno su češće kod LGSC-a nego kod SBT-a. Prema tome, navedene delecije mogle bi potaknuti progresiju SBT-a u LGSC (49, 52). Nestabilnost genoma postepeno se i progresivno povećava počevši od SBT-a, preko MPSC-a do LGSC-a, no svakako je puno manja nego kod HGSC-a (40). Budući da LGSC imaju funkcionalni protein

p53, homogeniji su i imaju stabilniji genom s manje mutacija i kromosomskih rearanžmana. Međutim, LGSC imaju i kompetentniji sustav za popravak DNA zbog čega nemaju dobar odgovor na kemoterapiju (33, 53).

1.2.2. Serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti

Serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti najčešći su i najsmrtonosniji karcinomi jajnika koji čine oko 70% svih epitelnih tumora jajnika te uzrokuju oko 70-80% svih smrti povezanih s rakom jajnika (26, 54). Uglavnom se dijagnosticiraju u uznapredovalom stadiju bolesti (oko 80% tumora), a u dvije trećine slučajeva zahvaćaju oba jajnika (26). Za razliku od žena s dijagnozom LGSC-a, žene s dijagnozom HGSC-a obolijevaju u starijoj životnoj dobi (srednja dob je 55-65 godina) i imaju lošije petogodišnje (32,1%) i desetogodišnje preživljenje (15%) (40-41). Iako HGSC na početku ima dobar odgovor na standardnu kemoterapiju, većina tumora recidivira i postane rezistentna na kemoterapiju (33).

Histološki gledano, HGSC najčešće imaju papilarni ili solidni rast sa žljezdanim lumenima nalik pukotinama (engl. *slit-like*). Puno su heterogeniji nego što se prije mislilo pa postoje različiti histološki fenotipovi s kombinacijom papilarnog, žljezdanog, difuznog i solidnog rasta (26, 40). Tumorske stanice HGSC-a također su heterogene s izraženim varijacijama u obliku i veličini. Imaju velike pleomorfne jezgre i izraženu nuklearnu atipiju te visok broj mitoza. Za HGSC su karakteristične velike multinuklearne stanice i nekroza (40, 54). U malom broju slučajeva, jako je teško odrediti razliku između LGSC-a i HGSC-a prema histološkim karakteristikama pa je potrebna dodatna analiza. U tom slučaju prati se ekspresija proteina p53, p16 i Ki-67 u tumorskom tkivu. LGSC je uglavnom negativan ili fokalno pozitivan na p53 i p16, i ima niski proliferacijski indeks Ki-67, dok je HGSC uglavnom pozitivan na p53 i p16 te ima visok proliferacijski indeks Ki-67 (40).

Budući da se HGSC većinom dijagnosticira u uznapredovalom stadiju bolesti i da u većini slučajeva nisu detektirane ishodišne lezije tumora u jajnicima, smatra se da se jako brzo razvija zbog čega je malo toga poznato o ranim fazama razvoja ovog tumora (34). Pretpostavlja se da HGSC ne nastaje postepeno, nego direktno iz inkluzijske ciste ili seroznog intraepitelnog karcinoma jajovoda (engl. *serous tubal intraepithelial carcinoma*, STIC) ili *de*

novo, što je karakteristično za tumore tipa II kao što je HGSC (Slika 1) (40, 43, 55-56). Uz HGSC, u tumore tipa II spadaju i endometrioidni karcinomi visokog stupnja malignosti, karcinosarkomi i nediferencirani karcinomi. Tumori tipa II su agresivni, brzo se razvijaju i uglavnom imaju lošu prognozu (43).

HGSC se može razviti i iz LGSC-a ili SBT-a, ali jako rijetko (Slika 1) (57). Samo podrijetlo nastanka HGSC-a još uvijek nije poznato. Smatra se da može nastati iz epitela jajnika, jajovoda ili peritoneuma (13). Prilikom ovulacije, pokrovni epitel jajnika može invaginirati u stromu jajnika, pri čemu nastaje inkluzijska cista. Pretpostavlja se da tijekom tog procesa dolazi do metaplazije, pri čemu epitelne stanice jajnika diferenciraju u cilindrične stanice slične epitelnim stanicama jajovoda. Ove inkluzijske ciste ponekad mogu akumulirati mutacije karakteristične za HGSC pa dolazi do maligne transformacije stanica i razvoja tumora, ali to se rijetko događa (55). Inkluzijske ciste mogu nastati i endosalpingiozom, kada se epitelne stanice fimbrija jajovoda prilikom ovulacije odvoje od epitela jajovoda i migriraju u jajnike. Ovakve ciste također mogu biti ishodišne lezije HGSC-a (34).

HGSC se može razviti i iz STIC-a, neinvazivne intraepitelne lezije jajovoda koja se najčešće nalazi u fimbrijama te ima slična citološka svojstva i genetske promjene kao i HGSC (56, 58). Pretpostavlja se da se STIC u jajovodu razvija u invazivni HGSC, nakon čega se iz jajovoda širi na jajnike. Također postoji i pretpostavka da stanice STIC-a migriraju iz jajovoda na površinu jajnika gdje se implantiraju, te kasnije transformiraju u maligne stanice HGSC-a (Slika 1) (13). STIC-ovi su detektirani kod 21-59% žena sa sporadičnim HGSC-om i kod 3-31% žena s nasljednim HGSC-om. Budući da STIC nastaje iz epitelnih stanica jajovoda, te stanice mogu se smatrati ishodišnim stanicama HGSC-a (13).

Imunofenotipska svojstva i profil ekspresije gena sličniji su između epitela jajovoda i HGSC-a, nego između epitela jajnika i HGSC-a, što potvrđuje teoriju o podrijetlu nastanka HGSC-a iz epitelnih stanica jajovoda (59). Međutim, iako je STIC prisutan kod velikog broja žena oboljelih od HGSC-a, postavlja se pitanje što je s karcinomima koji nemaju navedenu leziju. Teorija prema kojoj se HGSC razvijaju iz epitela jajnika također se treba uzeti u obzir. Komparativnom analizom transkriptoma i proteoma pokazano je da jedan dio karcinoma može nastati i iz pokrovnog epitela jajnika što ukazuje na dvojno podrijetlo nastanka HGSC-a (60-61). Karcinomi podrijetlom iz epitela jajnika i karcinomi podrijetlom iz epitela jajovoda imaju različite transkriptome, ali i različita klinička svojstva. Uočeno je da su karcinomi

podrijetlom iz epitela jajnika agresivniji, da imaju lošiju prognozu i slabiji odgovor na standardnu kemoterapiju (61-62).

Za HGSC karakteristične su mutacije gena *TP53* (engl. *Tumor Protein p53*) i izražena nestabilnost genoma (54, 63). *TP53* je tumor supresorski gen koji ima ključnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa i stanične smrti (64). Somatske mutacije gena *TP53* prisutne su u gotovo svim HGSC-ovima (96%) (63). Budući da su mutacije ovog gena detektirane i u ishodišnim lezijama HGSC-a, inkluzijskim cistama i STIC-u, kao i u pridruženom pokrovnom epitelu jajnika ili jajovoda, smatra se da igraju važnu ulogu u ranoj fazi razvoja HGSC-a (40, 65-66). Za razliku od LGSC-a, mutacije gena *KRAS*, *BRAF* i *HER2* su vrlo rijetko prisutne kod HGSC-a. Pojavljuju se jedino kada se HGSC razvija iz LGSC-a, pri čemu kod LGSC-a dolazi do mutacije gena *TP53* koja inače nije karakteristična za ovaj tumor (57). Osim mutacije gena *TP53*, kod HGSC-a su detektirane i mutacije gena *BRCA1*, *BRCA2*, *CSMD3*, *NF1*, *CDK12*, *GABRA6* i *RB1*. Mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2* (somatske i nasljedne) prisutne su kod 20% HGSC-ova. Ovi geni uključeni su u put popravka DNA homolognom rekombinacijom i povezuju se s nasljednim HGSC-om. Mutacije gena uključenih u navedeni put popravka DNA detektirane su kod polovice HGSC-ova pa, osim *BRCA1* i *BRCA2* mutacija koje su najčešće, u ovim tumorima mogu biti prisutne i mutacije gena *PTEN*, *RAD51C*, *ATM* i *ATR* (63). Zbog neispravnog sustava za popravak DNA, dolazi do izražene nestabilnosti genoma, pri čemu se često javljaju delecije i amplifikacije mnogih gena među kojima su najčešće amplifikacije gena *CCNE1*, *MYC* i *MECOM* (54, 63). Budući da HGSC imaju narušen sustav za popravak DNA, na početku dobro odgovaraju na standardnu kemoterapiju. Međutim, zbog nestabilnosti genoma može doći do reverznih mutacija gena kao što su *BRCA1* i *BRCA2*, pri čemu ti geni opet dobiju svoju funkciju pa se većina tumora ponovo pojavi i postane rezistentna na kemoterapiju (33).

Osim što HGSC imaju različite histološke fenotipove, imaju i različitu ekspresiju gena, pa se prema profilu ekspresije gena mogu podijeliti na sljedeće podtipove: diferencirani, imunoreaktivni, mezenhimski i proliferativni. Navedeni podtipovi imaju različiti klinički ishod, ali još se treba istražiti njihova važnost u klinici (3, 63, 67). S obzirom na izraženu kompleksnost genoma, jako je teško razviti učinkovitu terapiju za ove tumore (3).

1.3. Signalni put Hedgehog

Signalni put Hedgehog (Hh) evolucijski je konzerviran signalni put koji je prvi put opisan na vinskoj mušici (lat. *Drosophila melanogaster*). Ako kod vinske mušice dođe do mutacije u genu *Hh* (engl. *Hedgehog*), razvije se ličinka koja je prekrivena šiljastim izraslinama zbog čega je ovaj gen, kao i signalni put u koji je uključen, dobio ime '*hedgehog*' (jež) (68). Signalni put Hh regulira proliferaciju i diferencijaciju stanica, sudjeluje u održavanju polarnosti tkiva tijekom rane embriogeneze te igra važnu ulogu u razvoju neuralne cijevi, kože, pluća, aksijalnog kostura, gastrointestinalnog trakta, gušterače i mnogih drugih organa (69-70). Ovaj signalni put također regulira i homeostazu tkiva kao i ponašanje matičnih stanica, te sudjeluje u vaskulogenezi i angiogenezi (70). Zbog svega navedenog, jako je bitan za razvoj normalnog embrija (68-70). Međutim, signalni put Hh neaktivan je kod većine tkiva u odraslom organizmu. Aktivira se kod održavanja homeostaze organa, kao što su koža, mozak, mokraćni mjehur i prostata, ili nakon određene ozljede, pri čemu sudjeluje u popravku i regeneraciji tkiva (71).

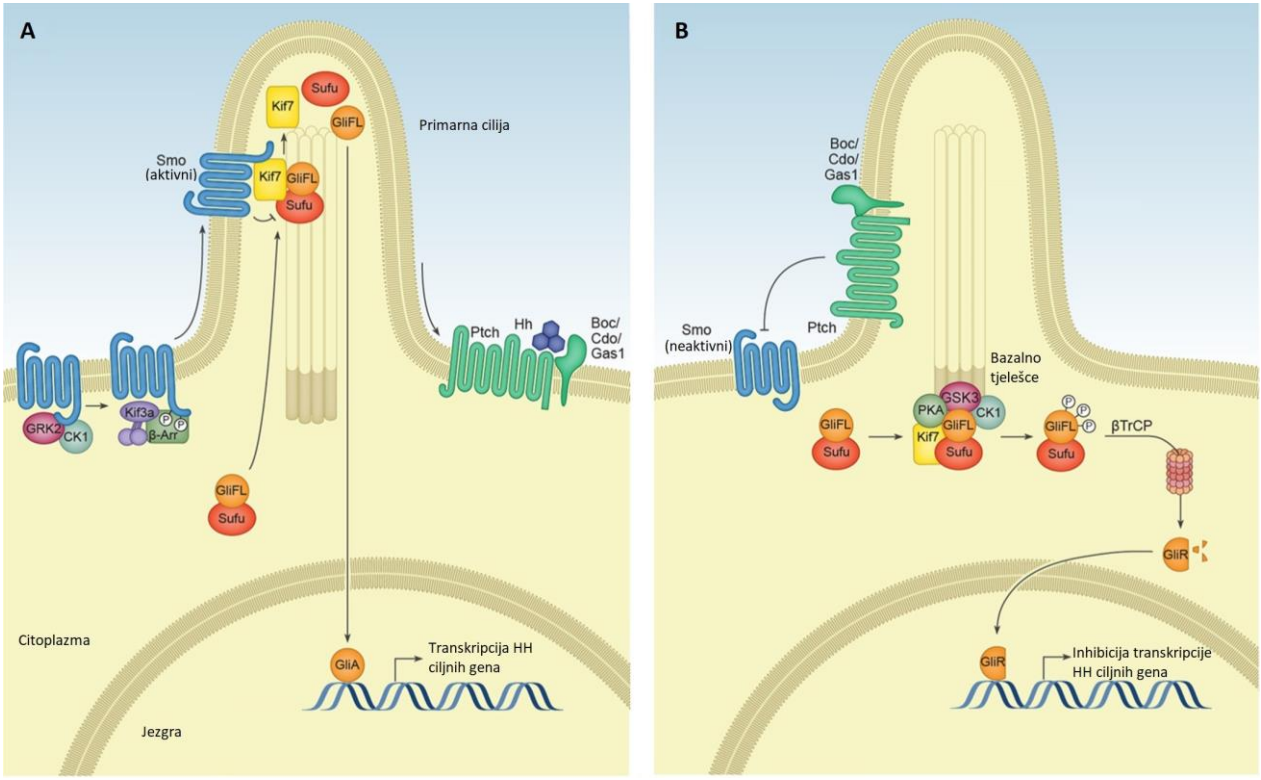
Signalni put Hh u potpunosti je ovisan o visoko specijaliziranim organelima, primarnim cilijama. Primarne cilije su mali citoplazmatski izdanci koji se nalaze na apikalnoj površini gotovo svih tipova stanica (najčešće epitelnih) (72-73). One su nužne za aktivaciju i utišavanje signalnog puta Hh. Pretpostavlja se da funkcioniraju poput antena koje olakšavaju primanje signala iz izvanstaničnog prostora. Ako se naruši njihova struktura, dolazi do poremećene aktivnosti ovog signalnog puta (72, 74).

Signalni put Hh može se podijeliti na kanonski i ne-kanonski signalni put. Kanonski signalni put aktivira se vezanjem jednog od tri Hh-liganda, SHh (engl. *Sonic Hedgehog*), IHh (engl. *Indian Hedgehog*) ili DHh (engl. *Desert Hedgehog*), na transmembranski receptor PTCH1 (engl. *Patched 1*) ili PTCH2 (engl. *Patched 2*) (75-76). Receptori PTCH formiraju kompleks s ko-receptorima CDO (engl. *Cell Adhesion Molecule-Related, Down-Regulated by Oncogenes*), BOC (engl. *Brother of CDO*) i GAS1 (engl. *Growth Arrest-Specific 1*) koji su jako bitni kod aktivacije signalnog puta (76-77). Nakon što se Hh-ligand veže na PTCH receptor, PTCH izlazi iz primarne cilije te dolazi do endocitoze liganda i receptora koji se u konačnici razgrade, pri čemu se oslobađa transmembranski receptor SMO (engl. *Smoothened*). Kinaze CK1 (engl. *Casein Kinase 1*) i GRK2 (engl. *G Protein-Coupled*

Receptor Kinase 2) fosforiliraju SMO koji prelazi u aktivnu konformaciju nakon čega se translocira u primarnu ciliju. Na aktivirani SMO vežu se β-ARR (engl. *β-Arrestin*) i KIF3A (engl. *Kinesin Family Member 3A*) koji olakšavaju transport SMO-a u ciliju (75, 78). KIF7 (engl. *Kinesin Family Member 7*) i kompleks SUFU-a (engl. *Suppressor of Fused*) i GLI-a (engl. *Glioma-Associated Oncogene Homolog*) također se akumuliraju u primarnoj ciliji. Aktivirani SMO potiče disocijaciju kompleksa SUFU-GLI kao i pretvorbu GLI-FL (engl. *full-length GLI*) u aktivacijski oblik, GLI-A (engl. *activator form of GLI*). Pretpostavlja se da KIF7 također potiče disocijaciju kompleksa SUFU-GLI. Nakon što se aktivira, transkripcijski faktor GLI-A putuje u jezgru gdje potiče transkripciju ciljnih gena (Slika 2A) (75, 78). Ciljni geni signalnog puta Hh sudjeluju u mehanizmima povratne sprege (npr. *HHIP*, *PTCH1*, *GLI1*), proliferaciji (npr. *PDGFR*, *MYC*), regulaciji staničnog ciklusa (npr. *CCND1/2*), angiogenezi (npr. *VEGF*, *ANG1/2*), apoptozi (npr. *BCL2*), epitelno-mezenhimskoj tranziciji (engl. *epithelial–mesenchymal transition*, EMT; npr. *MMP9*, *SNAIL*) i samoobnovi (engl. *self-renewal*) matičnih stanica (npr. *NANOG*, *SOX2*) (79).

U odsustvu Hh-liganda, PTCH prelazi u primarnu ciliju i inhibira SMO koji izlazi iz primarne cilije, nakon čega dolazi do endocitoze i nakupljanja receptora SMO u endosomima (75, 80). Transkripcijski faktor GLI-FL tvori kompleks s proteinom SUFU koji ga stabilizira i zadržava u citoplazmi. SUFU i KIF7 potiču fosforilaciju C-kraja GLI-FL-a. PKA (engl. *Protein Kinase A*), GSK3β (engl. *Glycogen Synthase Kinase-3β*) i CK1 fosforiliraju GLI-FL (što se može odvijati na bazalnom tjelešcu primarne cilije), nakon čega E3 ubikvitin ligaza βTrCP (engl. *β-Transducin Repeat-Containing Protein*) ubikvitinira fosforilirani GLI-FL te dolazi do proteasomske degradacije C-kraja GLI-FL-a, pri čemu nastaje represorski oblik, GLI-R (engl. *repressor form of GLI*), koji zaustavlja transkripciju ciljnih gena signalnog puta Hh (Slika 2B) (75, 78). Signalni put Hh može inhibirati i membranski glikoprotein HHIP (engl. *Hedgehog-Interacting Protein*) koji veže Hh-ligande istim afinitetom kao i PTCH1 te na taj način suprimira Hh-signalizaciju (81).

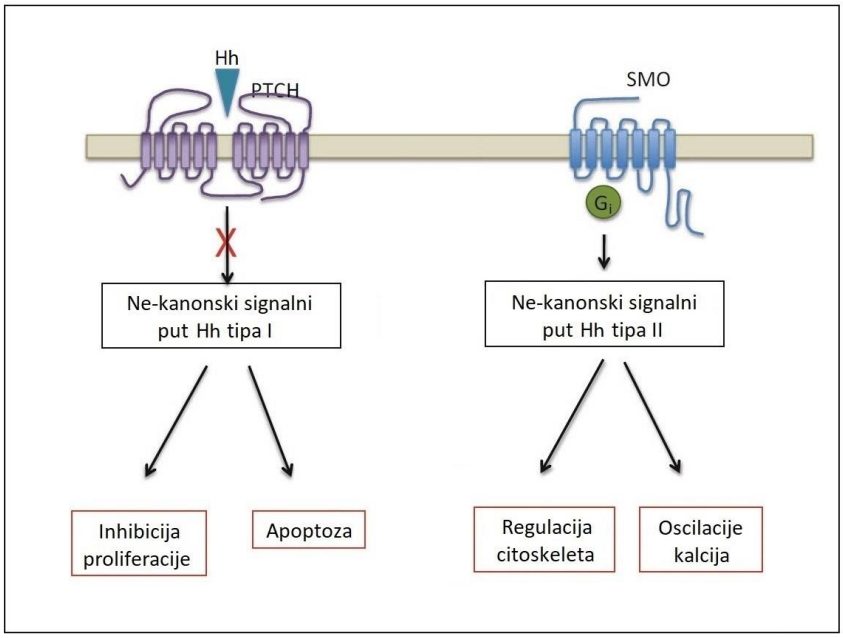
Ne-kanonski signalni put Hh je bilo koji signalni put povezan s komponentama Hh-signalizacije koji se razlikuje od uobičajenog kanonskog signalnog puta (70). Postoje najmanje dva ne-kanonska signalna puta Hh: tip I kod kojeg je Hh-signalizacija posredovana receptorom PTCH neovisno o receptoru SMO i tip II kod kojeg je Hh-signalizacija posredovana receptorom SMO neovisno o transkripcijskim faktorima GLI (Slika 3) (77, 82).



Slika 2. Shematski prikaz kanonskog signalnog puta Hedgehog (Hh). A) Kanonski signalni put Hh aktivira se vezanjem Hh-liganda na receptor PTCH. PTCH formira kompleks s ko-receptorima CDO, BOC i GAS1, pri čemu se oslobađa receptor SMO. CK1 i GRK2 fosforiliraju SMO, nakon čega se SMO aktivira. Na aktivirani SMO vežu se β-ARR i KIF3A te olakšavaju transport SMO-a u primarnu ciliju. KIF7 i kompleks SUFU-GLI također se akumuliraju u primarnoj ciliji. SMO potiče disocijaciju kompleksa SMO-GLI i pretvorbu GLI-FL u aktivacijski oblik GLI-A koji putuje u jezgru i potiče transkripciju Hh ciljnih gena. B) U odsustvu Hh-liganda, PTCH inhibira receptor SMO. SUFU tvori kompleks s GLI-FL te ga stabilizira i zadržava u citoplazmi. SUFU i KIF7 potiču fosforilaciju GLI-FL-a kojeg fosforiliraju kinaze PKA, GSK3β i CK1, nakon čega βTrCP ubikvitinira fosforilirani GLI-FL te dolazi do pretvorbe GLI-FL-a u represorski oblik GLI-R koji inhibira transkripciju Hh ciljnih gena. Preuređeno i preuzeto iz (75).

U ne-kanonskom signalnom putu Hh tipa I, receptor PTCH u odsustvu Hh-liganda potiče apoptozu te regulira stanični ciklus u kontrolnoj točki G2/M tako da na sebe veže fosforilirani oblik ciklina B1 i na taj način sprječava njegovu translokaciju u jezgru, pa samim time i nastavak staničnog ciklusa. Kada su prisutni, Hh-ligandi blokiraju pro-apoptotsku aktivnost

receptora PTCH te potiču preživljenje i proliferaciju stanica (Slika 3). U tom slučaju, povećava se afinitet PTCH-a za kinazu GRK2, pri čemu se ciklin B1 otpušta i putuje u jezgru (77, 82-83). Kod ne-kanonskog signalnog puta Hh tipa II, receptor SMO združuje se s G_i (engl. *G inhibitory protein*) proteinima koji aktiviraju Rho (engl. *Ras homologous*) GTPaze što vodi do promjena u aktinskom citoskeletu i indukcije unosa kalcija preko kalcijevih kanala tipa L (engl. *L-type calcium channels*), modulirajući na taj način metabolički odgovor (Slika 3) (82).

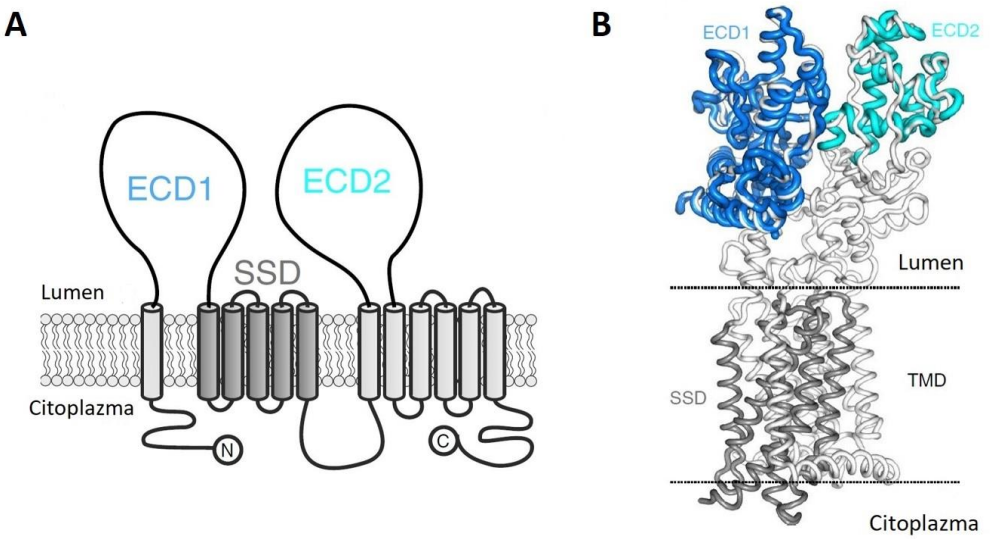


Slika 3. Klasifikacija ne-kanonskog signalnog puta Hh. Ne-kanonski signalni put tipa I posredovan je receptorom PTCH neovisno o receptoru SMO i regulira proliferaciju i apoptozu stanica. Ne-kanonski signalni put tipa II posredovan je receptorom SMO neovisno o transkripcijskim faktorima GLI te regulira citoskelet i unos kalcija. Preuređeno i preuzeto iz (82).

Mnogi signalni putevi, kao što su Notch, Wnt, TGF-β, PI3K, MAPK i NF-κB, također mogu aktivirati signalni put Hh (79, 84). Na primjer, signalni putevi PI3K, MAPK i TGF-β mogu aktivirati transkripcijske faktore GLI te na taj način inducirati Hh-signalizaciju (79, 85).

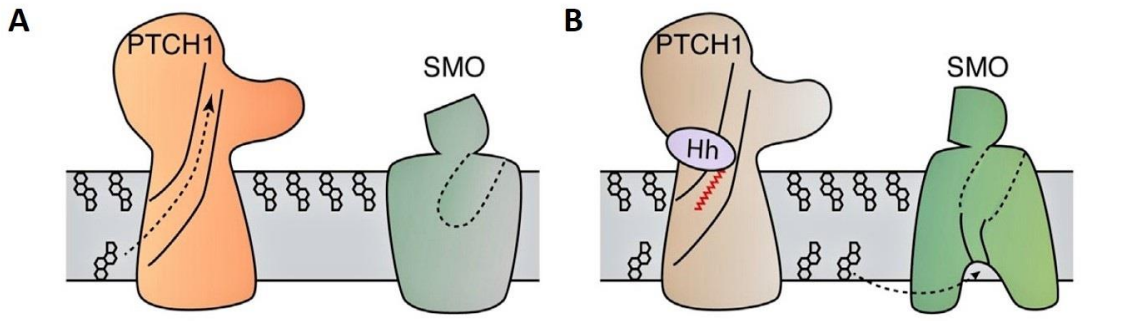
1.3.1. Patched 1

Patched 1 je glavni receptor signalnog puta Hh na kojeg se vežu Hh-ligandi. Humani gen *PTCH1* nalazi se na kromosomu 9q22.3, ima 23 egzona s otprilike 74 kb te kodira transmembranski glikoprotein od 1447 aminokiselina (~161 kDa) (86). Protein PTCH1 ima najmanje četiri izoforme, PTCH1-1, PTCH1-1A, PTCH1-1B i PTCH1-1C, koje nastaju alternativnim izrezivanjem prvih egzona. Izoforma PTCH1-1B smatra se divljim tipom. Sve navedene izoforme su funkcionalni receptori za Hh-ligande, međutim, promotori izoforma PTCH-1B i PTCH1-1C sadrže vezna mjesta za transkripcijske faktore GLI pa prilikom aktivacije signalnog puta Hh dolazi do njihove pojačane ekspresije zbog čega ove izoforme sudjeluju u negativnoj povratnoj sprezi (87-88). Receptor PTCH1 ima 12 transmembranskih uzvojnica, koje čine transmembransku domenu (engl. *transmembrane domain*, TMD), i dvije velike izvanstanične domene ECD1 (engl. *extracellular domain 1*) i ECD2 (engl. *extracellular domain 2*). U transmembranskoj domeni nalazi se domena SSD (engl. *sterol-sensing domain*). Domena SSD sastoji se od pet transmembranskih uzvojnica (Slika 4) (89). Pretpostavlja da sudjeluje u transportu kolesterola (90-91).



Slika 4. A) Shematski prikaz građe proteina PTCH1 i B) njegova kristalna struktura. Preuređeno i preuzeto iz (89).

Malo toga se zna o biokemijskim funkcijama proteina PTCH1 kao i o tome kako regulira aktivnost receptora SMO. Budući da PTCH1 dijeli homologne sekvence s prokariotskom proteinskom obitelji RND (engl. *Resistance-Nodulation-Division*), smatra se da bi mogao djelovati kao transportni protein koji kontrolira prijenos određenih lipida blokirajući na taj način aktivnost SMO-a, dok vezanje Hh-liganada inhibira transportnu aktivnost receptora PTCH1, pri čemu dolazi do aktivacije SMO-a (92). Protein PTCH1 dijeli homologne sekvence i s eukariotskim proteinom NPC1 (engl. *Niemann-Pick C1*) koji kontrolira transport kolesterola unutar stanice (93). NPC1, kao i PTCH1, ima domenu SSD. Ova domena može se naći kod proteina koji sudjeluju u transportu i regulaciji homeostaze kolesterola (94). Budući da je kolesterol potreban za aktivnost SMO-a, smatra se da PTCH1 regulira transport kolesterola (95). Pretpostavlja se da PTCH1 uklanja kolesterol s unutarnje strane membrane blokirajući na taj način aktivnost SMO-a. Ako su Hh-ligandi prisutni, amino-terminalna hidrofobna ekstenzija liganda zatvori hidrofobni kanal proteina PTCH1 i blokira njegovu transportnu aktivnost, pri čemu se kolesterol nakuplja s unutarnje strane membrane te dolazi do aktivacije SMO-a (Slika 5) (91, 96). Također se pretpostavlja da je za aktivnost proteina PTCH1 potreban gradijent kalijevih iona koji putuju iz stanice u izvanstanični prostor, pri čemu PTCH1 djeluje kao antiport – katalizira transport kolesterola vezanog za izvanstaničnu N-terminalnu CRD (engl. *cysteine-rich domain*) domenu SMO-a u plazma membranu (97).



Slika 5. Predloženi model regulacije PTCH1-SMO. A) Receptor PTCH1 uklanja kolesterol s unutarnje strane membrane te na taj način blokira aktivnost receptora SMO. B) Kada su prisutni, Hh-ligandi zatvaraju hidrofobni kanal proteina PTCH1 i blokiraju njegovu aktivnost zbog čega dolazi do nakupljanja kolesterola s unutarnje strane membrane te posljedično do aktivacije SMO-a. Preuzeto iz (91).

Uz domenu SSD za koju se smatra da sudjeluje u transportu kolesterola (90-91), za normalnu funkciju proteina PTCH1 jako su bitne i citoplazmatske i izvanstanične domene koje reguliraju njegovu aktivnost. Izvanstanične domene, ECD1 i ECD2, sudjeluju u prihvaćanju i prepoznavanju Hh-liganda, dok citoplazmatske domene, N-terminalna domena (engl. *N-terminal domain*, NTD), srednja petlja (engl. *middle loop*, ML) i C-terminalna domena (engl. *C-terminal domain*, CTD), igraju sastavnu ulogu u represiji signalnog puta Hh te su važne za intramolekularnu regulaciju aktivnosti proteina PTCH1 (89, 98). Citoplazmatske domene olakšavaju i nekovalentna vezanja brojnih proteina koji su uključeni u različite signalne putove (98). Domene CTD i ML posreduju u oligomerizaciji proteina PTCH1 (99). PTCH1 može stvarati dimere, trimere i tetramere (100-102). PTCH1 dimerizira u prisustvu Hh-liganda, pri čemu se formira 1:2 asimetrični kompleks, jedna molekula liganda veže se na dvije molekule proteina PTCH1 blokirajući na taj način njegovu transportnu aktivnost (100). Ovaj asimetrični kompleks može dimerizirati formirajući PTCH1 tetramer u kompleksu s Hh-ligandima i to u stehiometrijskom omjeru 4:2. Pretpostavlja se da bi navedeni tetramerni kompleks mogao poboljšati učinkovitost internalizacije ili biti preduvjet za internalizaciju receptora PTCH1, ali to još treba potvrditi (102).

PTCH1, kao što je već spomenuto, potiče apoptozu i regulira stanični ciklus vežući na sebe ciklin B1. Osim što se udružuje s ciklinom B1, također se udružuje i s pro-apoptotskim kompleksom kojeg čine kaspaza-9, TUCAN i adapterski protein DRAL (103-104). Regrutiranje navedenog pro-apoptotskog kompleksa, u određenim tipovima stanica, ovisi o prethodnom cijepanju domene CTD pomoću kaspaze-3, pri čemu se aktivira kaspaza-9. Aktivirana kaspaza-9 ubrzava proces formiranja pro-apoptotskog kompleksa te aktivira kaspazu-3 što u konačnici rezultira apoptozom. Ove interakcije narušavaju se vezanjem Hh-liganda na receptor PTCH1 zbog čega dolazi do povećane proliferacije stanica (104).

Osim PTCH1, postoji još jedan PTCH homolog, PTCH2. Ovi homolozi imaju 54% sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci te sličnim afinitetom vežu sva tri Hh-liganda (105). Još se ne zna koja je točno uloga receptora PTCH2 i koliki je njegov utjecaj na Hh-signalizaciju. Budući da su rezultati dosadašnjih istraživanja oprečni, ne zna se je li PTCH2 inhibira SMO jednako kao i PTCH1, slabije od homologa PTCH1, ili ga uopće ne inhibira (98, 106-107). Pretpostavlja se da bi PTCH2 mogao djelovati kao antagonist Hh-signalizacije ovisan o ligandu, pri čemu bi, umjesto da djeluje kao izravni represor aktivnosti receptora SMO,

ograničavao raspon aktivnosti Hh-liganada (98). PTCH2 prvenstveno je eksprimiran u stanicama kože i spermatocitama, dok je PTCH1 eksprimiran u cijelom embriju kao primarni medijator za većinu aktivnosti SHh-liganda (105).

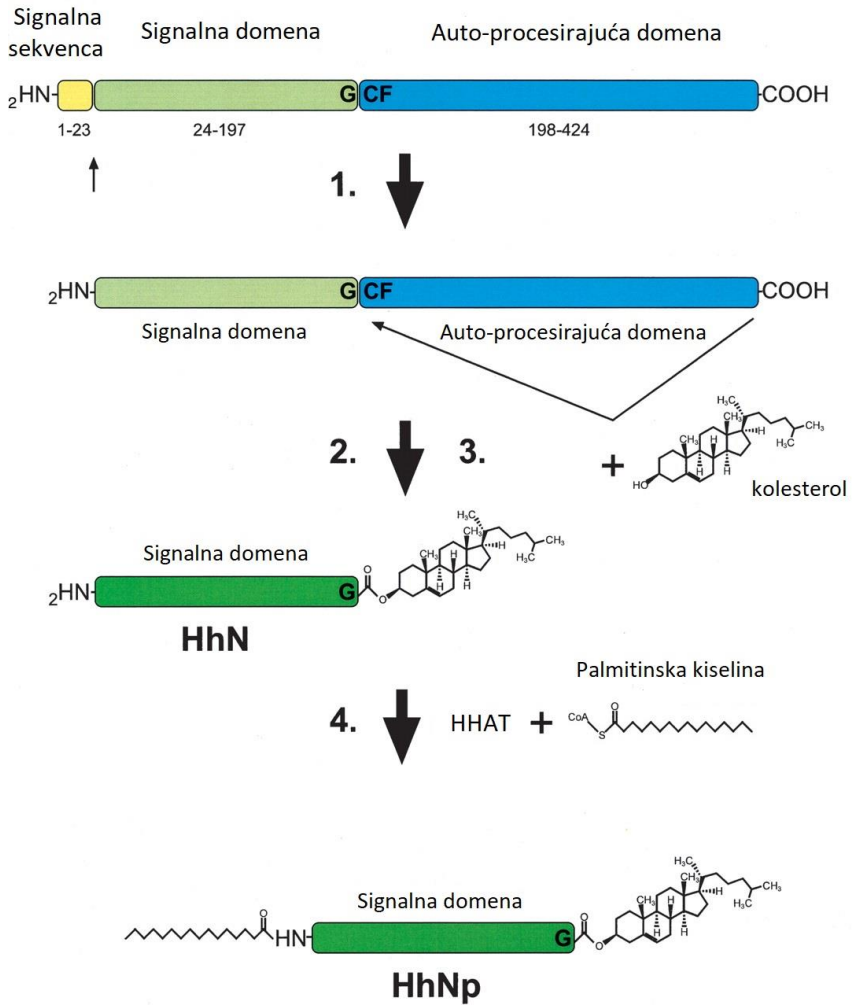
1.3.2. Sonic Hedgehog

Hh-ligandi su signalni proteini koji, nakon što se otpuste iz stanica, mogu difundirati u ciljna tkiva i uspostaviti gradijent, pri čemu kontroliraju obrasce razvoja mnogih tkiva tijekom embrionalnog razvoja (108). Ovi proteini mogu djelovati kao mitogeni, indukcijski faktori i morfogeni koji kontroliraju razvojne procese tijekom različitih faza razvoja (108). Smatra se da su Hh-ligandi slični u svojim fiziološkim učincima, međutim, zbog različitih obrazaca ekspresije, ostvaruju različite uloge u razvoju embrija (109).

SHh je najbolje proučen od svih Hh-liganada. Ovaj protein modulira sudbinu stanice putem autokrine ili parakrine signalizacije (110). Tijekom embriogeneze, eksprimiran je u notokordu i donjoj ploči (engl. *floor plate*) neuralne cijevi te kontrolira uspostavljanje lijeve i desne strane kao i dorzo-ventralne osi embrija (109). Također sudjeluje i u razvoju udova i mnogih tkiva i organa kao što su mozak, pluća, zubi, dlačni folikuli, crijeva, gušterača, oko i unutarnje uho (109).

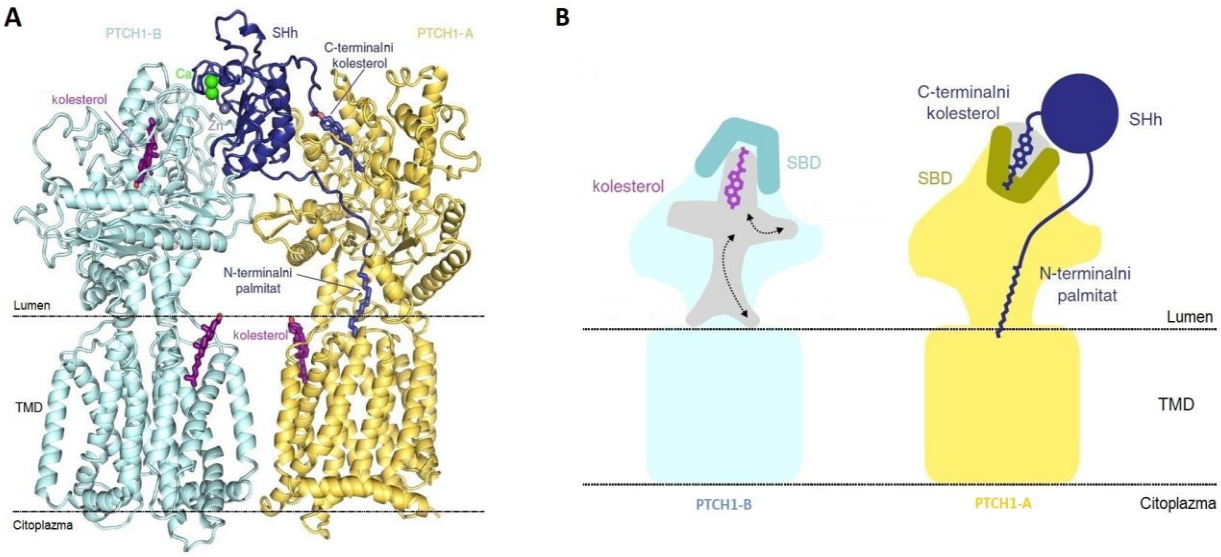
Humani gen *SHh* nalazi se na dugom kraku sedmog kromosoma na poziciji 36.3 (7q36.3). Ima samo tri egzona te kodira protein od 462 aminokiseline (~45 kDa) (111-112). Protein od 45 kDa je prekursorska molekula koja mora proći kroz procese sazrijevanja da bi nastao potpuno funkcionalni SHh-ligand koji će se otpustiti iz stanice i aktivirati signalni put Hh (113). Procesi sazrijevanja isti su za sve Hh-ligande. Nakon translacije prekursorskog proteina, s N-kraja uklanja se signalna sekvenca pomoću enzima signalne peptidaze (114). C-terminalna domena potom potiče autokatalitičko cijepanje prekursorskog proteina između konzerviranog glicina i cisteina, pri čemu nastaje N-terminalni produkt (HhN) od ~19 kDa kao signalna domena i C-terminalni produkt (HhC) od ~26 kDa koji nema signalnu aktivnost (109, 114). Tijekom tog procesa, C-terminalna domena djeluje kao unutarmolekularna transferaza kolesterola koja katalizira kovalentno vezanje kolesterola s glicinom na C-kraju N-terminalnog produkta (114-115). Nakon toga, enzim HHAT (engl. *Hedgehog acyltransferase*) katalizira kovalentno vezanje palmitata s N-terminalnim cisteinom signalne

domene, pri čemu nastaje zreli dvostruko modificirani protein Hh (HhNp) (Slika 6) koji se potom otpušta iz stanice (109, 116). Osim što se zreli Hh-ligandi otpuštaju iz stanice kao monomeri uz pomoć transmembranskih proteina DISP (engl. *Dispatched*) i SCUBE (engl. *Signal Peptide-CUB-EGF Domain-Containing Protein*), mogu se otpuštati i kao oligomeri, pri čemu se udružuju s lipoproteinima formirajući lipoproteinske čestice, ili se otpuštaju pomoću egzosoma (117-119).



Slika 6. Prikaz biogeneze Hh-liganda koja se odvija u nekoliko koraka: (1) cijepanje signalne sekvence, (2) autokatalitičko cijepanje prekursorskog proteina pomoću C-terminalne domene koja katalizira kovalentno vezanje kolesterola na C-kraju N-terminalnog produkta (3), pri čemu nastaje modificirana N-terminalna signalna domena (HhN), (4) kovalentno vezanje palmitata na N-kraju signalne domene pomoću enzima HHAT aciltransferaze, pri čemu nastaje zreli dvostruko modificirani protein Hh (HhNp). Preuređeno i preuzeto iz (109).

Nakon što se otpuste iz stanice, SHh-ligandi vežu se na receptor PTCH1, pri čemu se jedna molekula liganda veže na dvije molekule proteina PTCH1 (PTCH1-A i PTCH1-B) (100). SHh-ligandi ostvaruju kontakt s receptorom PTCH1 putem triju potpuno različitih interakcija: jedne konvencionalne protein-protein interakcije s molekulom PTCH1-B gdje se SHh-ligand visokim afinitetom veže na domenu ECD1 molekule PTCH1-B posredstvom svojih konzerviranih veznih mjesta za kalcij i cink, te dvije interakcije posredovane lipidima kod kojih se C-terminalni kolesterol i N-terminalni palmitat SHh-liganda inseriraju u jezgru domene ECD molekule PTCH1-A (Slika 7A) (89, 100).



Slika 7. (A) Model asimetričnog kompleksa jedne molekule SHh-liganda i dvije molekule receptora PTCH1 (PTCH1-A i PTCH1-B). SHh-ligand veže se visokim afinitetom na domenu ECD1 molekule PTCH1-B preko svojih konzerviranih veznih mjesta za kalcij i cink, dok se C-terminalni kolesterol i N-terminalni palmitat SHh-liganda inseriraju u jezgru domene ECD molekule PTCH1-A. (B) Shematski prikaz interakcije Hh-liganda s molekulama PTCH1-B (lijevo) i PTCH1-A (desno). Kada se SHh-ligand veže na molekulu PTCH1-B, zatvara se prolaz u domeni SBD čime se djelomično sprječava transport kolesterola. Strelice označavaju kretanje kolesterola kroz domenu ECD. Transport kolesterola u potpunosti se blokira vezanjem C-terminalnog kolesterola SHh-liganda na domenu ECD1 molekule PTCH1-A i umetanjem N-terminalnog palmitata SHh-liganda u domenu ECD. Preuređeno i preuzeto iz (89).

Kada se SHh-ligand veže na molekulu PTCH1-B, zatvara se prolaz u domeni SBD (engl. *sterol binding domain*) čime se djelomično sprječava transport kolesterola. Kolesterol se i dalje može kretati kroz domenu ECD s bočne strane domene ECD ili malo iznad domene TMD pa navedena interakcija ne može u potpunosti zaustaviti njegov transport (Slika 7B) (89). C-terminalni kolesterol SHh-liganda veže se direktno na domenu ECD1 molekule PTCH1-A stabilizirajući na taj način njenu konformaciju. U tom slučaju, otvara se prolaz u domeni SBD kako bi se omogućilo vezanje liganda, pri čemu je kretanje kolesterola blokirano (Slika 7B). N-terminalni palmitat SHh-liganda umeće se u domenu ECD i dodatno sprječava transport kolesterola (Slika 7B) (89). Ove dvije interakcije posredovane lipidima mogu u potpunosti blokirati transportnu aktivnost receptora PTCH1, dok se za interakciju protein-protein smatra da može poticati endocitozu i uklanjanje receptora PTCH1 iz stanične membrane (89, 120). SHh-ligand veže se na ko-receptore CDO, BOC i GAS1, te na inhibitor HHIP vjerojatno na isti način kao i na molekulu PTCH1-B (89, 100). Smatra se da je mehanizam pomoću kojeg SHh blokira transportnu aktivnost PTCH1 isti za sve Hh-ligande (89).

1.3.3. Indian Hedgehog

Humani gen *IHh* nalazi se na dugom kraku drugog kromosoma na poziciji 35 (2q35), ima tri egzona i kodira protein od 411 aminokiselina (~45 kDa) (121-122). Zreli IHh-ligand, modificiran kolesterolom na C-kraju i palmitatom na N-kraju, nastaje biogenezom iz prekursorske molekule od 45 kDa, kao što je opisano u poglavlju 1.3.2. (Slika 6). Nakon što se otpuste iz stanice, IHh-ligandi vežu se na receptor PTCH1, inhibiraju njegovu transportnu aktivnost i aktiviraju Hh-signalizaciju na isti način kao i SHh-ligandi (Slika 7) (89).

Iako prolaze kroz isti proces sazrijevanja i blokiraju receptor PTCH1 istim mehanizmom, SHh i IHh imaju različite uloge u razvoju embrija (109). IHh sudjeluje u diferencijaciji epitelnih stanica kolona (123), igra ključnu ulogu u razvoju najranijeg hemato-vaskularnog sustava (124) i regulira proliferaciju i diferencijaciju hondrocita zbog čega je nužan za pravilni razvoj kostiju (125-127). Također regulira razvoj i homeostazu T-stanica u fetalnom i adultnom timusu te proliferaciju i preživljenje T-stanica u razvoju (128).

1.3.4. Ostale komponente signalnog puta Hedgehog

Desert Hedgehog

Dok su SHh i IHh međusobno blisko srodni, DHh je blisko srodan s Hh-ligandom vinske mušice (104). Nastaje istim procesima sazrijevanja kao i ostali Hh-ligandi te se istim mehanizmom veže na receptor PTCH1 i aktivira signalni put Hh (opisano u poglavlju 1.3.2.). DHh igra ključnu ulogu u razvoju muških i ženskih gonada (129). Eksprimiran je u Sertolijevim i Leydigovim stanicama testisa i granuloza stanicama jajnika gdje igra važnu ulogu u gametogenezi i steroidogenezi (130-131). Također je eksprimiran i u Schwannovim stanicama, pri čemu regulira razvoj ovojnica u perifernom živčanom sustavu (132). Osim svega navedenog, DHh može negativno regulirati diferencijaciju eritrocita kako u jetri tako i u koštanoj srži (133).

Smoothened

SMO je transmembranski receptor koji spada u F klasu receptora povezanih s G-proteinima (engl. *G-protein-coupled receptors*, GPCR) (134). Ako su Hh-ligandi prisutni, SMO aktivira Hh-signalizaciju, međutim, u odsustvu Hh-liganada, njegovu aktivnost blokira receptor PTCH1 (mehanizam opisan u poglavlju 1.3.1.). SMO se sastoji od sedam hidrofobnih transmembranskih domena, triju unutarstaničnih i triju izvanstaničnih petlji, N-terminalne domene CRD i C-terminalnog repa koji je podložan post-translacijskim modifikacijama (134). Na domenu CRD veže se kolesterol, pri čemu se aktivira protein SMO (135). Kad je C-terminalni rep fosforiliran, SMO prelazi u aktivnu konformaciju i pokreće Hh-signalizaciju, dok ubikvitinacija C-terminalnog repa potiče internalizaciju i degradaciju receptora SMO pa samim time i deaktivaciju signalnog puta Hh (78, 134, 136).

Kinesin Family Member 7

KIF7 je evolucijski konzervirana komponenta signalnog puta Hh koja regulira aktivnost transkripcijskih faktora GLI (137). Može djelovati kao pozitivni i negativni regulator Hh-signalizacije (138). Kada je signalni put Hh neaktivan, dolazi do fosforilacije proteina KIF7, pri čemu se ograničava njegov transport u primarnu ciliju, kao i transport proteina GLI, te dolazi do njegovog nakupljanja u podnožju primarne cilije (78). U slučaju aktivacije signalnog puta Hh, KIF7 je defosforiliran, pri čemu se, kao i proteini GLI, nakuplja na vrhu

primarne cilije, dolazi do disocijacije kompleksa SUFU-GLI te, u konačnici, do aktivacije proteina GLI (78). Pretpostavlja se da KIF7 ne sudjeluje aktivno u transportu proteina GLI u primarnu ciliju. Glavna uloga proteina KIF7 je kontroliranje arhitekture primarne cilije. Ovaj protein, lokaliziran na vrhu primarne cilije, sudjeluje u organizaciji mikrotubula, kontrolirajući na taj način duljinu i strukturu cilije (139).

Suppressor of Fused

SUFU igra ključnu ulogu u Hh-signalizaciji kao negativni regulator signalnog puta. Ovaj protein je u direktnom kontaktu s transkripcijskim faktorima GLI te regulira njihovu aktivnost (137, 140). Kada je signalni put Hh neaktivan, SUFU tvori kompleks s proteinima GLI te inhibira njihovu translokaciju u jezgru. Ako se signalni put Hh aktivira, dolazi do disocijacije kompleksa SUFU-GLI nakon čega transkripcijski faktor GLI putuje u jezgru gdje potiče transkripciju ciljnih gena (78, 83). Osim što ih zadržava u citoplazmi sprječavajući na taj način njihovu translokaciju u jezgru, SUFU regulira proteine GLI i u jezgri (141-142). SUFU u jezgri može regrutirati ko-represorski kompleks te na taj način inhibirati transkripcijsku aktivnost GLI-a (142). Također se može i vezati za proteine GLI te olakšavati njihov prijenos iz jezgre u citoplazmu, pri čemu se navedeni transkripcijski faktori brzo uklanjaju iz jezgre (141-142).

Glioma-Associated Oncogene Homologues

Proteini GLI su terminalni transkripcijski faktori signalnog puta Hh koji spadaju u Krüppel obitelj proteina s motivom cinkovog prsta (engl. *zinc-finger*) (143). Kod sisavaca postoje tri homologa proteina GLI: GLI1, GLI2 i GLI3. Osim što svi imaju visoko konzerviranu DNA-vezujuću domenu koja se sastoji od motiva cinkovog prsta, ovi proteini imaju N-terminalnu represorsku i C-terminalnu aktivatorsku domenu koje se razlikuju kod različitih proteina GLI zbog čega ovi proteini nemaju iste uloge (144). Dok GLI2 i GLI3 imaju i represorsku i aktivatorsku domenu, proteinu GLI1 nedostaje represorska domena pa isključivo djeluje kao transkripcijski aktivator. Iako GLI2 i GLI3 imaju obje domene zbog čega mogu djelovati i kao represori i kao aktivatori, GLI2 primarno djeluje kao aktivator jer je njegova pretvorba u GLI-R oblik jako neučinkovita, dok GLI3 primarno djeluje kao represor zbog jake represivne aktivnosti N-kraja i kapaciteta proteina GLI3 da bude procesiran pomoću proteasoma na C-kraju (104, 144-145). Ekspresija ciljnih gena u kanonskom

signalnom putu Hh uglavnom je regulirana balansom između aktivatorskog oblika proteina GLI2 i represorskog oblika proteina GLI3, dok se ekspresija proteina GLI1 može stimulirati ne-kanonski, putem drugih signalnih puteva, što se uglavnom događa u patološkim stanjima (144).

1.4. Uloga signalnog puta Hedgehog u razvoju tumora

Signalni put Hh jako je bitan za razvoj normalnog embrija, dok je kod odraslog organizma neaktivan u većini tkiva (68-71). Nepravilna regulacija ovog signalnog puta tijekom embrionalnog razvoja dovodi do pojave kongenitalnih malformacija kao što su holoprozencefalija, brahidaktilija, Hirschsprungova bolest, parcijalna gonadna disgeneza i Pallister-Hallov sindrom (80, 146). Njegova aberantna aktivacija u odrasloj dobi povezana je s razvojem različitih tumora kao što su sitnostanični karcinom pluća, bazocelularni karcinom, meduloblastom, kolorektalni karcinom te karcinomi dojke, gušterače i jajnika (147).

Postoje tri tipa aberantne aktivacije signalnog puta Hh u tumorima: tip I – signalizacija neovisna o ligandu, tip II – autokrina ili jukstakrina signalizacija ovisna o ligandu i tip III – parakrina ili reverzna parakrina signalizacija ovisna o ligandu (Tablica 2) (147-148). Ako je aberantna Hh-signalizacija uzrokovana mutacijama u samom signalnom putu, radi se o signalizaciji koja je neovisna o ligandu, dok je prekomjerna ekspresija Hh-liganada obilježje signalizacije ovisne o ligandu (149). Kod autokrine ili jukstakrine signalizacije ovisne o ligandu, Hh-ligandi povratno djeluju na tumorske stanice koje su ih proizvele ili na susjedne tumorske stanice, potičući njihovu proliferaciju i preživljenje (77, 147-148). Takav način signalizacije uočen je kod različitih vrsta tumora kao što su rak prostate, jetre, dojke, jajnika i mozga (148). Kod parakrine signalizacije ovisne o ligandu, Hh-ligandi koje proizvedu tumorske stanice djeluju na okolne stromalne stanice koje nakon toga proizvode faktore rasta i potiču rast tumora (77, 148). Ovaj način signalizacije uočen je kod nekoliko vrsta tumora među kojima su rak gušterače, kolona i prostate (148). Osim navedene parakrine signalizacije, postoji i reverzna parakrina signalizacija ovisna o ligandu kod koje Hh-ligandi proizvedeni od strane stromalnih stanica djeluju na susjedne tumorske stanice i potiču njihov rast. Takva signalizacija uočena je samo kod hematoloških malignosti, kao što su limfomi B-stanica, plazmastanične novotvorine ili leukemije, kod kojih Hh-ligandi, proizvedeni direktno iz stromalnih stanica koštane srži ili limfnih čvorova, djeluju na tumorske stanice i stvaraju

okoliš pogodan za rast tumora (147, 150-151). Aberantna Hh-signalizacija može modulirati mikrookoliš te na taj način pripremiti nišu pogodnu za rast tumora djelujući na proliferaciju tumorskih stanica, diferencijaciju stanica i regulaciju imunosnog odgovora, pri čemu se stvara okoliš pogodan za progresiju tumora i metastaziranje malignih stanica (76).

Tablica 2. Tipovi aberantne aktivacije signalnog puta Hh u različitim vrstama tumora. Uređeno prema (148).

Tip aberantne aktivacije	Karakteristika	Vrsta tumora
Tip I	Signalizacija neovisna o ligandu	Bazocelularni karcinom, meduloblastom, tumor mozga kod djece i rabdomiosarkom
Tip II	Autokrina ili jukstakrina signalizacija ovisna o ligandu	Kolorektalni karcinom, melanom, rak prostate, jetre, dojke, jajnika i mozga
Tip III	Parakrina ili reverzna parakrina signalizacija ovisna o ligandu	Rak gušterače, leukemija (reverzna parakrina signalizacija)

Signalni put Hh ima različite uloge u razvoju tumora; može biti pokretač razvoja tumora, promotor tumora ili regulator kemorezistentnih tumorskih stanica (69). Aberantna aktivacija Hh-signalizacije može pokrenuti razvoj karcinoma kao što su bazocelularni karcinom, rabdomiosarkom i meduloblastom, dok kod sitnostaničnog karcinoma pluća, gdje djeluje kao promotor razvoja tumora, i kod raka gušterače, gdje djeluje kao promotor metastaziranja tumorskih stanica, nije dovoljna za inicijaciju razvoja samog tumora (69, 152-155). Signalni put Hh također je aktivan u stanicama raka prostate i raka jajnika kao regulator kemorezistentnih stanica koje postaju osjetljive na terapiju nakon inhibicije ovog signalnog puta (69, 156-157). Iako signalni put Hh sudjeluje u nastanku tumora, međudjelovanje s drugim signalnim putevima, kao što su TGF-β, Notch ili Wnt, ključno je za razvoj tumora. Recipročno sinergijsko djelovanje ovih signalnih puteva značajno pridonosi tumorigenezi i malignijem ponašanju tumorskih stanica (69, 84).

Osim što aberantna aktivacija signalnog puta Hh može biti uzrokovana genskim mutacijama sudionika signalnog puta, prekomjernom ekspresijom Hh-liganada i ne-kanonskom transkripcijskom regulacijom putem drugih signalnih puteva, epigenetske promjene također mogu biti jedan od uzroka poremećene aktivacije ovog signalnog puta (88, 158-159).

1.4.1. Genetske promjene

Genetske promjene uglavnom se odnose na genske mutacije koje zahvaćaju komponente signalnog puta Hh. Navedene mutacije mogu biti aktivirajuće i inaktivirajuće. Obje vrste mutacija dovode do konstitutivne aktivacije signalnog puta Hh te, u konačnici, do razvoja tumora (147-148).

Inaktivirajuće mutacije zahvaćaju negativne regulatore Hh-signalizacije kao što je *PTCH1*. PTCH1 je tumor supresorski protein koji inhibira receptor SMO. Ako dođe do mutacije u genu *PTCH1*, istoimeni protein gubi svoju funkciju, pri čemu SMO postaje konstitutivno aktivan te dolazi do aberantne aktivacije signalnog puta Hh (147). Inaktivirajuće mutacije ovog gena uočene su u brojnim tumorima među kojima su bazocelularni karcinom, meduloblastom, kolorektalni karcinom, rak dojke, jajnika, jednjaka i mjehura (160-166). Osim gena *PTCH1*, inaktivirajuće mutacije mogu zahvatiti i druge negativne regulatore Hh-signalizacije; mutacije gena *PTCH2* uočene su kod bazocelularnog karcinoma i meduloblastoma (167), dok su mutacije gena *SUFU* uočene kod meduloblastoma i multiplih meningeoma (161, 168). Aberantna aktivacija Hh-signalizacije može biti potaknuta i aktivirajućim mutacijama koje zahvaćaju pozitivne regulatore signalnog puta Hh, kao što je *SMO*, pri čemu navedeni regulatori postaju konstitutivno aktivni (147). Mutacije gena *SMO* uočene su kod bazocelularnog karcinoma, ameloblastoma, meningeoma i akutne limfoblastične leukemije (169-172). Kod akutne limfoblastične leukemije uočene su i aktivirajuće mutacije gena *GLI1* (172).

Osim genskih mutacija, varijacije u broju kopija gena također mogu poremetiti regulaciju signalnog puta Hh i pridonijeti nastanku tumora. Primjeri navedenih aberacija su amplifikacija gena *GLI2* kod meduloblastoma i delecija gena *PTCH1* kod fibromiksoma (173-174).

1.4.2. Epigenetske promjene

Epigenetske promjene odnose se na promjene u ekspresiji gena koje ne uključuju promjene u sekvenci DNA. Postoje najmanje tri epigenetska mehanizma koja modificiraju strukturu kromatina: metilacija DNA, modifikacija histona i RNA interferencija pomoću nekodirajućih RNA molekula kao što su mikro-RNA (engl. *micro-RNA*, miRNA) i duge nekodirajuće RNA (engl. *long non-coding RNA*, lnRNA) (175-176). Nepravilna regulacija navedenih epigenetskih mehanizama može dovesti do nastanka tumora (176).

Najbolje istražena epigenetska modifikacija kod sisavaca je metilacija DNA. Ova kovalentna modifikacija DNA nastaje dodavanjem metilne skupine (-CH_3) na C-5 poziciju citozinskog prstena u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu (CpG) pomoću enzima DNA metiltransferaze. Metilacija DNA je stabilna represivna oznaka koja igra ključnu ulogu u epigenetskom utišavanju transkripcije, pri čemu osigurava pravilnu regulaciju ekspresije gena (177-178). Jako je bitna za normalni razvoj embrija te sudjeluje u važnim procesima poput održavanja genomskog utiska, inaktivacije X kromosoma i supresije transkripcije i transpozicije repetitivnih elemenata. Abnormalnosti u metilaciji DNA dovode do pojave brojnih bolesti, među kojima je i rak (176, 178-179). Epigenetska obilježja raka su globalna hipometilacija i hipermetilacija promotora tumor supersorskih gena. Globalna hipometilacija dovodi do genomske nestabilnosti i aktivacije onkogena, dok hipermetilacija promotora tumor supersorskih gena rezultira transkripcijskim utišavanjem ovih gena (178-179).

Promjene u metilacijskom statusu promotora gena signalnog puta Hh uočene su kod različitih tipova tumora (88). Najčešće se radi o hipermetilaciji promotora negativnih regulatora Hh-signalizacije, genima *PTCH1* i *HHIP*. Hipermetilacija promotora tumor supresorskog gena *PTCH1* uočena je kod meduloblastoma, bazocelularnog karcinoma, raka dojke i želuca (180-183), dok je hipermetilacija promotora gena *HHIP* uočena kod meduloblastoma, glioma, adenokarcinoma pluća, raka jetre, želuca i gušterače (184-189). Hipometilacija promotora pozitivnog regulatora signalnog puta Hh, gena *SHh*, također je povezana s razvojem tumora. Promotor gena *SHh* hipometiliran je kod kolorektalnog karcinoma, raka želuca i dojke (190-192).

Uz aberantnu metaliciju DNA, aberantna ekspresija nekodirajućih molekula RNA, kao što su miRNA, također može utjecati na komponente signalnog puta Hh i doprinijeti nastanku

tumora (88). MiRNA su male, endogene, nekodirajuće molekule RNA koje su ključne za normalni razvoj organizma te sudjeluju u brojnim biološkim procesima. Ove molekule RNA mogu modificirati ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini vežući se na ciljnu glasničku RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA), pri čemu potiču degradaciju i translacijsku represiju mRNA (193). MiRNA su regulatori različitih signalnih puteva, među kojima je i signalni put Hh, pa nepravilna regulacija ekspresije ovih molekula RNA može biti uzrok aberantne aktivacije Hh-signalizacije (159, 194). Poremećenu aktivaciju signalnog puta Hh može uzrokovati prekomjerna ekspresija miRNA koje suprimiraju negativne regulatore ili smanjena ekspresija miRNA koje suprimiraju pozitivne regulatore Hh-signalizacije (88). MiR-212, supresor mRNA *PTCH1*, potiče rast i invaziju tumorskih stanica raka gušterače i nesitnostaničnog karcinoma pluća (195-196). Kod adenokarcinoma pluća i raka dojke uočena je povišena ekspresija miR-214, a kod raka želuca povišena ekspresija miR-194. Obje molekule su supresori mRNA *SUFU* (197-199). Smanjena ekspresija miR-125b, miR-326, miR-193b i miR-338-3p, supresora mRNA *SMO*, dovodi do povišene ekspresije *SMO*-a, dok smanjena ekspresija miR-324-5p, supresora mRNA *GLI1*, potiče ekspresiju navedenog *GLI*-a (200-202). Prekomjerna ekspresija *SMO*-a i *GLI*-a, izazvana smanjenom ekspresijom navedenih miRNA, pokreće aktivaciju ciljnih gena signalnog puta Hh te dolazi do proliferacije tumorskih stanica (200-202).

Posttranslacijske modifikacije histonskih repova igraju ključnu ulogu u regulaciji kromatina i aktivnosti gena pa je i njihova nepravilna regulacija povezana s razvojem tumora (203). Malo toga se zna o važnosti i ulozi ovih modifikacija u signalnom putu Hh zbog čega su potrebna daljnja istraživanja.

1.5. Signalni put Hedgehog u tumorima jajnika

Poremećena aktivacija signalnog puta Hh zabilježena je u različitim tumorima, među kojima je i rak jajnika (204-205). Kao što je već spomenuto, aberantna Hh-signalizacija može biti uzrokovana prekomjernom ekspresijom Hh-liganada, ili može biti potaknuta aktivirajućim ili inaktivirajućim genskim mutacijama komponenti signalnog puta Hh pa je u tom slučaju neovisna o ligandima (147-148). Kod raka jajnika uočena je pojačana ekspresija proteina SHh, DHh, PTCH, SMO i GLI1 te je primijećen postepeni rast ekspresije navedenih proteina od benignih, preko tumora niskog malignog potencijala do malignih neoplazmi. Ekspresija

ovih proteina povezana je s povećanom proliferacijom tumorskih stanica. Među navedenim komponentama Hh-signalizacije, ekspresija proteina DHh povezana je i s lošom prognozom kod bolesnica s rakom jajnika (206). Prekomjerna ekspresija proteina PTCH i GLI1 u raku jajnika u pozitivnoj je korelaciji s lošim preživljenjem bolesnica oboljelih od ove bolesti (207). GLI1 je identificiran kao potencijalni neovisni prognostički biomarker u raku jajnika. Njegova prekomjerna ektopična ekspresija potiče proliferaciju, mobilnost i invazivnost stanica te utječe na diferencijaciju stanica (207). U raku jajnika uočena je i povišena ekspresija mRNA *SHh* koja je češće detektirana u EC i CCC karcinomima jajnika, nego u seroznim i MC karcinomima jajnika (207). Komponente signalnog puta Hh, SMO, PTCH i GLI1, aktivirane su u epitelnim tumorima jajnika gdje je prekomjerna ekspresija proteina SMO i GLI1 povezana je s rezistencijom ovih tumora na cisplatinu (157). Poremećena aktivacija signalnog puta Hh također je uočena i u primarnim tumorima jajnika i staničnim linijama raka jajnika kod kojih je detektirana prekomjerna ekspresija proteina GLI1, SMO i SHh. Međutim, u navedenim tumorima i staničnim linijama, ekspresija proteina PTCH1, koji se inače koristi kao marker kanonske aktivacije signalnog puta Hh, bila je smanjena (208). Zheng i sur. također su uočili smanjenu ekspresiju proteina PTCH1 u tumorskom tkivu kao i u staničnim linijama raka jajnika. Primijetili su da bolesnice sa smanjenom ekspresijom proteina PTCH1 imaju lošiju prognozu od bolesnica s povišenom ekspresijom ovog proteina (209). U tumorima jajnika često dolazi do gubitka heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity*, LOH) tumor supresorskog gena *PTCH1* što doprinosi razvoju tumora (210). Metilacija promotora gena *PTCH1* uočena je kod benignih tumora jajnika, kao što su dermoidi i fibromi, ali ne i kod raka jajnika (211-212). Osim kanonske, u tumorima jajnika, kao što su tumori jajnika niskog malignog potencijala i karcinomi jajnika, također je zabilježena i ne-kanonska aktivacija Hh-signalizacije. Uočeno je da je ekspresija proteina SUFU i GLI1 veća kod tumora jajnika niskog malignog potencijala, nego kod karcinoma jajnika, kao i to da je ekspresija proteina SUFU manja u višim FIGO-stadijima (213).

Postoje i pojedine studije u kojima se navodi da je aberantna aktivacija Hh-signalizacije rijedak događaj u tumorima jajnika te da signalni put Hh ne igra značajnu ulogu u razvoju ovih tumora (214). Međutim, brojnija su istraživanja koja navode suprotno te se smatra da signalni put Hh igra važnu ulogu u nastanku i progresiji raka jajnika, zbog čega bi inhibicija ovog signalnog puta mogla biti jedna od terapijskih strategija za rak jajnika (204-205, 215).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je poremećena aktivacija signalnog puta Hh povezana s razvojem raka jajnika, međutim, uloga ovog signalnog puta treba se podrobnije istražiti, posebice u pojedinim histološkim podtipovima. Epigenetski mehanizmi odgovorni za razvoj ovog raka još su nedovoljno istraženi. Istraživanja na drugim tumorima ukazuju na povezanost aberantnog obrasca metilacije promotora gena signalnog puta Hh s razvojem bolesti (opisano u poglavlju 1.4.2.) što upućuje na moguću povezanost aberantnog obrasca metilacije promotora tih gena i s razvojem raka jajnika.

2. HIPOTEZA

Ekspresija proteina PTCH1 u seroznim karcinomima jajnika bit će smanjena, a ekspresija proteina SHh i IHh bit će povećana u odnosu na zdravo tkivo jajnika i jajovoda. U seroznim karcinomima jajnika tumor supresorski gen *PTCH1* bit će hipermetiliran, dok će geni *SHh* i *IHh* biti hipometilirani.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Istražiti promjene u ekspresiji proteina i metilaciji DNA u promotorima gena *PTCH1*, *SHh* i *IHh* u seroznim karcinomima jajnika visokog i niskog stupnja malignosti u odnosu na zdravo tkivo jajnika i jajovoda, te odrediti povezanost metilacije DNA u promotorima gena s ekspresijom proteina.

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti razinu ekspresije proteina PTCH1, negativnog regulatora signalnog puta Hh.
2. Odrediti razinu ekspresije proteina SHh i IHh, pozitivnih regulatora signalnog puta Hh.
3. Usporediti ekspresiju negativnog i pozitivnih regulatora signalnog puta Hh u seroznim karcinomima jajnika visokog i niskog stupnja malignosti u odnosu na zdravo tkivo jajnika i jajovoda.
4. Usporediti ekspresiju negativnog i pozitivnih regulatora signalnog puta Hh između seroznih karcinomima jajnika visokog i niskog stupnja malignosti.
5. Analizirati metilaciju DNA u promotorima gena *PTCH1*, *SHh* i *IHh*.
6. Odrediti povezanost metilacije DNA u promotorima gena s ekspresijom proteina.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Biološki materijali korišteni u istraživanju

U ovom istraživanju korišteni su humani uzorci tumorskog tkiva jajnika te uzorci zdravog tkiva jajnika i jajovoda. Također su korištene i humane stanične linije karcinoma jajnika, kao i stanična linija normalnih imortaliziranih epitelnih stanica jajovoda.

4.1.1. Zdravo i tumorsko tkivo

Parafinski blokovi seroznih karcinoma jajnika korišteni u ovom istraživanju arhivski su uzorci Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur, Zagreb. Preparati su sakupljeni tijekom operativnih zahvata u Klinici za ženske bolesti i porode u razdoblju od 2000. do 2012. godine te su analizirani i arhivirani u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur. U ovom istraživanju korištene su dvije kontrolne skupine: zdravo tkivo jajnika, pacijentica iste starosne dobi, koje je odstranjeno zbog druge ginekološke nemaligne indikacije, kao što su miomi i adenomioza maternice kod žena u perimenopauzi, te zdravo tkivo jajovoda koje je također odstranjeno zbog nemaligne ginekološke indikacije. Parafinski blokovi zdravog tkiva jajnika i jajovoda također su arhivski uzorci Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur. Navedeni preparati dani su Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na korištenje u znanstvene svrhe te su dio banke tumorskog i zdravog tkiva jajnika na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U ovom istraživanju korišteno je 37 uzoraka seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC), 11 uzoraka seroznih karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC), 20 uzoraka zdravog tkiva jajnika i 10 uzoraka zdravog tkiva jajovoda. LGSC i HGSC klasificirani su od strane iskusnog patologa prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO; engl. *World Health Organization*, WHO) iz 2014. godine (216).

Provođenje istraživanja odobreno je dozvolom Etičkog povjerenstva KB Merkur (ur.br.: 03/1-11097) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ur.br.: 380-59-10106-20-111/130).

4.1.2. Stanične linije

U ovom istraživanju korištene su stanične linije seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, i stanična linija normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom (engl. *Telomerase Reverse Transcriptase*, TERT), FNE1. Stanična linija FNE1 korištena je kao kontrola.

Stanične linije OVCAR5 i OVCAR8 dobivene su od prof. dr. sc. Ernsta Lengyela, dr. med. sa Sveučilišta u Chicagu, dok je stanična linija OVSAHO kupljena iz japanske banke stanica (Japanese Collection of Research Bioresurses), a stanična linija FNE1 iz LTCC-a (engl. *Live Tumor Culture Core*; Sveučilište u Miamiju, Sylvester Comprehensive Cancer Center, SAD).

4.2. Kultura stanica

4.2.1. Odmrzavanje stanica

Krioepruvete sa staničnim linijama, prethodno uskladištene u tekućem dušiku, odmrznute su u vodenoj kupelji pri 37 °C. Krioepruvete su premještene u vodenu kupelj direktno iz tekućeg dušika da bi proces odmrzavanja bio što brži, pa samim time i manje štetan za stanice. Odmrznute stanice premještene su iz krioepruvete u posude sa svježim hranjivim medijem (sastav hranjivog medija za pojedine stanične linije opisan je u poglavlju 4.2.2.), nakon čega su ostavljene u inkubatoru preko noći pri 37 °C. Sljedeći dan, uklonjen je stari hranjivi medij koji je zamijenjen svježim hranjivim medijem. Stanice su dalje presađivane sukladno postupcima opisanim u sljedećem poglavlju.

4.2.2. Presađivanje stanica

Stanične linije OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO uzgojene su u standardnim posudama za kulturu stanica (60 mm, 100 mm; Falcon, Corning, New York, SAD) u hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) s L-glutaminom i 4.5 g/L D-glukozom (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 10%-tnim fetalnim govođim serumom (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS; Gibco), 1 mM natrijevim piruvatom (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 1% MEM vitaminima (Gibco), 1% MEM neesencijalnim aminokiselinama (Sigma-Aldrich) i 1% penicilin-streptomicinom (Sigma-Aldrich), dok je stanična linija FNE1 uzgojena u mediju FOMI (LTCC, Sveučilište u Miamiju, Sylvester Comprehensive Cancer Center, SAD) uz dodatak 25 ng/mL kolera toksina (Sigma-Aldrich) u posudama za kulturu stanica Corning Primaria (60 mm, 100 mm; Corning). Navedene stanične linije presađivane su u nove posude sa svježim hranjivim medijem svakih 2-3 dana, odnosno kada bi dosegle 80-90%-tnu konfluenciju. U nastavku je opisan postupak prilagođen za posude za kulturu stanica promjera 100 mm. Prije presađivanja, hranjivi medij uklonjen je iz posuda sa stanicama, nakon čega su stanice isprane u 1 × DPBS-puferu (4 mL; engl. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*; Gibco). Nakon ispiranja s 1 × DPBS-puferom, stanice su tripsinizirane pomoću 1 mL 0,05%-tnog tripsina (Gibco) uz inkubaciju od 5-10 min pri 37 °C, nakon čega je slijedila inaktivacija tripsina dodavanjem istog volumena hranjivog medija. Tripsinizirane stanice resuspendirane su pomoću mikropipete te je u nove posude dodano 0,5 mL (¼) suspenzije stanica OVCAR5 ili OVCAR8, odnosno 1 mL (½) stanica OVSAHO ili FNE1 i 10 mL svježeg hranjivog medija. Sve stanične linije uzgajane su u inkubatoru pri 37 °C u vlažnoj atmosferi uz 5% CO_2.

4.2.3. Zamrzavanje stanica

Prije zamrzavanja, stanice su uzgojene u posudama za kulturu stanica promjera 100 mm. Nakon dosegnute 80-90%-tne konfluencije, iz posude sa stanicama uklonjen je hranjivi medij. Zatim su stanice isprane, tripsinizirane i resuspendirane (opisano u poglavlju 4.2.2.). Suspenzija sa stanicama (ukupno 2 mL) premještena je u epruvetu volumena 15 mL, nakon čega je centrifugirana 5 min pri 1000 × g (engl. *times gravity*); supernatant je uklonjen, a na talog je dodano 2 mL medija za zamrzavanje stanica [sastav: 90% FBS i 10% DMSO (dimetilsulfoksid; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)]. Stanice su resuspendirane u navedenom mediju te je po 1 mL stanične suspenzije razdijeljeno u dvije krioepruvete (Thermo Fisher Scientific) zapremnine 1,5 mL. Krioepruvete sa stanicama prebačene su u posudu za zamrzavanje Corning CoolCell LX (Corning) te ostavljene 24-48h pri -80 °C, nakon čega su pohranjene u tekući dušik.

4.3. Imunohistokemija

Uzorci tkiva fiksiranih formalinom i uklopljenih u parafin (engl. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE) rezani su na debljinu od 4 μm te postavljeni na adhezivna predmetna stakla (BioGnost, Zagreb, Hrvatska). Narezani FFPE-uzorci inkubirani su preko noći u termostatu pri 58 °C. Sljedeći dan, uzorci su izvađeni iz termostata te ostavljeni 10 min pri sobnoj temperaturi da se ohlade. Nakon toga, FFPE-uzorci deparafinizirani su u ksilenu (BioGnost) četiri puta po 10 min, rehidrirani u padajućim koncentracijama etanola (Kemika, Zagreb, Hrvatska) (100%-tni etanol 5 min, 96%-tni etanol 5 min i 70%-tni etanol 2 min) te dva puta isprani u destiliranoj vodi. Razotkrivanje epitopa provedeno je kuhanjem preparata u citratnom puferu (pH 6; Dako, Carpinteria, CA, SAD) u mikrovalnoj pećnici dva puta po 10 min na 600 W. Nakon kuhanja, posudica s uzorcima prebačena je u posudu s mlakom vodom gdje je ostavljena 25 min da se uzorci postepeno hlade. Zatim su uzorci isprani dva puta po 3 min u 1 × TBS-puferu (engl. *Tris-Buffered Saline*; 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl). Kako bi se blokiralo djelovanje endogenih peroksidaza, uzorci su tretirani 3%-tnom otopinom vodikovog peroksida (H_2O_2; BioGnost) u trajanju od 10 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedilo ispiranje u 1 × TBS-puferu dva puta po 3 min. Nakon ispiranja, na uzorke je dodano primarno antitijelo razrijeđeno u 1 × TBS-puferu. Uzorci su ostavljeni preko noći u vlažnoj komori pri 4 °C. Primarna antitijela korištena u istraživanju navedena su u Tablici 3.

Sljedeći dan, uzorci su isprani u 1 × TBS-u dva puta po 3 min, nakon čega je na njih dodano sekundarno antitijelo (Dako REAL EnVision Detection System), peroksidazom konjugirana polimerna okosnica koja na sebi nosi i molekule sekundarnog antitijela. Sekundarno antitijelo veže se na mišje ili kunićje imunoglobuline primarnog antitijela. Inkubacija u sekundarnom antitijelu trajala je 30 min te se odvijala pri sobnoj temperaturi. Uzorci su potom isprani u 1 × TBS-puferu dva puta po 3 min, nakon čega je slijedila inkubacija u kromogenu DAB (engl. *3,3'-diaminobenzidine*; Dako REAL EnVision Detection System) tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim isprani prvo u vodovodnoj pa onda u destiliranoj vodi, nakon čega su kontrastirani hematoksilinom (BioGnost) tijekom 1 min, a višak boje ispran je u vodovodnoj vodi tijekom 5 min. Uzorci su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (70%-tni etanol nekoliko urona, 96%-tni etanol nekoliko urona, 100%-tni etanol 1 min i 100%-tni etanol 2 min), nakon čega je slijedilo bistrenje u ksilenu dva puta po 5 min. Uzorci su naposljetku trajno uklopljeni u medij za uklapanje

(Biomount DPX Low, BioGnost). Negativna kontrola bio je uzorak obrađen na isti način kao i ispitivani uzorci, ali bez inkubacije u primarnom antitijelu. Kao pozitivne kontrole korišteni su humani uzorci posteljice (za PTCH1), bubrega (za SHh) i jetre (za IHh).

Tablica 3. Popis primarnih antitijela korištenih u imunohistokemiji i njihove specifikacije.

Kratica korištena u disertaciji	Antigen	Podrijetlo i tip antitijela	Epitop	Razrjeđenje	Proizvođač i šifra antitijela
Anti-PTCH1a	PTCH1	Kunićje poliklonsko	1-50 aa*	1:500	Abcam, Cambridge, UK; ab129341
Anti-PTCH1b	PTCH1	Kunićje poliklonsko	1-50 aa*	1:300	Abcam, Cambridge, UK; ab53715
Anti-PTCH1c	PTCH1	Kunićje poliklonsko	1-80 aa*	1:300	Aviva Systems Biology, San Diego, CA, SAD; OASG05688
Anti-PTCH1d	PTCH1	Mišje monoklonsko	122-436 aa*	1:50	Novus Biologicals, Centennial, CO, SAD; NBP1-47945
Anti-SHh	SHh	Kunićje monoklonsko	Nije naveden; antitijelo je specifično za protein u punoj dužini i C-terminalni produkt	1:300	Abcam, Cambridge, UK; ab53281
Anti-IHh	IHh	Kunićje monoklonsko	1-100 aa*	1:300	Abcam, Cambridge, UK; ab52919

*aa (engl. *amino acids*; aminokiseline)

Dva nezavisna patologa semikvantitativno su analizirala ekspresiju proteina. Ekspresija proteina PTCH1 određivana je u jezgri i citoplazmi stanica epitelnog tkiva seroznih karcinoma jajnika, vezivne strome tumora i epitela i stromalnog tkiva jajnika i jajovoda

(kontrolno tkivo), dok je ukupna ekspresija proteina SHh i IHh, u svim staničnim odjeljcima, određivana u epitelu seroznih karcinoma jajnika, vezivnoj stromi tumora i epitelu jajnika i jajovoda. Semikvantitativna analiza ekspresije proteina PTCH1 (detektiranog pomoću antitijela anti-PTCH1a), SHh i IHh provedena je prema sljedećim bodovnim kriterijima: 0 – nema ekspresije u stanicama, 1 – ako je < 10% stanica imunopozitivno, 2 – ako je 10-50% stanica imunopozitivno i 3 – ako je > 50% stanica imunopozitivno (217). Rezultati imunohistokemije očitani su pomoću svjetlosnog mikroskopa sa svijetlim vidnim poljem (Olympus CX22; Olympus Life Science, Tokyo, Japan).

4.4. Imunofluorescencija

Za potrebe imunofluorescencije (IF), stanične linije OVCAR5, OVCAR8, OVSAHO i FNE1 uzgojene su na okruglim pokrovnim stakalcima promjera 12 mm (Gerhard Menzel, Braunschweig, Njemačka) u kultivacijskim pločicama sa šest bunarića (4 stakalca po bunariću; engl. *6-well plates*; Falcon). Nakon dosegnute 80-90%-tne konfluencije, iz posuda sa stanicama uklonjen je hranjivi medij. Zatim su stanice tri puta isprane u 1 × DPBS-puferu (2 mL po bunariću), nakon čega je slijedila inkubacija stanica u 4%-tnoj otopini paraformaldehida (2 mL po bunariću; engl. *paraformaldehyde*, PFA; Santa Cruz Biotechnology) tijekom 15 min pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije s 4%-tnom otopinom PFA, stanice su tri puta isprane u 1 × DPBS-puferu (2 mL po bunariću). Pokrovna stakalca sa stanicama potom su prebačena u kultivacijsku pločicu s 12 bunarića (1 stakalce po bunariću; engl. *12-well plate*; Falcon). Zatim su stanice permeabilizirane pomoću PMS-pufera (1 mL po bunariću; DPBS s kalcijem i magnezijem – Gibco, 0,1% saponin – Sigma-Aldrich) tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi. Nakon permeabilizacije, slijedila je inkubacija stanica u *Blocking*-puferu (PMS-pufer s 5%-tnim FBS-om) tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi kako bi se blokiralo potencijalno nespecifično vezanje primarnog antitijela. Po završetku inkubacije, unutarnji dio poklopca kultivacijske pločice s 12 bunarića obložen je parafilmom (Bemis, Neenah, WI, SAD), nakon čega je na njega dodano 50 µL otopine s primarnim antitijelom (primarno antitijelo razrijeđeno je u *Blocking*-puferu) po jednom pokrovnom stakalcu. Kapljice s otopinom primarnog antitijela preklopljene su s gornjim dijelom pokrovnog stakalca na kojem su se nalazile stanice. Inkubacija stanica u otopini primarnog antitijela odvijala se preko noći pri 4 °C u vlažnoj komori. Primarna antitijela korištena u IF-u su: anti-

PTCH1a (razrjeđenje 1:100), anti-PTCH1b (razrjeđenje 1:100), anti-PTCH1c (razrjeđenje 1:100), anti-PTCH1d (razrjeđenje 1:25), anti-SHh (razrjeđenje 1:100) i anti-IHh (razrjeđenje 1:75). Karakteristike ovih antitijela opisane su u Tablici 3.

Sljedeći dan, pokrovna stakalca sa stanicama prebačena su u kultivacijsku pločicu s 12 bunarića (1 stakalce po bunariću), nakon čega su tri puta isprana u PMS-puferu (1 mL po bunariću). Potom je slijedila inkubacija u otopini sekundarnog antitijela (razrijeđeno u *Blocking*-puferu) tijekom 1h pri sobnoj temperaturi. Na 150 µL otopine razrijeđenog sekundarnog antitijela dodano je 20 µL fluorescentne boje Hoechst (NucBlue Live ReadyProbes Reagent; Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) koja specifično boji jezgre. Po jednom stakalcu dodano je 25 µL otopine sekundarnog antitijela (s bojom Hoechst). Uzorci su pokriveni aluminijskom folijom radi zaštite od svjetla. U istraživanju su korištena sekundarna antitijela konjugirana s fluorescentnim bojama: Alexa Fluor 488 magareće anti-kunićje (razrjeđenje 1:300; A-21206; Invitrogen) i Cy3 magareće anti-mišje (razrjeđenje 1:300; 715-165-150; Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) antitijelo. Nakon inkubacije u otopini sekundarnog antitijela, stanice su isprane tri puta u PMS-puferu, jedan put 1 × DPBS-puferu (bez kalcija i magnezija) i jedan put u ddH_2O (dvostruko destilirana voda). Zatim je na predmetna stakla (BioGnost) dodano 7 µL medija za uklapanje (Fluorescence Mounting Medium; Dako) po jednom pokrovnom stakalcu. Kapljice medija za uklapanje preklopljene su s gornjim dijelom pokrovnog stakalca na kojem su se nalazile stanice. Uzorci su se sušili u mraku preko noći pri sobnoj temperaturi, nakon čega su pohranjeni pri 4 °C. Negativne kontrole bili su uzorci obrađeni na isti način kao i ispitivani uzorci, ali bez inkubacije u primarnom antitijelu. Rezultati IF-a očitani su pomoću laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa (Leica SP8 X FLIM; Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka).

4.5. Izolacija proteina iz stanica u kulturi

Prije izolacije proteina, stanične linije OVCAR5, OVCAR8, OVSAHO i FNE1 uzgojene su u posudama za kulturu stanica promjera 100 mm. Nakon dosegnute 80-90%-tne konfluencije, iz posude sa stanicama uklonjen je hranjivi medij. Zatim su stanice isprane u ledeno-hladnom 1 × DPBS-puferu (4 mL). Pufer je potom uklonjen, a u posudu sa stanicama dodan je 1 mL ledeno-hladnog RIPA-pufera (engl. *Radioimmunoprecipitation Assay*) za lizu stanica (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% natrijev deoksikolat, 0,1% SDS, 50 mM Tris

pH 8) u kojeg su, neposredno prije korištenja, dodani inhibitori proteaza cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Švicarska) i 1 mM PMSF (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*; Thermo Fisher Scientific). Navedeni koraci odvijali su se na ledu. Nakon dodatka RIPA-pufera, stanice su ostrugane s podloge pomoću hladnog strugača za stanice i prebačene u mikroepruvetu volumena 1,5 mL, nakon čega je slijedila inkubacija na rotirajućoj miješalici tijekom 30 min pri 4 °C. Uzorci su potom centrifugirani 20 min pri 16 000 × g i temperaturi od 4 °C. Supernatant s proteinima sakupljen je u nove mikroepruvete, a koncentracija ukupnih proteina određena je pomoću metode BCA (Sigma-Aldrich) prema uputama proizvođača i očitana pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Spark; Tecan, Männedorf, Švicarska) pri valnoj duljini od 562 nm. Izolirani proteini pohranjeni su pri -80 °C.

Uz ukupne proteine, iz staničnih linija OVCAR5, OVCAR8, OVSAHO i FNE1 izolirani su i proteini iz pet različitih staničnih odjeljaka: citoplazmatski proteini, membranski proteini, slobodni jezgreni proteini (engl. *soluble nuclear*) koji nisu vezani na kromatin, proteini vezani na kromatin (engl. *chromatin-bound*) i citoskeletni proteini. Navedene frakcije proteina izolirane su pomoću kita Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača. Izolirane frakcije proteina također su pohranjene pri -80 °C.

4.6. Western blot

Uzorci ukupnih proteina, kao i uzorci frakcija proteina, analizirani su tehnikom Western blot. Navedeni uzorci pomiješani su s 4 × Laemmli SDS-puferom (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 0,02% bromfenol plavo, 8% β-merkaptoetanol – dodan neposredno prije korištenja) u omjeru 3:1, nakon čega su kuhani u termomikseru 5 min pri 95 °C. Nakon hlađenja pri sobnoj temperaturi, 10 µg ukupnih proteina i po 10 µL uzorka svake frakcije proteina dodano je na 10%-tni poliakrilamidni gel (Tablica 4).

Tablica 4. Sastav poliakrilamidnog gela korištenog u Western blotu.

Sabijajući gel	V	Razdvajajući gel (10%-tni)	V
30% akrilamid/bisakrilamid (29:1)	269,5 µL	30% akrilamid/bisakrilamid (29:1)	2,084 mL
Pufer (0,5 M Tris pH 6,8, 0,4% SDS)	520 µL	Pufer (1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS)	1,563 mL
ddH_2O	1,274 mL	ddH_2O	2,604 mL
APS	10,5 µL	APS	20 µL
TEMED	2 µL	TEMED	5 µL

SDS – natrijev dodecil sulfat; ddH_2O – dvostruko destilirana voda; APS – amonijev persulfat; TEMED – tetrametiletilendiamin

Elektroforeza je provedena u 1 × *Running*-puferu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS) na 90V prvih 35 min, nakon čega je napon povećan na 120V tijekom ~1h. Nakon elektroforeze, proteini su transferirani na PVDF membranu (Thermo Fisher Scientific). Transfer proteina odvijao se u 1 × *Transfer*-puferu (18,5 mM Tris, 140 mM glicin, 20% metanol – dodan neposredno prije korištenja) tijekom 90 min na 200 mA. Membrana je blokirana u 5%-tnom mlijeku (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) otopljenom u 1 × TBST-puferu (1 × TBS-pufer s 0,1%-tnim Tweenom 20) 1 sat pri sobnoj temperaturi, nakon čega je isprana četiri puta po 5 min u 1 × TBST-puferu. Membrana je zatim preko noći inkubirana u primarnom antitijelu razrijeđenom u 5%-tnom BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*; Carl Roth) pri 4°C. Primarna antitijela korištena u istraživanju su: anti-PTCH1a (razrjeđenje 1:1000), anti-PTCH1b (razrjeđenje 1:1000), anti-PTCH1c (razrjeđenje 1:1000) i anti-PTCH1d (razrjeđenje 1:500). Karakteristike navedenih antitijela opisane su u Tablici 3. Membrana je također inkubirana u kunićjem poliklonskom antitijelu anti-GAPDH (razrjeđenje 1:2000; IMG-5143A; IMGENEX, San Diego, SAD) i mišjem monoklonskom antitijelu anti-H3K4me2 (razrjeđenje 1:2000; klon CMA303, 05-1338; Millipore, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, SAD) koji su služili kao kontrola za provjeru uspješnosti izolacije proteina iz različitih staničnih odjeljaka i kontrola nanošenja. Nakon inkubacije u primarnom antitijelu,

membrana je isprana četiri puta po 5 min u TBST-puferu. Membrana je potom inkubirana u sekundarnom antitijelu razrijeđenom u 5%-tnom mlijeku tijekom 1h (anti-mišje) ili 2 h (anti-kunićje) pri sobnoj temperaturi. U istraživanju su korištena sekundarna antitijela konjugirana s peroksidazom: kozje anti-kunićje (razrjeđenje 1:5000; P0448; Dako) i kozje anti-mišje (razrjeđenje 1:12500; 170-6516; Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) antitijelo. Nakon inkubacije u sekundarnom antitijelu, membrana je isprana pet puta po 5 min u TBST-puferu. Za vizualizaciju proteina korišten je kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (za anti-PTCH1a, anti-PTCH1c i anti-PTCH1d; Thermo Fisher Scientific) ili kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (za anti-PTCH1b; Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača. Rezultati su očitani pomoću uređaja MicroChemi (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael).

4.7. Izolacija genomske DNA iz FFPE-tkiva

Genomska DNA izolirana je iz FFPE-uzoraka karcinoma LGSC i HGSC, te zdravog tkiva jajnika i jajovoda. Protokol za izolaciju genomske DNA iz FFPE-tkiva prilagođen je prema protokolu Vrsalović i sur. (218). Za izolaciju DNA korištena su dva reza svakog FFPE-uzorka debljine 10 μm. Narezani FFPE-uzorci prebačeni su u mikroepruvete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) volumena 1,5 mL. U svaku mikroepruvetu dodano je po 1 mL supstitucije za ksilen (Histoclear II; National Diagnostics, Hessle Hull, UK), nakon čega je slijedila inkubacija uzoraka u navedenoj otopini tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi uz miješanje okretanjem mikroepruveta. Uzorci su potom centrifugirani 5 min pri 13 000 rpm (engl. *revolutions per minute*) i sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo uklonjen pomoću mikropipete, dok je na talog opet dodano 1 mL supstitucije za ksilen. Nakon toga, uzorci su ponovo inkubirani i centrifugirani pod istim uvjetima kao što je prethodno opisano. Supernatant je opet pažljivo uklonjen te je na talog dodano 500 μL apsolutnog etanola (Kemika). Uzorci su miješani okretanjem mirkoepruveta tijekom 2 min, nakon čega su centrifugirani 5 min pri 13 000 rpm i sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo uklonjen, a na talog je opet dodano 500 μL apsolutnog etanola. Uzorci su zatim ponovo promiješani i centrifugirani pod istim uvjetima kao što je opisano u tekstu iznad. Cijeli supernatant je pažljivo uklonjen, a mikroepruvete su ostavljene otvorene kako bi etanol ispario. Na talog je dodano 100 μL digestijskog pufera (50 mM Tris pH 8,5, 1mM EDTA, 0,5% Tween 20) i 4 μL

proteinaze K (20 mg/mL; VWR Life Science AMRESCO, Radnor, PA, SAD) nakon čega su uzorci inkubirani u termomikseru (Eppendorf) preko noći uz miješanje pri 300 rpm i temperaturi od 37 °C.

Sljedeći dan, uzorci su centrifugirani 30 s pri 13 000 rpm i sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedila inkubacija u termomikseru (bez miješanja) tijekom 8 min pri 95 °C radi inaktivacije proteinaze K. Uzorci su potom ponovo centrifugirani 30 s pri 13 000 rpm i sobnoj temperaturi. Čistoća i koncentracija izolirane DNA u supernatantu izmjerene su pomoću mikrovolumnog spektrofotometra (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific). Uzorci izolirane genomske DNA pohranjeni su pri 4 °C.

4.8. Izolacija genomske DNA iz stanica u kulturi

Genomska DNA izolirana je iz karcinomskih staničnih linija OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO i kontrolne stanične linije FNE1. Prije izolacije DNA, stanice su uzgojene u posudama za kulturu stanica promjera 100 mm. Nakon dosegnute 80-90%-tne konfluencije, iz posude sa stanicama uklonjen je hranjivi medij. Zatim su stanice isprane u 1 × DPBS-puferu (4 mL). Nakon što je uklonjen pufer korišten za ispiranje stanica, u posudu sa stanicama dodan je 1 mL svježeg 1 × DPBS-pufera. Stanice su ostrugane s podloge pomoću strugača za stanice (Falcon) i prebačene u mikroepruvetu volumena 1,5 mL, nakon čega su centrifugirane 5 min pri 500 × g i temperaturi od 4 °C. Supernatant je pažljivo odstranjen, a talog sa stanicama resuspendiran je pomoću mikropipete u digestijskom puferu (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS, 0,1 mg/mL proteinaza K – dodana u pufer neposredno prije korištenja). Za 3 x 10^7 stanica korišteno je 0,3 mL pufera, dok se je za veći broj stanica koristilo 1 mL digestijskog pufera/10^8 stanica. Uzorci su potom inkubirani u termomikseru 12-18 h pri 300 rpm i temperaturi od 50 °C. Nakon inkubacije, na postojeći volumen uzorka, dodan je jednak volumen fenol-kloroform-izoamilnog alkohola (Carl Roth). Uzorci su zatim snažno vorteksirani 20 s, nakon čega je slijedilo centrifugiranje tijekom 5 min pri 16 000 × g i sobnoj temperaturi. Vodena (gornja) faza u kojoj se nalazila DNA pažljivo je, pomoću mikropipete, prebačena u novu mikroepruvetu volumena 1,5 mL u koju je zatim dodano 1 mL hladnog apsolutnog etanola i 3M natrijevog acetata (Kemika) u iznosu 10% volumena vodene faze. Navedena smjesa je promiješana okretanjem mikroepruveta te je ostavljena preko noći pri -80 °C.

Sljedeći dan, uzorci su centrifugirani 20 min pri maksimalnoj brzini (14 000 rpm) pri 4 °C. Supernatant je pažljivo uklonjen, a talog (DNA) dva puta ispran s hladnim 75%-tnim etanolom – 150 µL hladnog 75%-tnog etanola dodano je na talog, nakon čega je slijedilo centrifugiranje uzoraka u trajanju od 2 min pri maksimalnoj brzini pri 4 °C. Nakon što je etanol uklonjen, mikroepruvete su ostavljene otvorene ~30 min da se talog osuši. Talog je otopljen u 100 µL sterilne vode bez nukleaza (engl. *nuclease-free water*), a čistoća i koncentracija izolirane DNA izmjerene su pomoću mikrovolumnog spektrofotometra. Uzorci izolirane genomske DNA pohranjeni su pri -20 °C.

4.9. PCR ovisan o metilaciji

Genomska DNA izolirana iz FFPE-uzoraka seroznih karcinoma jajnika te zdravih jajnika i jajovoda, kao i genomska DNA izolirana iz karcinomskih i kontrolne stanične linije, bisulfitno su konvertirane pomoću kita MethylEdge Bisulfite Conversion System (Promega, Madison, WI, SAD) prema uputama proizvođača. Bisulfitno konvertirana DNA korištena je u reakcijama PCR-a (engl. *Polymerase Chain Reaction*) ovisnog o metilaciji (engl. *Methylation-Specific PCR*, MSP). Sekvence početnica za promotorske regije gena *PTCH1*, *SHh* i *IHh* (Sigma-Aldrich), kao i temperature sparivanja početnica s kalupom (engl. *annealing temperature*), navedene su u Tablici 5. Reakcije MSP provedene su pomoću kita TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA) (TaKaRa Bio, Kusatsu, Shiga, Japan). Reakcijska smjesa za MSP sadržavala je 0,25 µL TaKaRa EpiTaq HS DNA polimeraze (5 U/ µL), 5 µL 10xEpiTaq PCR (Mg^{2+} free)-pufera, 5 µL 25 mM $MgCl_2$, 6 µL dNTP-a (2,5 mM svaki), 2 µL početnica F (engl. *forward*), 2 µL početnica R (engl. *reverse*) (10 pmol svakih), 50 ng DNA kalupa i vodu bez nukleaza do ukupnog volumena reakcijske smjese od 50 µL. Reakcija se odvijala u sljedećim uvjetima: 30 s početne denaturacije pri 95 °C, nakon čega je slijedilo 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije pri 95 °C tijekom 30 s, sparivanja početnica s kalupom pri odgovarajućoj temperaturi (Tablica 5) tijekom 30 s, i produljivanja lanca DNA pri 72 °C tijekom 30 s. Završno produljivanje DNA trajalo je 7 min pri 72 °C. Za provjeru metilacijskog statusa gena *SHh* korišten je ugniježđeni MSP (engl. *Nested MSP*) koji se sastojao od primarnog i ugniježđenog PCR-a (svaki PCR imao je svoj set početnica; Tablica 5). Primarni i ugniježđeni PCR odvijali su se pod istim uvjetima kao i obični MSP. Jedina razlika bila je u sastavu reakcijske smjese ugniježđenog PCR-a. U ovom PCR-u,

produkti primarnog PCR-a služili kao kalup pa je u reakcijsku smjesu, umjesto 50 ng DNA, dodan 1 μL navedenih produkata. Sve reakcije MSP imale su iste kontrole. Methylated Human Control (Promega) korištena je kao pozitivna kontrola za metiliranu reakciju, dok je nemetilirana DNA EpiTect Control DNA (Qiagen, Hilden, Njemačka) korištena kao pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju. Kao negativna kontrola kod obje reakcije korištena je voda bez nukleaza.

Tablica 5. Početnice za promotorske regije gena *PTCH1*, *SHh* i *IHh* korištene u MSP-u.

Početnice	Sekvenca	Ta	Produkt	Ref.
PTCH1 mF **PTCH1 mR**	5'-AATTAAGGAGTTGTTGCGGTC-3' 5'-GCTAAACCATTCTATCCCCGTA-3'	61 °C	125 bp	(219)
PTCH1 umF **PTCH1 umR**	5'-ATTAAGGAGTTGTTGTGGTTGT-3' 5'-ACTAAACCATTCTATCCCCATA-3'	61 °C	124 bp	
SHh mF1 **SHh mR1**	5'-GAGCGGTGGAGAGTTTTTCG-3' 5'-ACTAATAACTTCCGAACTATCCCCG-3'	64 °C		(191)
SHh umF1 **SHh umR1**	5'-GGGAGTGGTGGAGAGTTTTTTG-3' 5'-AACTAATAACTTCCAAACTATCCCCA-3'	64 °C		
SHh mF2 **SHh mR2**	5'-AGAGTTTTTCGTAGTCGCGGC-3' 5'-ATCCCCGTACGAATCCGTACG-3'	64 °C	169 bp	
SHh umF2 **SHh umR2**	5'-GGTGGAGAGTTTTTTGTAGTTGTGGT-3' 5'-AAACTATCCCCATACAAATCCATACA-3'	64 °C	179 bp	
IHh mF **IHh mR**	5'-GTCGTCGCGTTGTTAAAATAAAC-3' 5'-ACCGACGAAACTCAAATACGA-3'	61 °C	145 bp	(220)
IHh umF **IHh umR**	5'-TTGTTGTGTTGTTAAAATAAATGG-3' 5'-CAAAACCAACAAAACTCAAATACAA-3'	61 °C	148 bp	

mF i mR – set početnica za metiliranu reakciju; umF i umR – set početnica za nemetiliranu reakciju; F1 i R1 – set početnica za primarni PCR; F2 i R2 – set početnica za ugniježđeni PCR; Ta – temperatura sparivanja početnica s kalupom; bp – parovi baza

Uspješnost MSP reakcije provjerena je pomoću elektroforeze u gelu agaroze. Za razdvajanje produkata MSP-a korišten je 2%-tni agarozni gel (agaroza; Lonza, Basel, Švicarska) u koji je prethodno dodana boja GelStar nucleic acid stain (Lonza). Veličina umnoženih fragmenata određena je prema standardu DNA (SimplyLoad 100 bp DNA Ladder; Lonza). Elektroforeza se odvijala u 1 × TAE-puferu (engl. *Tris-Acetate-EDTA*) (Bio-Rad) tijekom 30 min pri 120 V. Umnoženi fragmenti vizualizirani su pod UV svjetlom na transiluminatoru.

4.10. Statistička analiza

Distribucija podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom, Lillieforsovim testom i Shapiro-Wilkovim W-testom. Neparametrijski test Mann-Whitney U korišten je za usporedbu ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u ispitivanim (tumorskim) skupinama u odnosu na kontrolne skupine i za usporedbu ekspresije proteina unutar ispitivanih i kontrolnih skupina. Spearmanov test za neparametrijske varijable korišten je za testiranje povezanosti ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh unutar iste ispitivane ili kontrolne skupine, kao i za testiranje povezanosti metilacije DNA u promotoru određenog gena s ekspresijom odgovarajućeg proteina u ispitivanim i kontrolnim skupinama. Za statističku analizu dobivenih podataka korišten je program IBM SPSS Statistics (Version 21; Chicago, IL, SAD), a prag prihvaćanja odnosno odbacivanja hipoteze bio je na razini vjerojatnosti od $p < 0,05$.

5. REZULTATI

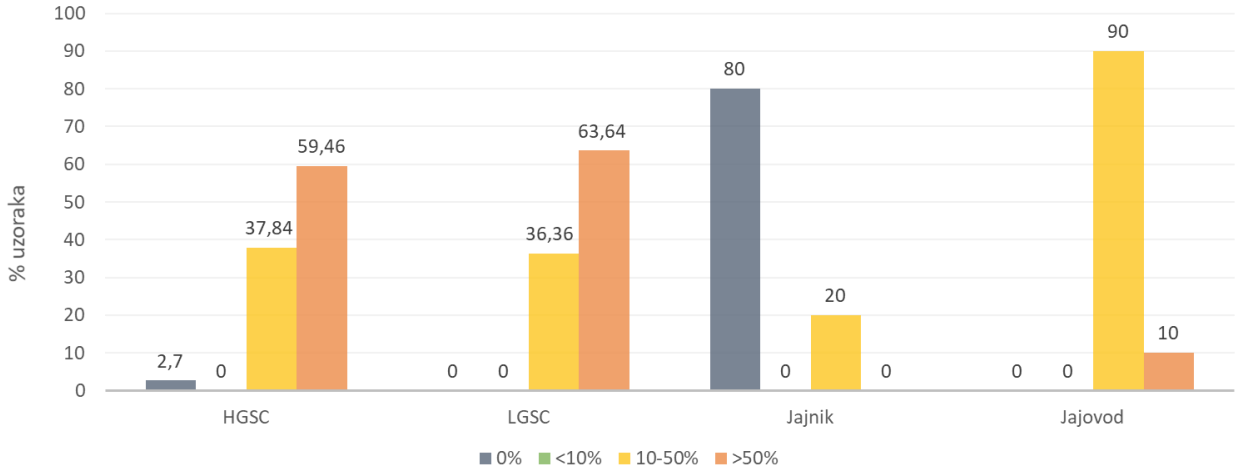
5.1. Ekspresija proteina PTCH1 u seroznim karcinomima jajnika

Analiza ekspresije proteina PTCH1 ukazala je na izraženu nuklearnu ekspresiju ovog proteina u tumorskom tkivu i tumorskim stanicama u kulturi. Osim nuklearne, uočena je i citoplazmatska ekspresija navedenog proteina. Nuklearna, citoplazmatska i ukupna ekspresija proteina PTCH1 analizirane su u tumorskom epitelu i vezivnoj stromi tumora kao i na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika, te u epitelnom i stromalnom tkivu i na cijelom preparatu zdravih jajnika i jajovoda. Razina ekspresije proteina PTCH1 u karcinomima HGSC i LGSC uspoređena je s razinom ekspresije navedenog proteina u zdravom tkivu jajnika i jajovoda, kao i između tumorskih skupina, između kontrolnih skupina i između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih i kontrolnih skupina.

5.1.1. Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u zdravom i tumorskom tkivu

U tumorskom epitelu HGSC-a i LGSC-a, 59,46%, odnosno 63,64% uzoraka imalo je izraženu nuklearnu ekspresiju proteina PTCH1 u >50% stanica (visoka razina ekspresije) (Slika 8). Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u epitelu zdravog tkiva jajnika nije bila prisutna kod 80% uzoraka, dok je kod preostalih 20% uzoraka bila prisutna u 10-50% stanica (umjerena razina ekspresije) (Slika 8). U epitelu zdravog tkiva jajovoda, samo 10% uzoraka imalo je nuklearnu ekspresiju proteina PTCH1 u >50% stanica, dok je preostalih 90% uzoraka imalo nuklearnu ekspresiju u 10-50% stanica (Slika 8). Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu HGSC-a u odnosu na epitel zdravih jajnika ($p < 0,0001$) (Tablica 6; Slika 9A i C) i epitel zdravih jajovoda ($p = 0,01$) (Tablica 6; Slika 9A i D). Kod LGSC-a, nuklearna ekspresija proteina PTCH1 također je bila statistički značajno veća u tumorskom epitelu nego u epitelu zdravih jajnika ($p < 0,0001$) (Tablica 6; Slika 9B-C) i epitelu zdravih jajovoda ($p = 0,014$) (Tablica 6; Slika 9B i D). U tumorskom epitelu nije bilo statistički značajne razlike u nuklearnoj ekspresiji proteina PTCH1 između karcinoma HGSC i LGSC ($p = 0,763$) (Tablica 6; Slika 9A-B), dok je u zdravom epitelu

nuklearna ekspresija bila statistički značajno veća u jajovodu nego u jajniku ($p < 0,0001$) (Tablica 6; Slika 9C-D).

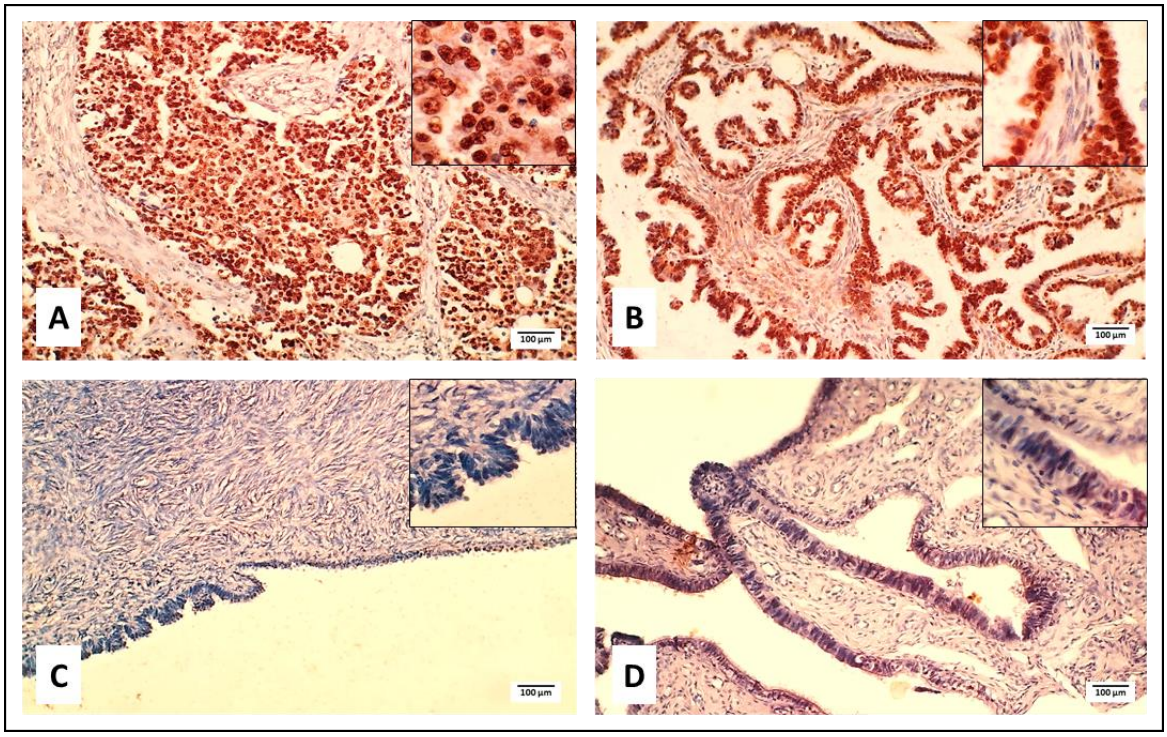


Slika 8. Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u tumorskom epitelu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i epitelu zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

Tablica 6. Vrijednosti statističke analize nuklearne ekspresije proteina PTCH1 u tumorskom epitelu i vezivnoj stromi seroznih karcinoma jajnika i zdravom epitelu i stromalnom tkivu jajnika i jajovoda određene imunohistokemijskom analizom.

	HGSC vs. Jajnik	**HGSC vs. Jajovod**	**LGSC vs. Jajnik**	**LGSC vs. Jajovod**	**HGSC vs. LGSC**	**Jajnik vs. Jajovod**
Mann-Whitney U test	Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u epitelu					
	U = 40 W = 250 Z = -5,866 **p < 0,0001**	U = 98 W = 153 Z = -2,584 **p = 0,01**	U = 8 W = 218 Z = -4,609 **p < 0,0001**	U = 25,5 W = 80,5 Z = -2,467 **p = 0,014**	U = 193 W = 896 Z = -0,302 p = 0,763	U = 18 W = 228 Z = -4,117 **p < 0,0001**
	Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u stromi					
	U = 273,5 W = 976,5 Z = -1,723 p = 0,085	U = 151 W = 206 Z = -0,949 p = 0,342	U = 99 W = 165 Z = -0,485 p = 0,627	U = 42 W = 97 Z = -0,96 p = 0,337	U = 185 W = 888 Z = -0,478 p = 0,633	U = 52 W = 107 Z = -2,286 **p = 0,022**

HGSC – serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

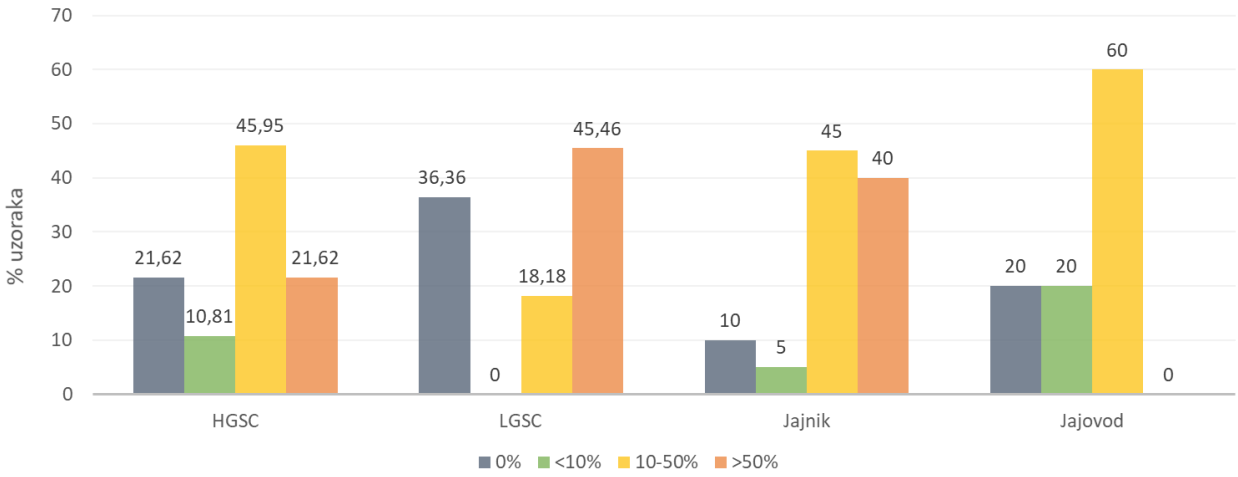


Slika 9. Imunohistokemijsko bojanje proteina PTCH1 u (A) seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC), (B) seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC), (C) zdravom tkivu jajnika i (D) zdravom tkivu jajovoda.

U vezivnoj stromi HGSC-a i LGSC-a, 21,62%, odnosno 45,46% uzoraka imalo je nuklearnu ekspresiju proteina PTCH1 u >50% stanica (Slika 10). U stromi zdravog tkiva jajnika 40% uzoraka imalo je nuklearnu ekspresiju proteina PTCH1 u >50% stanica, dok u stromi zdravog tkiva jajovoda nijedan uzorak nije imao nuklearnu ekspresiju u >50% stanica (Slika 10). Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u stromi zdravog jajnika nego u stromi zdravog jajovoda ($p = 0,022$), dok statistički značajne razlike u nuklearnoj ekspresiji navedenog proteina u vezivnoj stromi HGSC-a i LGSC-a u odnosu na stromu zdravog jajnika i jajovoda, kao ni između HGSC-a i LGSC-a, nije bilo (Tablica 6; Slika 9).

Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu nego u vezivnoj stromi karcinoma HGSC ($p < 0,0001$), kao i u epitelu zdravih jajovoda u odnosu na njihovu stromu ($p = 0,022$), dok je u zdravim jajnicima nuklearna ekspresija bila statistički značajno veća u stromalnom tkivu nego u epitelu ($p < 0,0001$)

(Tablica 7; Slika 9). U karcinomima LGSC nije bilo statistički značajne razlike u nuklearnoj ekspresiji proteina PTCH1 između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome tumora (p = 0,166) (Tablica 7; Slika 9B).



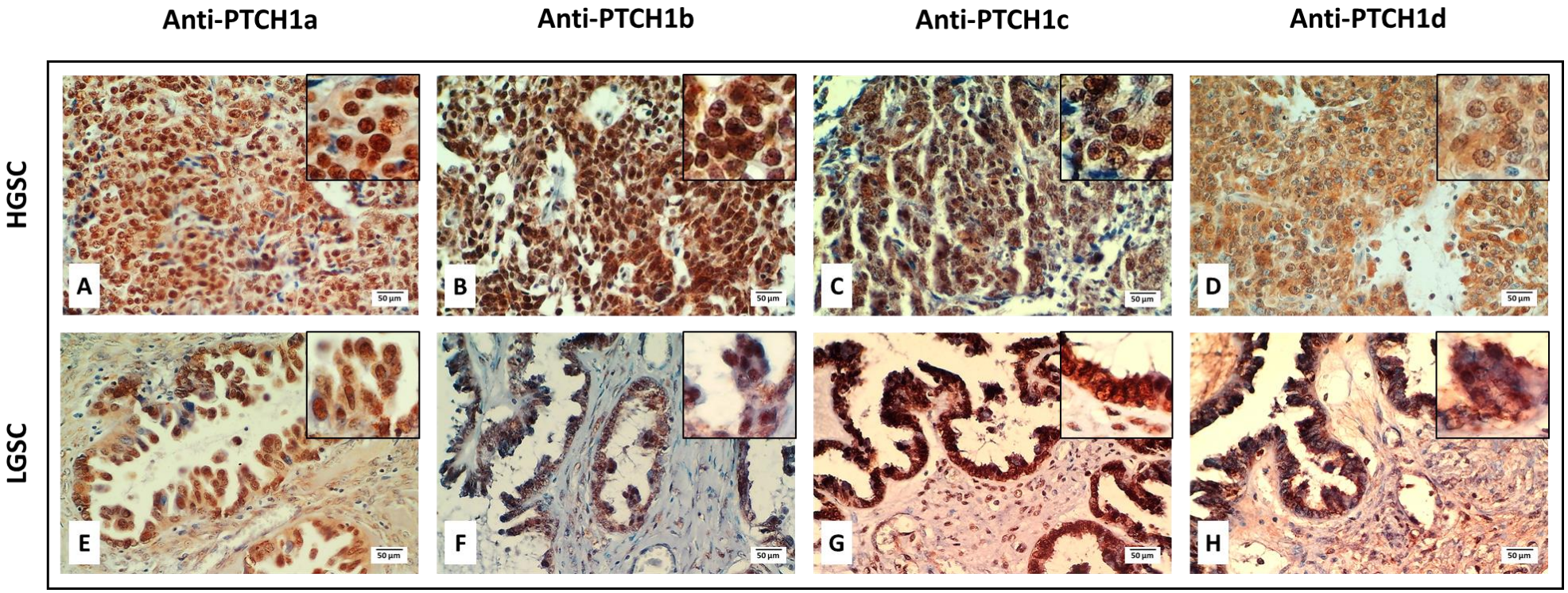
Slika 10. Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u vezivnoj stromi seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i stromi zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

Tablica 7. Usporedba nuklearne ekspresije proteina PTCH1 između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih (HGSC i LGSC) i kontrolnih skupina (jajnik i jajovod) određene imunohistokemijskom analizom.

	PTCH1 (n) – epitel vs. stroma			
	HGSC	**LGSC**	**Jajnik**	**Jajovod**
MW	U = 352 W = 1055 Z = -3,881 **p < 0,0001**	U = 41,5 W = 107,5 Z = -1,384 p = 0,166	U = 46 W = 256 Z = -4,474 **p < 0,0001**	U = 27 W = 82 Z = -2,288 **p = 0,022**

n – nuklearna ekspresija; HGSC – serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti; MW – Mann-Whitney U test; podebljano – p < 0,05 (statistički značajno)

Specifičnost nuklearne lokalizacije proteina PTCH1 potvrđena je metodom imunohistokemije na uzorcima karcinoma HGSC i LGSC uz pomoć četiri različita antitijela



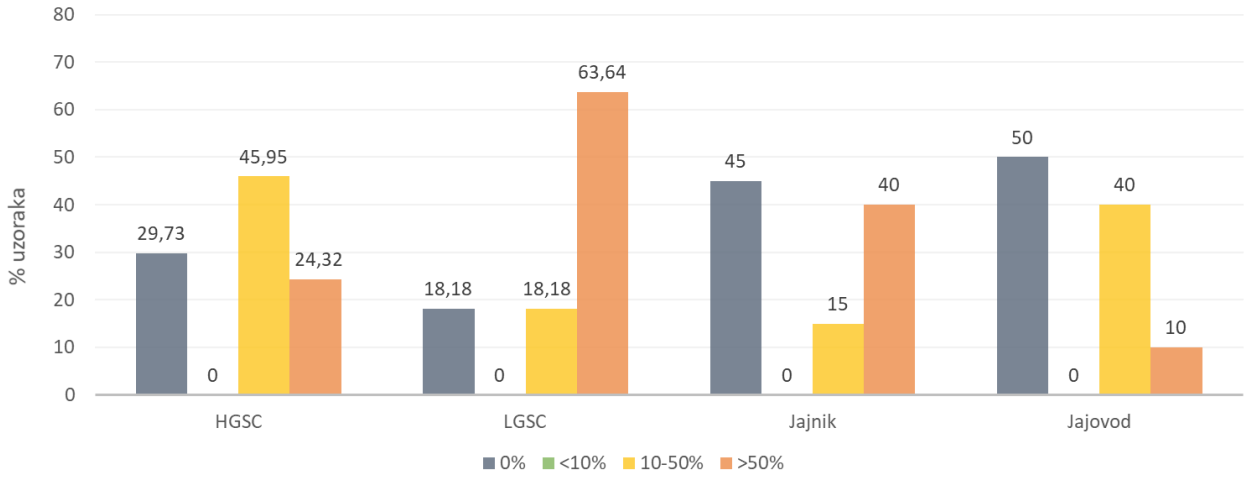
Slika 11. Imunohistokemijsko bojanje proteina PTCH1 detektiranog uz pomoć četiri različita antitijela, anti-PTCH1a (A, E), anti-PTCH1b (B, F), anti-PTCH1c (C, G) i anti-PTCH1d (D, H) na uzorcima seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC; A-D) i niskog (LGSC; E-H) stupnja malignosti.

anti-PTCH1: anti-PTCH1a, anti-PTCH1b, anti-PTCH1c i anti-PTCH1d (Tablica 3; Slika 11). Sva četiri antitijela vežu se na N-terminalnu regiju transmembranskog receptora PTCH1. Osim nuklearne, u sva četiri slučaja uočena je i citoplazmatska ekspresija navedenog proteina. Kod uzoraka tretiranih s antitijelom anti-PTCH1d najmanje je izražena nuklearna, a najviše citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 (Slika 11D i H). Za razliku od antitijela anti-PTCH1a (epitop: 1-50 aa), anti-PTCH1b (epitop: 1-50 aa) i anti-PTCH1c (epitop: 1-80 aa), antitijelo anti-PTCH1d veže se na udaljeniji epitop (122-436 aa) antigena PTCH1.

5.1.2. Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 u zdravom i tumorskom tkivu

U tumorskom epitelu HGSC-a i LGSC-a, >50% stanica bilo je imunopozitivno na citoplazmatsku ekspresiju proteina PTCH1 u 24,32%, odnosno 63,64% uzoraka (Slika 12). U epitelu zdravog tkiva jajnika, 40% uzoraka imalo je citoplazmatsku ekspresiju proteina PTCH1 u >50% stanica, dok je u epitelu zdravog tkiva jajovoda samo 10% uzoraka imalo citoplazmatsku ekspresiju u >50% stanica (Slika 12). Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu LGSC-a u odnosu na epitel zdravog jajovoda ($p = 0,023$). U tumorskom epitelu, citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 bila je veća kod LGSC-a u odnosu na HGSC, ali bez postizanja statističke značajnosti ($p = 0,053$) (Tablica 8; Slika 9). Statistički značajne razlike nije bilo u citoplazmatskoj ekspresiji navedenog proteina u tumorskom epitelu HGSC-a u odnosu na epitel zdravog jajnika i jajovoda, LGSC-a u odnosu na epitel zdravog jajnika, kao ni između epitela jajnika i jajovoda (Tablica 8; Slika 9).

U vezivnoj stromi HGSC-a i LGSC-a, 29,73%, odnosno 27,27% uzoraka imalo je citoplazmatsku ekspresiju proteina PTCH1 u >50% stanica (Slika 13). U stromi zdravog tkiva jajnika, >50% stanica bilo je imunopozitivno na citoplazmatsku ekspresiju proteina PTCH1 kod 40% uzoraka, dok je u stromi zdravog tkiva jajovoda samo 10% uzoraka imalo citoplazmatsku ekspresiju u >50% stanica (Slika 13). Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u stromi zdravog jajnika nego u stromi zdravog jajovoda ($p = 0,005$), dok statistički značajne razlike u citoplazmatskoj ekspresiji navedenog proteina u vezivnoj stromi HGSC-a i LGSC-a u odnosu na stromu zdravog jajnika i jajovoda, kao ni između HGSC-a i LGSC-a, nije bilo (Tablica 8; Slika 9).

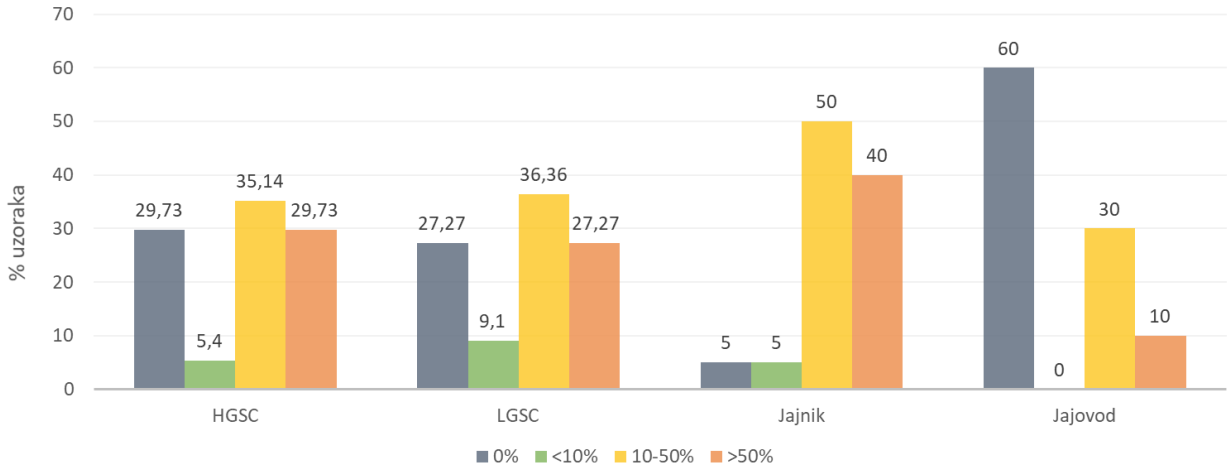


Slika 12. Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 u tumorskom epitelu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i epitelu zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

Tablica 8. Vrijednosti statističke analize citoplazmatske ekspresije proteina PTCH1 u tumorskom epitelu i vezivnoj stromi seroznih karcinoma jajnika i zdravom epitelu i stromalnom tkivu jajnika i jajovoda određene imunohistokemijskom analizom.

	HGSC vs. Jajnik	**HGSC vs. Jajovod**	**LGSC vs. Jajnik**	**LGSC vs. Jajovod**	**HGSC vs. LGSC**	**Jajnik vs. Jajovod**
Mann-Whitney U test	Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 u epitelu					
	U = 368 W = 578 Z = -0,036 p = 0,972	U = 138 W = 193 Z = -1,316 p = 0,188	U = 78 W = 288 Z = -1,443 p = 0,149	U = 24,5 W = 79,5 Z = -2,281 **p = 0,023**	U = 129,5 W = 832,5 Z = -1,933 p = 0,053*	U = 80,5 W = 135,5 Z = -0,925 p = 0,355
	Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 u stromi					
	U = 275,5 W = 978,5 Z = -1,677 p = 0,094	U = 123 W = 178 Z = -1,702 p = 0,089	U = 79 W = 145 Z = -1,379 p = 0,168	U = 36,5 W = 91,5 Z = -1,389 p = 0,165	U = 201 W = 267 Z = -0,064 p = 0,949	U = 40 W = 95 Z = -2,814 **p = 0,005**

HGSC – serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno); * na granici statističke značajnosti



Slika 13. Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 u vezivnoj stromi seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i stromi zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

Citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 nije bila statistički značajno različita između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome u karcinomima HGSC i LGSC, kao ni između epitelnog i stromalnog tkiva u zdravim jajnicima i jajovodima (Tablica 9; Slika 9).

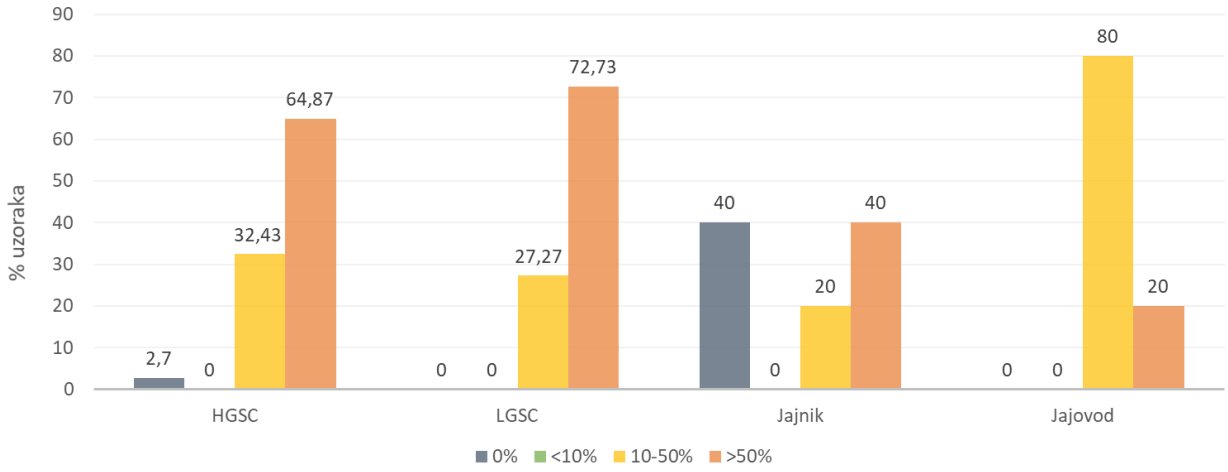
Tablica 9. Usporedba citoplazmatske ekspresije proteina PTCH1 između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih (HGSC i LGSC) i kontrolnih skupina (jajnik i jajovod) određene imunohistokemijskom analizom.

	PTCH1 (c) – epitel vs. stroma			
	HGSC	**LGSC**	**Jajnik**	**Jajovod**
MW	U = 675,5 W = 1378,5 Z = -0,103 p = 0,918	U = 39,5 W = 105,5 Z = -1,474 p = 0,141	U = 153,5 W = 363,5 Z = -1,336 p = 0,182	U = 45,5 W = 100,5 Z = -0,382 p = 0,702

c – citoplazmatska ekspresija; HGSC – serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti; MW – Mann-Whitney U test

5.1.3. Ukupna ekspresija proteina PTCH1 u zdravom i tumorskom tkivu

Ekspresija proteina PTCH1 (bez obzira na substaničnu lokalizaciju) u tumorskom epitelu HGSC-a i LGSC-a bila je prisutna kod 64,87%, odnosno 72,73% uzoraka u >50% stanica (Slika 14). U epitelu zdravog jajnika i jajovoda, >50% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina PTCH1 kod 40%, odnosno 20% uzoraka (Slika 14). Ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu HGSC-a u odnosu na epitel zdravih jajnika ($p = 0,01$) (Tablica 10; Slika 9A i C) i epitel zdravih jajovoda ($p = 0,018$) (Tablica 10; Slika 9A i D). Kod LGSC-a, ekspresija proteina PTCH1 također je bila statistički značajno veća u tumorskom epitelu nego u epitelu zdravih jajnika ($p = 0,03$) (Tablica 10; Slika 9B-C) i epitelu zdravih jajovoda ($p = 0,018$) (Tablica 10; Slika 9B i D). U tumorskom epitelu nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji proteina PTCH1 između karcinoma HGSC i LGSC ($p = 0,601$), kao ni u zdravom epitelu između jajnika i jajovoda ($p = 0,574$) (Tablica 10; Slika 9).



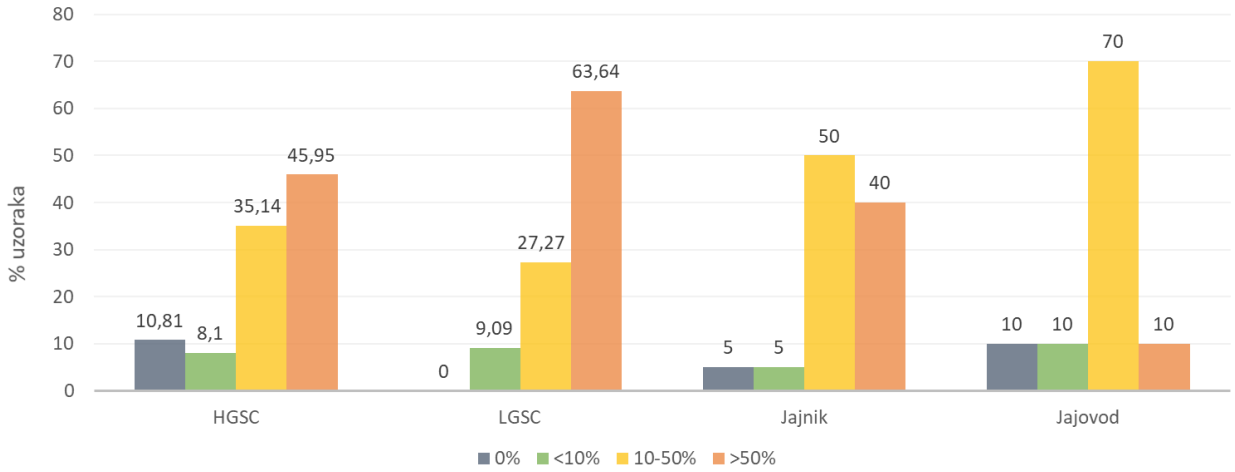
Slika 14. Ukupna ekspresija proteina PTCH1 u tumorskom epitelu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i epitelu zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

Tablica 10. Vrijednosti statističke analize ukupne ekspresije proteina PTCH1 u tumorskom epitelu, vezivnoj stromi tumora i na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika te zdravom epitelu i stromalnom tkivu i cijelom preparatu jajnika i jajovoda određene imunohistokemijskom analizom.

	HGSC vs. Jajnik	**HGSC vs. Jajovod**	**LGSC vs. Jajnik**	**LGSC vs. Jajovod**	**HGSC vs. LGSC**	**Jajnik vs. Jajovod**
Mann-Whitney U test	Ukupna ekspresija proteina PTCH1 u epitelu					
	U = 232 W = 442 Z = -2,584 **p = 0,01**	U = 106 W = 161 Z = -2,365 **p = 0,018**	U = 62 W = 272 Z = -2,169 **p = 0,03**	U = 26 W = 81 Z = -2,358 **p = 0,018**	U = 186 W = 889 Z = -0,523 p = 0,601	U = 88 W = 298 Z = -0,562 p = 0,574
	Ukupna ekspresija proteina PTCH1 u stromi					
	U = 369,5 W = 1072,5 Z = -0,009 p = 0,993	U = 130,5 W = 185,5 Z = -1,523 p = 0,128	U = 85,5 W = 295,5 Z = -1,121 p = 0,262	U = 25,5 W = 80,5 Z = -2,270 **p = 0,023**	U = 161,5 W = 864,5 Z = -1,126 p = 0,26	U = 67 W = 122 Z = -1,632 p = 0,103
	Ukupna ekspresija proteina PTCH1 na cijelom preparatu					
	U = 258,5 W = 468,5 Z = -2,17 **p = 0,03**	U = 60 W = 115 Z = -3,742 **p < 0,0001**	U = 72,5 W = 282,5 Z = -1,763 p = 0,078	U = 15 W = 70 Z = -3,345 **p = 0,001**	U = 197 W = 900 Z = -0,202 p = 0,84	U = 65 W = 120 Z = -1,927 p = 0,054*

HGSC – serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno); * na granici statističke značajnosti

U vezivnoj stromi HGSC-a i LGSC-a, >50% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina PTCH1 kod 45,95%, odnosno 63,64% uzoraka (Slika 15). U stromi zdravog tkiva jajnika, ekspresija proteina PTCH1 bila je prisutna u >50% stanica kod 40% uzoraka, dok je u stromi zdravog tkiva jajovoda samo 10% uzoraka bilo imunopozitivno na ekspresiju proteina PTCH1 u >50% stanica (Slika 15). Ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u vezivnoj stromi LGSC-a nego u stromi zdravog jajovoda ($p = 0,023$), dok statistički značajne razlike u ekspresiji navedenog proteina u vezivnoj stromi HGSC-a u odnosu na stromu zdravog jajnika i jajovoda, u vezivnoj stromi LGSC-a u odnosu na stromu zdravog jajnika, između HGSC-a i LGSC-a, kao ni između jajnika i jajovoda, nije bilo (Tablica 10; Slika 9).



Slika 15. Ukupna ekspresija proteina PTCH1 u vezivnoj stromi seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i stromi zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

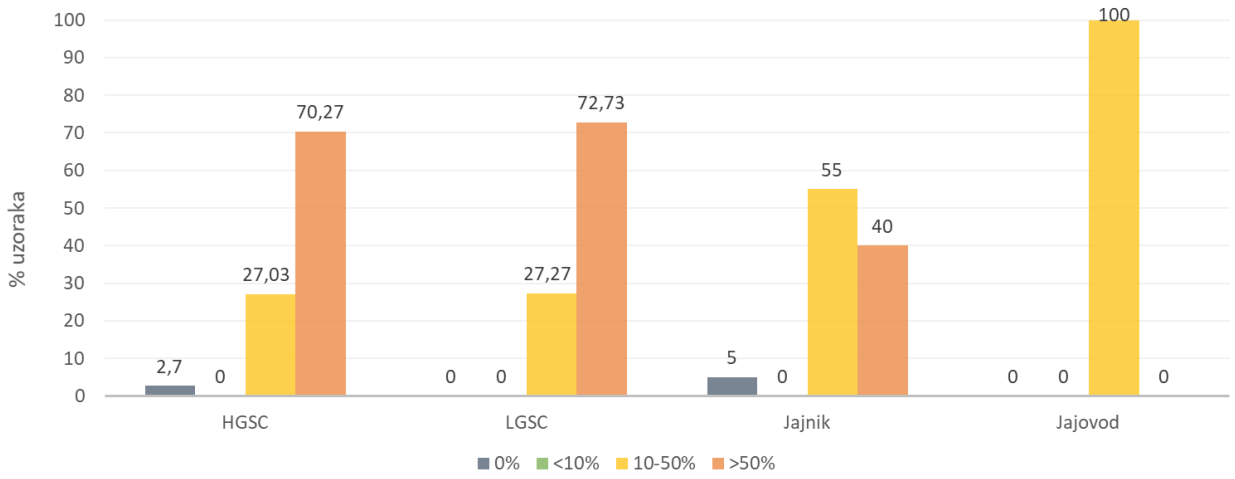
Ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu, nego u vezivnoj stromi karcinoma HGSC (p = 0,047), dok statistički značajne razlike nije bilo u ekspresiji navedenog proteina između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome u karcinomima LGSC, kao ni između epitelnog i stromalnog tkiva u zdravim jajnicima i jajovodima (Tablica 11; Slika 9).

Tablica 11. Usporedba ukupne ekspresije proteina PTCH1 između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih (HGSC i LGSC) i kontrolnih skupina (jajnik i jajovod) određene imunohistokemijskom analizom.

	PTCH1 (u) – epitel vs. stroma			
	HGSC	**LGSC**	**Jajnik**	**Jajovod**
MW	U = 521 W = 1224 Z = -1,987 **p = 0,047**	U = 53,5 W = 119,5 Z = -0,564 p = 0,573	U = 160 W = 370 Z = -1,152 p = 0,249	U = 37 W = 92 Z = -1,295 p = 0,195

u – ukupna ekspresija; HGSC – serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti; MW – Mann-Whitney U test; podebljano – p < 0,05 (statistički značajno)

Na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) HGSC-a i LGSC-a, >50% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina PTCH1 u 70,27%, odnosno 72,73% uzoraka (Slika 16). Na cijelom preparatu zdravog tkiva jajnika, >50% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina PTCH1 u 40% uzoraka, dok na cijelom preparatu zdravog tkiva jajovoda nijedan uzorak nije imao ekspresiju navedenog proteina u >50% stanica (Slika 16). Ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u tumorskom tkivu HGSC-a u odnosu na tkivo zdravih jajnika ($p = 0,03$) (Tablica 10; Slika 9A i C) i jajovoda ($p < 0,0001$) (Tablica 10; Slika 9A i D). Kod LGSC-a, ekspresija proteina PTCH1 bila je statistički značajno veća u tumorskom tkivu nego u tkivu zdravih jajovoda ($p = 0,001$) (Tablica 10; Slika 9B i D). Ekspresija proteina PTCH1 nije bila statistički značajno različita u tumorskom tkivu LGSC-a u odnosu na zdravo tkivo jajnika, kao ni između karcinoma HGSC i LGSC, dok je u zdravom tkivu ekspresija navedenog proteina bila veća u jajniku nego u jajovodu, ali bez postizanja statističke značajnosti ($p = 0,054$) (Tablica 10; Slika 9).

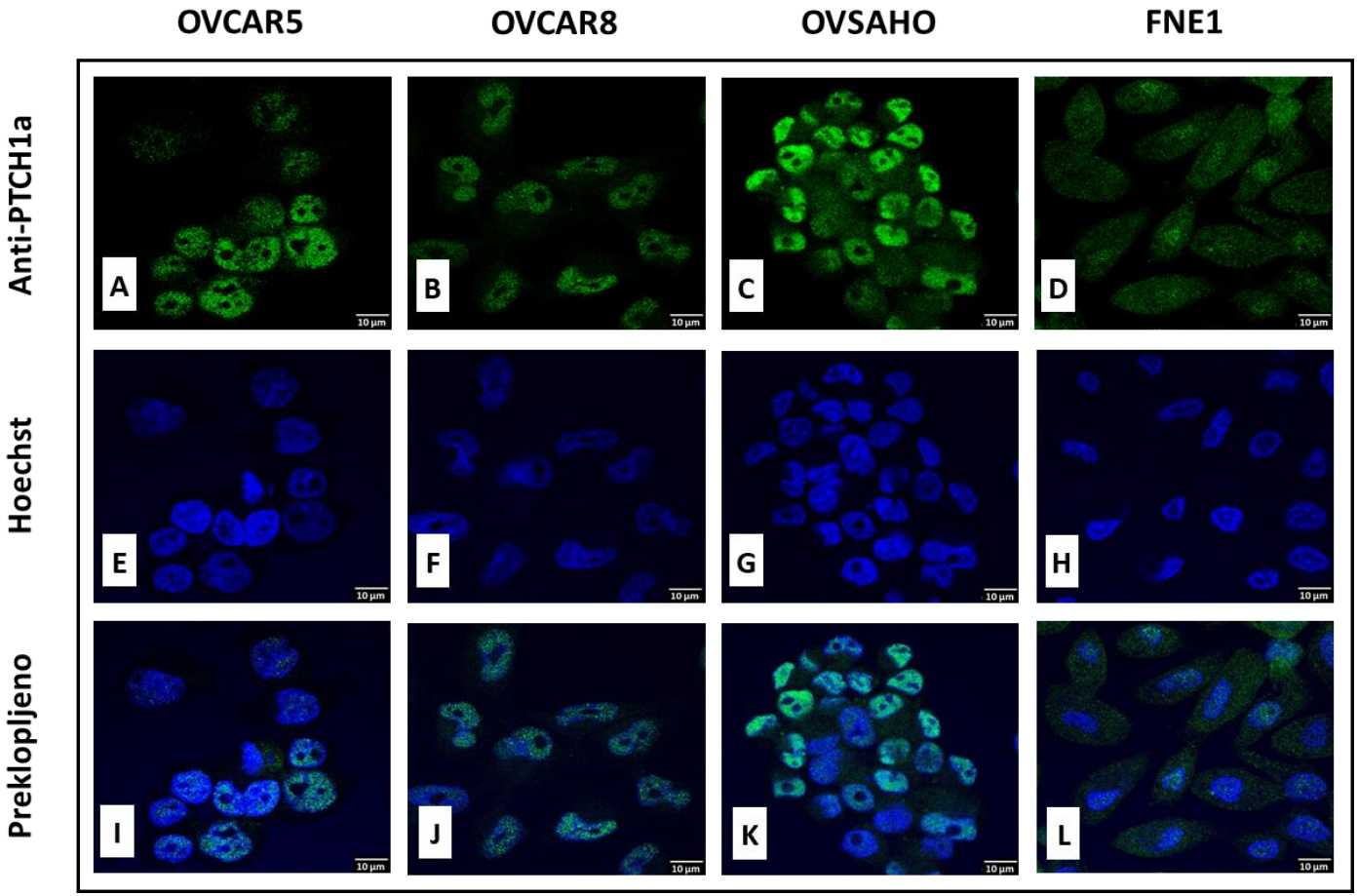


Slika 16. Ukupna ekspresija proteina PTCH1 na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

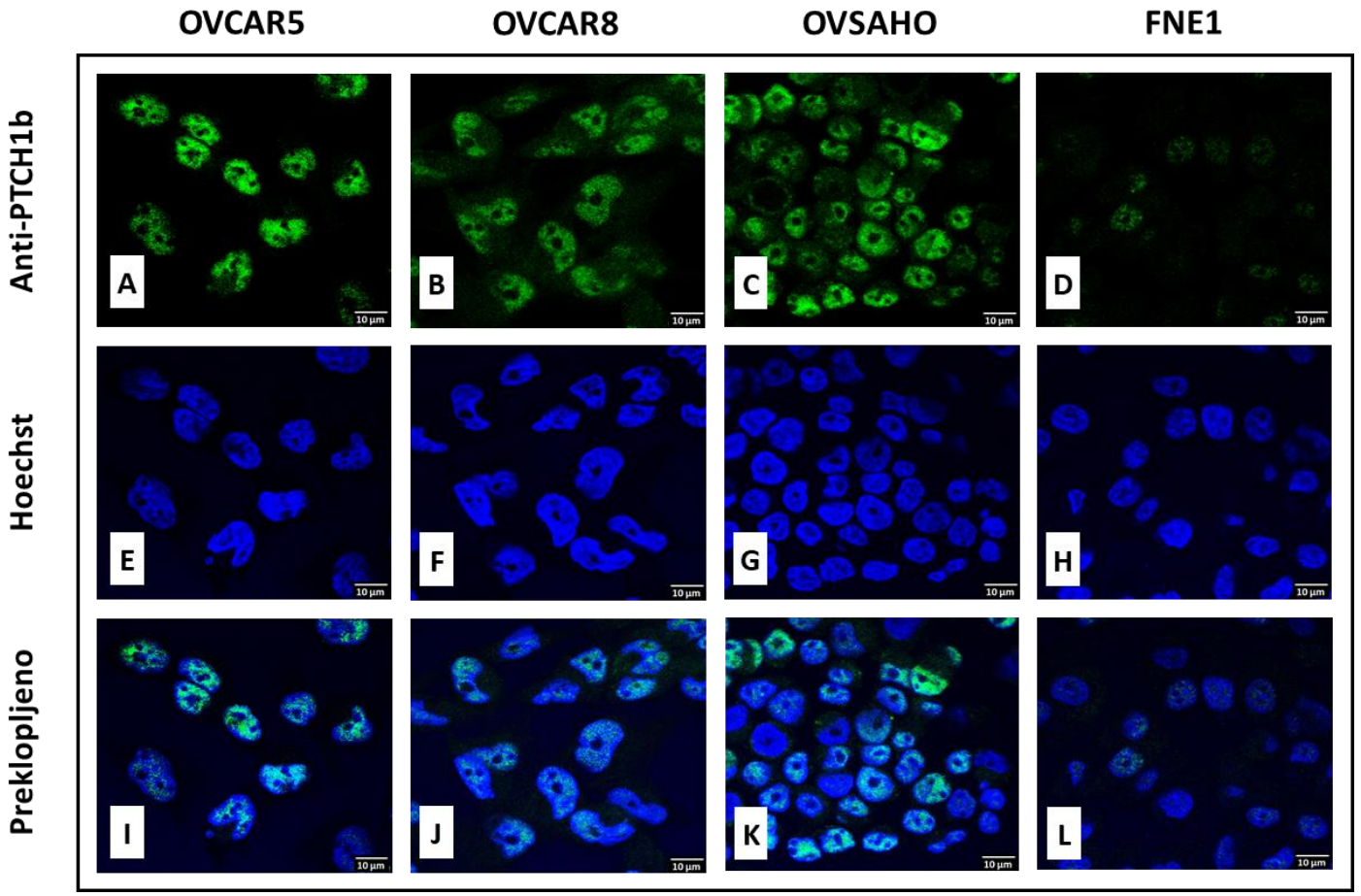
5.1.4. Ekspresija proteina PTCH1 u staničnim linijama

Ekspresija proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda, FNE1, detektirana je pomoću četiri različita antitijela, anti-PTCH1a, anti-PTCH1b, anti-PTCH1c i anti-PTCH1d (Tablica 3). U sva četiri slučaja, ekspresija proteina PTCH1 bila je viša u karcinomskim nego u kontrolnoj staničnoj liniji (Slike 17-20). Visoka razina nuklearne ekspresije proteina PTCH1, detektiranog pomoću antitijela anti-PTCH1a, anti-PTCH1bi i anti-PTCH1c, uočena je u svim karcinomskim staničnim linijama, dok je u kontrolnoj staničnoj liniji FNE1, u sva tri slučaja, nuklearna ekspresija ovog proteina bila niska (Slike 17-19). Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 detektirana pomoću antitijela anti-PTCH1d bila je prisutna u karcinomskim staničnim linijama, ali u značajno manjoj mjeri nego u slučaju preostala tri antitijela, dok u staničnoj liniji FNE1 uglavnom nije bila prisutna (Slika 20).

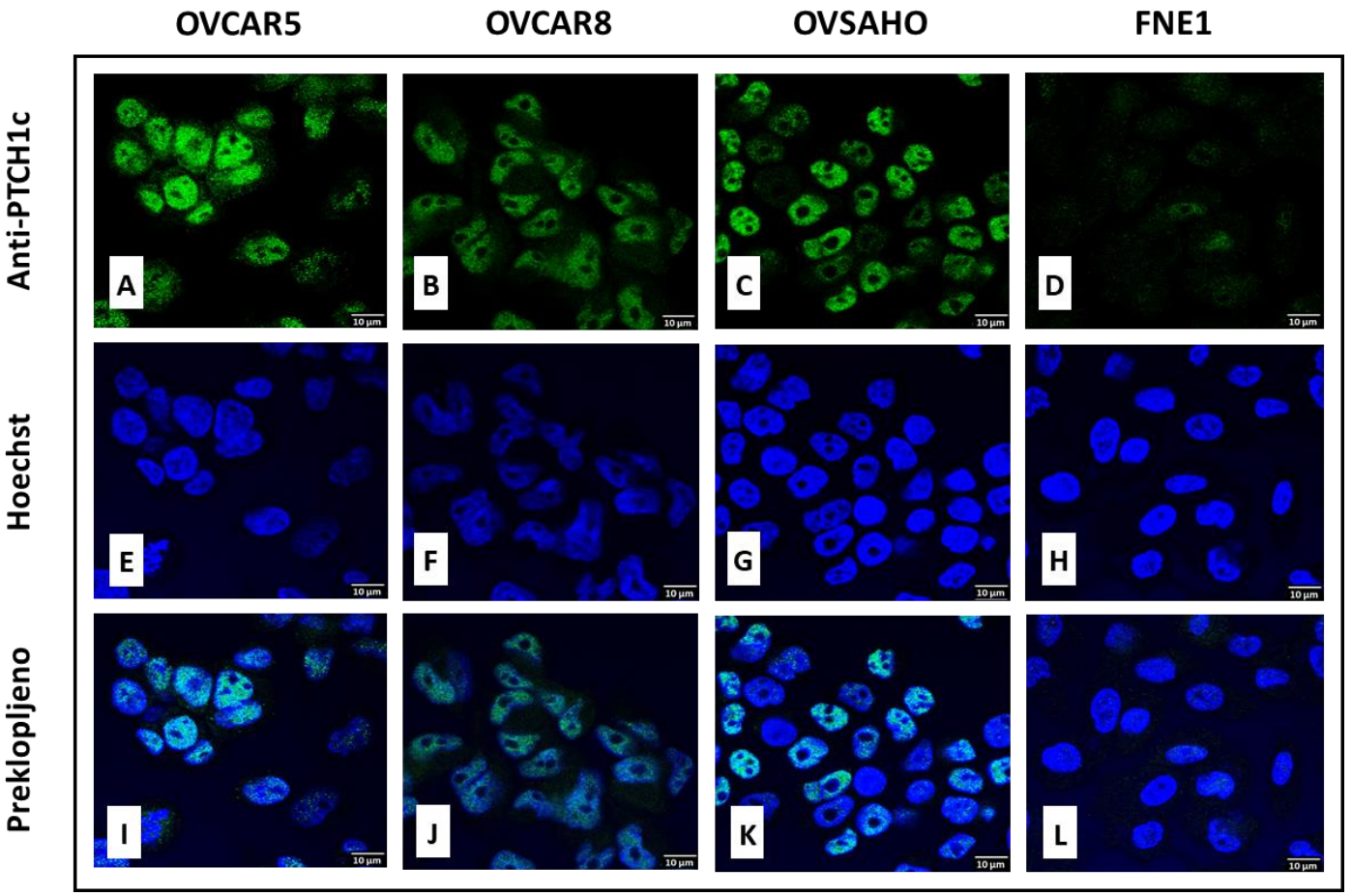
U staničnim linijama je, osim nuklearne, uočena citoplazmatska i membranska ekspresija proteina PTCH1. Citoplazmatska ekspresija detektirana pomoću antitijela anti-PTCH1a u manjoj mjeri je bila prisutna u staničnim linijama OVCAR5 i OVCAR8, dok je u većoj mjeri bila prisutna u staničnim linijama OVSAHO i FNE1 (Slika 17). Citoplazmatska ekspresija detektirana pomoću antitijela anti-PTCH1b bila je više zastupljena u OVCAR8 i OVSAHO, a manje u staničnim linijama OVCAR5 i FNE1 (Slika 18), dok je citoplazmatska ekspresija detektirana pomoću antitijela anti-PTCH1c bila više zastupljena u OVCAR5 i OVCAR8, a manje u staničnim linijama OVSAHO i FNE1 (Slika 19). Za razliku od antitijela anti-PTCH1a, anti-PTCH1b i anti-PTCH1c, citoplazmatska ekspresija detektirana pomoću antitijela anti-PTCH1d bila je visoko zastupljena u svim karcinomskim staničnim linijama gdje su uočeni točkasti signali u citoplazmi, dok u kontrolnoj staničnoj liniji uglavnom nije bila prisutna (Slika 20). Kod kontrolne stanične linije FNE1 uočena je membranska ekspresija proteina PTCH1 detektirana pomoću antitijela anti-PTCH1d, dok je kod karcinomskih staničnih linija također bila prisutna, ali u puno manjoj mjeri nego citoplazmatska (Slika 20).



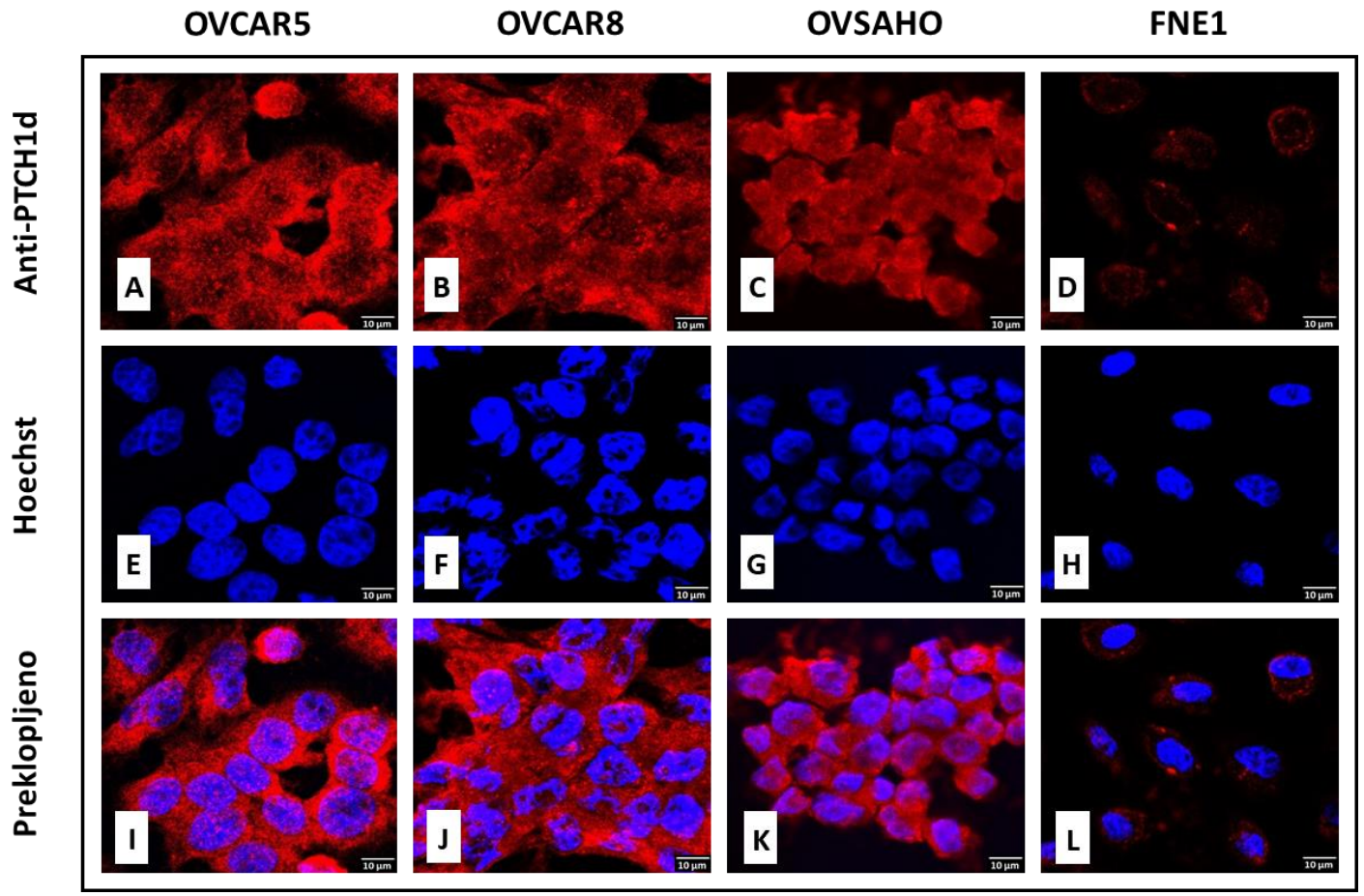
Slika 17. Imunofluorescencijsko bojanje proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5 (A, E, I), OVCAR8 (B, F, J) i OVSAHO (C, G, K) i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1 (D, H, L) pomoću antitijela anti-PTCH1a (A-E). Jezgre obojene bojom Hoechst (E-H). Preklopljene slike (I-L).



Slika 18. Imunofluorescencijsko bojanje proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5 (A, E, I), OVCAR8 (B, F, J) i OVSAHO (C, G, K) i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1 (D, H, L) pomoću antitijela anti-PTCH1b (A-E). Jezgre obojene bojom Hoechst (E-H). Preklopljene slike (I-L).



Slika 19. Imunofluorescencijsko bojanje proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5 (A, E, I), OVCAR8 (B, F, J) i OVSAHO (C, G, K) i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1 (D, H, L) pomoću antitijela anti-PTCH1c (A-E). Jezgre obojene bojom Hoechst (E-H). Preklopljene slike (I-L).



Slika 20. Imunofluorescencijsko bojanje proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5 (A, E, I), OVCAR8 (B, F, J) i OVSAHO (C, G, K) i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1 (D, H, L) pomoću antitijela anti-PTCH1d (A-E). Jezgre obojene bojom Hoechst (E-H). Preklopljene slike (I-L).

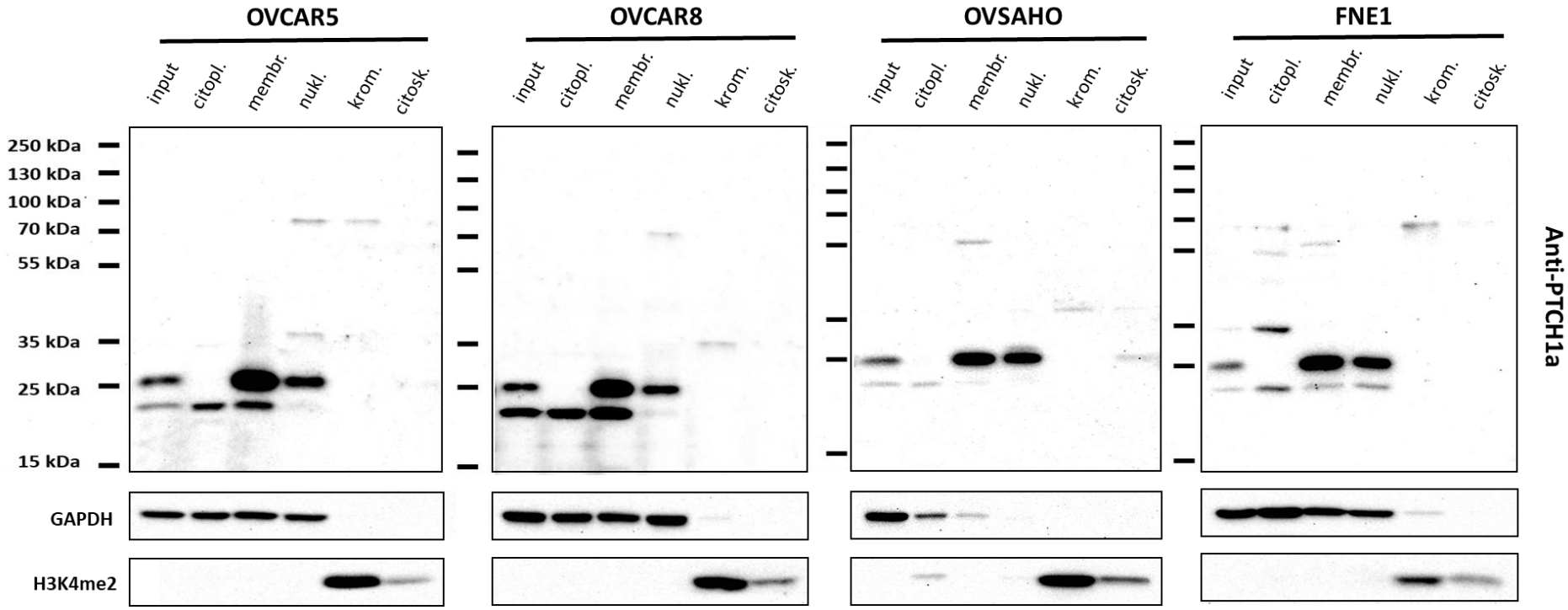
5.1.5. Substanična lokalizacija proteina PTCH1 u staničnim linijama

Substanična lokalizacija proteina PTCH1 u karcinomskim staničnim linijama OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, te kontrolnoj staničnoj liniji FNE1 analizirana je pomoću Western blota. Ekspresija proteina PTCH1 u različitim staničnim odjeljcima (citoplazmatski proteini, membranski proteini, slobodni jezgreni proteini, proteini vezani na kromatin i citoskeletni proteini) detektirana je uz pomoć četiri različita antitijela anti-PTCH1: anti-PTCH1a, anti-PTCH1b, anti-PTCH1c i anti-PTCH1d (Tablica 3). Uspješnost izolacije proteina iz različitih staničnih odjeljaka potvrđena je provjerom prisutnosti proteina H3K4me2 u kromatinskoj frakciji i proteina GAPDH u citoplazmatskoj, membranskoj i jezgrenoj frakciji (Slike 21-24). Analizom ukupnih proteina potvrđena je prisutnost proteina PTCH1 u svim staničnim linijama koristeći sva četiri antitijela anti-PTCH1 (Slika 21-24).

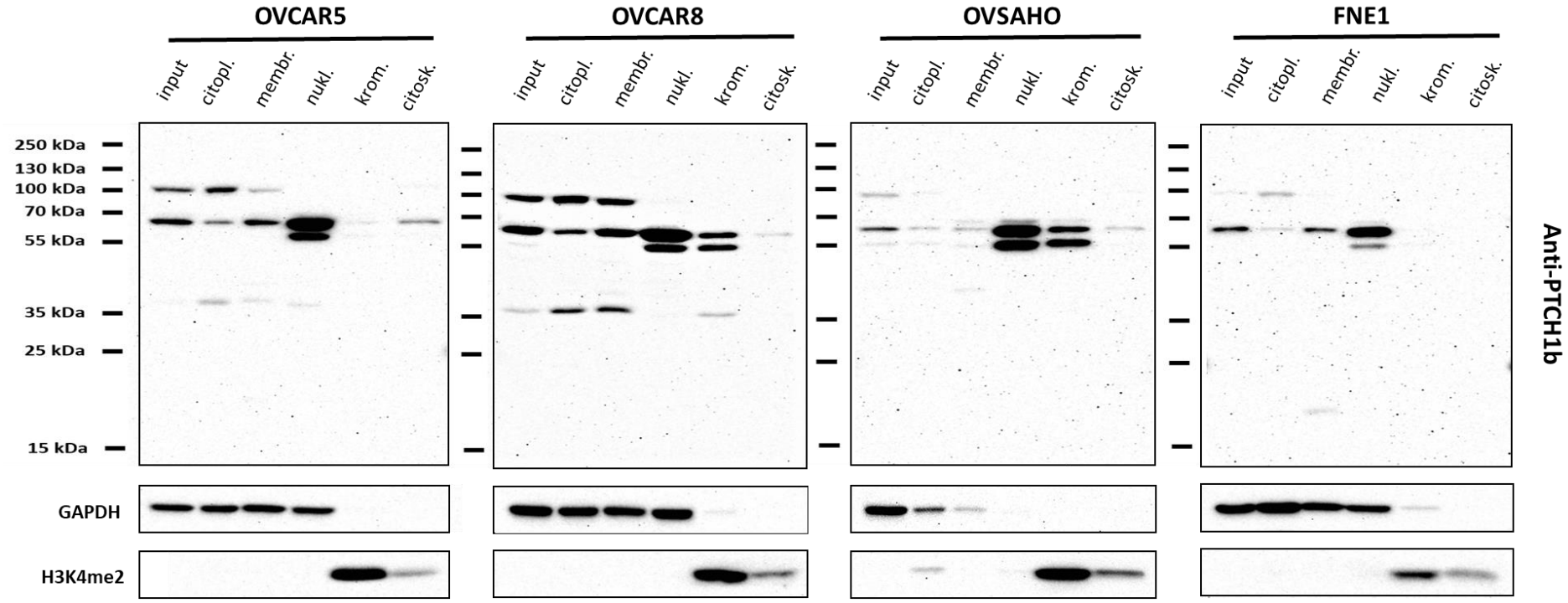
Protein PTCH1 detektiran pomoću antitijela anti-PTCH1a bio je prisutan u citoplazmatskoj, membranskoj, jezgrenoj i kromatinskoj frakciji u svim staničnim linijama, s najvećom zastupljenosti u membranskoj i jezgrenoj frakciji, dok je u citoskeletnoj frakciji bio prisutan samo u staničnoj liniji OVSAHO (Slika 21).

Protein PTCH1 detektiran pomoću antitijela anti-PTCH1b bio je prisutan u citoplazmatskoj, membranskoj i jezgrenoj frakciji u svim staničnim linijama, s najvećom zastupljenosti u jezgrenoj frakciji, dok je u kromatinskoj frakciji bio prisutan u staničnim linijama OVCAR8 i OVSAHO, a u citoskeletnoj frakciji u svim osim u staničnoj liniji FNE1 (Slika 22).

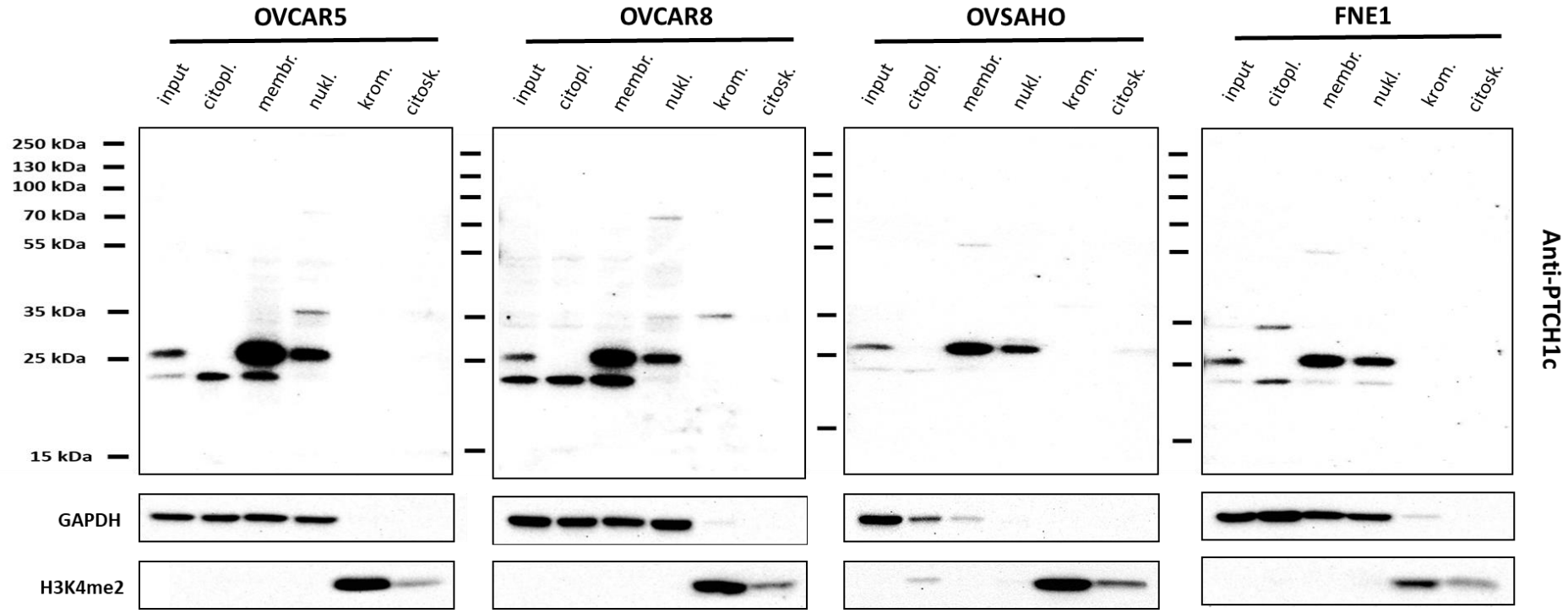
Protein PTCH1 detektiran pomoću antitijela anti-PTCH1c bio je prisutan u membranskoj i jezgrenoj frakciji u svim staničnim linijama, u citoplazmatskoj frakciji u svim osim u staničnoj liniji OVSAHO, dok je u kromatinskoj frakciji bio zastupljen samo u staničnoj liniji OVCAR8 (Slika 23). Navedeni protein bio je najviše zastupljen u membranskoj i jezgrenoj frakciji u svim staničnim linijama (Slika 23).



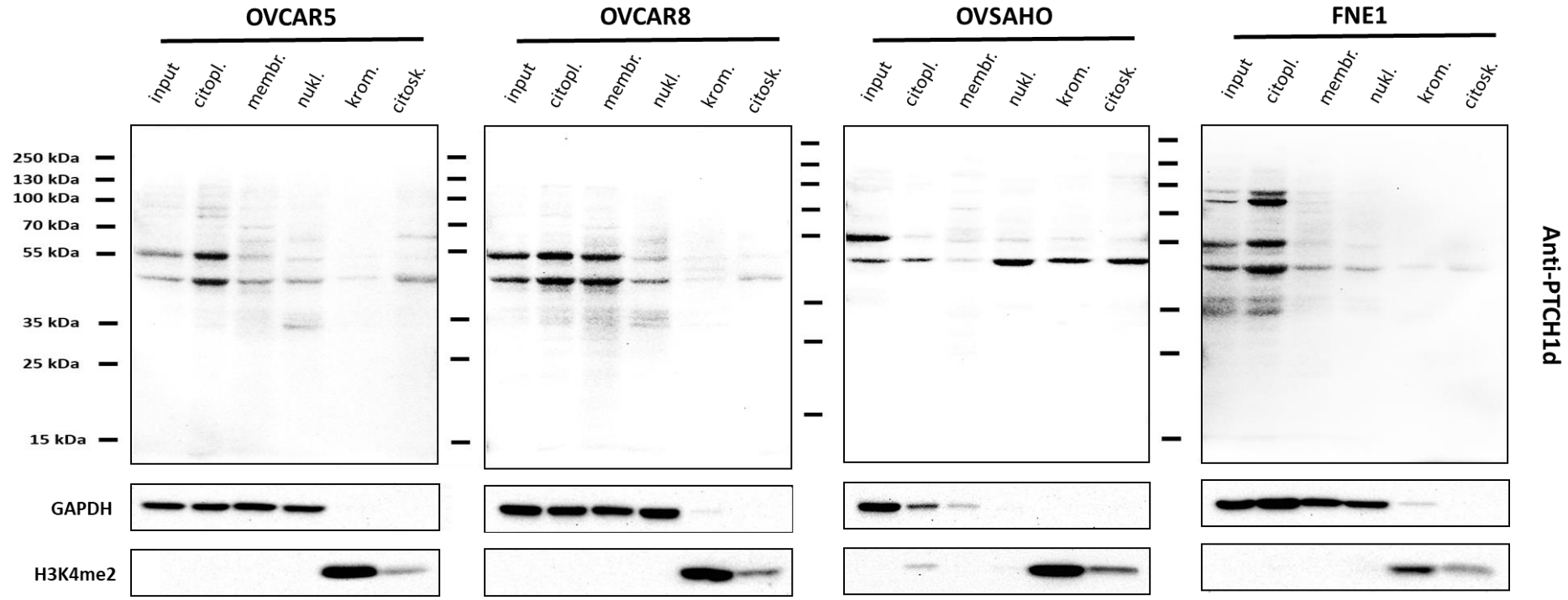
Slika 21. Substanična lokalizacija proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1, detektirana Western blotom pomoću antitijela anti-PTCH1a. input – ukupni proteini; citopl. – citoplazmatski proteini; membr. – membranski proteini; nukl. – slobodni jezgreni proteini; krom. – proteini vezani na kromatin; citosk. – citoskeletni proteini



Slika 22. Substanična lokalizacija proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1, detektirana Western blotom pomoću antitijela anti-PTCH1b. input – ukupni proteini; citopl. – citoplazmatski proteini; membr. – membranski proteini; nukl. – slobodni jezgreni proteini; krom. – proteini vezani na kromatin; citosk. – citoskeletni proteini



Slika 23. Substanična lokalizacija proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1, detektirana Western blotom pomoću antitijela anti-PTCH1c. input – ukupni proteini; citopl. – citoplazmatski proteini; membr. – membranski proteini; nukl. – slobodni jezgreni proteini; krom. – proteini vezani na kromatin; citosk. – citoskeletni proteini



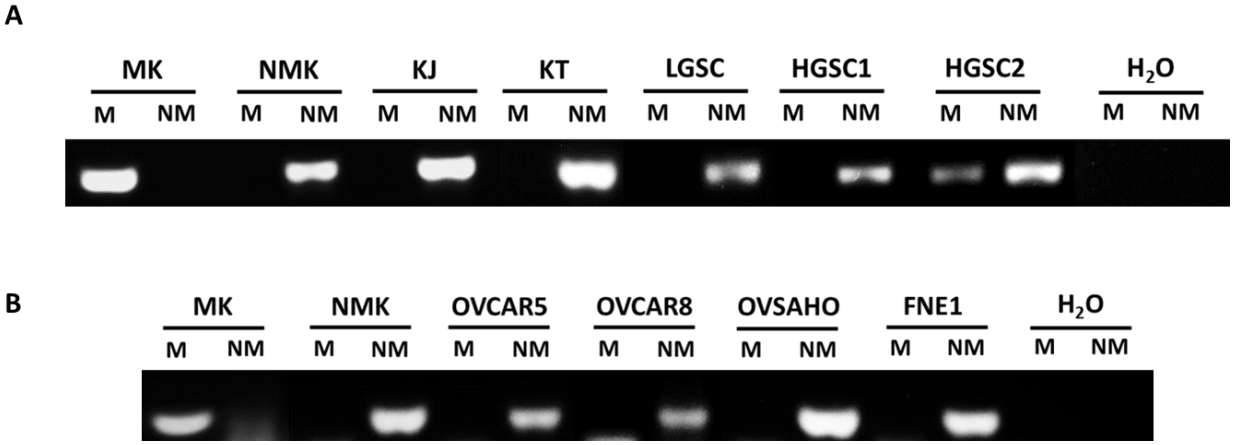
Slika 24. Substanična lokalizacija proteina PTCH1 u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1, detektirana Western blotom pomoću antitijela anti-PTCH1d. input – ukupni proteini; citopl. – citoplazmatski proteini; membr. – membranski proteini; nukl. – slobodni jezgreni proteini; krom. – proteini vezani na kromatin; citosk. – citoskeletni proteini

Protein PTCH1 detektiran pomoću antitijela anti-PTCH1d bio je prisutan u svim substaničnim frakcijama u svim staničnim linijama. U staničnim linijama OVCAR5 i FNE1 najviše je bio zastupljen u citoplazmatskoj frakciji, u staničnoj liniji OVCAR8 u citoplazmatskoj i membranskoj frakciji, a u staničnoj liniji OVSAHO u jezgrenoj, kromatinskoj i citoskeletnoj frakciji (Slika 24).

Korištenjem antitijela anti-PTCH1a, anti-PTCH1b i anti-PTCH1c, u staničnim linijama uglavnom je nađena nuklearna ekspresija, dok je korištenjem antitijela anti-PTCH1d uglavnom nađena citoplazmatska ekspresija. Korištenjem sva četiri antitijela, u pojedinim substaničnim frakcijama, detektirani su fragmenti proteina PTCH1 različite molekularne mase što upućuje na mogućnost proteolitičkog cijepanja ovog proteina (Slike 21-24).

5.2. Metilacija gena *PTCH1* u seroznim karcinomima jajnika

Metilacija DNA u promotoru gena *PTCH1* detektirana je u 13,5% (5/37) uzoraka karcinoma HGSC, dok u karcinomima LGSC i tkivu zdravog jajnika i jajovoda nije uočena metilacija ovog gena (Slika 25A). Analizirana je i povezanost metilacije DNA u promotoru gena *PTCH1* s ukupnom ekspresijom proteina PTCH1 na cijelom preparatu karcinoma HGSC pri čemu je utvrđeno da metilacija gena *PTCH1* nije povezana s razinom ekspresije proteina PTCH1 u karcinomima HGSC ($\rho = 0,079$; $p = 0,642$). Statistička analiza korelacije metilacije DNA u promotoru gena *PTCH1* s razinom ukupne ekspresije proteina PTCH1 na cijelom preparatu karcinoma LGSC i zdravog tkiva jajnika i jajovoda nije bila moguća jer je promotor gena *PTCH1* u svim navedenim skupinama u svim uzorcima bio nemetiliran. Promotor gena *PTCH1* bio je nemetiliran i u karcinomskim staničnim linijama OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO te kontrolnoj staničnoj liniji FNE1 (Slika 25B).



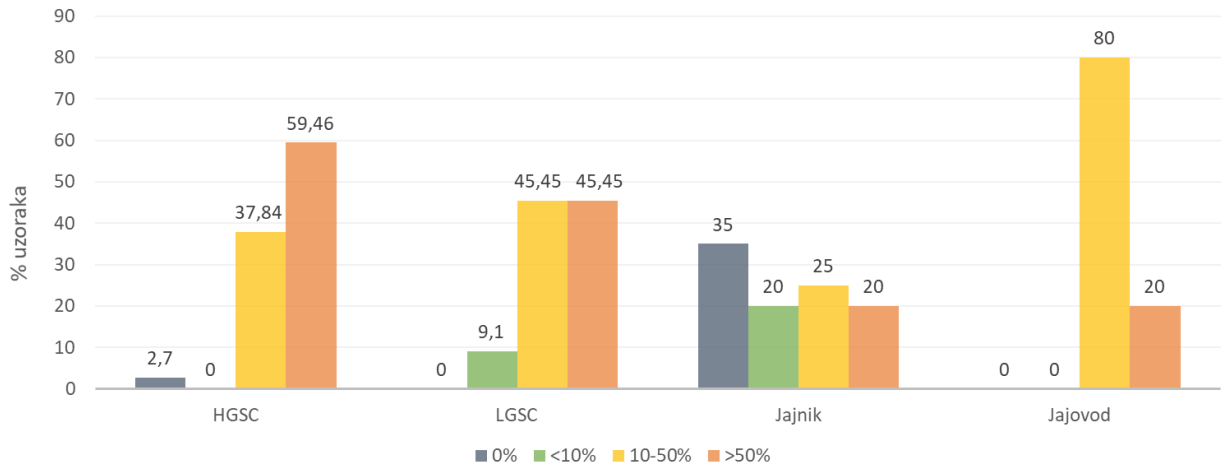
Slika 25. (A) Reprezentativni prikaz rezultata metilacije DNA u promotoru gena *PTCH1* u zdravom tkivu jajnika (KJ – kontrolno tkivo jajnika) i jajovoda (KT – kontrolno tkivo jajovoda/tuba) i seroznim karcinomima jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti. (B) Metilacija DNA u promotoru gena *PTCH1* u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO te staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1. M – metilirana reakcija; NM – nemetilirana reakcija; MK – pozitivna kontrola za metiliranu reakciju; NMK – pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju; voda (H_2O) – negativna kontrola

5.3. Ekspresija proteina SHh u seroznim karcinomima jajnika

Ukupna ekspresija proteina SHh (bez obzira na substaničnu lokalizaciju) analizirana je u tumorskom epitelu i vezivnoj stromi tumora kao i na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika, te u epitelnom i stromalnom tkivu i na cijelom preparatu zdravih jajnika i jajovoda. Razina ekspresije proteina SHh u karcinomima HGSC i LGSC uspoređena je s razinom ekspresije navedenog proteina u zdravom tkivu jajnika i jajovoda, kao i između tumorskih skupina, između kontrolnih skupina i između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih i kontrolnih skupina. Osim u zdravom i tumorskom tkivu, ekspresija proteina SHh analizirana je i u kontrolnoj i karcinomskim staničnim linijama.

5.3.1. Ukupna ekspresija proteina SHh u zdravom i tumorskom tkivu

U tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC, >50% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina SHh kod 59,45%, odnosno 45,45% uzoraka, dok je ekspresija proteina SHh u epitelu zdravog jajnika i epitelu zdravog jajovoda bila prisutna kod 20% uzoraka u >50% stanica u obje kontrolne skupine (Slika 26). Ekspresija proteina SHh bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu HGSC-a u odnosu na epitel zdravih jajnika ($p < 0,0001$) (Tablica 12; Slika 27A i C) i epitel zdravih jajovoda ($p = 0,04$) (Tablica 12; Slika 27A i D). Kod LGSC-a, ekspresija proteina SHh bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu nego u epitelu zdravih jajnika ($p = 0,015$) (Tablica 12; Slika 27B-C), dok značajne razlike u ekspresiji navedenog proteina u tumorskom epitelu u odnosu na zdravi epitel jajovoda nije bilo ($p = 0,409$) (Tablica 12; Slika 27B i D). U tumorskom epitelu nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji proteina SHh između karcinoma HGSC i LGSC ($p = 0,361$) (Tablica 12; Slika 27A-B), dok je u zdravom epitelu ekspresija ovog proteina bila statistički značajno veća u jajovodu nego u jajniku ($p = 0,041$) (Tablica 12; Slika 27C-D).



Slika 26. Ukupna ekspresija proteina SHh u tumorskom epitelu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i epitelu zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

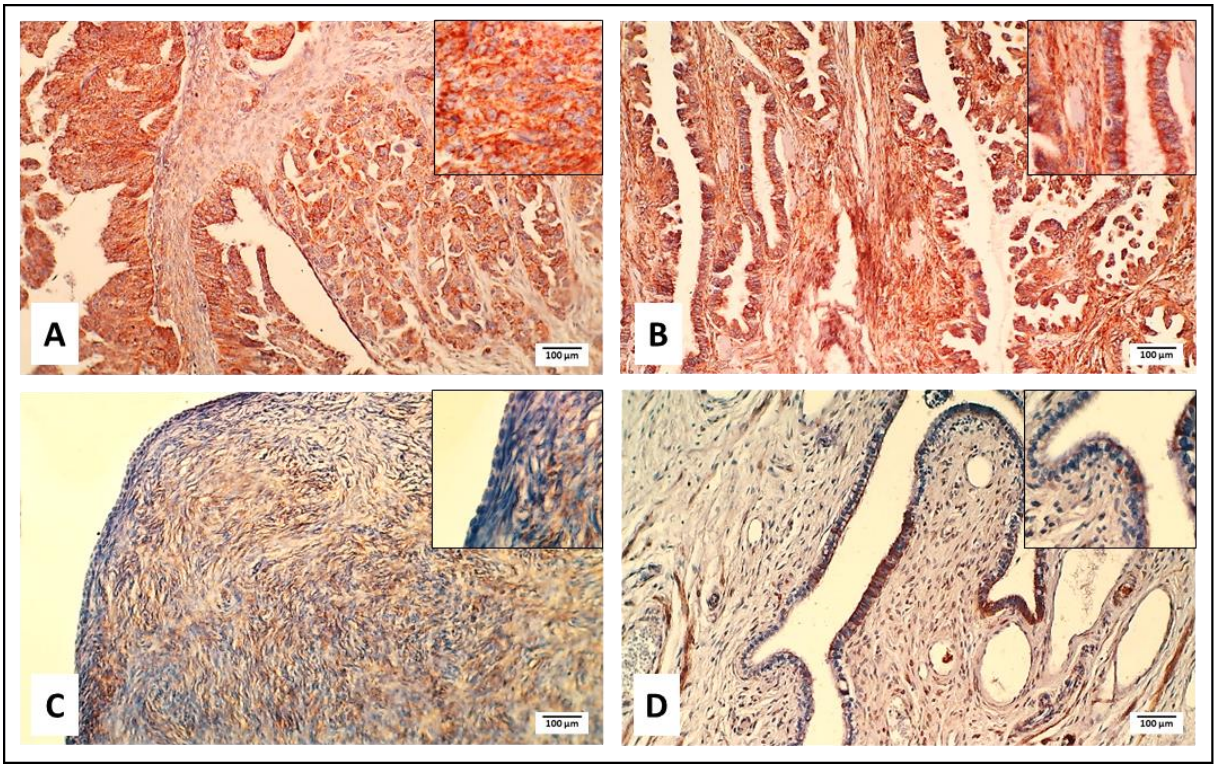
Tablica 12. Vrijednosti statističke analize ukupne ekspresije proteina SHh u tumorskom epitelu, vezivnoj stromi tumora i na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika te zdravom epitelu i stromalnom tkivu i cijelom preparatu jajnika i jajovoda određene imunohistokemijskom analizom.

	HGSC vs. Jajnik	**HGSC vs. Jajovod**	**LGSC vs. Jajnik**	**LGSC vs. Jajovod**	**HGSC vs. LGSC**	**Jajnik vs. Jajovod**
Mann-Whitney U test	Ukupna ekspresija proteina SHh u epitelu					
	U = 151,5 W = 361,5 Z = -3,928 **p < 0,0001**	U = 116 W = 171 Z = -2,051 **p = 0,04**	U = 53,5 W = 263,5 Z = -2,422 **p = 0,015**	U = 45 W = 100 Z = -0,826 p = 0,409	U = 171 W = 237 Z = -0,914 p = 0,361	U = 56 W = 266 Z = -2,044 **p = 0,041**
	Ukupna ekspresija proteina SHh u stromi					
	U = 290,5 W = 956,5 Z = -1,318 p = 0,187	U = 112,5 W = 167,5 Z = -1,928 p = 0,054*	U = 96 W = 306 Z = -0,626 p = 0,531	U = 28,5 W = 83,5 Z = -1,965 **p = 0,049**	U = 139,5 W = 805,5 Z = -1,603 p = 0,109	U = 47,5 W = 102,5 Z = -2,415 **p = 0,016**
	Ukupna ekspresija proteina SHh na cijelom preparatu					
	U = 282 W = 492 Z = -1,635 p = 0,102	U = 105,5 W = 160,5 Z = -2,298 **p = 0,022**	U = 85 W = 295 Z = -1,12 p = 0,263	U = 32,5 W = 87,5 Z = -1,707 p = 0,088	U = 203 W = 906 Z = -0,014 p = 0,989	U = 81,5 W = 136,5 Z = -0,878 p = 0,38

HGSC – serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno); * na granici statističke značajnosti

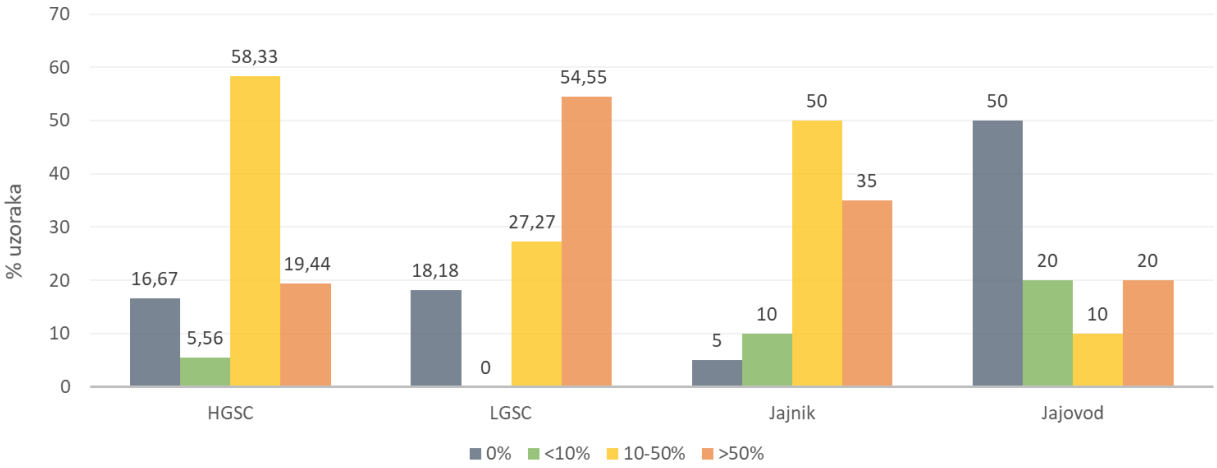
U vezivnoj stromi karcinoma HGSC i LGSC, >10% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina SHh u 77,77%, odnosno 81,82% uzoraka (Slika 28). U stromi zdravog tkiva jajnika, ekspresija proteina SHh bila je prisutna u >10% stanica u 85% uzoraka, dok je u stromi zdravog tkiva jajovoda 30% uzoraka bilo imunopozitivno na ekspresiju proteina SHh u >10% stanica (Slika 28). Ekspresija proteina SHh bila je statistički značajno veća u vezivnoj stromi LGSC-a u odnosu na stromu zdravog jajovoda ($p = 0,049$), kao i u stromi zdravog jajnika u odnosu na stromu zdravog jajovoda ($p = 0,016$) (Tablica 12; Slika 27). Kod HGSC-a, ekspresija proteina SHh bila je veća u vezivnoj stromi tumora nego u stromi zdravog jajovoda, ali bez postizanja statističke značajnosti ($p = 0,054$) (Tablica 12; Slika 27A i D). Statistički značajne razlike nije bilo u ekspresiji navedenog proteina u vezivnoj stromi HGSC-

a u odnosu na stromu zdravog jajnika, LGSC-a u odnosu na stromu zdravog jajnika, kao ni između HGSC-a i LGSC-a (Tablica 12; Slika 27).



Slika 27. Imunohistokemijsko bojanje proteina SHh u (A) seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC), (B) seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC), (C) zdravom tkivu jajnika i (D) zdravom tkivu jajovoda.

Ekspresija proteina SHh bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu nego vezivnoj stromi karcinoma HGSC ($p < 0,0001$), kao i u epitelu zdravih jajovoda u odnosu na njihovu stromu ($p = 0,025$), dok je u zdravim jajnicima ekspresija proteina SHh bila statistički značajno veća u stromalnom tkivu nego u epitelu ($p = 0,02$) (Tablica 13; Slika 27). U karcinomima LGSC nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji proteina SHh između tumorskog epitela i vezivne strome tumora ($p = 0,942$) (Tablica 13; Slika 27B).



Slika 28. Ukupna ekspresija proteina SHh u vezivnoj stromi seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i stromi zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

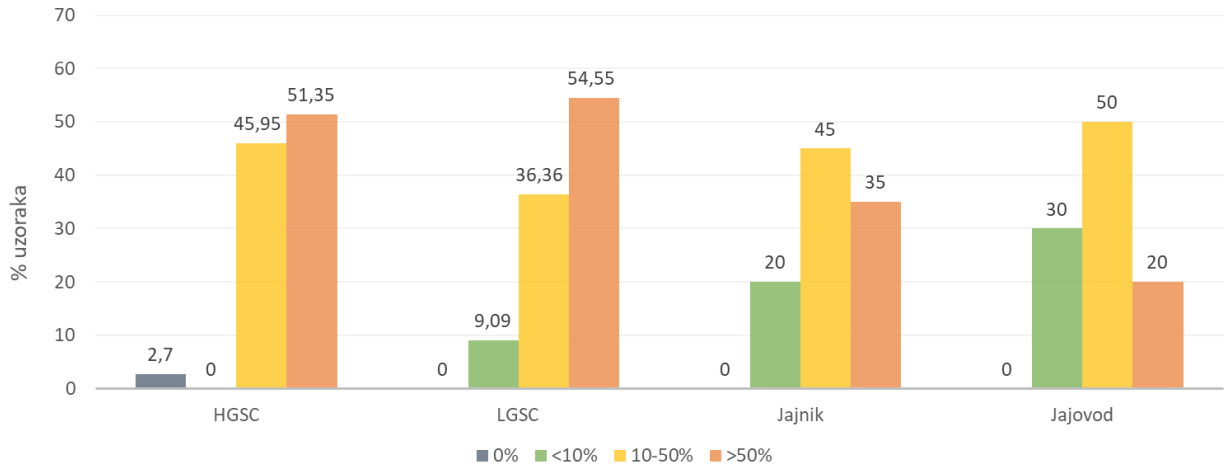
Tablica 13. Usporedba ukupne ekspresije proteina SHh između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih (HGSC i LGSC) i kontrolnih skupina (jajnik i jajovod) određene imunohistokemijskom analizom.

	SHh – epitel vs. stroma			
	HGSC	**LGSC**	**Jajnik**	**Jajovod**
MW	U = 351,5 W = 1017,5 Z = -3,675 **p < 0,0001**	U = 59,5 W = 125,5 Z = -0,072 p = 0,942	U = 117,5 W = 327,5 Z = -2,332 **p = 0,02**	U = 22 W = 77 Z = -2,248 **p = 0,025**

HGSC – serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti; MW – Mann-Whitney U test; podebljano – p < 0,05 (statistički značajno)

Na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) karcinoma HGSC, >10% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina SHh u 97,3% uzoraka, dok je na cijelom preparatu karcinoma LGSC ekspresija navedenog proteina bila prisutna kod 90,91% uzoraka u >10% stanica (Slika 29). Na cijelom preparatu zdravog tkiva jajnika i zdravog tkiva jajovoda, >10% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina SHh u 80%, odnosno

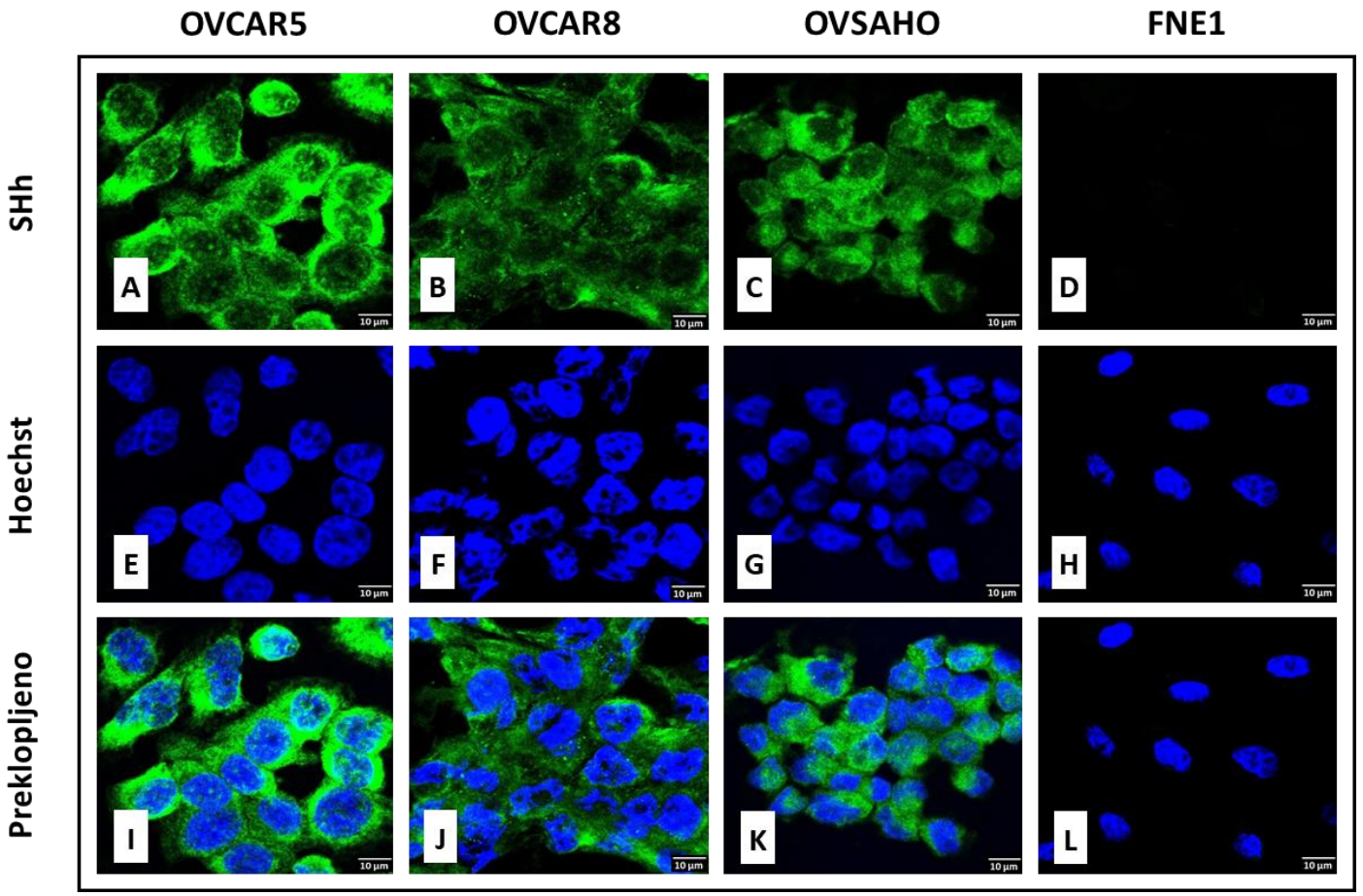
70% uzoraka (Slika 29). Ekspresija proteina SHh bila je statistički značajno veća u tumorskom tkivu HGSC-a u odnosu na zdravo tkivo jajovoda (p = 0,022) (Tablica 12; Slika 27A i C). Ekspresija proteina SHh nije bila statistički značajno različita u tumorskom tkivu HGSC-a u odnosu na zdravo tkivo jajnika, u tumorskom tkivu LGSC-a u odnosu na zdravo tkivo jajnika i zdravo tkivo jajovoda, između karcinoma HGSC i LGSC, kao ni između zdravih jajnika i jajovoda (Tablica 12; Slika 27).



Slika 29. Ukupna ekspresija proteina SHh na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

5.3.2. Ekspresija proteina SHh u staničnim linijama

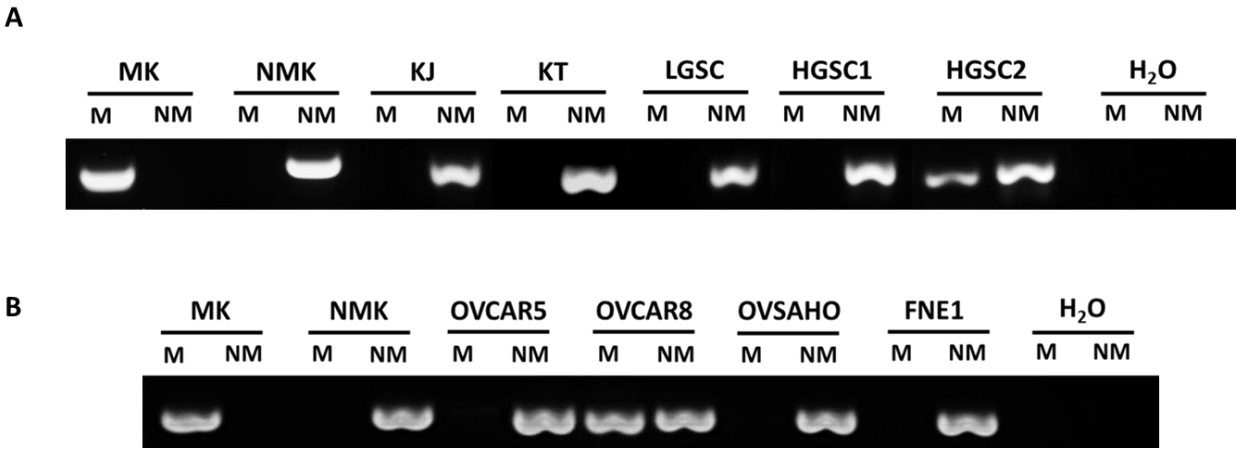
Visoka razina ekspresije proteina SHh uočena je u staničnim linijama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, dok u staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1, nije bilo ekspresije ovog proteina (Slika 30). Ekspresija proteina SHh najviše je bila zastupljena u OVCAR5, a najmanje u staničnoj liniji OVCAR8. Citoplazmatska ekspresija navedenog proteina bila je visoko izražena u svim karcinomskim staničnim linijama, dok je njegova prisutnost vidljiva i na staničnoj membrani (Slika 30).



Slika 30. Imunofluorescencijsko bojanje proteina SHh u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5 (A, E, I), OVCAR8 (B, F, J) i OVSAHO (C, G, K) i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1 (D, H, L). Jezgre obojene bojom Hoechst (E-H). Preklopljene slike (I-L).

5.4. Metilacija gena *SHh* u seroznim karcinomima jajnika

Metilacija DNA u promotoru gena *SHh* detektirana je u dva od ukupno 37 uzoraka (5,4%) karcinoma HGSC. U karcinomima LGSC i tkivu zdravog jajnika i jajovoda, metilacija DNA u promotoru ovog gena nije bila prisutna (Slika 31A). Analizom povezanosti metilacije DNA u promotoru gena *SHh* s ukupnom ekspresijom proteina SHh na cijelom preparatu karcinoma HGSC utvrđeno je da metilacija gena *SHh* nije povezana s razinom ekspresije proteina SHh u karcinomima HGSC (ρ = -0,23; p = 0,171). Statistička analiza korelacije metilacije DNA u promotoru gena *SHh* s razinom ukupne ekspresije proteina SHh na cijelom preparatu karcinoma LGSC i zdravog tkiva jajnika i jajovoda nije bila moguća jer je promotor gena *SHh* u svim navedenim skupinama kod svih uzoraka bio nemetiliran. Metilacija DNA u promotoru gena *SHh* detektirana je u karcinomskoj staničnoj liniji OVCAR8, dok metilacija ovog gena nije bila prisutna u ostalim karcinomskim staničnim linijama, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, te kontrolnoj staničnoj liniji FNE1 (Slika 31B).



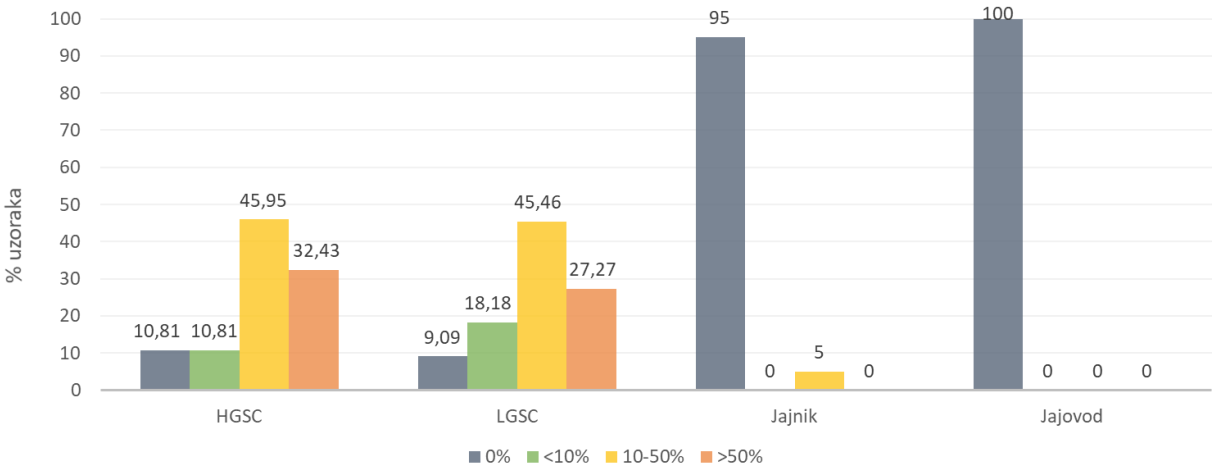
Slika 31. (A) Reprezentativni prikaz rezultata metilacije DNA u promotoru gena *SHh* u zdravom tkivu jajnika (KJ – kontrolno tkivo jajnika) i jajovoda (KT – kontrolno tkivo jajovoda/tuba) i seroznim karcinomima jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti. (B) Metilacija DNA u promotoru gena *SHh* u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO te staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1. M – metilirana reakcija; NM – nemetilirana reakcija; MK – pozitivna kontrola za metiliranu reakciju; NMK – pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju; voda (H_2O) – negativna kontrola

5.5. Ekspresija proteina IHh u seroznim karcinomima jajnika

Ukupna ekspresija proteina IHh (bez obzira na substaničnu lokalizaciju) analizirana je u tumorskom epitelu i vezivnoj stromi tumora kao i na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika, te u epitelu i stromalnom tkivu i na cijelom preparatu zdravih jajnika i jajovoda. Razina ekspresije proteina IHh u karcinomima HGSC i LGSC uspoređena je s razinom ekspresije navedenog proteina u zdravom tkivu jajnika i jajovoda, kao i između tumorskih skupina, između kontrolnih skupina i između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih i kontrolnih skupina. Osim u zdravom i tumorskom tkivu, ekspresija proteina IHh analizirana je i u kontrolnoj i karcinomskim staničnim linijama.

5.5.1. Ukupna ekspresija proteina IHh u zdravom i tumorskom tkivu

Ekspresija proteina IHh u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC bila je prisutna u 78,38%, odnosno 72,73% uzoraka u >10% stanica (Slika 32). U epitelu zdravog tkiva jajnika, ekspresija proteina SHh nije bila prisutna kod 95% uzoraka, dok je kod preostalih 5% uzoraka bila prisutna u 10-50% stanica (Slika 32). U epitelu zdravog tkiva jajovoda, ekspresija proteina IHh nije bila prisutna ni u jednom uzorku (Slika 32). Ekspresija proteina IHh bila je statistički značajno veća u tumorskom epitelu HGSC-a u odnosu na epitel zdravih jajnika ($p < 0,0001$) (Tablica 14; Slika 33A i C) i epitel zdravih jajovoda ($p < 0,0001$) (Tablica 14; Slika 33A i D). Kod LGSC-a, ekspresija proteina IHh također je bila statistički značajno veća u tumorskom epitelu nego u epitelu zdravih jajnika ($p < 0,0001$) (Tablica 14; Slika 33B-C) i epitelu zdravih jajovoda ($p < 0,0001$) (Tablica 14; Slika 33B i D). U tumorskom epitelnom tkivu nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji proteina IHh između karcinoma HGSC i LGSC ($p = 0,713$), kao ni u epitelnom tkivu između jajnika i jajovoda ($p = 0,48$) (Tablica 14; Slika 33).

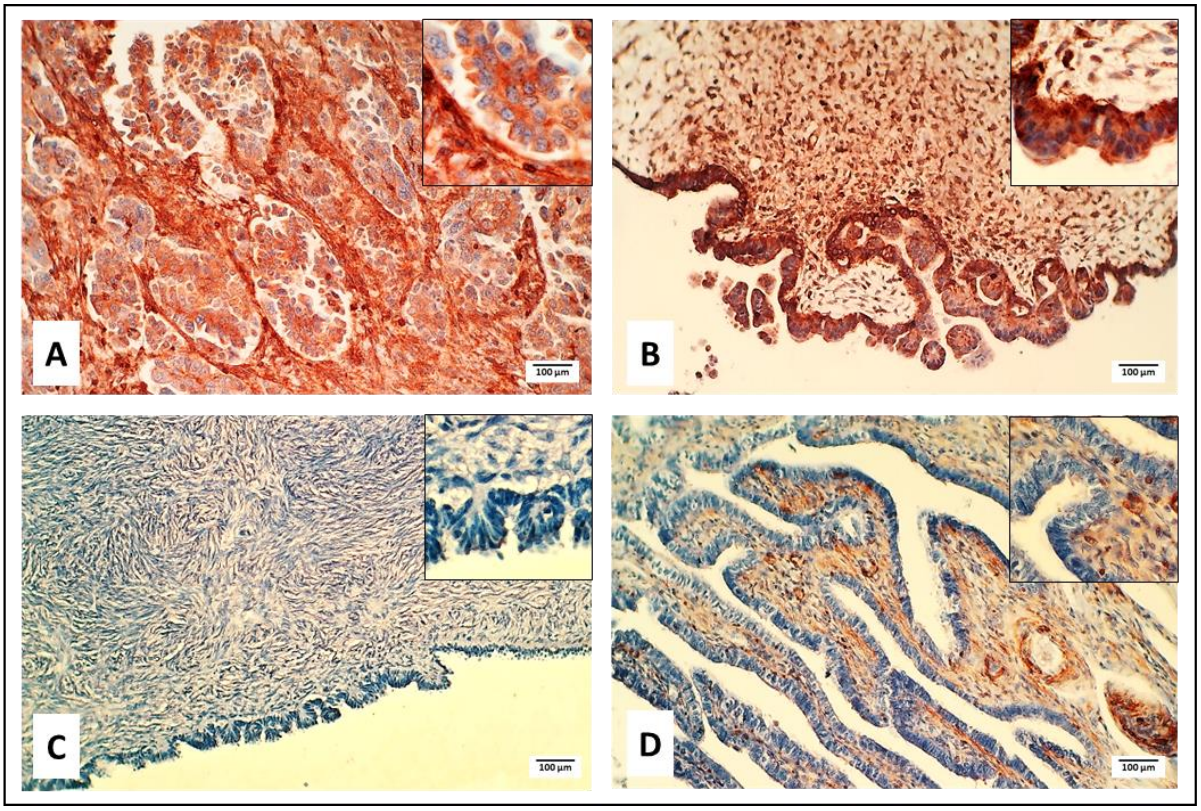


Slika 32. Ukupna ekspresija proteina IHh u tumorskom epitelu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i epitelu zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

Tablica 14. Vrijednosti statističke analize ukupne ekspresije proteina IHh u tumorskom epitelu, vezivnoj stromi tumora i na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika te zdravom epitelu i stromalnom tkivu i cijelom preparatu jajnika i jajovoda određene imunohistokemijskom analizom.

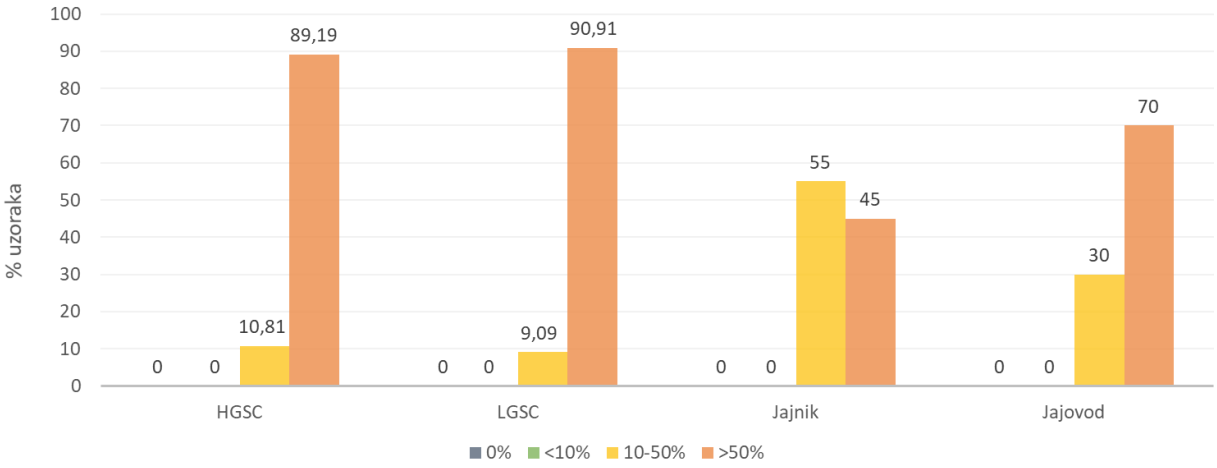
	HGSC vs. Jajnik	**HGSC vs. Jajovod**	**LGSC vs. Jajnik**	**LGSC vs. Jajovod**	**HGSC vs. LGSC**	**Jajnik vs. Jajovod**
Mann-Whitney U test	Ukupna ekspresija proteina IHh u epitelu					
	U = 54,4 W = 264,5 Z = -5,581 **p < 0,0001**	U = 20 W = 75 Z = -4,498 **p < 0,0001**	U = 15 W = 225 Z = -4,61 **p < 0,0001**	U = 5 W = 60 Z = -3,84 **p < 0,0001**	U = 189,5 W = 255,5 Z = -0,368 p = 0,713	U = 95 W = 150 Z = -0,707 p = 0,48
	Ukupna ekspresija proteina IHh u stromi					
	U = 206,5 W = 416,5 Z = -3,584 **p < 0,0001**	U = 149,5 W = 204,5 Z = -1,496 p = 0,135	U = 59,5 W = 269,5 Z = -2,47 **p = 0,014**	U = 43,5 W = 98,5 Z = -1,189 p = 0,234	U = 200 W = 903 Z = -0,162 p = 0,871	U = 75 W = 285 Z = -1,272 p = 0,203
	Ukupna ekspresija proteina IHh na cijelom preparatu					
	U = 316 W = 526 Z = -1,023 p = 0,306	U = 85 W = 140 Z = -2,98 **p = 0,003**	U = 107,5 W = 173,5 Z = -0,116 p = 0,908	U = 35 W = 90 Z = -2,068 **p = 0,039**	U = 165,5 W = 231,5 Z = -1,067 p = 0,286	U = 65 W = 120 Z = -1,815 p = 0,069

HGSC – serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)



Slika 33. Imunohistokemijsko bojanje proteina IHh u (A) seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC), (B) seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC), (C) zdravom tkivu jajnika i (D) zdravom tkivu jajovoda.

U vezivnoj stromi karcinoma HGSC i LGSC, >50% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina IHh kod 89,19%, odnosno 90,91% uzoraka, dok je ekspresija proteina IHh u epitelu zdravog jajnika i epitelu zdravog jajovoda bila je prisutna kod 45%, odnosno 70% uzoraka u >50% stanica (Slika 34). Ekspresija proteina IHh bila je statistički značajno veća u vezivnoj stromi HGSC-a u odnosu na stromu zdravih jajnika ($p < 0,0001$) (Tablica 14; Slika 33A i C), kao i u vezivnoj stromi LGSC-a u odnosu na stromu zdravih jajnika ($p = 0,014$) (Tablica 14; Slika 33B-C). Statistički značajne razlike nije bilo u ekspresiji navedenog proteina u vezivnoj stromi HGSC-a u odnosu na stromu zdravih jajovoda, LGSC-a u odnosu na stromu zdravih jajovoda, između HGSC-a i LGSC-a, kao ni između zdravih jajnika i jajovoda (Tablica 14; Slika 33).



Slika 34. Ukupna ekspresija proteina IHh u vezivnoj stromi seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i stromi zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

Ekspresija proteina IHh bila je statistički značajno veća u vezivnoj stromi tumora u odnosu na tumorsko epitelno tkivo karcinoma HGSC ($p < 0,0001$) i LGSC ($p = 0,003$), kao i u stromi zdravih jajnika ($p < 0,0001$) i jajovoda ($p < 0,0001$) u odnosu na njihov epitel (Tablica 15; Slika 33).

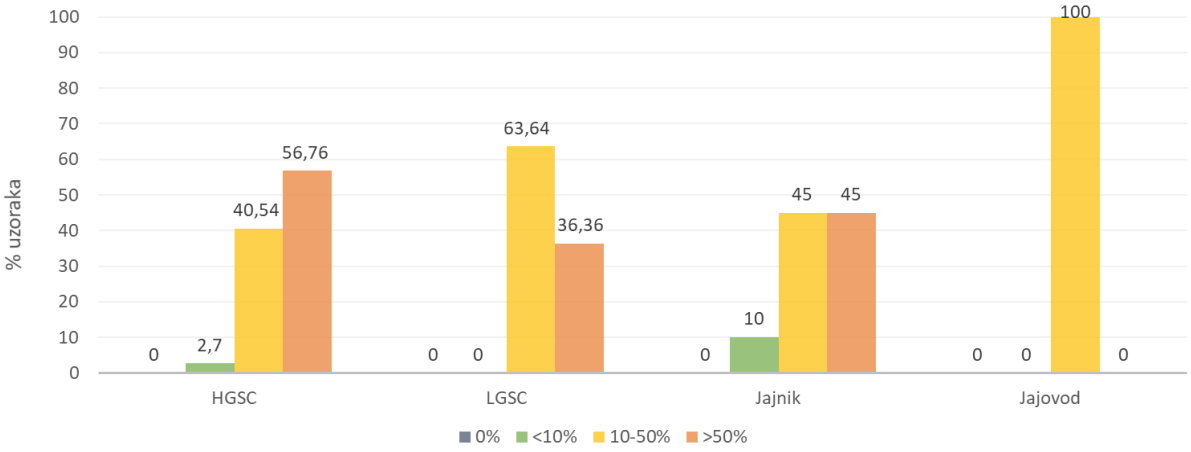
Tablica 15. Usporedba ukupne ekspresije proteina IHh između epitelnog i stromalnog tkiva unutar pojedinih tumorskih (HGSC i LGSC) i kontrolnih skupina (jajnik i jajovod) određene imunohistokemijskom analizom.

	IHh – epitel vs. stroma			
	HGSC	**LGSC**	**Jajnik**	**Jajovod**
MW	U = 280 W = 983 Z = -5,042 **p < 0,0001**	U = 20,5 W = 86,5 Z = -2,985 **p = 0,003**	U = 5,5 W = 215,5 Z = -5,69 **p < 0,0001**	U = 0 W = 55 Z = -4,147 **p < 0,0001**

HGSC – serozni karcinomi jajnika visokog stupnja malignosti; LGSC – serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti; MW – Mann-Whitney U test; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

Na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) HGSC-a i LGSC-a, >50% stanica bilo je imunopozitivno na ekspresiju proteina IHh u 56,76%, odnosno 36,36% uzoraka (Slika 35). Na cijelom preparatu zdravog tkiva jajnika, >50% stanica bilo je imunopozitivno

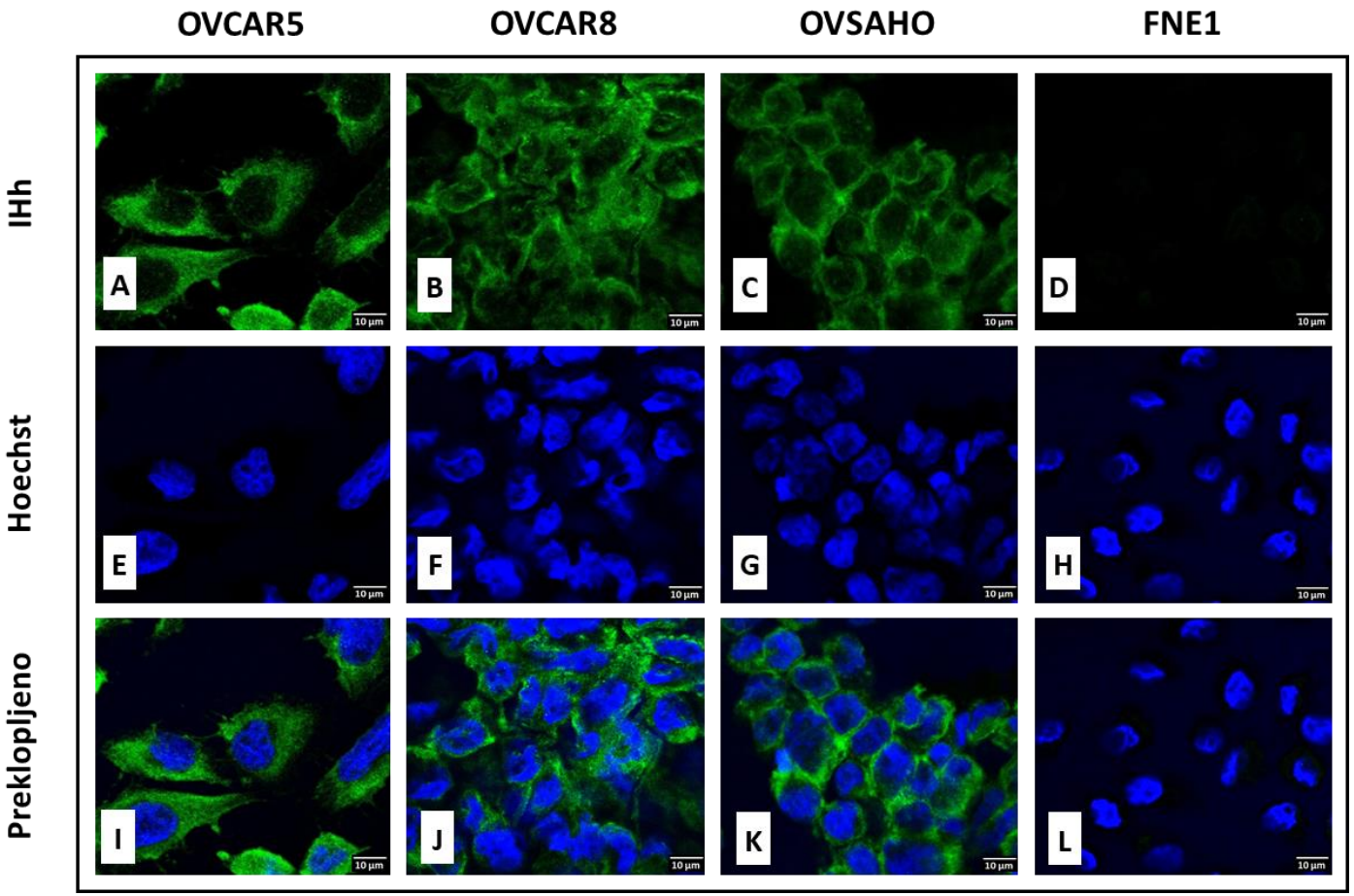
na ekspresiju proteina IHh u 45% uzoraka, dok na cijelom preparatu zdravog tkiva jajovoda nijedan uzorak nije imao ekspresiju navedenog proteina u >50% stanica (Slika 35). Ekspresija proteina IHh bila je statistički značajno veća u tumorskom tkivu HGSC-a u odnosu na tkivo zdravih jajovoda (p = 0,003) (Tablica 14; Slika 33A i D). Kod karcinoma LGSC, ekspresija proteina IHh također je bila statistički značajno veća u tumorskom tkivu nego u tkivu zdravih jajovoda (p = 0,039) (Tablica 14; Slika 33B i D). Ekspresija proteina IHh nije bila statistički značajno različita u tumorskom tkivu HGSC-a u odnosu na zdravo tkivo jajnika, LGSC-a u odnosu na zdravo tkivo jajnika, između karcinoma HGSC i LGSC, kao ni između jajnika i jajovoda (Tablica 14; Slika 33).



Slika 35. Ukupna ekspresija proteina IHh na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti i zdravih jajnika i jajovoda određena imunohistokemijskom analizom (0%, <10%, 10-50%, >50% – postotak imunopozitivnih stanica).

5.5.2. Ekspresija proteina IHh u staničnim linijama

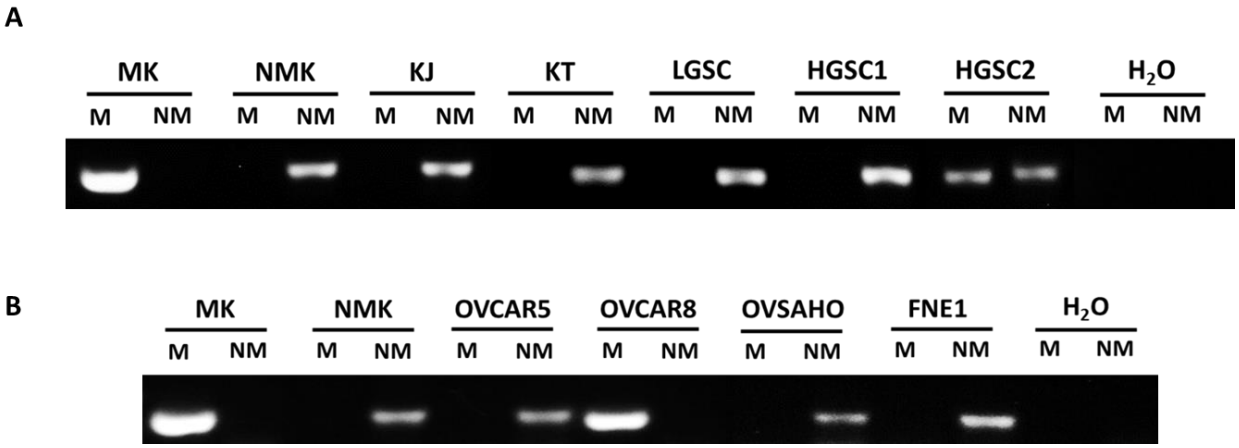
Visoka razina ekspresije proteina IHh uočena je u staničnim linijama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, dok u staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1, ekspresija ovog proteina nije bila prisutna (Slika 36). Citoplazmatska ekspresija navedenog proteina bila je izražena u svim karcinomskim staničnim linijama, dok je uočljiva njegova prisutnost i na staničnoj membrani. Citoplazmatska ekspresija proteina IHh najviše je bila zastupljena u staničnoj liniji OVCAR5, dok je membranska ekspresija navedenog proteina najviše bila zastupljena u staničnoj liniji OVSAHO (Slika 36).



Slika 36. Imunofluorescencijsko bojanje proteina IHh u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5 (A, E, I), OVCAR8 (B, F, J) i OVSAHO (C, G, K) i staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1 (D, H, L). Jezgre obojene bojom Hoechst (E-H). Preklopljene slike (I-L).

5.6. Metilacija gena *IHh* u seroznim karcinomima jajnika

Metilacija DNA u promotoru gena *IHh* detektirana je u samo 2,7% (1/37) uzoraka karcinoma HGSC, dok u karcinomima LGSC i tkivu zdravog jajnika i jajovoda metilacija ovog gena nije nađena (Slika 37A). Analizirana je i povezanost metilacije DNA u promotoru gena *IHh* s ukupnom ekspresijom proteina IHh na cijelom preparatu karcinoma HGSC pri čemu je utvrđeno da metilacija gena *IHh* nije povezana s razinom ekspresije proteina IHh u karcinomima HGSC ($\rho = 0,18$; $p = 0,286$). Statistička analiza korelacije metilacije DNA u promotoru gena *IHh* s razinom ukupne ekspresije proteina IHh na cijelom preparatu karcinoma LGSC i zdravog tkiva jajnika i jajovoda nije bila moguća jer je promotor gena *IHh* u svim navedenim skupinama u svim uzorcima bio nemetiliran. Promotor gena *IHh* bio je nemetiliran i u karcinomskim staničnim linijama OVCAR5 i OVSAHO te kontrolnoj staničnoj liniji FNE1, dok je u karcinomskoj staničnoj liniji OVCAR8 promotor ovog gena bio metiliran (Slika 37B).



Slika 37. (A) Reprezentativni prikaz rezultata metilacije DNA u promotoru gena *IHh* u zdravom tkivu jajnika (KJ – kontrolno tkivo jajnika) i jajovoda (KT – kontrolno tkivo jajovoda/tuba) i seroznim karcinomima jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti. (B) Metilacija DNA u promotoru gena *IHh* u staničnim linijama seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO te staničnoj liniji normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane telomeraznom reverznom transkriptazom, FNE1. M – metilirana reakcija; NM – nemetilirana reakcija; MK – pozitivna kontrola za metiliranu reakciju; NMK – pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju; voda (H_2O) – negativna kontrola

5.7. Korelacijska analiza ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravom i tumorskom tkivu

Međusobna korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh analizirana je u tumorskom epitelu i vezivnoj stromi tumora kao i na cijelom preparatu seroznih karcinoma jajnika, te u epitelu i stromalnom tkivu i na cijelom preparatu zdravih jajnika i jajovoda. Korelacija je ispitana međusobnom usporedbom razina ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u navedenim tkivima određenim imunohistokemijskom analizom. Kod proteina PTCH1 ispitana je povezanost nuklearne (n), citoplazmatske (c) i ukupne (u) ekspresije s ukupnom ekspresijom proteina SHh i IHh. Budući da su proteini SHh i IHh-ligandi koji mogu difundirati u tkivu, korelacija proteina PTCH1, SHh i IHh ispitana je i između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome tumora te epitelnog i stromalnog tkiva zdravih jajnika i jajovoda.

5.7.1. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti

U tumorskom epitelu karcinoma HGSC uočena je slaba pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) i SHh ($\rho = 0,46$; $p = 0,004$), PTCH1 (u) i SHh ($\rho = 0,453$; $p = 0,005$), PTCH1 (n) i IHh ($\rho = 0,331$; $p = 0,046$) i PTCH1 (c) i IHh ($\rho = 0,367$; $p = 0,025$). Trend pozitivne korelacije uočen je i između proteina PTCH1 (u) i IHh, ali bez postizanja statističke značajnosti ($\rho = 0,313$; $p = 0,059$). Povezanosti ekspresije proteina PTCH1 (c) i SHh, kao ni između SHh i IHh, nije bilo (Tablica 16; Slika 38).

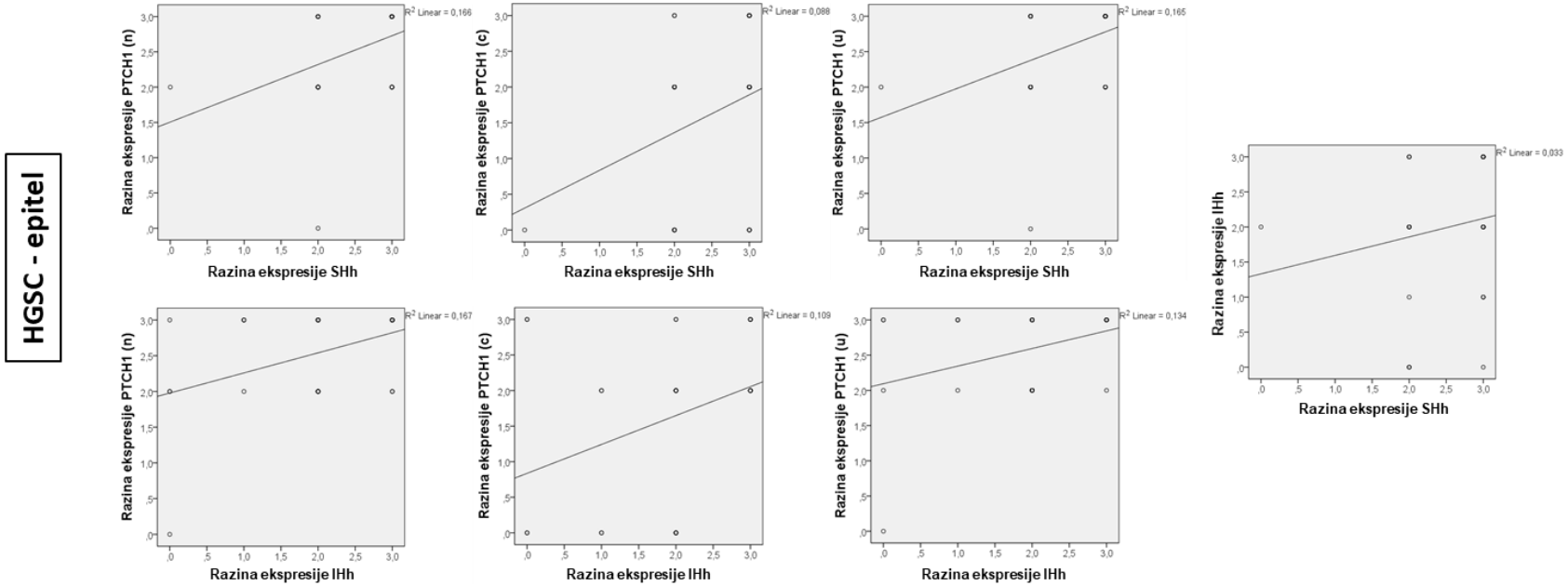
U vezivnoj stromi HGSC-a utvrđena je slaba pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (c) i IHh ($\rho = 0,39$; $p = 0,017$) i proteina PTCH1 (u) i IHh ($\rho = 0,449$; $p = 0,005$). Povezanost između proteina PTCH1 (n, c i u) i SHh, PTCH1 (n) i IHh i SHh i IHh nije ustanovljena (Tablica 17; Slika 39).

Na cijelom preparatu karcinoma HGSC detektirana je slaba pozitivna korelacija ekspresije proteina PTCH1 i SHh ($\rho = 0,457$; $p = 0,004$) i PTCH1 i IHh ($\rho = 0,43$; $p = 0,008$), dok povezanosti između proteina SHh i IHh nije bilo (Tablica 18; Slika 40).

Tablica 16. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u tumorskom epitelu seroznih karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

HGSC – tumorski epitel						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	ρ = 0,46; **p = 0,004**	ρ = 0,259; p = 0,121	ρ = 0,453; **p = 0,005**	-	ρ = 0,221; p = 0,189
	IHh	ρ = 0,331; **p = 0,046**	ρ = 0,367; **p = 0,025**	ρ = 0,313; p = 0,059*	ρ = 0,221; p = 0,189	-

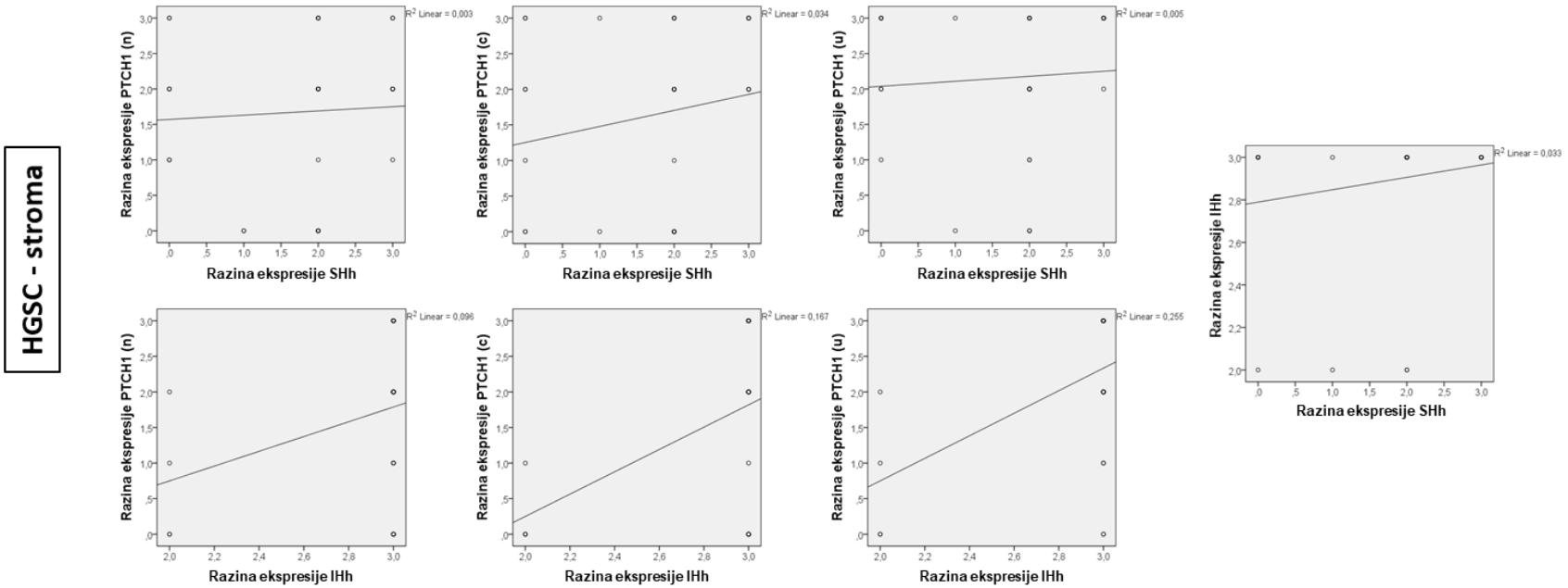
* na granici statističke značajnosti



Slika 38. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u tumorskom epitelu seroznih karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 17. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u vezivnoj stromi seroznih karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

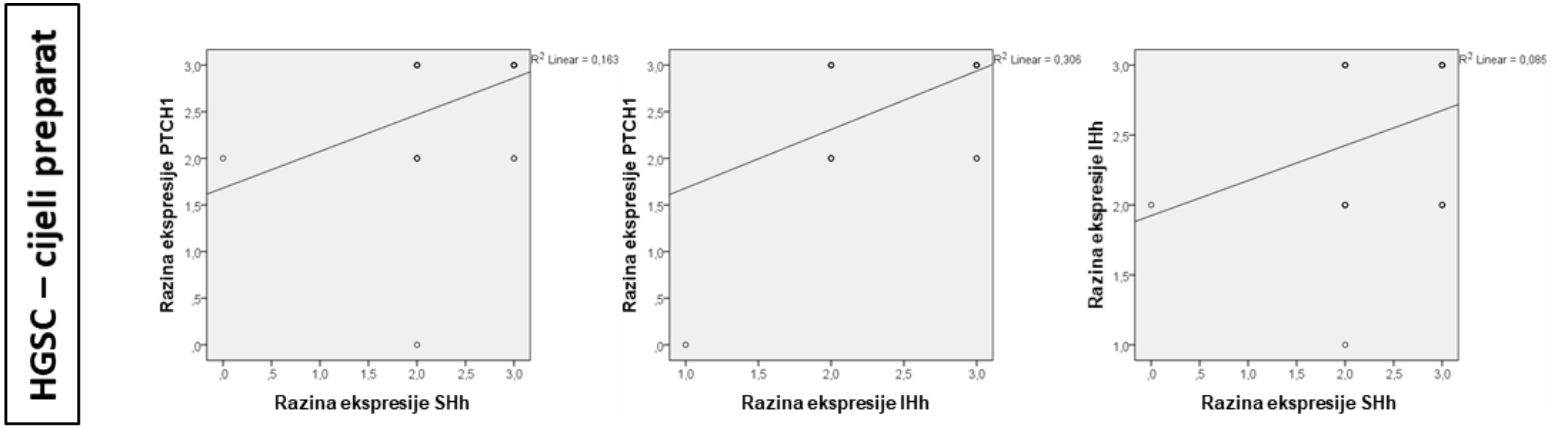
HGSC – vezivna stroma tumora						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	ρ = 0,125; p = 0,461	ρ = 0,234; p = 0,163	ρ = 0,163; p = 0,334	-	ρ = 0,214; p = 0,204
	IHh	ρ = 0,308; p = 0,064	ρ = 0,39; **p = 0,017**	ρ = 0,449; **p = 0,005**	ρ = 0,214; p = 0,204	-



Slika 39. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u vezivnoj stromi seroznih karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 18. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) seroznih karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) određene imunohistokemijskom analizom. SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

HGSC – cijeli preparat				
		PTCH1	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	$\rho = 0,457$; **p = 0,004**	-	$\rho = 0,275$; $p = 0,099$
	IHh	$\rho = 0,43$; **p = 0,008**	$\rho = 0,275$; $p = 0,099$	-



Slika 40. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) seroznih karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) određene imunohistokemijskom analizom.

U karcinomima HGSC uočena je pozitivna korelacija ekspresije proteina PTCH1 između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome tumora (Tablica 19). Slaba pozitivna korelacija utvrđena je u ekspresiji proteina PTCH1 (n) ($\rho = 0,421$; $p = 0,009$) i PTCH1 (c) ($\rho = 0,372$; $p = 0,023$) između epitelnog i stromalnog tkiva, dok je umjerena pozitivna korelacija ekspresije proteina PTCH1 (u) utvrđena između epitelnog i stromalnog tkiva ($\rho = 0,506$; $p = 0,001$) (Tablica 19). Slaba pozitivna korelacija uočena je i između ekspresije proteina PTCH1 (n) u epitelu i PTCH1 (c) u stromi ($\rho = 0,353$; $p = 0,032$), PTCH1 (n) u epitelu i PTCH1 (u) u stromi ($\rho = 0,469$; $p = 0,003$), PTCH1 (u) u epitelu i PTCH1 (n) u stromi ($\rho = 0,361$; $p = 0,028$) te PTCH1 (u) u epitelu i PTCH1 (c) u stromi ($\rho = 0,435$; $p = 0,007$), dok je umjerena, odnosno jaka pozitivna korelacija ekspresije uočena između proteina PTCH1 (c) u epitelu i PTCH1 (n) u stromi ($\rho = 0,536$; $p = 0,001$) i proteina PTCH1 (c) u epitelu i PTCH1 (u) u stromi ($\rho = 0,618$; $p < 0,0001$) (Tablica 19).

Tablica 19. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome u seroznim karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) određene imunohistokemijskom analizom.

			HGSC – epitel vs. stroma				
			Epitel				
Spearmanova korelacija			**PTCH1 (n)**	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
	Stroma	**PTCH1 (n)**	ρ = 0,421 **p = 0,009**	ρ = 0,536 **p = 0,001**	ρ = 0,361 **p = 0,028**	ρ = 0,254 p = 0,129	ρ = 0,426 **p = 0,009**
		PTCH1 (c)	ρ = 0,353 **p = 0,032**	ρ = 0,372 **p = 0,023**	ρ = 0,435 **p = 0,007**	ρ = 0,202 p = 0,23	ρ = 0,003 p = 0,987
		PTCH1 (u)	ρ = 0,469 **p = 0,003**	ρ = 0,618 **p < 0,0001**	ρ = 0,506 **p = 0,001**	ρ = 0,281 p = 0,092	ρ = 0,223 p = 0,185
		SHh	ρ = -0,013 p = 0,937	ρ = 0,003 p = 0,987	ρ = -0,068 p = 0,69	ρ = 0,126 p = 0,457	ρ = 0,042 p = 0,805
		IHh	ρ = 0,47 **p = 0,003**	ρ = 0,333 **p = 0,044**	ρ = 0,514 **p = 0,001**	ρ = 0,128 p = 0,449	ρ = 0,289 p = 0,083

n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

U karcinomima HGSC detektirana je i slaba pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) u epitelu i IHh u stromi ($\rho = 0,47$; $p = 0,003$), PTCH1 (c) u epitelu i IHh u stromi ($\rho = 0,333$; $p = 0,044$), IHh u epitelu i PTCH1 (n) u stromi ($\rho = 0,426$; $p = 0,009$), te umjerena pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (u) u epitelu i IHh u stromi ($\rho = 0,514$; $p = 0,001$) (Tablica 19).

5.7.2. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti

U tumorskom epitelu karcinoma LGSC utvrđena je jaka pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) i SHh ($\rho = 0,727$; $p = 0,011$), i PTCH1 (u) i SHh ($\rho = 0,642$; $p = 0,033$), dok povezanosti između proteina PTCH1 (c) i SHh, PTCH1 (n, c i u) i IHh, i SHh i IHh, nije bilo (Tablica 20; Slika 41).

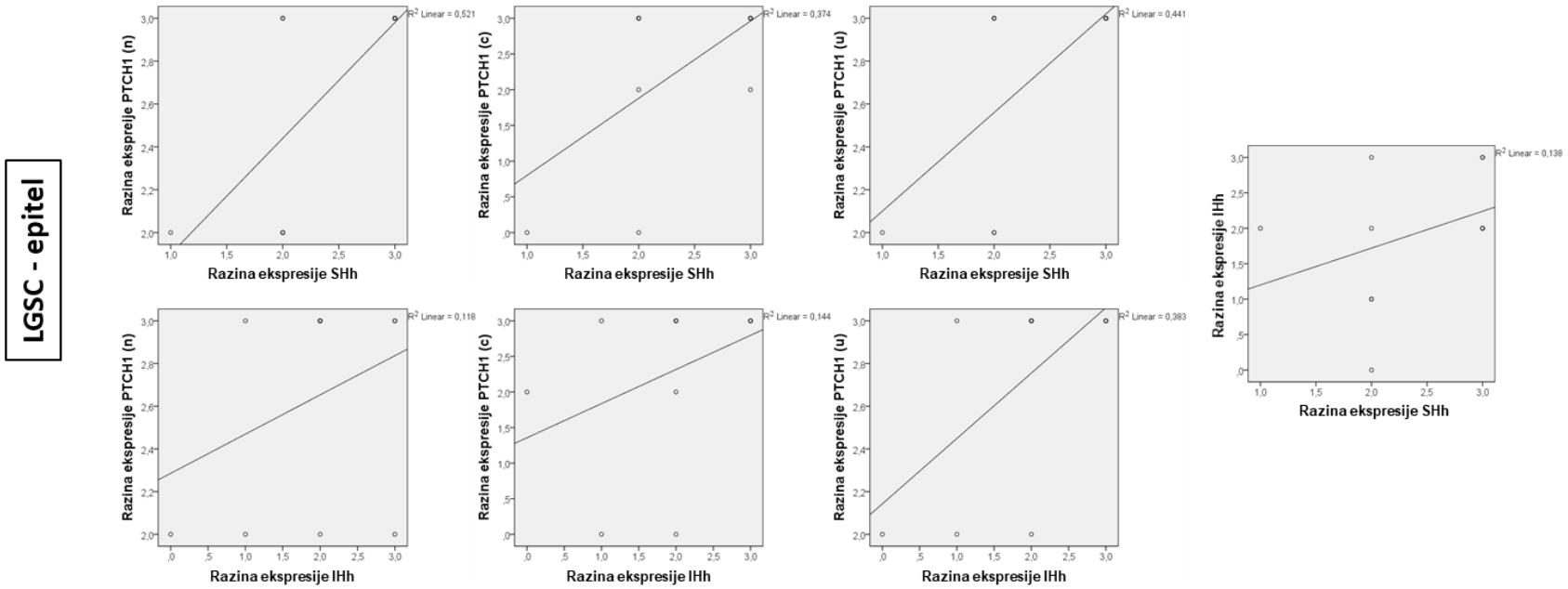
U vezivnoj stromi karcinoma LGSC nije ustanovljena povezanost između proteina PTCH1 (n, c i u) i SHh, PTCH1 (n, c i u) i IHh, kao ni između SHh i IHh (Tablica 21; Slika 42).

Na cijelom preparatu karcinoma LGSC uočena je jaka pozitivna korelacija između proteina SHh i IHh ($\rho = 0,67$; $p = 0,024$), dok povezanost između proteina PTCH1 i SHh, kao ni između PTCH1 i IHh, nije utvrđena (Tablica 22; Slika 43).

U karcinomima LGSC nije detektirana međusobna povezanost proteina PTCH1, SHh i IHh između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome tumora (Tablica 23).

Tablica 20. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u tumorskom epitelu seroznih karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

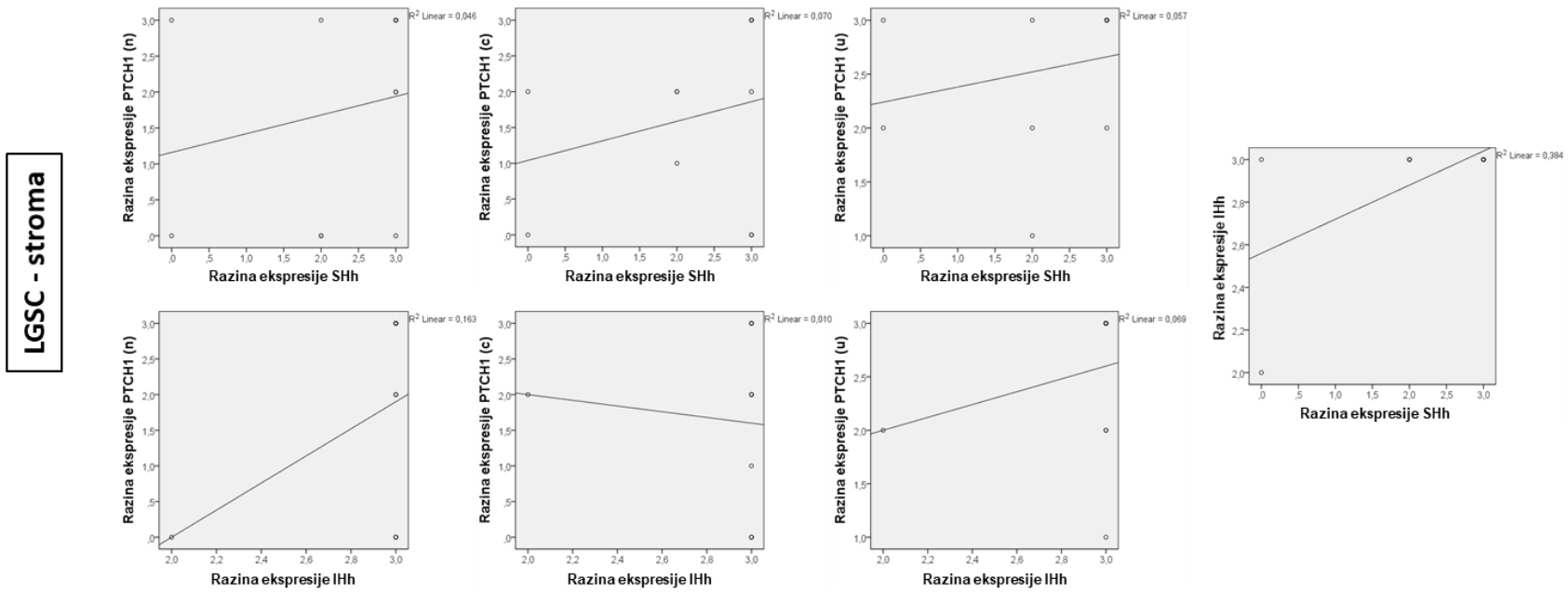
LGSC – tumorski epitel						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	ρ = 0,727; **p = 0,011**	ρ = 0,48; p = 0,135	ρ = 0,642; **p = 0,033**	-	ρ = 0,427; p = 0,19
	IHh	ρ = 0,286; p = 0,395	ρ = 0,509; p = 0,11	ρ = 0,583; p = 0,06	ρ = 0,427; p = 0,19	-



Slika 41. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u tumorskom epitelu seroznih karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 21. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u vezivnoj stromi seroznih karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija

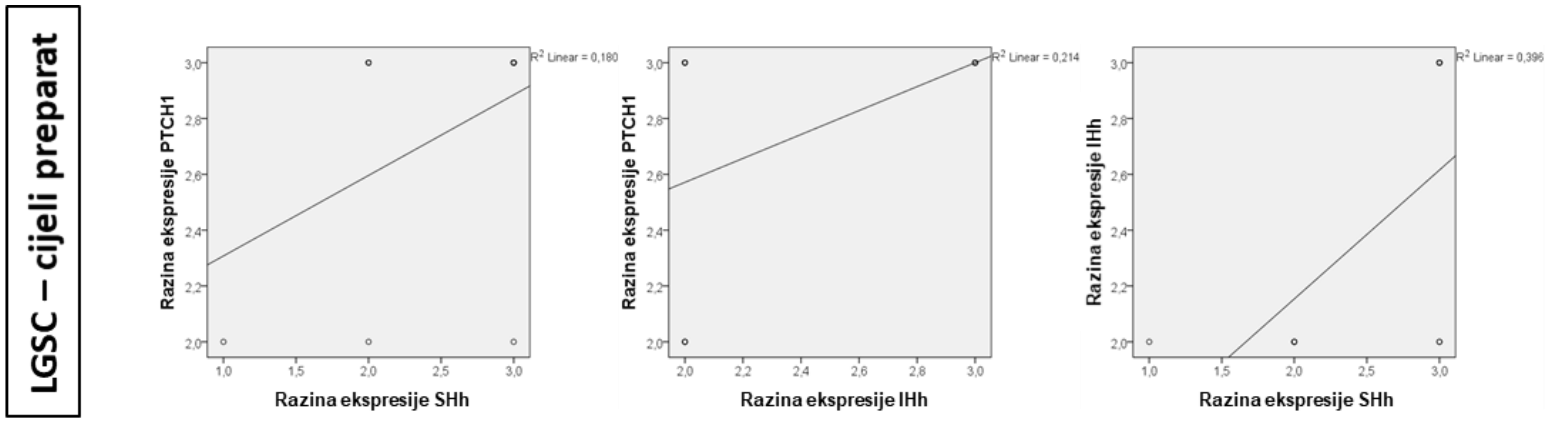
LGSC – vezivna stroma tumora						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	ρ = 0,233; p = 0,49	ρ = 0,304; p = 0,363	ρ = 0,401; p = 0,222	-	ρ = 0,497; p = 0,119
	IHh	ρ = 0,378; p = 0,252	ρ = -0,052; p = 0,879	ρ = 0,352; p = 0,289	ρ = 0,497; p = 0,119	-



Slika 42. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u vezivnoj stromi seroznih karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 22. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) seroznih karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) određene imunohistokemijskom analizom. SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

LGSC – cijeli preparat				
		PTCH1	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	$\rho = 0,362$; $p = 0,274$	-	$\rho = 0,67$; **p = 0,024**
	IHh	$\rho = 0,463$; $p = 0,152$	$\rho = 0,67$; **p = 0,024**	-



Slika 43. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) seroznih karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) određene imunohistokemijskom analizom.

Tablica 23. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh između tumorskog epitelnog tkiva i vezivne strome u seroznim karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) određene imunohistokemijskom analizom.

	LGSC – epitel vs. stroma						
Spearmanova korelacija			Epitel				
			PTCH1 (n)	PTCH1 (c)	PTCH1 (u)	SHh	IHh
	Stroma	PTCH1 (n)	ρ = -0,129 p = 0,706	ρ = 0,063 p = 0,854	ρ = -0,174 p = 0,609	ρ = 0,033 p = 0,924	ρ = 0,091 p = 0,79
		PTCH1 (c)	ρ = 0,437 p = 0,179	ρ = 0,55 p = 0,08	ρ = 0,505 p = 0,113	ρ = 0,115 p = 0,736	ρ = 0,222 p = 0,512
		PTCH1 (u)	ρ = 0,14 p = 0,681	ρ = 0,248 p = 0,461	ρ = -0,076 p = 0,825	ρ = -0,12 p = 0,973	ρ = -0,226 p = 0,503
		SHh	ρ = 0,264 p = 0,432	ρ = 0,495 p = 0,122	ρ = 0,464 p = 0,151	ρ = 0,344 p = 0,3	ρ = 0,374 p = 0,258
		IHh	ρ = 0,418 p = 0,2	ρ = 0,524 p = 0,098	ρ = 0,516 p = 0,104	ρ = 0,553 p = 0,078	ρ < 0,0001 p = 1

n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

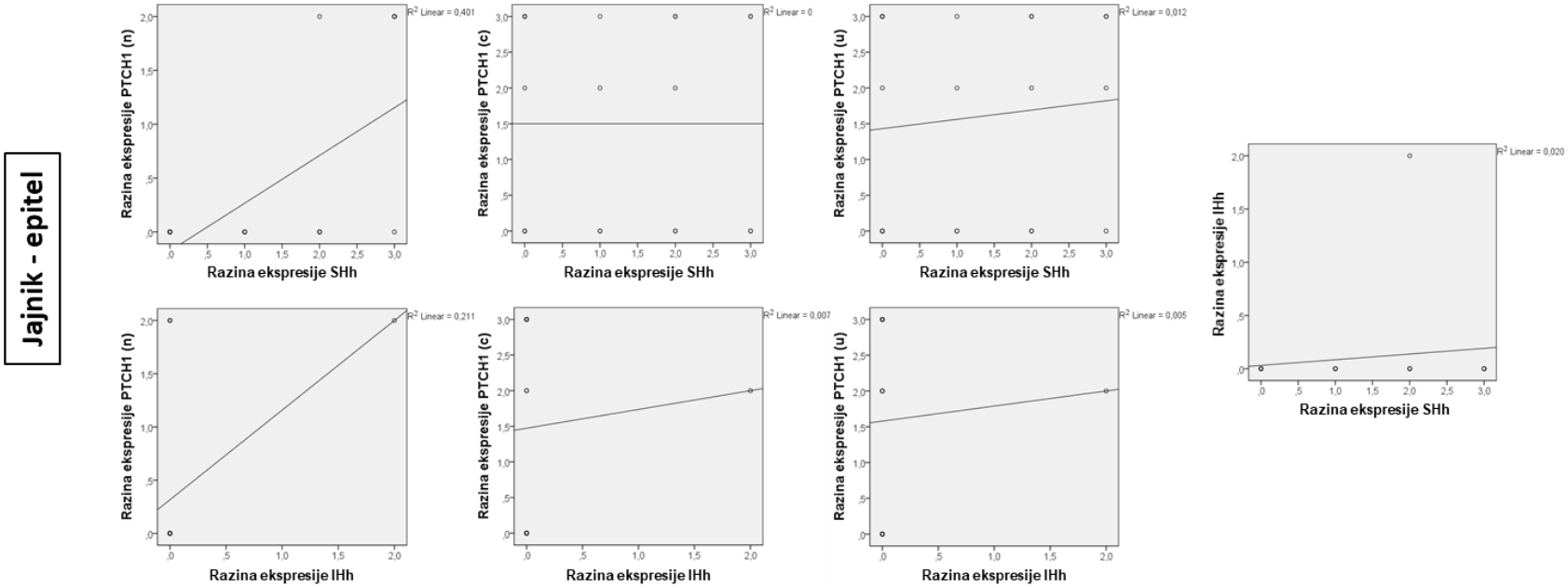
5.7.3. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravim jajnicima

U epitelu zdravih jajnika uočena je jaka pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) i SHh (ρ = 0,619; p = 0,004), i slaba pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) i IHh (ρ = 0,459; p = 0,042). Povezanost nije utvrđena između proteina PTCH1 (c i u) i SHh, PTCH1 (c i u) i IHh, kao ni između SHh i IHh (Tablica 24; Slika 44).

U stromi zdravih jajnika detektirana je slaba pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) i SHh (ρ = 0,479; p = 0,033), PTCH1 (c) i SHh (ρ = 0,483; p = 0,031) i PTCH1 (u) i SHh (ρ = 0,483; p = 0,031), i jaka pozitivna korelacija između proteina SHh i IHh (ρ = 0,63; p = 0,003). Povezanost između proteina PTCH1 (n, c i u) i IHh nije ustanovljena (Tablica 25; Slika 45).

Tablica 24. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u epitelu zdravih jajnika određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

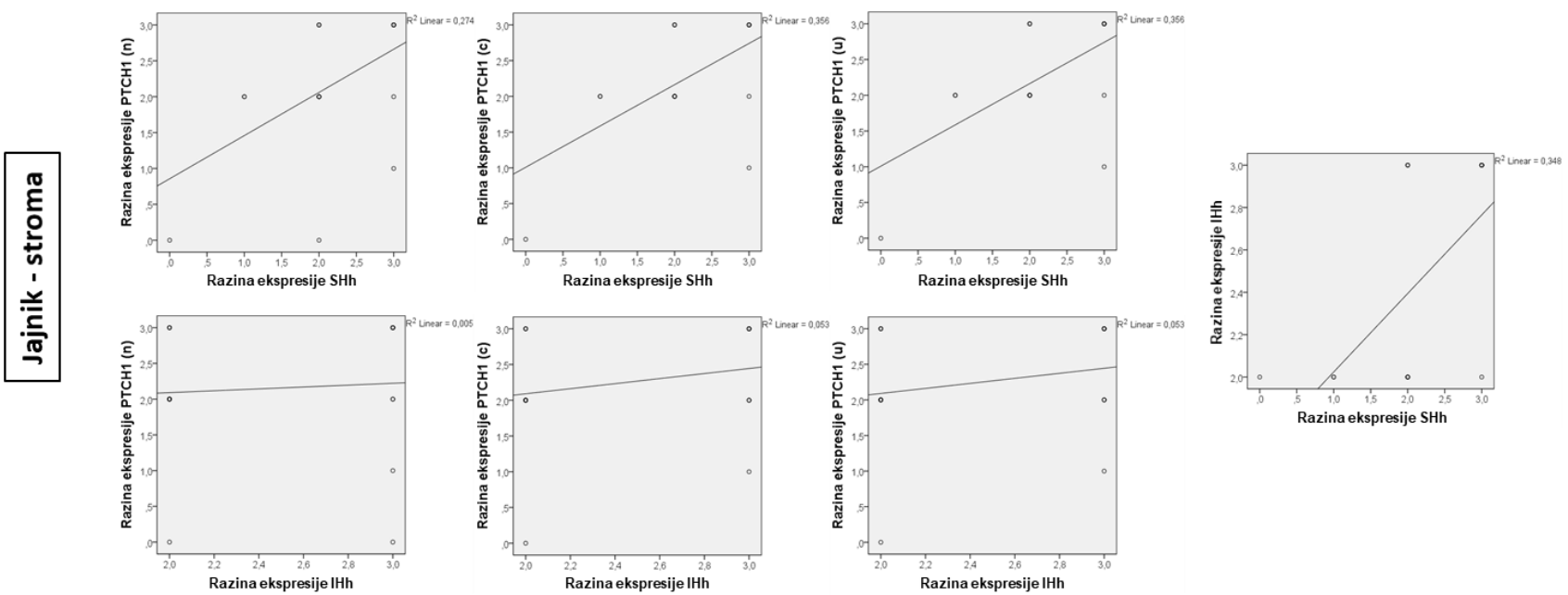
Jajnik – epitel						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	$\rho = 0,619$; **p = 0,004**	$\rho = 0,008$; $p = 0,973$	$\rho = 0,091$; $p = 0,704$	-	$\rho = 0,145$; $p = 0,543$
	IHh	$\rho = 0,459$; **p = 0,042**	$\rho = 0,022$; $p = 0,928$	$\rho < 0,0001$; $p = 1$	$\rho = 0,145$; $p = 0,543$	-



Slika 44. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u epitelu zdravih jajnika određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 25. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u stromi zdravih jajnika određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

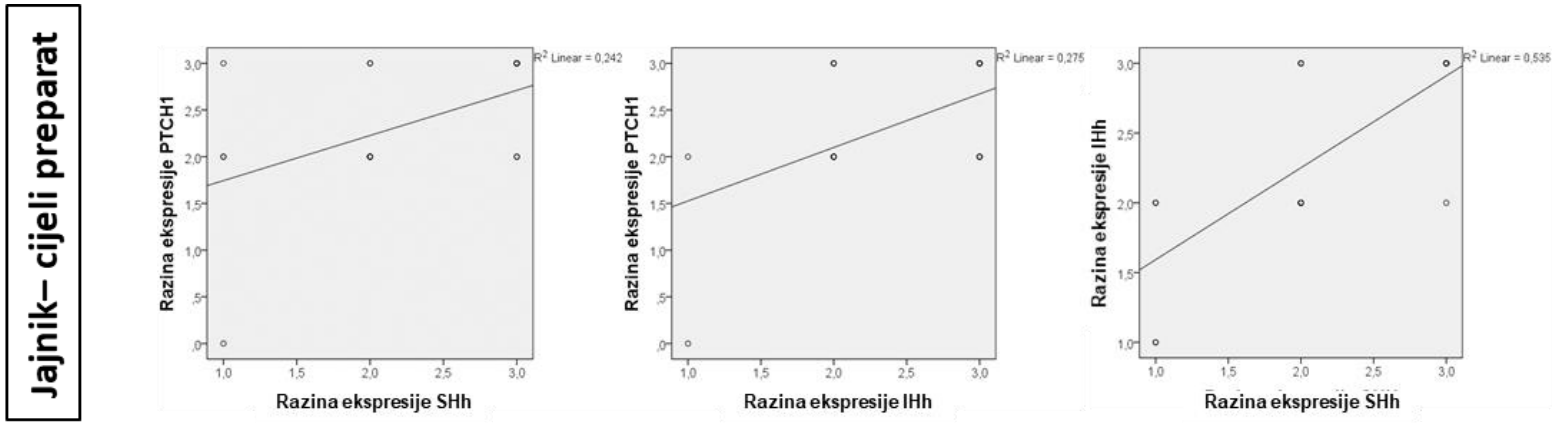
Jajnik – stroma						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	ρ = 0,479; **p = 0,033**	ρ = 0,483; **p = 0,031**	ρ = 0,483; **p = 0,031**	-	ρ = 0,63; **p = 0,003**
	IHh	ρ = 0,161; p = 0,497	ρ = 0,242; p = 0,305	ρ = 0,242; p = 0,305	ρ = 0,63; **p = 0,003**	-



Slika 45. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u stromi zdravih jajnika određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 26. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) zdravih jajnika određene imunohistokemijskom analizom. SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno)

Jajnik – cijeli preparat				
		PTCH1	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	$\rho = 0,466$; **p = 0,039**	-	$\rho = 0,714$; **p < 0,0001**
	IHh	$\rho = 0,408$; $p = 0,074$	$\rho = 0,714$; **p < 0,0001**	-



Slika 46. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh na cijelom preparatu (epitelno i stromalno tkivo zajedno) zdravih jajnika određene imunohistokemijskom analizom.

Na cijelom preparatu zdravih jajnika utvrđena je slaba pozitivna korelacija između proteina PTCH1 i SHh ($\rho = 0,466$; $p = 0,039$) i jaka pozitivna korelacija između SHh i IHh ($\rho = 0,714$; $p < 0,0001$), dok povezanosti između proteina PTCH1 i IHh nije bilo (Tablica 26; Slika 46).

U zdravim jajnicima uočena je jaka pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) u epitelu i proteina SHh u stromi ($\rho = 0,618$; $p = 0,004$). Trend pozitivne korelacije uočen je i između proteina SHh u epitelu i istog proteina u stromi, ali bez postizanja statističke značajnosti ($\rho = 0,43$; $p = 0,058$) (Tablica 27).

Tablica 27. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh između epitelnog i stromalnog tkiva u zdravim jajnicima određene imunohistokemijskom analizom.

	Jajnik – epitel vs. stroma						
Spearmanova korelacija			**Epitel**				
			PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
	Stroma	**PTCH1 (n)**	ρ = 0,365 p = 0,113	ρ = 0,195 p = 0,41	ρ = 0,264 p = 0,262	ρ = -0,2 p = 0,398	ρ = 0,108 p = 0,65
		PTCH1 (c)	ρ = 0,361 p = 0,118	ρ = 0,136 p = 0,568	ρ = 0,204 p = 0,388	ρ = -0,119 p = 0,616	ρ = -0,132 p = 0,578
		PTCH1 (u)	ρ = 0,361 p = 0,118	ρ = 0,136 p = 0,568	ρ = 0,204 p = 0,388	ρ = -0,119 p = 0,616	ρ = -0,132 p = 0,578
		SHh	ρ = 0,618 **p = 0,004**	ρ = 0,191 p = 0,421	ρ = 0,26 p = 0,268	ρ = 0,43 p = 0,058*	ρ = 0,283 p = 0,226
		IHh	ρ = 0,302 p = 0,196	ρ = -0,275 p = 0,24	ρ = -0,225 p = 0,341	ρ = 0,29 p = 0,216	ρ = 0,254 p = 0,281

n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno); * na granici statističke značajnosti

5.7.4. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravim jajovodima

U epitelu zdravih jajovoda utvrđena je jaka pozitivna korelacija između proteina PTCH1 (n) i SHh ($\rho = 0{,}667$; $p = 0{,}035$), dok povezanosti između proteina PTCH1 (c i u) i SHh nije bilo (Tablica 28; Slika 47). Statistička analiza korelacije proteina PTCH1 (n, c i u) i IHh nije bila moguća jer je razina ekspresije proteina IHh u epitelu zdravih jajovoda u svim uzorcima bila jednaka.

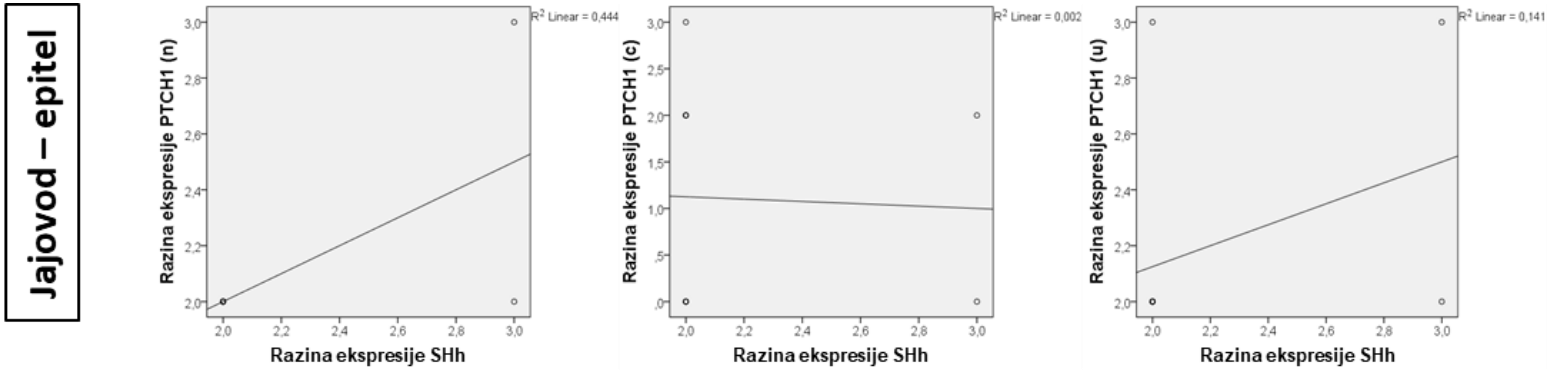
U stromi zdravih jajnika nije ustanovljena povezanost između proteina PTCH1 (n, c i u) i SHh, PTCH1 (n, c i u) i IHh, kao ni između SHh i IHh (Tablica 29; Slika 48).

Statistička analiza međusobne korelacije proteina PTCH1, SHh i IHh na cijelom preparatu zdravih jajovoda nije bila moguća jer je razina ekspresije proteina PTCH1, kao i IHh, bila jednaka u svim uzorcima.

U zdravim jajovodima detektirana je jaka pozitivna korelacija između proteina SHh u epitelu i istog proteina u stromi ($\rho = 0{,}748$; $p = 0{,}013$) (Tablica 30). Statistička analiza korelacije proteina IHh u epitelu s proteinima PTCH1 (n, c i u), SHh i IHh u stromi zdravih jajovoda nije bila moguća jer je razina ekspresije proteina IHh u epitelu bila jednaka u svim uzorcima.

Tablica 28. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u epitelu zdravih jajovoda određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno); / – statistička analiza nije bila moguća

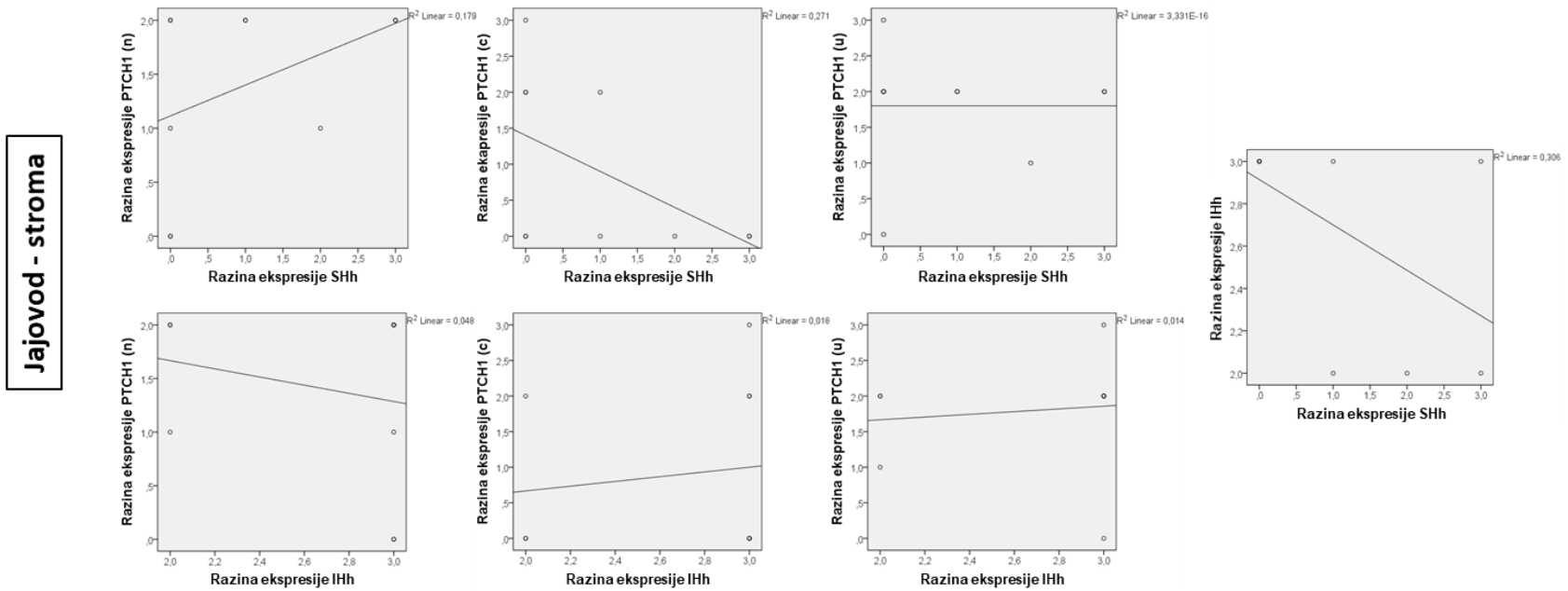
Jajovod – epitel						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	$\rho = 0,667$; **p = 0,035**	$\rho = -0,048$; $p = 0,895$	$\rho = 0,375$; $p = 0,286$	-	/
	IHh	/	/	/	/	-



Slika 47. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u epitelu zdravih jajovoda određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 29. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u stromi zdravih jajovoda određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; SK – Spearmanova korelacija

Jajovod – stroma						
		PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
SK	**SHh**	ρ = 0,433; p = 0,199	ρ = -0,51; p = 0,132	ρ = -0,12; p = 0,741	-	ρ = -0,612; p = 0,06
	IHh	ρ = -0,173; p = 0,634	ρ = 0,13; p = 0,72	ρ = 0,234; p = 0,516	ρ = -0,612; p = 0,06	-



Slika 48. Grafički prikaz korelacije ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh u stromi zdravih jajovoda određene imunohistokemijskom analizom. n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija

Tablica 30. Korelacija ekspresije proteina PTCH1, SHh i IHh između epitelnog i stromalnog tkiva u zdravim jajovodima određene imunohistokemijskom analizom.

	Jajovod – epitel vs. stroma						
Spearmanova korelacija			**Epitel**				
			PTCH1 (n)	**PTCH1 (c)**	**PTCH1 (u)**	**SHh**	**IHh**
	Stroma	**PTCH1 (n)**	ρ = 0,264 p = 0,462	ρ = 0,061 p = 0,867	ρ < 0,0001 p = 1	ρ = 0,395 p = 0,258	/
		PTCH1 (c)	ρ = -0,266 p = 0,458	ρ = 0,027 p = 0,941	ρ = 0,05 p = 0,891	ρ = -0,398 p = 0,254	/
		PTCH1 (u)	ρ = 0,071 p = 0,845	ρ = -0,091 p = 0,803	ρ = 0,107 p = 0,768	ρ = 0,107 p = 0,768	/
		SHh	ρ = 0,499 p = 0,142	ρ = 0,299 p = 0,402	ρ = 0,14 p = 0,699	ρ = 0,748 **p = 0,013**	/
		IHh	ρ = 0,218 p = 0,545	ρ = -0,126 p = 0,729	ρ = 0,327 p = 0,356	ρ = -0,218 p = 0,545	/

n – nuklearna ekspresija; c – citoplazmatska ekspresija; u – ukupna ekspresija; podebljano – $p < 0,05$ (statistički značajno); / – statistička analiza nije bila moguća

6. RASPRAVA

Rak jajnika veliki je klinički izazov u ginekološkoj onkologiji s najvišom stopom smrtnosti od svih malignih bolesti ženskog reproduktivnog sustava (8). Većina bolesnica nema gotovo nikakve simptome u ranom stadiju bolesti, dok se u uznapredovalom stadiju javljaju nespecifični simptomi koji se povezuju s češćim benignim stanjima što znatno otežava dijagnozu ove bolesti (8-9). Dijagnozu dodatno otežava i činjenica da postoje različiti histološki podtipovi raka jajnika s različitim biološkim i kliničkim svojstvima (3). Najčešći i najsmrtonosniji oblik raka jajnika su epitelni tumori jajnika koji se dijele na serozne, endometrioidne, mucinozne i svijetlostanične karcinome (26-27). Serozni karcinomi jajnika su najbrojniji i čine oko 75% svih epitelnih tumora jajnika. Dijele se na serozne karcinome jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) i serozne karcinome jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC), koji se, bez obzira na isti histološki tip, razlikuju u molekularnim i genetskim promjenama, podrijetlu nastanka, patogenezi i prognozi (26-27).

Budući da ne postoje učinkovite metode probira, izuzetno je važno pronaći dovoljno osjetljive i specifične biomarkere koji će osigurati pravovremenu dijagnozu raka jajnika. Da bi se to postiglo, potrebno je istražiti molekularnu patogenezu pojedinih tipova raka jajnika te identificirati specifične molekularne biljege i signalne putove odgovorne za nastanak i progresiju bolesti. Osim što je ključna za dijagnozu, identifikacija specifičnih biomarkera i signalnih puteva povezanih s razvojem raka jajnika bitna je i za razvoj učinkovite ciljane terapije za precizno liječenje ove bolesti.

Kod raka jajnika primijećena je poremećena aktivacija više signalnih puteva među kojima je i signalni put Hh (221). Aberantne promjene u Hh-signalizaciji povezane su s razvojem brojnih tumora (147). Poremećeni prijenos signala može biti posljedica prekomjerne ekspresije Hh-liganada, genskih mutacija u samom signalnom putu, ne-kanonske transkripcijske regulacije putem drugih signalnih puteva i epigenetskih promjena kao što su promjene u metilacijskom statusu promotora gena signalnog puta Hh (88, 158-159). Iako su dosadašnja istraživanja pokazala da je aberantna aktivnost signalnog puta Hh uključena u molekularnu patogenezu raka jajnika (204-205), uloga ovog signalnog puta u raku jajnika, kao i u pojedinim histološkim podtipovima raka jajnika, nije dovoljno istražena. Zbog toga smo odlučili istražiti ulogu proteina PTCH1, SHh i IHh, kao i promjene u metilacijskom

statusu promotora istoimenih gena, u seroznim karcinomima jajnika. Identifikacija specifičnih molekula i detekcija genetskih i epigenetskih promjena povezanih s razvojem raka jajnika mogu značajno olakšati dijagnozu i razvoj novih ciljnih terapija ili poboljšati odgovor na trenutno dostupne terapije.

6.1. Uloga proteina PTCH1 u seroznim karcinomima jajnika

Iako je PTCH1 negativni regulator Hh-signalizacije, ovaj receptor služi kao marker kanonske aktivacije signalnog puta Hh (222). Gen *PTCH1* sadrži vezna mjesta za transkripcijske faktore GLI pa prilikom aktivacije signalnog puta Hh dolazi do njegove pojačane ekspresije zbog čega sudjeluje u negativnoj povratnoj sprezi (87-88). Ukoliko ovaj protein izgubi svoju funkciju, bilo zbog genskih mutacija ili epimutacija, dolazi do aberantne aktivacije signalnog puta Hh (147). Inaktivirajuće mutacije gena *PTCH1*, kao i hipermetilacija njegovog promotora, uočene su u brojnim tumorima (160-166, 180-183). Međutim, brojne studije su pokazale da protein PTCH1, koji se inače smatra tumor supresorskim proteinom, ima povišenu ekspresiju u velikom broju različitih tumora uključujući rak dojke, prostate, pluća, kolona, tumore mozga i melanome (223-226). Primjerice, kod raka dojke, povišena ekspresija ovog proteina povezana je s metastazama u limfnim čvorovima, uznapredovalim stadijima bolesti i agresivnijim ponašanjem tumora (223), dok se kod raka prostate povezuje s biokemijskim relapsom kod visokorizičnih pacijenata (225). Nedavna istraživanja pokazala su da receptor PTCH1 može služiti i kao transporter koji izbacuje kemoterapeutske tvari izvan stanice te tako doprinosi rezistenciji tumora na kemoterapiju (226). Povišena ekspresija proteina PTCH1 u tumorskom tkivu može se objasniti mogućim promjenama u strukturi i funkciji ovog proteina u malignom tkivu. Navedene promjene mogle bi biti potaknute mutacijama u genu *PTCH1* pri čemu bi PTCH1 izgubio svoju prvotnu tumor-supresorsku ulogu i dobio novu, tumor-promotorsku ulogu u transportu lijekova (163).

Povećana ekspresija proteina PTCH uočena je i kod raka jajnika gdje je primijećen postepeni rast ekspresije ovog proteina od benignih, preko tumora niskog malignog potencijala do malignih neoplazmi (206). Ekspresija proteina PTCH u raku jajnika povezana je s povećanom proliferacijom tumorskih stanica te je u pozitivnoj korelaciji s lošim preživljenjem bolesnica oboljelih od ove bolesti (206-207). S druge strane, postoje i oprečna istraživanja u kojima je primijećena smanjena ekspresija proteina PTCH1 u tumorskom tkivu

kao i u staničnim linijama raka jajnika (208-209). Ustanovljeno je da bolesnice sa smanjenom ekspresijom proteina PTCH1 imaju lošiju prognozu nego bolesnice s povišenom ekspresijom ovog proteina (209).

Da bismo saznali kakav je status proteina PTCH1 u karcinomima HGSC i LGSC, u ovom radu istražili smo obrasce ekspresije navedenog proteina u tumorskom tkivu i zdravom tkivu jajnika i jajovoda, te u karcinomskim staničnim linijama, OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, i kontrolnoj staničnoj liniji normalnih imortaliziranih epitelnih stanica jajovoda, FNE1. Budući da postoje dva modela o podrijetlu nastanka malignih stanica karcinoma HGSC i LGSC (5, 12), zdravi jajnici i zdravi jajovodi korišteni su kao kontrolna tkiva. Rezultati ovog rada pokazali su da je ukupna ekspresija proteina PTCH1 znatno veća u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC nego u epitelu zdravih jajnika i jajovoda, kao i u karcinomskim u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Povećana ekspresija ovog proteina u seroznim karcinomima jajnika upućuje na njegovu aktivnu uključenost u patogenezu ovih karcinoma što je u skladu s ranije spomenutim istraživanjima gdje je povećana ekspresija proteina PTCH1 povezana s razvojem tumora (206-207, 223-226). Prema tome, protein PTCH1 bi u ovom slučaju imao tumor-promotorsku, a ne tumor-supresorsku ulogu. Treba naglasiti da je u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC i tumorskim stanicama u kulturi uočena izražena nuklearna ekspresija ovog proteina koja je bila značajno veća u tumorskom epitelu i tumorskim stanicama u kulturi nego u epitelu zdravog jajnika i jajovoda i zdravim stanicama u kulturi. Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 do sada nije zabilježena u karcinomima jajnika te se rijetko spominje u znanstvenoj literaturi zbog čega je specifičnost nuklearne lokalizacije ovog proteina ispitana metodom imunohistokemije na uzorcima karcinoma HGSC i LGSC te metodom imunofluorescencije na karcinomskim staničnim linijama uz pomoć četiri različita antitijela anti-PTCH1. Izražena nuklearna ekspresija proteina PTCH1 (u tumorskom tkivu i karcinomskim staničnim linijama) uočena je u slučaju tri od četiri antitijela (anti-PTCH1a, epitop: 1-50 aa; anti-PTCH1b, epitop: 1-50 aa i anti-PTCH1c, epitop: 1-80 aa), dok je u slučaju antitijela anti-PTCH1d (epitop: 122-436 aa) bila prisutna, ali u znatno manjoj količini. Anti-PTCH1d je monoklonsko antitijelo koje se, za razliku od ostala tri poliklonska antitijela, veže na udaljeniji epitop antigena PTCH1. Razlike u ekspresiji proteina PTCH1 vjerojatno proizlaze iz razlika u klonalnosti antitijela i epitopu na kojeg se vežu (227). Poliklonska antitijela prepoznaju citoplazmatsku N-terminalnu domenu, dok monoklonsko antitijelo prepoznaje izvanstaničnu domenu ECD1 proteina PTCH1 (228). Budući da je

korištenjem sva četiri antitijela uočena nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC i tumorskim stanicama u kulturi, može se zaključiti da bi ovaj protein mogao igrati aktivnu, tumor-promotorsku ulogu u jezgri malignih stanica seroznih karcinoma jajnika.

Da bi se podrobnije ispitala njegova lokalizacija u stanici, prisutnost proteina PTCH1 analizirana je u različitim staničnim odjeljcima pomoću metode Western blota pri čemu su korištena četiri prethodno spomenuta antitijela. U slučaju tri poliklonska antitijela, u staničnim linijama najviše je bila izražena nuklearna ekspresija, dok je u slučaju monoklonskog antitijela najviše bila izražena citoplazmatska ekspresija, što je u skladu s rezultatima imunofluorescencije. U sva četiri slučaja, u pojedinim substaničnim frakcijama, detektirani su fragmenti proteina PTCH1 različite molekularne mase što upućuje na mogućnost proteolitičkog cijepanja ovog proteina, kao i na mogućnost posttranslacijskih modifikacija nastalih fragmenata. Iako poliklonska antitijela anti-PTCH1a i anti-PTCH1b prepoznaju isti epitop antigena PTCH1, nije jasno zašto kod istih uzoraka pokazuju drukčiji obrazac fragmenata ovog proteina.

Budući da su rezultati imunofluorescencije i Western blota ukazali na izraženu nuklearnu ekspresiju koristeći poliklonska antitijela koja prepoznaju citoplazmatsku N-terminalnu domenu proteina PTCH1 i izraženu citoplazmatsku ekspresiju u slučaju monoklonskog antitijela koji prepoznaje izvanstaničnu domenu ECD1 proteina PTCH1, moguće je da dolazi do proteolitičkog cijepanja citoplazmatske N-terminalne domene (koju ne prepoznaje monoklonsko antitijelo anti-PTCH1d) koja se zatim translocira u jezgru gdje obavlja do sada još nepoznatu funkciju, dok veći dio proteina ostaje u citoplazmi. Osim u jezgrenoj frakciji, protein PTCH1 bio je prisutan i u kromatinskoj frakciji iz čega se može zaključiti da bi ovaj protein mogao igrati aktivnu ulogu u transkripcijskoj regulaciji određenih gena.

Nuklearni transport citoplazmatskih fragmenata transmembranskih proteina već je prepoznat kao važan mehanizam direktnog prijenosa signala s plazma membrane u jezgru (229-230). Takav prijenos signala uočen je i kod proteina PTCH1 (231). Kagawa i sur. pokazali su da je protein PTCH1 podložan proteolitičkom cijepanju na C-kraju pri čemu nastaju C-terminalni fragmenti ICD7. Da bi istražili ponašanje N- i C-terminalne polovice ovog proteina, u istraživanju su koristili stanice HeLa koje su transfecirali plazmidom koji je sadržavao cDNA fragmenta *PTCH1* kojeg su fuzionirali s 3xT7 N-terminalnim i 3xFLAG C-

terminalnim privjeskom. Uočili su da se C-terminalni fragmenti nakupljaju u jezgri stanica gdje moduliraju transkripcijsku aktivnost proteina GLI1, dok N-terminalna regija ostaje u membranskim frakcijama i ne putuje u jezgru. Ponašanje endogenog proteina PTCH1 pratili su u mišjim embrionalnim fibroblastima C3H10T1/2 i mišjim embrionalnim primarnim stanicama gdje su također uočili nuklearnu lokalizaciju C-terminalnih fragmenata ICD7. Iako su otkrili da ovi fragmenti imaju određene regulatorne uloge, njihova biološka važnost još uvijek nije poznata (231). Međutim, rezultati našeg istraživanja ukazali su na mogućnost proteolitičkog cijepanja N-terminalne regije proteina PTCH1 pri čemu nastaju N-terminalni fragmenti koji se transportiraju u jezgru. Koliko je nama poznato, do sada nije zabilježena prisutnost N-terminalnih fragmenata proteina PTCH1 u jezgri te je ovo prvo istraživanje koje na to ukazuje. Budući da je izražena nuklearna lokalizacija ovih fragmenata otkrivena u karcinomskim stanicama raka jajnika, pretpostavlja se da bi mogli igrati aktivnu, tumor-promotorsku ulogu u jezgri ovih malignih stanica.

Osim nuklearne, uočena je i citoplazmatska ekspresija proteina PTCH1 koja je bila značajno veća u tumorskom epitelu karcinoma LGSC nego u epitelu zdravih jajovoda. Kao što je već spomenuto, citoplazmatska ekspresija ovog proteina detektirana pomoću poliklonskih antitijela bila je slabo izražena u staničnim linijama, dok je u slučaju monoklonskog antitijela bila visoko zastupljena u svim karcinomskim staničnim linijama gdje su uočeni točkasti signali u citoplazmi. Ti signali mogu predstavljati unutarstanične membranske vezikule koje služe za prijenos proteina PTCH1 kroz sekretorni i/ili endocitički put (231-233).

Budući da na ekspresiju proteina PTCH1 utječu epigenetske promjene poput metilacije DNA, u ovom istraživanju ispitali smo i metilacijski status gena *PTCH1* u seroznim karcinomima jajnika i staničnim linijama HGSC-a. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je metilacija DNA u promotoru gena *PTCH1* bila prisutna u 13,5% uzoraka karcinoma HGSC, dok u karcinomima LGSC, tkivu zdravog jajnika i jajovoda, i svim staničnim linijama, nije bila prisutna ni u jednom uzorku. Utvrđeno je da metilacija gena *PTCH1* nije povezana s razinom ekspresije proteina PTCH1. Relativno mali postotak HGSC-uzoraka s metiliranim promotorom gena *PTCH1*, odsutnost metilacije ovog gena u karcinomima LGSC, kontrolnim tkivima i svim staničnim linijama, te nepovezanost metilacije promotora ovog gena s ekspresijom proteina dovode nas do zaključka da metilacija promotora gena *PTCH1*

nije mehanizam uključen u patogenezu seroznih karcinoma jajnika. Metilacija promotora ovog gena uočena je kod benignih tumora jajnika, kao što su dermoidi i fibromi (211). Međutim, navedena alteracija nije se pokazala značajnom kod raka jajnika (212) što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja.

6.2. Uloga proteina SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika

Hh-ligandi SHh i IHh su signalni proteini koji se vežu na receptor PTCH1. Nakon što se otpuste iz stanica, mogu difundirati u ciljna tkiva i uspostaviti gradijent te tako kontrolirati obrasce razvoja mnogih tkiva tijekom embrionalnog razvoja (108). Iako prolaze kroz isti proces sazrijevanja i blokiraju receptor PTCH1 istim mehanizmom, SHh i IHh imaju različite uloge u razvoju embrija (109). Ovi proteini moduliraju sudbinu stanice putem autokrine ili parakrine signalizacije (110). U tumorima su zabilježena dva tipa aberantne aktivacije signalnog puta Hh koja su povezana s prekomjernom ekspresijom Hh-liganada, autokrina ili jukstakrina signalizacija ovisna o ligandu i parakrina ili reverzna parakrina signalizacija ovisna o ligandu (147-149). Da bismo saznali kakav je status proteina SHh i IHh u seroznim karcinomima jajnika, u ovom radu istražili smo obrasce ekspresije navedenih proteina u tumorskom i kontrolnom tkivu te tumorskim i zdravim stanicama u kulturi.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je ukupna ekspresija proteina SHh značajno veća u tumorskom epitelu karcinoma HGSC nego u zdravom epitelu jajnika i jajovoda, kao i u tumorskom epitelu karcinoma LGSC u odnosu na epitel zdravih jajnika, i karcinomskim u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Da bi se istražio utjecaj strome na tumorsko tkivo, ekspresija proteina SHh ispitana je i u vezivnoj stromi tumora. Rezultati su pokazali da je ovaj protein više eksprimiran u vezivnoj stromi karcinoma HGSC i LGSC, nego u stromi zdravog jajovoda, te da je ekspresija proteina SHh znatno veća u tumorskom epitelu karcinoma HGSC nego u vezivnoj stromi tumora. Povećana ekspresija navedenog proteina u seroznim karcinomima jajnika ukazuje na njegovu aktivnu uključenost u patogenezu ovih karcinoma. Brojna istraživanja ukazala su na povezanost aberantne ekspresije proteina SHh s razvojem raka jajnika (206-208, 234-235). Liao i sur. pokazali su da je ekspresija *SHh* mRNA bila znatno veća u tumorima jajnika nego u normalnom tkivu. Uočili su da je ekspresija proteina

SHh visoko zastupljena u navedenim tumorima gdje je prisutnost ovog proteina zabilježena u tumorskom epitelu i vezivnoj stromi tumora, što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja (207). U istraživanju McCanna i sur., ekspresija proteina SHh zabilježena je u 47% uzoraka epitelnih tumora jajnika iz čega se može zaključiti da SHh jednim dijelom igra aktivnu ulogu u patogenezi ovih tumora (234). Međutim, u navedenim istraživanjima nije razjašnjena uloga autokrine i/ili parakrine SHh-signalizacije u tumorima jajnika. Da bi saznali status Hh-signalizacije u stromi i tumorskom tkivu raka jajnika, McCann i sur. analizirali su aktivnost signalnog puta Hh u ksenograftima nastalim iz humanih seroznih karcinoma jajnika pri čemu su koristili inhibitor Hh-signalizacije, IPI-926. Otkrili su da IPI-926 inhibira aktivnost signalnog puta Hh i u stromi i u tumorskom tkivu. Na temelju dobivenih rezultata, zaključili su da je ovaj signalni put uključen u patogenezu seroznih karcinoma jajnika te su ukazali na važnost Hh-signalizacije u oba navedena tkiva (234). Međutim, niska razina genske ekspresije *SHh* u seroznim karcinomima jajnika koje su McCann i sur. koristili za generiranje ksenografta upućuje na zaključak da navedeni ligand ne igra važnu ulogu u patogenezi ovih karcinoma. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je protein SHh jače eksprimiran u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC nego u zdravom epitelu jajnika i/ili jajovoda. Također, ekspresija proteina SHh bila je znatno veća u tumorskom epitelu karcinoma HGSC nego u vezivnoj stromi tumora. Isti obrasci ekspresije uočeni su kod proteina PTCH1. Gen *PTCH1* direktna je transkripcijska meta Hh-signalizacije zbog čega ovaj protein služi kao marker kanonske aktivacije signalnog puta Hh (222). Povećana ekspresija proteina PTCH1 pokazatelj je aktivnosti ovog signalnog puta u tumorskom epitelu seroznih karcinoma jajnika, dok povećana ekspresija proteina SHh u tumorskom tkivu, kao i jača ekspresija ovog proteina u tumorskom tkivu karcinoma HGSC u odnosu na vezivnu stromu, ukazuje na važnost autokrine SHh-signalizacije u seroznim karcinomima jajnika.

Autokrina signalizacija putem SHh-liganda potvrđena je i na staničnim linijama HGSC-a gdje je uočena jaka ekspresija ovog liganda i proteina PTCH1, što ukazuje na aktivnost signalnog puta Hh u ovim stanicama. Naši rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Bhattacharya i sur. gdje je utvrđeno da je ekspresija proteina SHh, kao i mRNA *SHh*, bila prisutna u svim ispitivanim staničnim linijama raka jajnika. U navedenom istraživanju, autori su inkubirali tumorske stanice u kulturi s monoklonskim antitijelom 5E1-Shh-N koje inhibira vezanje SHh-liganda na receptor PTCH1 pri čemu su opazili da se s povećanjem koncentracije ovog antitijela smanjuje proliferacija tumorskih stanica (208). Ovaj nalaz

potvrđuje važnost autokrine signalizacije ovisne o SHh-ligandu u raku jajnika. U našem istraživanju korišteno je antitijelo anti-SHh koje je specifično za protein u punoj dužini i C-terminalni produkt. U svim karcinomskim staničnim linijama uočena je jaka citoplazmatska ekspresija proteina SHh iz čega se može zaključiti da navedene karcinomske stanice proizvode SHh-ligand u većim količinama. Međutim, iako u puno manjoj količini, prisutnost ovog proteina bila je vidljiva i na staničnoj membrani. Ovaj nalaz nije uobičajen za protein SHh u punoj dužini ili C-terminalni produkt s obzirom na to da, prilikom sazrijevanja ovog proteina, iz N-terminalnog produkta nastaje zreli dvostruko modificirani protein SHh koji se potom otpušta iz stanice i veže na receptor PTCH1 (109, 116). Postoje istraživanja koja ukazuju na biološku aktivnost proteina SHh u punoj dužini (235-236). Primijećeno je da se ovaj protein može transportirati do stanične membrane te da može direktno sudjelovati u Hh-signalizaciji (235). Protein SHh u punoj dužini lokaliziran na staničnoj membrani identificiran je kao marker tumorskih matičnih stanica (engl. *cancer stem cell,* CSC) kod nesitnostaničnog karcinoma pluća (236). U ovom istraživanju utvrđeno je da samo stanice s membranskom lokalizacijom proteina SHh (SHh^+ stanice) mogu proizvoditi protein SHh i svojim parakrinim djelovanjem inducirati proliferaciju i migraciju ostalih tumorskih stanica (SHH^- stanice). SHh^+ stanice bile su kemorezistentne te su imale svojstva stanica CSC (236). Prema tome, membranska lokalizacija proteina SHh mogla bi upućivati na prisutnost stanica CSC u staničnim linijama HGSC-a.

Uz autokrinu signalizaciju, u raku jajnika zabilježena je i parakrina signalizacija ovisna o SHh-ligandu (237). Tumorski mikrookoliš ključan je za rast, preživljenje i širenje tumorskih stanica karcinoma jajnika, kao i za rezistenciju tumora na terapiju, gdje važnu ulogu igraju stromalne komponente kao što su adipociti, fibroblasti povezani s tumorom (engl. *cancer-associated fibroblast,* CAF) i mezenhimske matične stanice (engl. *mesenchymal stem cell,* MSC) (237-240). Istraživanje koje su proveli Yauch i sur. ukazuje su na važnost aberantne parakrine Hh-signalizacije u brojnim solidnim tumorima. Pokazali su da je Hh-signalizacija u stromi jako bitna za razvoj tumora (241). Za razliku od McCanna i sur. koji su ukazali na aktivnost Hh-signalizacije u vezivnoj stromi karcinoma jajnika, Coffman i sur. pokazali su da je navedena aktivnost ovisna o SHh-ligandima koje proizvode tumorske stanice (234, 237). U navedenom istraživanju utvrđeno je da SHh-ligandi koje proizvode tumorske stanice karcinoma jajnika mogu aktivirati signalni put Hh u mezenhimskim matičnim stanicama povezanim s karcinomom jajnika (engl. *carcinoma-associated mesenchymal stem cell*, CA-

MSC) (237). Stanice CA-MSC snažno potiču rast i razvoj tumora te reguliraju CSC. To su multipotentne stanice koje mogu diferencirati u nekoliko ključnih komponenti vezivne strome tumora, uključujući adipocite, osteocite i fibroblaste (242-243). Coffman i sur. otkrili su postojanje pozitivne povratne sprege Hh/BMP4 u karcinomima jajnika. Pokazali su da tumorske stanice proizvode Hh-ligande, SHh i IHh, koji aktiviraju Hh-signalizaciju u stanicama CA-MSC te da CA-MSC izlučuju protein BMP4 (engl. *Bone Morphogenetic Protein 4*) koji povratno djeluje na tumorske stanice povećavajući ekspresiju Hh-liganada. Ova parakrina pozitivna povratna sprega Hh/BMP4 između tumorskih stanica i CA-MSC ključna je za rast tumora i njegovu rezistenciju na kemoterapiju te je glavni medijator pro-tumorskog učinka stanica CA-MSC, dok bi Hh-signalizacija mogla biti glavni regulator djelovanja CA-MSC u karcinomima jajnika (237). Naši rezultati pokazali su da je protein SHh bio jače eksprimiran u vezivnoj stromi karcinoma HGSC i LGSC nego u stromi zdravog jajovoda, dok navedeni obrazac ekspresije nije primijećen kod proteina PTCH1 u karcinomima HGSC. Navedeni nalaz upućuje na moguću odsutnost parakrine SHh-signalizacije u karcinomima HGSC, ali ne i u karcinomima LGSC. Budući da je u našem istraživanju korišteno antitijelo anti-SHh koje je specifično za protein u punoj dužini i C-terminalni produkt, u uzorcima su vjerojatno detektirani C-terminalni produkti koji su difundirali iz tumorskih stanica (244). Da bi se uključila ili isključila mogućnost parakrine signalizacije putem SHh-liganda, trebalo bi pratiti ekspresiju N-terminalne regije proteina SHh budući da C-terminalni produkti nemaju signalnu aktivnost.

U našem istraživanju utvrđeno je da bi, uz SHh, protein IHh također mogao igrati aktivnu ulogu u patogenezi seroznih karcinoma jajnika. Postoje kontradiktorna istraživanja o ulozi ovog liganda u raku jajnika (206, 245). U istraživanju kojeg su proveli Schmid i sur., signalni put Hh bio je aktivan kod više od polovice uzoraka seroznih karcinoma jajnika. Kod 31% uzoraka, aktivacija ovog signalnog puta bila je povezana s povećanom ekspresijom IHh/SHh-liganada, pri čemu je više uzoraka imalo povećanu ekspresiju IHh-liganda (245). Međutim, Chen i sur. opazili su jaku ekspresiju SHh i DHh, ali ne i IHh-liganda, u karcinomskim stanicama raka jajnika (206). Naši rezultati pokazali su da je ukupna ekspresija proteina IHh značajno veća u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC nego u zdravom epitelu jajnika i jajovoda, kao i u karcinomskim u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Isti obrasci ekspresije uočeni su kod proteina PTCH1 što ukazuje na aktivnost signalnog puta Hh u tumorskom tkivu seroznih karcinoma jajnika i staničnim linijama HGSC-a. Citoplazmatska ekspresija proteina

IHh bila je izražena u svim karcinomskim staničnim linijama, dok je njegova prisutnost bila vidljiva i na staničnoj membrani. Navedeni rezultati navode nas na zaključak da bi autokrina signalizacija ovisna o IHh-ligandu također mogla igrati aktivnu ulogu u razvoju seroznih karcinoma jajnika. Koliko je nama poznato, do sada nisu zabilježena istraživanja koja ukazuju na prisutnost autokrine IHh-signalizacije u raku jajnika. U staničnim linijama raka jajnika ES2, TOV112D, OV90 i SKOV3 opažena je pojačana aktivacija signalnog puta Hh potaknuta IHh-ligandom. Iako u navedenom istraživanju nije praćena endogena ekspresija ovog liganda, pokazano je da se volumen sferoida, kojih formiraju tumorske stanice, povećava s dodatkom rekombinantnih proteina SHh (42x) i IHh (46x) (246).

Za razliku od autokrine signalizacije, parakrina signalizacija ovisna o IHh-ligandu uočena je u različitim tumorima, uključujući i rak jajnika (237, 241, 247). U već spomenutom istraživanju kojeg su proveli Coffman i sur. opaženo je da, uz SHh-ligande, tumorske stanice karcinoma jajnika proizvode i IHh-ligande koji mogu aktivirati signalni put Hh u stanicama CA-MSC te tako sudjelovati u parakrinoj pozitivnoj povratnoj sprezi Hh/BMP4 između tumorskih stanica i CA-MSC koja je ključna za rast tumora i njegovu rezistenciju na kemoterapiju (237). U našem istraživanju, protein IHh bio je jače eksprimiran u vezivnoj stromi karcinoma HGSC i LGSC, nego u stromi zdravog jajnika, dok je njegova ekspresija bila znatno veća u vezivnoj stromi tumora u odnosu na tumorski epitel karcinoma HGSC i LGSC. Iako navedene razlike u ekspresiji nisu zabilježene kod proteina PTCH1, izražena ekspresija proteina IHh u vezivnoj stromi tumora ukazuje na moguću važnost parakrine signalizacije ovisne o IHh-ligandu u seroznim karcinomima jajnika. Naši rezultati u suprotnosti su s rezultatima istraživanja Kasiri i sur. u kojem je uočeno da protein IHh suprimira metastaze i rast tumora aktivacijom Hh-signalizacije u adenokarcinomima pluća (248). Treba imati na umu da učinci Hh-signalizacije mogu biti tkivno specifični zbog čega je potrebno istražiti svaki tip tumora (237).

Svakako treba napomenuti da su karcinomi jajnika heterogena skupina tumora te da ekspresija određenih proteina može biti različita u različitim histološkim podtipovima. Kod većine spomenutih istraživanja nije naveden histološki podtip karcinoma jajnika zbog čega se rezultati pojedinih istraživanja mogu razlikovati. Prema tome, jako je bitno istražiti ekspresiju proteina od interesa u pojedinim histološkim podtipovima. Međutim, treba imati u vidu da se

ekspresija pojedinih proteina može razlikovati i unutar istog histološkog podtipa zbog heterogenosti samih tumora što je već zabilježeno u literaturi (245).

Epigenetske promjene poput metilacije DNA također mogu doprinijeti razvoju tumora, pa je tako hipometilacija gena *SHh* povezana s razvojem kolorektalnog karcinoma, rakom želuca i dojke (190-192), dok je hipermetilacija gena *IHh* povezana s razvojem kolorektalnog karcinoma (190). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da metilacija gena *SHh* i *IHh* nije povezana s razinom ekspresije odgovarajućih proteina u seroznim karcinomima jajnika. Metilacija DNA u promotorima gena *SHh* i *IHh* bila je prisutna u 5,4%, odnosno 2,7% uzoraka karcinoma HGSC. U karcinomima LGSC, tkivu zdravih jajnika i jajovoda te staničnim linijama OVCAR5, OVSAHO i FNE1, promotor navedenih gena bio je nemetiliran. Metilacija DNA u *SHh* i *IHh* detektirana u staničnoj liniji OVCAR8 nije utjecala na ekspresiju odgovarajućih proteina. Jako mali postotak HGSC-uzoraka s metiliranim promotorom gena *SHh* i *IHh*, odsutnost metilacije ovih gena u karcinomima LGSC, kontrolnim tkivima i staničnim linijama te nepovezanost metilacije promotora ovih gena s ekspresijom proteina u svim navedenim tkivima i staničnoj liniji OVCAR8 dovode nas do zaključka da metilacija promotora gena *SHh* i *IHh* nije mehanizam uključen u patogenezu seroznih karcinoma jajnika.

6.3. Međusobna povezanost proteina PTCH1, SHh i IHh u zdravom i tumorskom tkivu

Da bismo istražili ulogu Hh-signalizacije u tumorskom mikrookolišu, ispitali smo aktivnost signalnog puta Hh u zdravom tkivu jajnika i jajovoda i tumorskom tkivu seroznih karcinoma jajnika. Uočili smo da je ekspresija proteina SHh bila znatno veća u stromi jajnika nego u stromi jajovoda, kao i u stromi jajnika u odnosu na njegov epitel. U stromi jajnika također je uočena i pozitivna korelacija između proteina PTCH1 i SHh. Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti da je signalni put Hh aktivan u stromi zdravih jajnika, što je u skladu s postojećim istraživanjima (237). Iako je ekspresija proteina IHh veća u stromi jajnika nego u njegovom epitelu, i usprkos tome što postoji pozitivna korelacija između proteina IHh i SHh u stromi jajnika, nepovezanost proteina IHh i PTCH1 u stromi jajnika ukazuje na to da ovaj ligand vjerojatno nema utjecaj na Hh-signalizaciju u stromi zdravih jajnika. Zdravi

jajnici i jajovodi razlikovali su se u ekspresiji SHh-liganda; ekspresija proteina SHh bila je značajno veća u epitelu jajovoda nego u epitelu jajnika, kao i u epitelu jajovoda u odnosu na njegovu stromu, dok je ekspresija proteina IHh bila veća u stromi jajovoda u odnosu na njegov epitel. Ukupna ekspresija proteina PTCH1 nije bila u pozitivnoj korelaciji ni s SHh ni s IHh-ligandom. Treba istaknuti da statistička analiza korelacije proteina PTCH1 i IHh u epitelu jajovoda nije bila moguća jer je razina ekspresije proteina IHh kod svih uzoraka bila jednaka. Iako nije bilo značajne razlike u ukupnoj ekspresiji proteina PTCH1 između jajnika i jajovoda, uočena je razlika u nuklearnoj ekspresiji ovog proteina između navedenih kontrolnih skupina, kao i pozitivna korelacija ovog proteina s SHh-ligandom. Nuklearna ekspresija proteina PTCH1 bila je viša u stromi jajnika nego u stromi jajovoda, kao i u stromi jajnika u odnosu na njegov epitel, te je pokazana pozitivna korelacija između nuklearnog proteina PTCH1 i SHh-liganda u stromi jajnika. Kod jajovoda je bilo obrnuto; nuklearna ekspresija proteina PTCH1 bila je viša u epitelu jajovoda nego u epitelu jajnika, kao i u epitelu jajovoda u odnosu na njegovu stromu, te je pokazana pozitivna korelacija između nuklearnog proteina PTCH1 i SHh-liganda u epitelu jajovoda. Osim što se navedenim nalazima potvrđuje aktivnost signalnog puta Hh u stromi jajnika, nameće se mogućnost aktivnosti ovog signalnog puta u epitelu jajovoda te se otvara pitanje o mehanizmima aberantne aktivacije Hh-signalizacije u navedenim tkivima i njihovom utjecaju na razvoj tumorskih stanica.

Rezultati našeg istraživanja ukazali su na važnost autokrine signalizacije ovisne o SHh-ligandu u seroznim karcinomima jajnika, te moguću odsutnost parakrine SHh-signalizacije u karcinomima HGSC, ali ne i u LGSC. Pozitivna korelacija ekspresije proteina SHh i PTCH1 u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC i nepovezanost ekspresije navedenih proteina u vezivnoj stromi kod oba tipa karcinoma dodatno potvrđuju važnost autokrine SHh-signalizacije u ovim karcinomima jajnika. Uz autokrinu SHh-signalizaciju, opaženo je da bi i autokrina i parakrina IHh-signalizacija također mogle biti bitne za razvoj seroznih karcinoma jajnika. Iako je ekspresija proteina IHh bila značajno veća u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC nego u zdravom epitelu jajnika i jajovoda, pozitivna korelacija između proteina IHh i PTCH1 bila je prisutna samo u karcinomima HGSC. Prema tome, autokrina IHh-signalizacija mogla bi igrati ulogu u razvoju karcinoma HGSC, ali ne i LGSC. Budući da je ekspresija proteina IHh bila znatno veća u vezivnoj stromi tumora nego u tumorskom epitelu karcinoma HGSC i LGSC, ukazali smo na moguću važnost parakrine signalizacije

ovisne o IHh-ligandu u ovim karcinomima. Pozitivna korelacija između proteina IHh i PTCH1 u vezivnoj stromi karcinoma HGSC potvrđuje moguću važnost parakrine IHh-signalizacije u ovim karcinomima, dok nepovezanost ekspresije navedenih proteina u vezivnoj stromi karcinoma LGSC upućuje na odsutnost ove signalizacije u navedenim karcinomima. U karcinomima HGSC uočena je i pozitivna korelacija između proteina PTCH1 u tumorskom epitelu i IHh u vezivnoj stromi tumora, kao i pozitivna korelacija između proteina IHh u tumorskom epitelu i PTCH1 u vezivnoj stromi tumora. Navedeni rezultati mogu se objasniti istovremenim djelovanjem autokrine i parakrine IHh-signalizacije u karcinomima HGSC pri čemu se aktivnost Hh-signalizacije u tumorskom tkivu i u vezivnoj stromi tumora povećava s porastom razine ekspresije IHh-liganda kojeg izlučuju tumorske stanice.

Rezultati ovog rada pokazali su da je poremećena ekspresija regulatornih komponenti signalnog puta Hh, receptora PTCH1 i liganada SHh i IHh, povezana s razvojem seroznih karcinoma jajnika. U ovom istraživanju prvi put je zabilježena nuklearna lokalizacija proteina PTCH1 u tumorskim stanicama seroznih karcinoma jajnika. Protein PTCH1, odnosno njegov N-terminalni fragment, mogao bi igrati aktivnu, tumor-promotorsku ulogu u jezgri ovih malignih stanica pa bi bilo zanimljivo istražiti njegovu potencijalnu regulatornu ulogu u jezgri. Osim toga, ukazali smo na važnost autokrine signalizacije ovisne o SHh-ligandu, kao i autokrine i parakrine signalizacije ovisne o IHh-ligandu, u patogenezi seroznih karcinoma jajnika. Da bi se dodatno razjasnilo međudjelovanje tumorskog tkiva i vezivne strome tumora, neophodne su daljnje studije na većem broju uzoraka i uz dodatne molekularno-biološke metode. Budući da su serozni karcinomi jajnika maligni tumori s visokom stopom smrtnosti, jako je bitno istražiti molekularnu podlogu ove bolesti. Spoznaje o statusu pojedinih komponenti signalnog puta Hh u seroznim karcinomima jajnika doprinose boljem razumijevanju molekularne patogeneze ovih karcinoma te otvaraju mogućnost terapijskih djelovanja nudeći pogodne molekularne mete, što može rezultirati mjerljivom koristi za buduće pacijentice.

7. ZAKLJUČAK

1. Povećana ekspresija proteina PTCH1 u karcinomima HGSC i LGSC i staničnim linijama HGSC-a upućuje na njegovu aktivnu uključenost u patogenezu ovih karcinoma. Izražena nuklearna ekspresija proteina PTCH1 u tumorskom epitelu i tumorskim stanicama u kulturi navodi na zaključak da bi navedeni protein mogao igrati aktivnu, tumor-promotorsku ulogu u jezgri malignih stanica seroznih karcinoma jajnika.

2. U pojedinim substaničnim frakcijama staničnih linija HGSC-a i kontrolne stanične linije normalnih epitelnih stanica jajovoda FNE1 detektirani su fragmenti proteina PTCH1 različite molekularne mase što upućuje na mogućnost proteolitičkog cijepanja ovog proteina, kao i na mogućnost posttranslacijskih modifikacija nastalih fragmenata. Moguće je da dolazi do proteolitičkog cijepanja citoplazmatske N-terminalne domene proteina PTCH1 koja se zatim translocira u jezgru gdje obavlja do sada još nepoznatu funkciju, dok veći dio proteina ostaje u citoplazmi.

3. Osim u jezgrenoj frakciji, protein PTCH1 bio je prisutan i u kromatinskoj frakciji iz čega se može zaključiti da bi ovaj protein mogao igrati aktivnu ulogu u transkripcijskoj regulaciji određenih gena.

4. Metilacija DNA u promotoru gena *PTCH1* nije povezana s razinom ekspresije proteina PTCH1 te nije mehanizam uključen u patogenezu seroznih karcinoma jajnika.

5. Povećana ekspresija SHh i IHh-liganada u karcinomima HGSC i LGSC i staničnim linijama HGSC-a ukazuje na njihovu aktivnu uključenost u patogenezu ovih karcinoma.

6. U seroznim karcinomima jajnika zabilježene su autokrina signalizacija ovisna o SHh-ligandu i IHh-ligandu te parakrina signalizacija ovisna o IHh-ligandu. Autokrina signalizacija ovisna o SHh-ligandu uočena je u karcinomima HGSC i LGSC, dok su autokrina i parakrina signalizacija ovisna o IHh-ligandu uočene u karcinomima HGSC.

7. Metilacija DNA u promotorima gena *SHh* i *IHh* nije povezana s razinom ekspresije odgovarajućih proteina te nije mehanizam uključen u patogenezu seroznih karcinoma jajnika.

8. SAŽETAK

Serozni karcinomi jajnika najčešći su oblik epitelnih tumora jajnika. Uglavnom se dijagnosticiraju u uznapredovalom stadiju bolesti i imaju visoku stopu smrtnosti. Kod raka jajnika primijećena je poremećena aktivacija više signalnih puteva među kojima je i signalni put Hedgehog (Hh). Uloga signalnog puta Hh u raku jajnika, kao i u pojedinim histološkim podtipovima raka jajnika, nije dovoljno istražena. U ovoj disertaciji istražili smo ulogu proteina PTCH1, SHh i IHh, kao i promjene u metilacijskom statusu promotora istoimenih gena, u seroznim karcinomima jajnika. Istraživanje je provedeno na uzorcima seroznih karcinoma jajnika niskog (LGSC) i visokog (HGSC) stupnja malignosti, dok su uzorci zdravih jajnika i jajovoda služili kao kontrole. U istraživanju su korištene i stanične linije HGSC-a, OVCAR5, OVCAR8 i OVSHAO, i kontrolna stanična linija normalnih epitelnih stanica jajovoda, FNE1. Ekspresija proteina PTCH1, SHh i IHh u tkivnim uzorcima analizirana je metodom imunohistokemije, dok je u staničnim linijama ispitana uz pomoć imunofluorescencije i Western blota. Metilacijski obrazac DNA u promotorima gena *PTCH1*, *SHh* i *IHh* analizirali smo koristeći PCR ovisan o metilaciji (MSP). Ekspresija proteina PTCH1, SHh i IHh bila je značajno veća u karcinomima HGSC i LGSC u odnosu na kontrolna tkiva, kao i u karcinomskim u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. U tumorskom tkivu i tumorskim stanicama u kulturi bila je izražena nuklearna ekspresija proteina PTCH1 što navodi na zaključak da bi navedeni protein mogao igrati aktivnu, tumor-promotorsku ulogu u jezgri malignih stanica seroznih karcinoma jajnika. U staničnim linijama detektirani su fragmenti proteina PTCH1 različite molekularne mase što upućuje na mogućnost proteolitičkog cijepanja ovog proteina. Autokrina signalizacija ovisna o SHh-ligandu utvrđena je u karcinomima HGSC i LGSC, dok su autokrina i parakrina signalizacija ovisna o IHh-ligandu uočene u karcinomima HGSC. Metilacija DNA u promotorima gena *PTCH1*, *SHh* i *IHh* nije bila povezana s razinom ekspresije ovih proteina što navodi na zaključak da ovaj mehanizam nije uključen u patogenezu seroznih karcinoma jajnika. Dobiveni rezultati upućuju na aktivnu ulogu proteina PTCH1, SHh i IHh u patogenezi seroznih karcinoma jajnika te doprinose boljem razumijevanju molekularne patogeneze ovih karcinoma.

9. SUMMARY

Epigenetic changes and PTCH1, SHh and IHh protein expression in serous ovarian carcinomas

Valentina Karin-Kujundžić, 2021

Serous ovarian carcinomas are the most common type of epithelial ovarian cancers. They are mostly diagnosed in the advanced stage of the disease and have a high mortality rate. In ovarian cancer, aberrant activation of several signaling pathways, including the Hh signaling pathway, has been observed. The role of Hh signaling pathway in ovarian cancer, as well as in certain histological subtypes of ovarian cancer, has not been sufficiently investigated. In this dissertation, we investigated the role of PTCH1, SHh and IHh proteins, as well as changes in the promoter methylation status of the corresponding genes, in serous ovarian carcinomas. Low- (LGSC) and high-grade (HGSC) serous ovarian carcinoma tissue samples were used in this study, while normal ovarian and fallopian tube tissue samples served as controls. HGSC cell lines, OVCAR5, OVCAR8 and OVSHAO, and control cell line, normal fallopian tube non-ciliated epithelium cell line FNE1, were also used in the study. PTCH1, SHh and IHh protein expression levels were analyzed using immunohistochemistry in tissue samples, and by immunofluorescence and Western blot in cell lines. DNA methylation pattern of *PTCH1*, *SHh* and *IHh* genes were analyzed by methylation-specific PCR (MSP). PTCH1, SHh and IHh protein expression levels were significantly higher in HGSCs and LGSCs compared to control tissues, as well as in cancer cell lines compared to control cell line. Nuclear expression of the PTCH1 protein in tumor tissue and cultured tumor cells suggests that this protein could play an active, tumor-promoter role in the nuclei of serous ovarian cancer cells. PTCH1 protein fragments of different molecular weight were detected in the cell lines, indicating possible proteolytic cleavage of this protein. Autocrine SHh signaling was found in HGSCs and LGSCs, while autocrine and paracrine IHh signaling were observed in HGSCs. DNA methylation of *PTCH1*, *SHh*, and *IHh* gene promoters were not in line with the expression levels of these proteins, leading to the conclusion that this mechanism is not involved in the pathogenesis of serous ovarian carcinoma. Our results indicate that PTCH1, SHh and IHh proteins play an active role in pathogenesis of serous ovarian carcinoma, and contribute to a better understanding of the molecular pathogenesis of these cancers.

10. LITERATURA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.

2. Bhatla N. The world ovarian cancer coalition atlas: Global trends in incidence, mortality and survival [Internet]. World Ovarian Cancer Coalition 2018. Dostupno na: https://worldovariancancercoalition.org/wp-content/uploads/2018/10/THE-WORLD-OVARIAN-CANCER-COALITION-ATLAS-2018.pdf

3. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16061. doi: 10.1038/nrdp.2016.61

4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. Šekerija M, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske; 2017 [pristupljeno 03.02.2020.], Bilten br. 42. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2017-final.pdf

5. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. Clin Obstet Gynecol. 2012;55(1):3-23.

6. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. Int J Womens Health. 2019;11:287-99.

7. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. Cancer Biol Med. 2017;14(1):9-32.

8. Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. Mol Cell Proteomics. 2004;3(4):355-66.

9. Ebell MH, Culp MB, Radke TJ. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. Am J Prev Med. 2016;50(3):384-94.

10. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. J Ovarian Res. 2019;12(1):28. doi:10.1186/s13048-019-0503-7

11. Shetty M. Imaging and Differential Diagnosis of Ovarian Cancer. Semin Ultrasound CT MR. 2019;40(4):302-18.

12. Klotz DM, Wimberger P. Cells of origin of ovarian cancer: ovarian surface epithelium or fallopian tube? Arch Gynecol Obstet. 2017;296(6):1055-62.

13. Kim J, Park EY, Kim O, Schilder JM, Coffey DM, Cho CH, i sur. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. Cancers. 2018;10(11):433. doi: 10.3390/cancers10110433

14. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. Facts Views Vis Obgyn. 2013;5(4):292-7.

15. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. J Natl Cancer Inst. 1983;71(4):717-21.

16. Lukanova A, Kaaks R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(1):98-107.

17. Risch HA. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. J Natl Cancer Inst. 1998;90(23):1774-86.

18. Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. J Natl Cancer Inst. 1999;91(17):1459-67.

19. Shan W, Liu J. Inflammation: a hidden path to breaking the spell of ovarian cancer. Cell Cycle. 2009;8(19):3107-11.

20. Jia D, Nagaoka Y, Katsumata M, Orsulic S. Inflammation is a key contributor to ovarian cancer cell seeding. Sci Rep. 2018;8(1):12394. doi: 10.1038/s41598-018-30261-8

21. Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. Int J Gynaecol Obstet. 2014;124(1):1-5.

22. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. Gynecol Oncol. 2014;133(3):401-4.

23. Cannistra SA, Gershenson DM, Recht A. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. U: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, ur. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 9. izd. Philadelphia: Lippincott, Williams, Wilkins; 2011. Str. 1368–91.

24. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Coté TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. Cancer. 2003;97(10 Suppl):2631-42.

25. Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, Iyer RB, Bhosale P. Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging. AJR Am J Roentgenol. 2016;206(6):1351-60.

26. Prat J, D'Angelo E, Espinosa I. Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics. Hum Pathol. 2018;80:11-27.

27. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. Virchows Arch. 2012;460(3):237-49.

28. Bergstrom J, Shih IM, Fader, AN. Updates on Rare Epithelial Ovarian Carcinoma. U: Birrer MJ, Ceppi L, ur. Translational Advances in Gynecologic Cancers. Cambridge: Academic Press; 2017. Str. 181–95.

29. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, i sur. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. Lancet Oncol. 2012;13(4):385-94.

30. Rosen DG, Yang G, Liu G, Mercado-Uribe I, Chang B, Xiao XS, i sur. Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. Front Biosci. 2009;14:2089-102.

31. Cybulska P, Paula ADC, Tseng J, Leitao MM Jr, Bashashati A, Huntsman DG, i sur. Molecular profiling and molecular classification of endometrioid ovarian carcinomas. Gynecol Oncol. 2019;154(3):516-23.

32. Liu H, Xu Y, Ji J, Dong R, Qiu H, Dai X. Prognosis of ovarian clear cell cancer compared with other epithelial cancer types: A population-based analysis. Oncol Lett. 2020;19(3):1947-57.

33. Hirst J, Crow J, Godwin A. Ovarian Cancer Genetics: Subtypes and Risk Factors. U: Devaja O, Papadopoulos A, ur. Ovarian Cancer - From Pathogenesis to Treatment. London: IntechOpen; 2018. Str. 3-38.

34. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Ovarian Cancers: Evolving Paradigms in Research and Care. Washington, DC: National Academies Press; 2016.

35. Babaier A, Ghatage P. Mucinous Cancer of the Ovary: Overview and Current Status. Diagnostics. 2020;10(1):52. doi: 10.3390/diagnostics10010052

36. Cheasley D, Wakefield MJ, Ryland GL, Allan PE, Alsop K, Amarasinghe KC, i sur. The molecular origin and taxonomy of mucinous ovarian carcinoma. Nat Commun. 2019;10(1):3935. doi: 10.1038/s41467-019-11862-x

37. Morice P, Gouy S, Leary A. Mucinous Ovarian Carcinoma. N Engl J Med. 2019;380(13):1256-66.

38. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, i sur. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. Am J Surg Pathol. 2004;28(4):496-504.

39. Slomovitz B, Gourley C, Carey MS, Malpica A, Shih IM, Huntsman D, i sur. Low-grade serous ovarian cancer: State of the science. Gynecol Oncol. 2020;156(3):715-25.

40. Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. Adv Anat Pathol. 2009;16(5):267-82.

41. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Köbel M3, Harris HR, Berchuck A, Rossing MA, i sur. Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. J Natl Cancer Inst. 2019;111(1):60-8.

42. Fader AN, Java J, Ueda S, Bristow RE, Armstrong DK, Bookman MA, i sur. Survival in women with grade 1 serous ovarian carcinoma. Obstet Gynecol. 2013;122(2 Pt 1):225-32.

43. Sfakianos GP, Secord AA, Shih IeM. Epithelial Ovarian Cancers: Low Malignant Potential and Non-Serous Ovarian Histologies. U: Karlan BY, Bristow RE, Li AJ, ur. Gynecologic Oncology: Clinical Practice and Surgical Atlas. New York: McGraw Hill; 2012.

44. Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms. Histopathology. 2013;62(1):44-58.

45. Kaldawy A, Segev Y, Lavie O, Auslender R, Sopik V, Narod SA. Low-grade serous ovarian cancer: A review. Gynecol Oncol. 2016;143(2):433-8.

46. Li J, Abushahin N, Pang S, Xiang L, Chambers SK, Fadare O, i sur. Tubal origin of 'ovarian' low-grade serous carcinoma. Mod Pathol. 2011;24(11):1488-99.

47. Qiu C, Lu N, Wang X, Zhang Q, Yuan C, Yan S, i sur. Gene expression profiles of ovarian low-grade serous carcinoma resemble those of fallopian tube epithelium. Gynecol Oncol. 2017;147(3):634-41.

48. Wang Y, Hong S, Mu J, Wang Y, Lea J, Kong B, i sur. Tubal Origin of "Ovarian" Low-Grade Serous Carcinoma: A Gene Expression Profile Study. J Oncol. 2019;2019:8659754. doi: 10.1155/2019/8659754

49. Matsumura N, Konishi I. Ovarian Cancer Genome and Molecular Experimental Sciences. U: Katabuchi H, ur. Frontiers in Ovarian Cancer Science. Singapore: Springer Nature; 2017. Str. 143-154.

50. Ho CL, Kurman RJ, Dehari R, Wang TL, Shih IeM. Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. Cancer Res. 2004;64(19):6915-8.

51. Cho KR, Shih IeM. Ovarian cancer. Annu Rev Pathol. 2009;4:287-313.

52. Kuo KT, Guan B, Feng Y, Mao TL, Chen X, Jinawath N, i sur. Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. Cancer Res. 2009;69(9):4036-42.

53. Tone AA, McConechy MK, Yang W, Ding J, Yip S, Kong E, i sur. Intratumoral heterogeneity in a minority of ovarian low-grade serous carcinomas. BMC Cancer. 2014;14:982. doi: 10.1186/1471-2407-14-982

54. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. Int J Mol Sci. 2019;20(4):952. doi: 10.3390/ijms20040952

55. Auersperg N. Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? Gynecol Oncol. 2013;130(1):246-51.

56. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. Ann Oncol. 2013;24(Suppl 10):x16-21.

57. Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih IeM. The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. Am J Surg Pathol. 2007;31(7):1007-12.

58. Toptas T, Pestereli E, Simsek T, Bozkurt S, Erdogan G, Karaveli S. The clinical impact of serous tubal intraepithelial carcinoma on outcomes of patients with high-grade serous carcinoma of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. J Cancer Res Ther. 2018;14(3):587-92.

59. Xiang L, Rong G, Zhao J, Wang Z, Shi F. Identification of candidate genes associated with tubal origin of high-grade serous ovarian cancer. Oncol Lett. 2018;15(5):7769-75.

60. Coscia F, Watters KM, Curtis M, Eckert MA, Chiang CY, Tyanova S, i sur. Integrative proteomic profiling of ovarian cancer cell lines reveals precursor cell associated proteins and functional status. Nat Commun. 2016;7:12645. doi: 10.1038/ncomms12645

61. Hao D, Li J, Jia S, Meng Y, Zhang C, Wang L, i sur. Integrated Analysis Reveals Tubal- and Ovarian-Originated Serous Ovarian Cancer and Predicts Differential Therapeutic Responses. Clin Cancer Res. 2017;23(23):7400-11.

62. Zhang S, Dolgalev I, Zhang T, Ran H, Levine DA, Neel BG. Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma. Nat Commun. 2019;10(1):5367. doi: 10.1038/s41467-019-13116-2

63. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. Nature. 2011;474(7353):609-15.

64. Kastenhuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. Cell. 2017;170(6):1062–78.

65. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, i sur. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. J Pathol. 2007;211(1):26-35.

66. Testa U, Petrucci E, Pasquini L, Castelli G, Pelosi E. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. Medicines (Basel). 2018;5(1):E16. doi: 10.3390/medicines5010016

67. Verhaak RG, Tamayo P, Yang JY, Hubbard D, Zhang H, Creighton CJ, i sur. Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. J Clin Invest. 2013;123(1):517-25.

68. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. Nat Rev Genet. 2006;7(11):841-50.

69. Jia Y, Wang Y, Xie J. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. Arch Toxicol. 2015;89(2):179-91.

70. Jeng KS, Chang CF, Lin SS. Sonic Hedgehog Signaling in Organogenesis, Tumors, and Tumor Microenvironments. Int J Mol Sci. 2020;21(3):758. doi:10.3390/ijms21030758

71. Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. Development. 2014;141(18):3445-57.

72. Bangs F, Anderson KV. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017;9(5):a028175. doi:10.1101/cshperspect.a028175

73. Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the Primary Cilium. Front Cell Dev Biol. 2018;6:8. doi:10.3389/fcell.2018.00008

74. Goetz SC, Ocbina PJ, Anderson KV. The primary cilium as a Hedgehog signal transduction machine. Methods Cell Biol. 2009;94:199-222.

75. Ryan KE, Chiang C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. J Biol Chem. 2012;287(22):17905-13.

76. Hanna A, Shevde LA. Hedgehog signaling: modulation of cancer properies and tumor mircroenvironment [published correction appears in Mol Cancer. 2016;15(1):35]. Mol Cancer. 2016;15:24. doi:10.1186/s12943-016-0509-3

77. Niyaz M, Khan MS, Mudassar S. Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. Transl Oncol. 2019;12(10):1334-44.

78. Pak E, Segal RA. Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy. Dev Cell. 2016;38(4):333-44.

79. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothened. Oncotarget. 2015;6(16):13899-913.

80. Briscoe J, Thérond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013;14(7):416-29.

81. Bishop B, Aricescu AR, Harlos K, O'Callaghan CA, Jones EY, Siebold C. Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(7):698-703.

82. Riobo NA. Canonical and Non-Canonical Hedgehog Signaling Pathways: Role of G Proteins. U: Ruat M, ur. The Smoothened Receptor in Cancer and Regenerative Medicine. Topics in Medicinal Chemistry. 16. izd. Cham: Springer; 2014. Str. 13-42.

83. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCLSE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. Cell Commun Signal. 2018;16(1):11. doi:10.1186/s12964-018-0220-7

84. Pelullo M, Zema S, Nardozza F, Checquolo S, Screpanti I, Bellavia D. Wnt, Notch, and TGF-β Pathways Impinge on Hedgehog Signaling Complexity: An Open Window on Cancer. Front Genet. 2019;10:711. doi:10.3389/fgene.2019.00711

85. Lauth M, Toftgård R. Non-canonical activation of GLI transcription factors: implications for targeted anti-cancer therapy. Cell Cycle. 2007;6(20):2458-63.

86. Guo YY, Zhang JY, Li XF, Luo HY, Chen F, Li TJ. PTCH1 gene mutations in Keratocystic odontogenic tumors: a study of 43 Chinese patients and a systematic review. PLoS One. 2013;8(10):e77305. doi:10.1371/journal.pone.0077305

87. Shimokawa T, Svärd J, Heby-Henricson K, Teglund S, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of first exon variants of the tumor-suppressor Patched1 in Hedgehog signaling. Oncogene. 2007;26(34):4889-96.

88. Wils LJ, Bijlsma MF. Epigenetic regulation of the Hedgehog and Wnt pathways in cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2018;121:23-44.

89. Rudolf AF, Kinnebrew M, Kowatsch C, Ansell TB, El Omari K, Bishop B, i sur. The morphogen Sonic hedgehog inhibits its receptor Patched by a pincer grasp mechanism. Nat Chem Biol. 2019;15(10):975-82.

90. Gong X, Qian H, Cao P, Zhao X, Zhou Q, Lei J, i sur. Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human Patched1. Science. 2018;361(6402):eaas8935. doi:10.1126/science.aas8935

91. Zhang Y, Bulkley DP, Xin Y, Roberts KJ, Asarnow DE, Sharma A, i sur. Structural Basis for Cholesterol Transport-like Activity of the Hedgehog Receptor Patched. Cell. 2018;175(5):1352-64.

92. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened [published correction appears in Nature 2002;420(6914):445]. Nature. 2002;418(6900):892-7.

93. Kowatsch C, Woolley RE, Kinnebrew M, Rohatgi R, Siebold C. Structures of vertebrate Patched and Smoothened reveal intimate links between cholesterol and Hedgehog signalling. Curr Opin Struct Biol. 2019;57:204-14.

94. Kuwabara PE, Labouesse M. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? Trends Genet. 2002;18(4):193-201.

95. Xiao X, Tang JJ, Peng C, Wang Y, Fu L, Qiu ZP, i sur. Cholesterol Modification of Smoothened Is Required for Hedgehog Signaling. Mol Cell. 2017;66(1):154-62.

96. Qi C, Di Minin G, Vercellino I, Wutz A, Korkhov VM. Structural basis of sterol recognition by human hedgehog receptor PTCH1. Sci Adv. 2019;5(9):eaaw6490. doi:10.1126/sciadv.aaw6490

97. Petrov K. Functional Mechanisms of Patched1, the Hedgehog Pathway Receptor [disertacija]. Cambridge: Harvard University, Graduate School of Arts & Sciences; 2019.

98. Fleet AJ, Hamel PA. The protein-specific activities of the transmembrane modules of Ptch1 and Ptch2 are determined by their adjacent protein domains. J Biol Chem. 2018;293(43):16583-95.

99. Fleet A, Lee JP, Tamachi A, Javeed I, Hamel PA. Activities of the Cytoplasmic Domains of Patched-1 Modulate but Are Not Essential for the Regulation of Canonical Hedgehog Signaling. J Biol Chem. 2016;291(34):17557-68.

100. Qi X, Schmiege P, Coutavas E, Li X. Two Patched molecules engage distinct sites on Hedgehog yielding a signaling-competent complex. Science. 2018;362(6410):eaas8843. doi:10.1126/science.aas8843

101. Lu X, Liu S, Kornberg TB. The C-terminal tail of the Hedgehog receptor Patched regulates both localization and turnover. Genes Dev. 2006;20(18):2539-51.

102. Qian H, Cao P, Hu M, Gao S, Yan N, Gong X. Inhibition of tetrameric Patched1 by Sonic Hedgehog through an asymmetric paradigm. Nat Commun. 2019;10(1):2320. doi:10.1038/s41467-019-10234-9

103. Mille F, Thibert C, Fombonne J, Rama N, Guix C, Hayashi H, i sur. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. Nat Cell Biol. 2009;11(6):739-46.

104. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. Sci Signal. 2012;5(246):re6. doi: 10.1126/scisignal.2002906

105. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, i sur. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(23):13630-4.

106. Holtz AM, Peterson KA, Nishi Y, Morin S, Song JY, Charron F, i sur.. Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning. Development. 2013;140(16):3423-34.

107. Rahnama F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. Biochem J. 2004;378(Pt 2):325-34.

108. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev. 2001;15(23):3059-87.

109. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. Genes Dev. 2008;22(18):2454-72.

110. Tickle C, Towers M. Sonic Hedgehog Signaling in Limb Development. Front Cell Dev Biol. 2017;5:14. doi:10.3389/fcell.2017.00014

111. SHH gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [ažurirano u rujnu 2010; pristupljeno 28.04.2020]. Dostupno na: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SHH#location

112. Odent S, Atti-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Aug J, Delezo de AL, i sur. Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. Hum Mol Genet. 1999;8(9):1683-9.

113. Kong JH, Siebold C, Rohatgi R. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. Development. 2019;146(10):dev166892. doi:10.1242/dev.166892

114. Hardy RY, Resh MD. Identification of N-terminal residues of Sonic Hedgehog important for palmitoylation by Hedgehog acyltransferase. J Biol Chem. 2012;287(51):42881-9.

115. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development [published correction appears in Science 1996;274(5293):1597]. Science. 1996;274(5285):255-9.

116. Buglino JA, Resh MD. Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. J Biol Chem. 2008;283(32):22076-88.

117. Tukachinsky H, Kuzmickas RP, Jao CY, Liu J, Salic A. Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. Cell Rep. 2012;2(2):308-20.

118. Panáková D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. Nature. 2005;435(7038):58-65.

119. Liégeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in Caenorhabditis elegans. J Cell Biol. 2006;173(6):949-61.

120. Tukachinsky H, Petrov K, Watanabe M, Salic A. Mechanism of inhibition of the tumor suppressor Patched by Sonic Hedgehog. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(40):E5866-75.

121. IHH gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [pristupljeno 12.05.2020]. Dostupno na: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IHH#location

122. Gao B, He L. Answering a century old riddle: brachydactyly type A1. Cell Res. 2004;14(3):179-87.

123. van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, i sur. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. Nat Genet. 2004;36(3):277-82.

124. Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, Munday JR, Baron MH. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. Development. 2001;128(10):1717-30.

125. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. Genes Dev. 1999;13(16):2072-86. Erratum in: Genes Dev 1999;13(19):2617.

126. Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. Int J Oral Sci. 2015;7(2):73-79.

127. Wu Q, Zhang Y, Chen Q. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. J Biol Chem. 2001;276(38):35290-6.

128. Outram SV, Hager-Theodorides AL, Shah DK, Rowbotham NJ, Drakopoulou E, Ross SE, i sur. Indian hedgehog (Ihh) both promotes and restricts thymocyte differentiation. Blood. 2009;113(10):2217-28.

129. O'Hara WA, Azar WJ, Behringer RR, Renfree MB, Pask AJ. Desert hedgehog is a mammal-specific gene expressed during testicular and ovarian development in a marsupial. BMC Dev Biol. 2011;11:72. doi: 10.1186/1471-213X-11-72

130. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. Genes Dev. 2002;16(11):1433-40.

131. Finco I, LaPensee CR, Krill KT, Hammer GD. Hedgehog signaling and steroidogenesis. Annu Rev Physiol. 2015;77:105-29.

132. Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, i sur. Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. Neuron. 1999;23(4):713-24.

133. Lau CI, Outram SV, Saldaña JI, Furmanski AL, Dessens JT, Crompton T. Regulation of murine normal and stress-induced erythropoiesis by Desert Hedgehog. Blood. 2012;119(20):4741-51.

134. Arensdorf AM, Marada S, Ogden SK. Smoothened Regulation: A Tale of Two Signals. Trends Pharmacol Sci. 2016;37(1):62-72.

135. Huang P, Zheng S, Wierbowski BM, Kim Y, Nedelcu D, Aravena L, Liu J, Kruse AC, Salic A. Structural Basis of Smoothened Activation in Hedgehog Signaling. Cell. 2018 Jul 12;174(2):312-24.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.029. Erratum in: Cell. 2018;175(1):295-7.

136. Li S, Cho YS, Wang B, Li S, Jiang J. Regulation of Smoothened ubiquitylation and cell surface expression through a Cul4-DDB1-Gβ E3 ubiquitin ligase complex. J Cell Sci. 2018;131(15):jcs218016. doi:10.1242/jcs.218016

137. Li ZJ, Nieuwenhuis E, Nien W, Zhang X, Zhang J, Puviindran V, i sur. Kif7 regulates Gli2 through Sufu-dependent and -independent functions during skin development and tumorigenesis. Development. 2012;139(22):4152-61.

138. Cheung HO, Zhang X, Ribeiro A, Mo R, Makino S, Puviindran V, i sur. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. Sci Signal. 2009;2(76):ra29. doi:10.1126/scisignal.2000405

139. He M, Subramanian R, Bangs F, Omelchenko T, Liem KF Jr, Kapoor TM, i sur. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. Nat Cell Biol. 2014;16(7):663-72.

140. Gorojankina T. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction. Cell Mol Life Sci. 2016;73(7):1317-32.

141. Cheng SY, Yue S. Role and regulation of human tumor suppressor SUFU in Hedgehog signaling. Adv Cancer Res. 2008;101:29-43.

142. Huang D, Wang Y, Tang J, Luo S. Molecular mechanisms of suppressor of fused in regulating the hedgehog signalling pathway. Oncol Lett. 2018;15(5):6077-86.

143. Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011;27:513-37.

144. Niewiadomski P, Niedziółka SM, Markiewicz Ł, Uśpieński T, Baran B, Chojnowska K. Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. Cells. 2019;8(2):147. doi:10.3390/cells8020147

145. Pan Y, Wang B. A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. J Biol Chem. 2007;282(15):10846-52.

146. Nieuwenhuis E, Hui CC. Hedgehog signaling and congenital malformations. Clin Genet. 2005;67(3):193-208.

147. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. Bosn J Basic Med Sci. 2018;18(1):8-20.

148. Sari IN, Phi LTH, Jun N, Wijaya YT, Lee S, Kwon HY. Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells. Cells. 2018;7(11):208. doi:10.3390/cells7110208

149. Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer. Clin Cancer Res. 2006;12(20 Pt 1):5924-8.

150. Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, i sur. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. Nat Med. 2007;13(8):944-51.

151. Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, i sur. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. Blood. 2012;120(25):5002-13.

152. Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. Nat Rev Cancer. 2008;8(10):743-54.

153. Raleigh DR, Choksi PK, Krup AL, Mayer W, Santos N, Reiter JF. Hedgehog signaling drives medulloblastoma growth via CDK6. J Clin Invest. 2018;128(1):120-4.

154. Hatley ME, Tang W, Garcia MR, Finkelstein D, Millay DP, Liu N, i sur. A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage. Cancer Cell. 2012;22(4):536-46.

155. Park KS, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, i sur. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. Nat Med. 2011;17(11):1504-8.

156. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. Int J Mol Sci. 2013;14(7):13979-4007.

157. Song X, Yan L, Lu C, Zhang C, Zhu F, Yang J, i sur. Activation of hedgehog signaling and its association with cisplatin resistance in ovarian epithelial tumors. Oncol Lett. 2018;15(4):5569-76.

158. Car D, Sabol M, Musani V, Ozretić P, Levanat S. Epigenetic regulation of the Hedgehog-Gli signaling pathway in cancer. Period Biol. 2010;112(4):419-23.

159. Levanat S, Sabol M, Musani V, Ozretic P, Trnski D. Hedgehog Signaling Pathway as Genetic and Epigenetic Target in Ovarian Tumors. Curr Pharm Des. 2017;23(1):73-94.

160. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, i sur. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. Br J Dermatol. 2005;152(1):43-51.

161. Menyhárt O, Győrffy B. Principles of tumorigenesis and emerging molecular drivers of SHH-activated medulloblastomas. Ann Clin Transl Neurol. 2019;6(5):990-1005.

162. Chung JH, Bunz F. A loss-of-function mutation in PTCH1 suggests a role for autocrine hedgehog signaling in colorectal tumorigenesis. Oncotarget. 2013;4(12):2208-11.

163. Wang CY, Chang YC, Kuo YL, Lee KT, Chen PS, Cheung CHA, i sur. Mutation of the PTCH1 gene predicts recurrence of breast cancer. Sci Rep. 2019;9(1):16359. doi:10.1038/s41598-019-52617-4

164. Musani V, Sabol M, Car D, Ozretic P, Oreskovic S, Leovic D, i sur. LOH of PTCH1 region in BCC and ovarian carcinoma: microsatellite vs. HRM analysis. Front Biosci (Elite Ed). 2012;4:1049-57.

165. Maesawa C, Tamura G, Iwaya T, Ogasawara S, Ishida K, Sato N, i sur. Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in esophageal squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer. 1998;21(3):276-9.

166. McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Malkowicz SB. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. Oncogene. 1998;17(9):1167-72.

167. Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, i sur. Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene inbasal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. Hum Mol Genet. 1999;8(2):291-7.

168. Aavikko M, Li SP, Saarinen S, Alhopuro P, Kaasinen E, Morgunova E, i sur. Loss of SUFU function in familial multiple meningioma. Am J Hum Genet. 2012;91(3):520-6.

169. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, i sur. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. Nature. 1998;391(6662):90-2.

170. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA, i sur. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. Nat Genet. 2014;46(7):722-5. Erratum in: Nat Genet. 2015;47(1):97.

171. Boetto J, Bielle F, Sanson M, Peyre M, Kalamarides M. SMO mutation status defines a distinct and frequent molecular subgroup in olfactory groove meningiomas. Neuro Oncol. 2017;19(3):345-51.

172. Dagklis A, Pauwels D, Lahortiga I, Geerdens E, Bittoun E, Cauwelier B, i sur. Hedgehog pathway mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2015;100(3):e102-5.

173. Rusert JM, Wu X, Eberhart CG, Taylor MD, Wechsler-Reya RJ. SnapShot: Medulloblastoma. Cancer Cell. 2014;26(6):940-940.e1. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.015

174. Banerjee S, Corless CL, Miettinen MM, Noh S, Ustoy R, Davis JL, i sur. Loss of the PTCH1 tumor suppressor defines a new subset of plexiform fibromyxoma. J Transl Med. 2019;17(1):246. doi:10.1186/s12967-019-1995-z

175. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet. 2003;33(Suppl):245-54.

176. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell. 2012;150(1):12-27.

177. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science. 2001;293(5532):1068-70.

178. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? Genes Cancer. 2011;2(6):607-17.

179. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet. 2010;70:27-56.

180. Diede SJ, Guenthoer J, Geng LN, Mahoney SE, Marotta M, Olson JM, i sur.. DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(1):234-9.

181. Heitzer E, Bambach I, Dandachi N, Horn M, Wolf P. PTCH promoter methylation at low level in sporadic basal cell carcinoma analysed by three different approaches. Exp Dermatol. 2010;19(10):926-28.

182. Sinha S, Singh RK, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Alterations in candidate genes PHF2, FANCC, PTCH1 and XPA at chromosomal 9q22.3 region: pathological

significance in early- and late-onset breast carcinoma. Mol Cancer. 2008;7:84. doi:10.1186/1476-4598-7-84

183. Zuo Y, Song Y, Zhang M, Xu Z, Qian X. Role of PTCH1 gene methylation in gastric carcinogenesis. Oncol Lett. 2014;8(2):679-82.

184. Shahi MH, Afzal M, Sinha S, Eberhart CG, Rey JA, Fan X, i sur. Human hedgehog interacting protein expression and promoter methylation in medulloblastoma cell lines and primary tumor samples. J Neurooncol. 2011;103(2):287-96.

185. Shahi MH, Zazpe I, Afzal M, Sinha S, Rebhun RB, Meléndez B, i sur. Epigenetic regulation of human hedgehog interacting protein in glioma cell lines and primary tumor samples. Tumour Biol. 2015;36(4):2383-91.

186. Lin EH, Kao YR, Lin CA, Kuo TY, Yang SP, Hsu CF, i sur. Hedgehog pathway maintains cell survival under stress conditions, and drives drug resistance in lung adenocarcinoma. Oncotarget. 2016;7(17):24179-93.

187. Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, i sur. Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 2008;14(12):3768-76.

188. Sun H, Ni SJ, Ye M, Weng W, Zhang Q, Zhang M, i sur. Hedgehog Interacting Protein 1 is a Prognostic Marker and Suppresses Cell Metastasis in Gastric Cancer. J Cancer. 2018;9(24):4642-9.

189. Martin ST, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx SR, Abe T, i sur. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms. Cancer Biol Ther. 2005;4(7):728-33.

190. Fu X, Deng H, Zhao L, Li J, Zhou Y, Zhang Y. Distinct expression patterns of hedgehog ligands between cultured and primary colorectal cancers are associated with aberrant methylation of their promoters. Mol Cell Biochem. 2010;337(1-2):185-92.

191. Wang LH, Choi YL, Hua XY, Shin YK, Song YJ, Youn SJ, i sur. Increased expression of sonic hedgehog and altered methylation of its promoter region in gastric cancer and its related lesions. Mod Pathol. 2006;19(5):675-83.

192. Cui W, Wang LH, Wen YY, Song M, Li BL, Chen XL, i sur. Expression and regulation mechanisms of Sonic Hedgehog in breast cancer. Cancer Sci. 2010;101(4):927-33.

193. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402

194. Fattahi S, Pilehchian Langroudi M, Akhavan-Niaki H. Hedgehog signaling pathway: Epigenetic regulation and role in disease and cancer development. J Cell Physiol. 2018;233(8):5726-35.

195. Ma C, Nong K, Wu B, Dong B, Bai Y, Zhu H, i sur. miR-212 promotes pancreatic cancer cell growth and invasion by targeting the hedgehog signaling pathway receptor patched-1. J Exp Clin Cancer Res. 2014 ;33(1):54. doi:10.1186/1756-9966-33-54

196. Li Y, Zhang D, Chen C, Ruan Z, Li Y, Huang Y. MicroRNA-212 displays tumor-promoting properties in non-small cell lung cancer cells and targets the hedgehog pathway receptor PTCH1. Mol Biol Cell. 2012;23(8):1423-34.

197. Long H, Wang Z, Chen J, Xiang T, Li Q, Diao X, i sur. microRNA-214 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in lung adenocarcinoma by targeting the suppressor-of-fused protein (Sufu). Oncotarget. 2015;6(36):38705-18.

198. Alimirah F, Peng X, Gupta A, Yuan L, Welsh JE, Cleary M, i sur. Crosstalk between the vitamin D receptor (VDR) and miR-214 in regulating SuFu, a hedgehog pathway inhibitor in breast cancer cells. Exp Cell Res. 2016;349(1):15-22.

199. Peng Y, Zhang X, Ma Q, Yan R, Qin Y, Zhao Y, i sur. MiRNA-194 activates the Wnt/β-catenin signaling pathway in gastric cancer by targeting the negative Wnt regulator, SUFU. Cancer Lett. 2017;385:117-27.

200. Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, i sur. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. EMBO J. 2008;27(19):2616-27.

201. González-Gugel E, Villa-Morales M, Santos J, Bueno MJ, Malumbres M, Rodríguez-Pinilla SM, i sur. Down-regulation of specific miRNAs enhances the expression of the gene Smoothened and contributes to T-cell lymphoblastic lymphoma development. Carcinogenesis. 2013;34(4):902-8.

202. Huang XH, Chen JS, Wang Q, Chen XL, Wen L, Chen LZ, i sur. miR-338-3p suppresses invasion of liver cancer cell by targeting smoothened. J Pathol. 2011;225(3):463-72.

203. Chervona Y, Costa M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? Am J Cancer Res. 2012;2(5):589-97.

204. Chen Q, Gao G, Luo S. Hedgehog signaling pathway and ovarian cancer. Chin J Cancer Res. 2013;25(3):346-53.

205. Szkandera J, Kiesslich T, Haybaeck J, Gerger A, Pichler M. Hedgehog signaling pathway in ovarian cancer. Int J Mol Sci. 2013;14(1):1179-96.

206. Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T, i sur. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. Cancer Sci. 2007;98(1):68-76.

207. Liao X, Siu MK, Au CW, Wong ES, Chan HY, Ip PP, i sur. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. Carcinogenesis. 2009;30(1):131-40.

208. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, Wang E, Patra S, Shridhar V, i sur. Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2008;14(23):7659-66.

209. Zheng F, Xiao X, Wang C. The Effect of PTCH1 on Ovarian Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. Cancer Biother Radiopharm. 2019;34(2):103-9.

210. Byrom J, Mudaliar V, Redman CW, Jones P, Strange RC, Hoban PR. Loss of heterozygosity at chromosome 9q22-31 is a frequent and early event in ovarian tumors. Int J Oncol. 2004;24(5):1271-7.

211. Cretnik M, Musani V, Oreskovic S, Leovic D, Levanat S. The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. Int J Mol Med. 2007;19(6):875-83.

212. Löf-Öhlin ZM, Levanat S, Sabol M, Sorbe B, Nilsson TK. Promoter methylation in the PTCH gene in cervical epithelial cancer and ovarian cancer tissue as studied by eight novel Pyrosequencing® assays. Int J Oncol. 2011;38(3):685-92.

213. Ozretić P, Trnski D, Musani V, Maurac I, Kalafatić D, Orešković S, i sur. Non-canonical Hedgehog signaling activation in ovarian borderline tumors and ovarian carcinomas. Int J Oncol. 2017;51(6):1869-77.

214. Yang L, He J, Huang S, Zhang X, Bian Y, He N, i sur. Activation of hedgehog signaling is not a frequent event in ovarian cancers. Mol Cancer. 2009;8:112. doi:10.1186/1476-4598-8-112

215. Li H, Li J, Feng L. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. Cancer Epidemiol. 2016;40:152-7.

216. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, ur. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2014.

217. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, i sur. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. Diagn Pathol. 2012;7:42. doi:10.1186/1746-1596-7-42

218. Vrsalovic MM, Korac P, Dominis M, Ostojic S, Mannhalter C, Kusec R. T- and B-cell clonality and frequency of human herpes viruses-6, -8 and Epstein Barr virus in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Hematol Oncol. 2004;22:169-177.

219. Peng L, Hu J, Li S, Wang Z, Xia B, Jiang B, i sur. Aberrant methylation of the PTCH1 gene promoter region in aberrant crypt foci. Int J Cancer. 2013;132(2):E18-E25.

220. Fu X, Yang X, Li J, Tian X, Cai J, Zhang Y. Opposite expression patterns of Sonic hedgehog and Indian hedgehog are associated with aberrant methylation status of their promoters in colorectal cancers. Pathology. 2010;42(6):553-9.

221. Kotsopoulos IC, Papanikolaou A, Lambropoulos AF, Papazisis KT, Tsolakidis D, Touplikioti P, i sur. Serous ovarian cancer signaling pathways. Int J Gynecol Cancer. 2014;24(3):410-7.

222. Riobo-Del Galdo NA, Lara Montero Á, Wertheimer EV. Role of Hedgehog Signaling in Breast Cancer: Pathogenesis and Therapeutics. Cells. 2019;8(4):375. doi: 10.3390/cells8040375.

223. Im S, Choi HJ, Yoo C, Jung JH, Jeon YW, Suh YJ, i sur. Hedgehog related protein expression in breast cancer: gli-2 is associated with poor overall survival. Korean J Pathol. 2013;47(2):116-23.

224. Jeng KS, Sheen IS, Jeng WJ, Yu MC, Hsiau HI, Chang FY. High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma. Onco Targets Ther. 2013;7:79-86.

225. Gonnissen A, Isebaert S, Perneel C, McKee CM, Van Utterbeeck F, Lerut E, i sur. Patched 1 Expression Correlates with Biochemical Relapse in High-Risk Prostate Cancer Patients. Am J Pathol. 2018;188(3):795-804.

226. Hasanovic A, Mus-Veteau I. Targeting the Multidrug Transporter Ptch1 Potentiates Chemotherapy Efficiency. Cells. 2018;7(8):107. doi: 10.3390/cells7080107.

227. Acharya P, Quinlan A, Neumeister V. The ABCs of finding a good antibody: How to find a good antibody, validate it, and publish meaningful data. F1000Res. 2017;6:851. doi: 10.12688/f1000research.11774.1.

228. Protein patched homolog 1 isoform L [Homo sapiens] [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); [pristupljeno 28.09.2020]. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000255.2?report=graph

229. Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. Curr Opin Cell Biol. 2003;15(2):143-8.

230. Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, Santiago Josefat B, Todo FR, Baselga J, i sur. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. EMBO J. 2006;25(13):3234-44.

231. Kagawa H, Shino Y, Kobayashi D, Demizu S, Shimada M, Ariga H, i sur. A novel signaling pathway mediated by the nuclear targeting of C-terminal fragments of mammalian Patched 1. PLoS One. 2011;6(4):e18638. doi: 10.1371/journal.pone.0018638.

232. Strutt H, Thomas C, Nakano Y, Stark D, Neave B, Taylor AM, i sur. Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothened regulation. Curr Biol. 2001;11(8):608-13.

233. Incardona JP, Gruenberg J, Roelink H. Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothened in endosomes. Curr Biol. 2002;12(12):983-95.

234. McCann CK, Growdon WB, Kulkarni-Datar K, Curley MD, Friel AM, Proctor JL, i sur. Inhibition of Hedgehog signaling antagonizes serous ovarian cancer growth in a primary xenograft model. PLoS One. 2011;6(11):e28077. doi: 10.1371/journal.pone.0028077.

235. Tokhunts R, Singh S, Chu T, D'Angelo G, Baubet V, Goetz JA, i sur. The full-length unprocessed hedgehog protein is an active signaling molecule. J Biol Chem. 2010;285(4):2562-8.

236. Giroux Leprieur E, Tolani B, Li H, Leguay F, Hoang NT, Acevedo LA, i sur. Membrane-bound full-length Sonic Hedgehog identifies cancer stem cells in human non-small cell lung cancer. Oncotarget. 2017;8(61):103744-57.

237. Coffman LG, Choi YJ, McLean K, Allen BL, di Magliano MP, Buckanovich RJ. Human carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote ovarian cancer chemotherapy resistance via a BMP4/HH signaling loop. Oncotarget. 2016;7(6):6916-32.

238. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, i sur. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. Nat Med. 2011;17(11):1498-503.

239. Xu L, Deng Q, Pan Y, Peng M, Wang X, Song L, i sur. Cancer-associated fibroblasts enhance the migration ability of ovarian cancer cells by increasing EZH2 expression. Int J Mol Med. 2014;33(1):91-6.

240. Thibault B, Castells M, Delord JP, Couderc B. Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition. Cancer Metastasis Rev. 2014;33(1):17-39.

241. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, i sur. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. Nature. 2008;455(7211):406-10.

242. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, i sur. Human ovarian carcinoma–associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. J Clin Invest. 2011;121(8):3206-19.

243. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, i sur. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

244. Bumcrot DA, Takada R, McMahon AP. Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. Mol Cell Biol. 1995;15(4):2294-303. Erratum in: Mol Cell Biol 1995;15(5):2904.

245. Schmid S, Bieber M, Zhang F, Zhang M, He B, Jablons D, i sur. Wnt and hedgehog gene pathway expression in serous ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer. 2011;21(6):975-80.

246. Ray A, Meng E, Reed E, Shevde LA, Rocconi RP. Hedgehog signaling pathway regulates the growth of ovarian cancer spheroid forming cells. Int J Oncol. 2011;39(4):797-804.

247. Tian H, Callahan CA, DuPree KJ, Darbonne WC, Ahn CP, Scales SJ, i sur. Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(11):4254-9.

248. Kasiri S, Chen B, Wilson AN, Reczek A, Mazambani S, Gadhvi J, i sur. Stromal Hedgehog pathway activation by IHH suppresses lung adenocarcinoma growth and metastasis by limiting reactive oxygen species. Oncogene. 2020;39(16):3258-75.

11. ŽIVOTOPIS

Valentina Karin-Kujundžič rođena je 11. studenog 1991. godine u Splitu, dok osnovnu školu završava u Krivodolu, a opću gimnaziju u Imotskom. Diplomirala je 2015. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te stekla naziv magistre molekularne biologije. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo upisuje 2016. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te počinje s izradom disertacije pod mentorstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman. Od 2016. godine je asistent na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje sudjeluje u izvođenju nastave na tri kolegija na Integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju medicine. Od srpnja do listopada 2018. godine bila je na usavršavanju u laboratoriju prof. dr. sc. Ivana Đikića (Goethe-Universität, Frankfurt) gdje je usvojila brojne molekularno-biološke metode. Tijekom diplomskog studija bila je suradnik na jednom međunarodnom projektu, dok je tijekom svog zaposlenja bila suradnik na 3 domaća projekta. Trenutno je suradnik na projektu "Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala" koji je dio Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu. Autorica je 9 znanstvenih radova u časopisima s međunarodnom recenzijom, te je i koautorica na 17 kongresnih priopćenja. Prema bazi WoS do sada je citirana 120 puta, a h-indeks joj iznosi 3.