Signalni put HH-GLI i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika

Maurac, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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:105:409550

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

Središnja medicinska knjižnica

Maurac, Ivana (2011) ***Signalni put HH-GLI i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika [Interaction of the Hh-Gli signaling pathway with BRCA1 and BRCA2 gene in ovarian cancer].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1468

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Maurac

Signalni put HH- GLI i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Ivana Maurac **DISERTACIJA** **2011.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Maurac

Signalni put HH- GLI i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu te u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr.sc. Slavko Orešković, predstojnik Klinke za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i pročelnik Katedre za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Posebno se zahvaljujem svom mentoru prof.dr.sc. Slavku Oreškoviću na nesebičnoj pomoći, stučnom vodstvu i poticanju na rad.

Zahvaljujem se cijelom timu Laboratorija za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković" te djelatnicima Zavoda za ginekološku patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su mi pomogli u izradi doktorskog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD …… 1
1.1. Zloćudne novotvorine jajnika ……..... 1
1.1.1. Epidemiologija zloćudnih novotvorina jajnika…… 1
1.1.2. Podjela zloćudnih novotvorina jajnika …… 2
1.1.3. Simptomatologija zloćudnih novotvorina jajnika…… 4
1.1.4. Dijagnostika i FIGO klasifikacija zloćudnih novotvorina jajnika …..... 4
1.1.5. Putevi širenja bolesti…… 7
1.1.6. Liječenje zloćudnih novotvorina jajnika…….. 8
1.2. Molekularna osnova promjena u zloćudnih novotvorina jajnika……..... 9
1.2.1. Geni BRCA1 i BRCA2 (breast cancer 1 i breast cancer 2) 10
1.2.2. Molekularna regulacija BRCA1 gena ……. 12
1.2.3. Veza gena BRCA1 sa survivinom ..……. 14
1.3. Hh-Gli signalni put……..... 15
1.3.1. Protein Hedgehog (Hh)…… 16
1.3.2. Protein Patched (Ptch)……. 16
1.3.3. Protein Smoothened (Smo)……..... 17
1.3.4. Protein Gli …….. 17
1.3.5. Uloga signalnog puta Hh-Gli u karcinogenezi…..…….. 17

2. HIPOTEZA…… 19

3. CILJ RADA ……. 20

4. MATERIJALI I METODE …….. 21
4.1. Prikupljanje uzoraka …….. 21
4.2. Metode …… 23
4.2.1. Ekstrakcija RNA ……. 23
4.2.1.1. Ekstrakcija RNA iz tkiva ……. 23
4.2.1.2. Ekstrakcija RNA iz stanica ……. 24
4.2.2. Ekstrakcija DNA……. 24
4.2.2.1. Ekstrakcija DNA iz tkiva …… 24
4.2.2.2. Ekstrakcija DNA iz krvi ……. 25
4.2.3. Mjerenje koncentracije DNA ……. 26
4.2.4. Provjera kvalitete i koncentracije RNA ……. 26
4.2.4.1. Provjera kvalitete RNA ……... 26
4.2.4.2. Mjerenje koncentracije RNA ……. 27
4.2.5. Reverzna transkripcija …….. 28
4.2.6. Kvantitativni real-time PCR ……. 29
4.2.7. Statistička obrada podataka …… 31
4.2.8. Analiza mutacija gena BRCA1 i BRCA2 …….. 32
4.2.8.1. Fragmentalna analiza 32
4.2.8.2. Određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje) …….. 33
4.2.9. Analiza gubitka heterozigotnosti …… 34
4.2.10. Uzgoj stanične kulture …….. 37
4.2.10.1. Odmrzavanje stanica …….. 37
4.2.10.2. Održavanje stanica u kulturi …….. 37
4.2.11. MTT test …… 38
4.2.12. Transfekcija …… 40

4.2.13. Migracija ……. 41
4.2.14. RNA utišavanje ……..... 42

5. REZULTATI ……. 44
5.1. Ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli u tumorima jajnika……. 44
5.2. Korelacija ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli, BRCA1 i BRCA2 i survivina u tumorima jajnika …….. 50
5.3. Analiza gubitka heterozigotnosti gena PTCH1 i BRCA1…… 54
5.4. Analiza mutacija u genima BRCA1 i BRCA2 …… 55
5.5. Pokusi na staničnim linijama …… 56
5.5.1. Vijabilnost stanica nakon tretmana Hh-Gli specifičnim aktivatorom ili inhibitorom…… 56
5.5.2. Aktivacija signalnog puta transfekcijom transkripcijskog faktora GLI1 ……. 58
5.5.3. Utišavanje signalnog puta pomoću siRNA molekula…… 60
5.5.4. Migratorna sposobnost stanica nakon aktivacije i inhibicije signalnog puta Hh-Gli …… 64
5.6. Sažeti prikaz rezultata ……. 65

6. RASPRAVA…… 68
7. ZAKLJUČCI……. 74
8. SAŽETAK …….. 75
9. SUMMARY……. 77
10. LITERATURA …….. 79
11. ŽIVOTOPIS …… 84

POPIS SKRAĆENICA

FIGO - Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara
BRCA - breast cancer
HNPCC - hereditary nonpolyposis colorectal cancer
CTNNB1- beta katenin
LOH - loss of heterozygosity (gubitak heterozigotnosti)
Hh - Hedgehog (engl. jež)
Shh - Sonic Hedgehog
Dhh - Desert Hedgehog
PTCH - Patched (engl. zakrpa)
Smo - Smoothened (engl.gladak)
MEM - minimal essential medium
EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina
RNA - ribonukleinska kiselina
DNA - deoksiribonukleinska kiselina
cDNA - komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
PCR - polymerase chain reaction (reakcija lančane polimeraze)
qRT-PCR- kvantitativni real-time PCR
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid
FBS - fetal bovine serum (fetalni goveđi serum)
siRNA - small interfering RNA ili silencing RNA
PI3K- phosphoinositide-3-kinase
SIRT1 - sirtuin
QMP- kvantitativni multipleks PCR

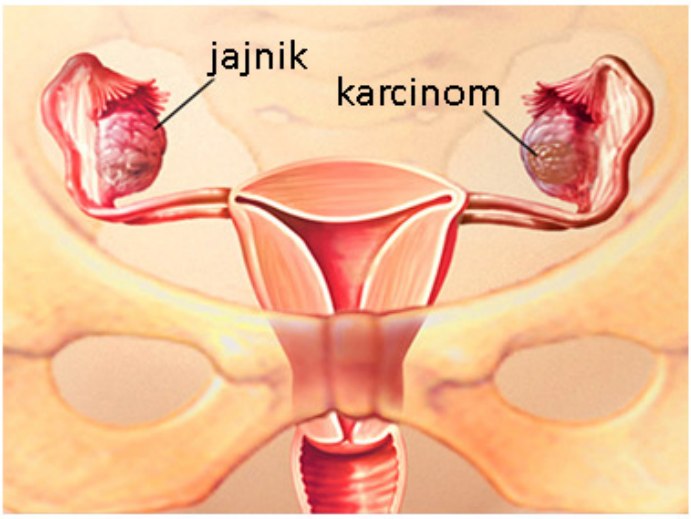
1. UVOD

1.1. Zloćudne novotvorine jajnika

1.1.1. Epidemiologija zloćudnih novotvorina jajnika

Zloćudna novotvorina jajnika ili karcinom jajnika je sedmi po redu karcinom u žena u SAD-u, čineći 3% od svih maligniteta i 6% svih smrtnosti od karcinoma u žena u SAD-u. Karcinom jajnika je 5. po redu uzrok smrti od malignih tumora u žena. Rizik za oboljenjem od karcinoma jajnika je 1-1,5%, a rizik od smrtnosti je 0,5%. Podaci za SAD za 2006. godinu govore da se prosječno dijagnosticira 25000 novih slučajeva godišnje i od toga otprilike umre 15000 (1). Prema registru za rak RH, za 2008. godinu, šest najčešćih sijela raka u žena su dojka (26%), kolon (8%), rektum, rektosigma i anus (6%), tijelo maternice (6%), traheja, bronh i pluća (6%) te jajnik i jajovod (5%). U Republici Hrvatskoj je prema registru za rak, za 2008. godinu, 429 novootkrivenih karcinoma jajnika (2).

Zloćudne novotvorine jajnika ili karcinomi jajnika, iako čine 23% svih karcinoma ženskog spolnog sustava, uzrokuju više smrti nego bilo koji drugi karcinom ženskog spolnog sustava. Najveća incidencija karcinoma jajnika je između 56 do 60 godina starosti (3). Prognoza karcinoma jajnika je vrlo loša sa 50%-tnim petogodišnjim preživljenjem od trenutka dijagnosticiranja bolesti. Razlog tome je dijagnosticiranje karcinoma jajnika u uznapredovalom stadiju bolesti, jer u ranom stadiju uzrokuje minimalne, nespecifične ili gotovo nikakve simptome. Neke studije ukazuju da je loša prognoza karcinoma jajnika uzrokovana ne samo pojavom prvih simptoma u uznapredovalom stadiju (kasnom simptomatologijom) i metastazama nego i visokom proliferacijskom aktivnošću samih stanica karcinoma (4,5,6).



Slika l. Izgled ženskih spolnih organa i lokalizacija tumora jajnika
(preuzeto iz http://healthwire.pl)

1.1.2. Podjela zloćudnih novotvorina jajnika

Više od 90% karcinoma jajnika podrijetlom su pokrovnog epitela (3). Epitelne zloćudne novotvorine jajnika prema histološkom nalazu dijelimo na serozne adenokarcinome, koji su najčešći i čine 75% svih karcinoma jajnika, mucinozne (20%), endometrioidne (2%), karcinome svijetlih stanica, Brennerov karcinom i nediferencirani karcinom koji zajedno čine manje od 1% svi epitelnih lezija (3). Potrebno je posebno naglasiti skupinu tumora jajnika niskog malignog potencijala, koji se još nazivaju atipični epitelni proliferativni tumori ili tumori jajnika granične malignosti (borderline ovarian tumors). Obzirom na složeniji naziv ove skupine tumora jajnika, u daljnjem tekstu koristit će se jednostavniji izraz „borderline“ tumori. Oko 15% ovarijskih tumora pokrovnog epitela pripada ovoj skupini. Atipični epitelni proliferativni tumori („borderline“) imaju obilježja dobroćudnih i zloćudnih novotvorina. Još uvijek nije razjašnjeno jesu li „bordeline“ tumori jajnika međustepenica u procesu karcinogeneze ili su zaseban patohistološki, a time i klinički entitet (7). „Borderline“ tumori jajnika imaju jaču sposobnost proliferacije nego dobroćudne novotvorine, ali ne pokazuju nekrozu, destruirajuću invaziju strome, niti sposobnost metastaziranja (8, 9). Neki od „borderline“ tumora mogu biti popraćeni peritonejskim implantatima, koji se svrstavaju u neinvazivne implantate. Ovakvi tumori imaju bolju prognozu od invazivnih karcinoma, no i oni mogu, iako vrlo rijetko, metastazirati.

U tablici 1. prikazana je histološka podjela novotvorina jajnika prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji.

Tablica 1. Histološka klasifikacija novotvorina jajnika

1. EPITELNO- STROMALNE NOVOTVORINE POKROVNOG EPITELA	Serozni, mucinozni, endometrioidni, paramezonefroidni (tumor svijetlih stanica) tumor, tumor prijelaznih stanica, tumor pločastih stanica, miješani epitelni tumor, nediferencirani karcinom
2. NOVOTVORINE SPECIJALIZIRANE STROME JAJNIKA (SEX CORD STROMALNI TUMORI)	Tumor granuloza- teka stanični, Sertoli- Leydigov stanični tumor (androblastom), tumor stromalnih jajničnih stanica (iz eng. sex cord tumor), ginandroblastom, neklasificirani stromalni tumor, steroidno- stanični tumori
3. NOVOTVORINE SPOLNIH STANICA	Dizgerminom, endodermalni sinus tumor (iz eng. Yolk sac tumor, tumor žumanjčane vreće), embrionalni karcinom, poliembriom, koriokarcinom, teratom, tumor miješanih zametnih stanica
4. GONADOBLASTOM	
5. NOVOTVORINE SPOLNIH I STROMALNIH STANICA NEGONADOBLASTIČNOG TIPA	
6. NOVOTVORINE PORIJEKLA RETE OVARIJ	
7. TUMORI IZ MEZOTELA	
8. NOVOTVORINE NESIGURNA PORIJEKLA I POMIJEŠANI	
9. GESTACIJSKA TROFOBLASTIČNA BOLEST	
10. NOVOTVORINE VEZIVNIH TKIVA NEJEDINSTVENIH ZA JAJNIKE	
11. ZLOĆUDNI LIMFOMI I LEUKEMIJE	
12. NOVOTVORINE KOJE SE NE MOGU KLASIFICIRATI	
13. METASTATSKE (SEKUNDARNE) NOVOTVORINE	
14. NOVOTVORINAMA SLIČNE PROMJENE	

1.1.3. Simptomatologija zloćudnih novotvorina jajnika

Zloćudne novotvorine jajnika u početku nemaju specifičnih simptoma. Vrlo rijetko se, u ranom stadiju bolesti, mogu javiti učestalo mokrenje ili opstipacija kao posljedica pritiska na okolne organe, mokraćni mjehur ili rektum. Povremno se mogu javiti nelagoda i pritisak u donjem dijelu trbuha te dispareunija. Najčešće se zloćudni tumori jajnika manifestiraju u kasnom stadiju bolesti kao rast trbuha (zbog ascitesa), bol u trbuhu, smetnje disanja (pritisak tumora i ascitesa na dijafragmu) te malaksalost i gubitak tjelesne težine.

1.1.4. Dijagnostika i FIGO klasifikacija zloćudnih novotvorina jajnika

Dijagnoza zloćudnih novotvorina jajnika se postavlja na temelju brižljivo uzete anamneze, izvanjske palpacije trbuha, bimanualne pretrage zdjelice, ultrazvučne pretrage i pretrage obojenim doplerom, serumske vrijednosti tumorskog markera CA-125, rentgenske snimke pluća, infuzijske urografije, kolonoskopije i pasaže crijeva, kompjutorizirane tomografije i magnetske rezonancije.

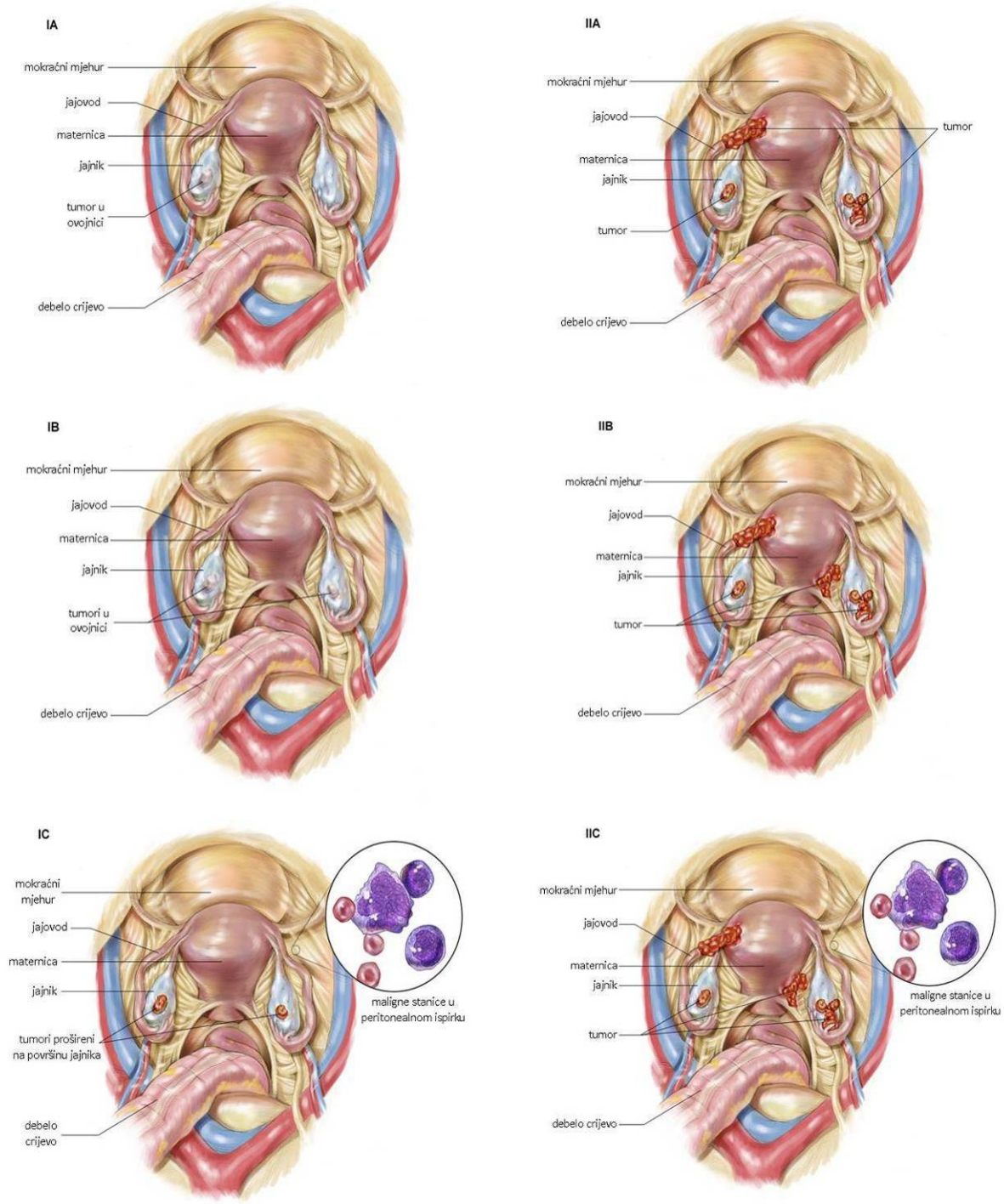
Kliničkim pregledom u zdjelici se pipa tumorska tvorba. Katkad tumor može biti i većih dimenzija te može ispunjavati i čitavu trbušnu šupljinu (npr. mucinozni tumori).

Ultrazvučni nalaz multikolukarne ciste, deblje stijenke i septa, s papilarnim rastom i patološkom prokrvljenosti govori u prilog zloćudnoj tvorbi. Serumski biljeg CA-125 je antigen nađen na površini stanica u više od 80% nemucinoznih epitelnih karcinoma. Taj je biljeg dovoljno osjetljiv, ali nisko specifičan, jer njegove vrijednosti mogu biti povišene u drugim ginekološkim i neginekološkim stanjima i bolestima.

Analize velikog broja karcinoma jajnika potvrdile su anatomsku proširenost bolesti ili stadij kao najjači, neovisni prognostički pokazatelj. Stoga je međunarodna federacija ginekologa i opstetričara (FIGO) zloćudne tumore jajnika podijelila u 4 stadija (10), (tablica 2, slika 2).

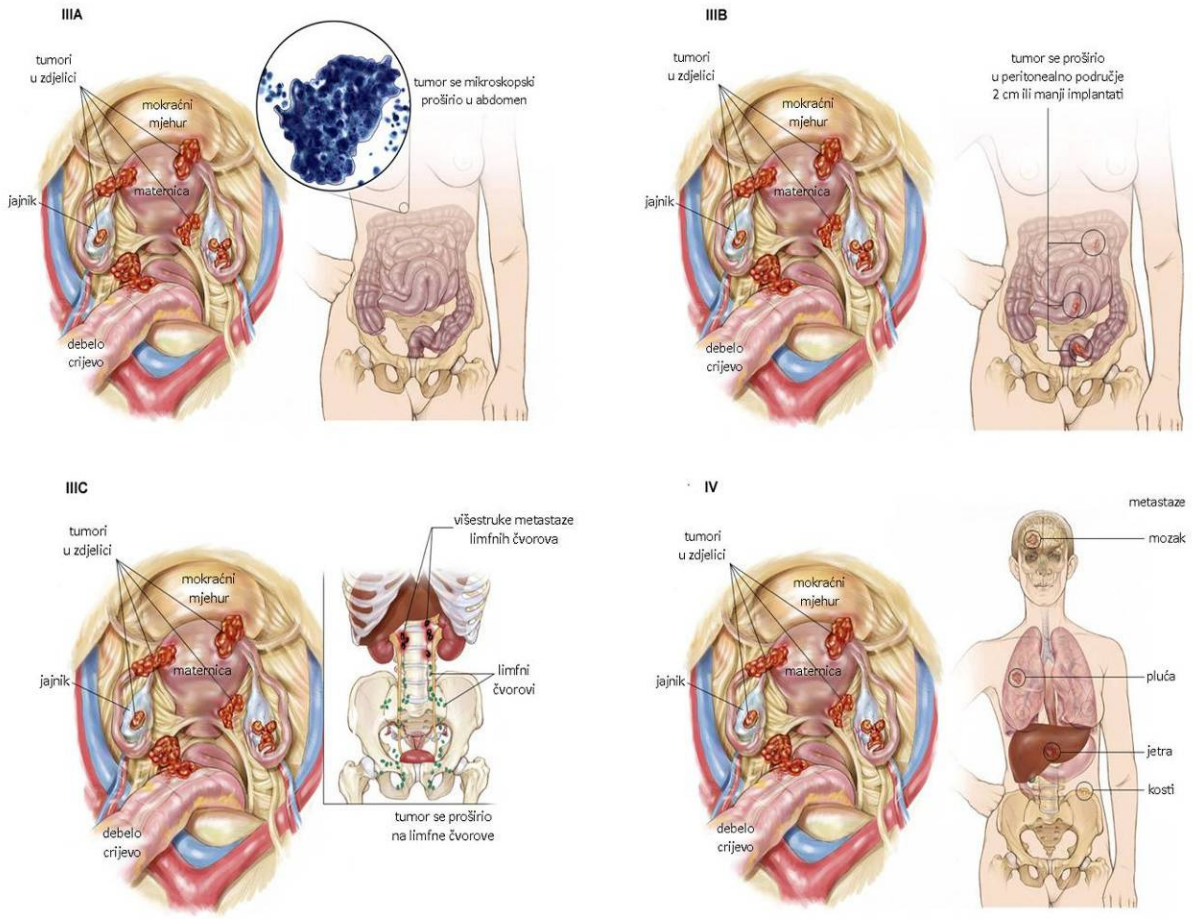
Tablica 2. FIGO klasifikacija zloćudnih novotvorina jajnika

Stadij I	Tumorski rast ograničen na jajnike
IA	Rast ograničen na jedan jajnik; kapsula tumora intaktna
IB	Tumor nazočan na oba jajnika; bez ascitesa; kapsula tumora intaktna
IC	Stadij IA ili IB s tumorom na površini na jednom ili oba jajnika; ili rupturirana kapsula; ili prisutan ascites s pozitivnim malignim stanicama; ili pozitivan peritonealni ispirak
Stadij II	Tumorski rast zahvaća jedan ili oba jajnika sa širenjem u malu zdjelicu
IIA	Širenje tumora i/ili metastaze u maternicu i/ili u jajovod
IIB	Tumor proširen na druga tkiva u maloj zdjelici
IIC	Tumor stadija IIA ili IIB ali s tumorom na površini na jednom ili oba jajnika; ili rupturirana kapsula; ili prisutan ascites sa pozitivnim malignim stanicama; ili pozitivan peritonealni ispirak
Stadij III	Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika, s peritonealnim implantatima izvan zdjelice i/ili s pozitivnim retroperitonealnim ili ingvinalnim limfnim čvorovima Površinske metastaze jetre odgovaraju stadiju III. Tumor je ograničen na malu zdjelicu, ali su histološki dokazane maligne stanice na crijevu ili omentumu.
IIIA	Tumor ograničen na malu zdjelicu sa negativnim limfnim čvorovima, ali sa histološki dokazanim malignim stanicama na abdominalnom peritoneumu.
IIIB	Tumor na jednom ili oba jajnika, sa histološki dokazanim implantatima na abdominalnom peritoneumu, ne većim od 2 cm u promjeru. Limfni čvorovi negativni.
IIIC	Abdominalni implantati veći od 2 cm u promjeru ili pozitivni retroperitonealni ili ingvinalni limfni čvorovi.
Stadij IV	Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika s udaljenim metastazama (izvan abdomena). Ako je nazočan pleuralni izljev, mora biti citološki pozitivan. Metastaze parenhima jetre odgovaraju stadiju IV.



Slika 2. FIGO klasifikacija zloćudnih novotvorina jajnika

(preuzeto sa http://www.ovca.org/ovarian-cancer-symptoms-stages/stages-of ovarian-cancer.html)



Slika 2. (nastavak) FIGO klasifikacija zloćudnih novotvorina jajnika (preuzeto sa http://www.ovca.org/ovarian-cancer-symptoms-stages/stages-of-ovarian-cancer.html)

1.1.4. Putevi širenja bolesti

Zloćudni epitelni tumori jajnika šire se uglavnom implantacijom pojedinih fragmenata tumora po trbušnoj šupljini. To je tzv. transcelomno širenje bolesti. Implantati se tipično pojavljuju po serozi donjeg dijela trbušne šupljine i male zdjelice, u supseroznom vezivu i u masnom tkivu omentuma te po serozi dijafragme i Glissonove čahure jetre. Limfogene presadnice nađu se u zdjeličnim i/ili paraaortalnim limfnim čvorovima. U uznapredovalom IV. stadiju bolesti limfatičnim transdijafragmalnim putem presadnice (metastaze) ulaze i u pleuralnu

šupljinu te uzrokuju karcinozu pleure i hidrotoraks. To je tzv. lažni Meigsov sindrom (sy. pseudo Meigs) (11). Hematogenim rasapom karcinom jajnika se širi uglavnom u jetru i pluća.

1.1.5. Liječenje zloćudnih novotvorina jajnika

Liječenje ovarijskog karcinoma provodi se kombinacijom kirurškog i potom dodatnog (adjuvantnog) liječenja, uglavnom kemoterapeuticima.

Danas se smatra kirurška citoredukcijska terapija jedinim prognostičkim pokazateljem na koji se može utjecati u terapiji ovarijskog karcinoma. Naime, primarnim kirurškim pristupom moguće je utvrditi točan stadij bolesti i odstraniti, što je više moguće, tumorskog tkiva i tako stvoriti povoljne uvjete za nastavak liječenja kemoterapijom.

Smjernice za pravilno kirurško patološko stupnjevanje ovarijskog karcinoma:

- uzimanje ispiraka iz trbušne šupljine i njihova citološka pretraga (ispirci se uzimaju s četiri tipična mjesta: mala zdjelica, lijevi i desni parakolički prostor, subdijafragmalno)
- uzimanje uzoraka (biopsija) peritoneja sa sumnjivih mjesta, ili nasumce uzimanje uzoraka naizgled zdravog peritoneja s tipičnih mjesta (najmanje 15-20)
- potpuna resekcija trbušne maramice
- resekcija svih priraslica
- apendektomija
- zdjelična i paraaortalna limfadenektomija
- histerektomija i obostrana adneksektomija.

1.2. Molekularna osnova promjena u zloćudnih novotvorina jajnika

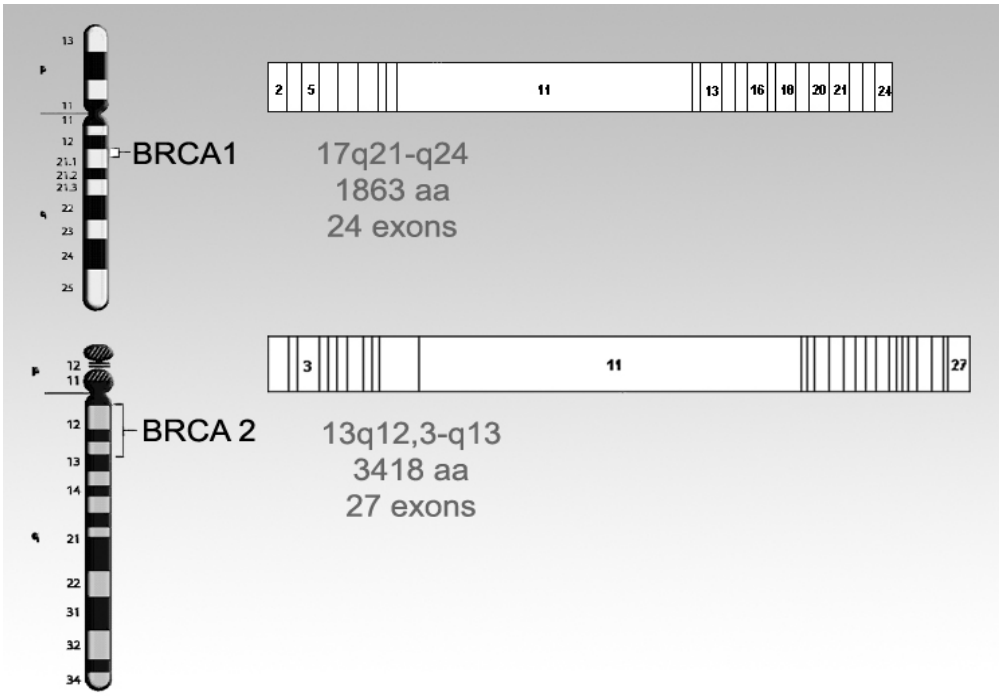
Uzrok nastanka karcinoma jajnika, još uvijek, nije razjašnjen. Postoji nekoliko čimbenika koji su povezani s povećanom ili smanjenom opasnošću od nastanka zloćudnog tumora (rađanje, dojenje, neplodnost, oralna kontracepcija, hormonsko nadomjesno liječenje, K-ras i HER-2/neu onkogeni, BRCA1 i BRCA2 te p53 tumor supresor geni). Rađanje, dojenje i oralna kontracepcija povezani su sa smanjenom opasnošću od razvoja karcinoma jajnika. Nerađanje i neplodnost povezani su s povećanom opasnošću od nastanka karcinoma jajnika (12). Važnu ulogu u nastanku karcinoma jajnika ima i inaktivacija p53 tumor supresor gena koja je zamijećena u karcinomima jajnika koji se javljaju povremeno ili, pak, u istoj obitelji. Istraživani su i razni onkogeni u nastanku karcinoma jajnika i atipičnih epitelnih proliferativnih tumora jajnika te su pronađene mutacije K-ras (prijenosni GTP stanični protein) i HER-2/neu (receptor faktora rasta) onkogena. U bolesnica u čijim su tumorima jajnika jače izraženi ti onkogeni postoji veća vjerojatnost opetovanog javljanja bolesti i značajno kraće vrijeme preživljavanja.

Poznato je da je svaki histološki tip tumora jajnika i stupanj diferenciranosti stanica povezan s određenim molekularno-genetičkim promjenama. Serozni i endometrioidni tip tumora, visokog gradusa, nastaje uslijed mutacija p53 i disfunkcije BRCA1 i BRCA2. Serozni tip tumora, niskog gradusa, vjerojatno nastaje postupno zbog mutacije K-ras i BRAF. Mucinozni tip uslijed mutacija u K-ras. Endometrioidni tip, niskog gradusa mutacijama u CTNNB1 (beta-katenin) i PTEN. Vjerojatno je da većina tumora jajnika niskog gradusa nastaje iz postojećih cistadenoma ili endometrioze, dok oni visokog gradusa nastaju spontano bez prijašnjih lezija (13).

Također je poznato, da je velika povezanosti između FIGO stadija bolesti i ploidnosti tumora: karcinomi niskog stadija bolesti su diploidni dok su karcinomi višeg stadija bolesti aneuploidni. Pacijentice s diploidnim karcinomom imaju duže preživljenje od onih s aneuploidnim karcinomom. Opisan je povećan rizik od karcinoma jajnika i endometrija u Lynch II sindromu (hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome - HNPCC syndrome) koji uključuje multiple adenokarcinome kolona zajedno sa karcinomom jajnika, endometrija i dojke te gastrointestinalnim i genitourinarnim karcinomima (14).

1.2.1. Geni BRCA1 i BRCA2 (breast cancer 1 i breast cancer 2)

Većina epitelnih zloćudnih tumora jajnika su sporadični te su samo u 5% do 10% slučajeva nasljedni i vežu se s mutacijama gena BRCA1 i BRCA2 na 17. i 13. kromosomu. Putem analize haplotipa (tzv. 'linkage analize') dokazano je da su geni BRCA1 i BRCA2 udruženi s genetskom predispozicijom nastanka i karcinoma jajnika i karcinoma dojke. Temeljem analize, žene sa mutacijom BRCA1 gena imaju povećan rizik od nastanka karcinoma jajnika od 28 do 44%, dok žene s mutacijom BRCA2 gena imaju rizik od nastanka karcinoma jajnika veći od 27 % (15).



Slika 3. Lokacija gena BRCA1 i BRCA2 na 17. i 13. kromosomu, te shematski prikaz gena po eksonima

Za razliku od onkogena, promjena koja dovodi do inaktivacije tumor supresorskih gena je recesivna, dakle, oba alela koja čine tumorsupresorski gen moraju biti prigušena kako bi došlo do razvoja tumora. Genetski mehanizmi koji rezultiraju prigušenjem tumor supresorskog gena jesu mutacije, gubitak heterozigotnosti (loss of heterozygosity, LOH) te delecija dijela kromosoma. Gubitak heterozigotnosti (loss of heterozygosity, LOH) kromosomske regije 17q21 (BRCA1) također je relativno čest događaj u patogenezi karcinoma jajnika, može se

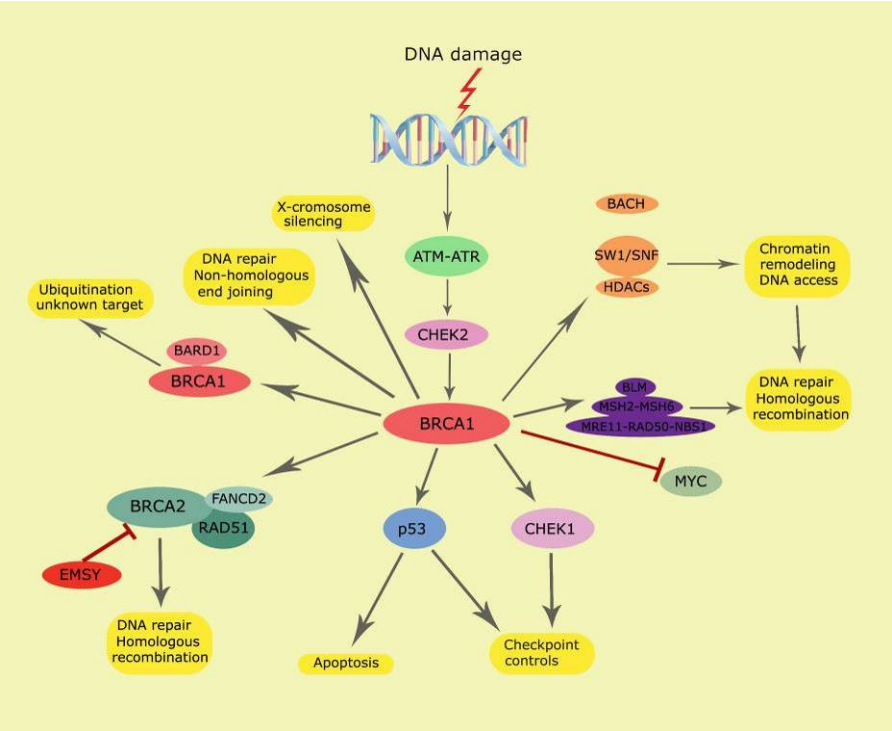
pronaći u 40 do 70% uzoraka, ali LOH ne utječe direktno na razinu transkripta gena BRCA1 (16, 17). U zadnje vrijeme pokazano je da je genska ekspresija BRCA1 ponekad smanjena u uzorcima karcinoma ovarija, i to uslijed metilacije promotora gena BRCA1 (18). Smanjena genska ekspresija dovodi do smanjene količine proteina, a time i do smanjenja procesa u koje je taj protein uključen (19). Imunohistokemijsko bojanje na protein BRCA1 smanjeno je u tumorima jajnika (20,17) te korelira sa stadijem bolesti, i to na način da se ekspresija smanjuje s višim stadijima tumora (20). Skupina istraživača je pokazala su da je genska ekspresija vrlo dobro korelirana s proteinskom ekspresijom, odnosno u uzorcima koji su pokazivali jače obojenje na protein BRCA1, genska ekspresija bila je 10 puta jača nego u uzorcima na slabim obojenjem (17).

Gubitak heterozigotnosti gena BRCA2 uočen je u oko 30% sporadičnih slučajeva tumora jajnika (21).

Ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 je međusobno povezana tijekom proliferacije stanica (22) te je pokazano da se ekspresija oba gena smanjuje kako se smanjuje proliferacija, primjerice kada stanice u kulturi postignu 100% konfluentnost (23). Zaustavljanjem stanica citostaticima u različitim fazama staničnog ciklusa pokazala je da se ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 mijenja usklađeno, veća je u G1 i S fazi, a manja tijekom mitoze (22). Slično smanjenje ekspresije oba gena uočeno je i kada se stanice natjeraju na diferencijaciju (22).

Utišavanje ekspresije gena BRCA1 dovodi do povećanja proliferacije stanica, i to smanjenjem ekspresije p21/Waf1 i $p27^{Kip1}$, inhibitora ciklin-ovisnih kinaza (24). Također se povećava mogućnost rasta neovisnog o sidrenju, sposobnost migracije i invazivnost (24). Tumori sa smanjenom ekspresijom proteina BRCA1 zbog mutacije u genu BRCA1 imaju različit ekspresijski profil drugih gena od onih tumora u kojima je ekspresija proteina BRCA1 smanjena epigenetskim mehanizmima (25). Točnije, tumori sa epigenetski utišanim genom BRCA1 imaju povećanu ekspresiju PI3K, što nije slučaj kod tumora s mutacijom. Treba uzeti u obzir da ekspresija BRCA1 varira tijekom staničnog ciklusa te je najviša u S fazi, tako da razlike među tumorima mogu biti odraz razlika u proliferaciji između različitih uzoraka (26).

U zadnje vrijeme postalo je jasnije da je u patogenezu tumora jajnika uključen niz različitih gena, da bi pravi put za pronalaženje markera za razlikovanje tumorskog tkiva jajnika od invazivnog karcinoma bio analiza genske ekspresije na razini mRNA (27).

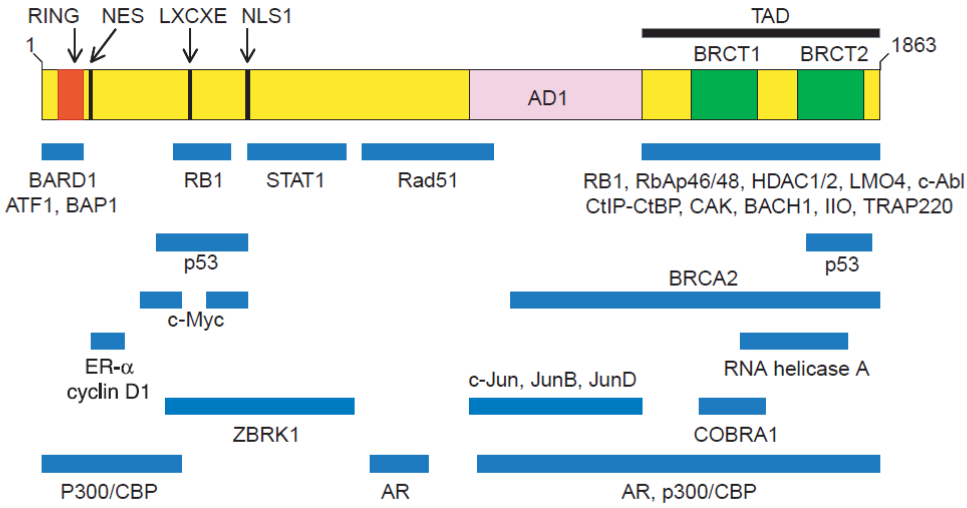


Slika 4. Uloga gena BRCA1 i BRCA2 u popravcima oštećenja DNA

1.2.2. Molekularna regulacija gena BRCA1

Gen BRCA1 nalazi se na 17q21 i kodira jezgrin protein veličine 220 kDa. Protein BRCA1 sadrži RING domenu, koja omogućuje interakciju među proteinima, i TAD domenu (transcriptional activation domain), koja također pomaže u interakciji s drugim proteinima te može aktivirati transkripciju (28). BRCA1 ima ulogu u nizu procesa, kao što su odgovor na oštećenje DNA, integritet genoma, progresija stanica kroz stanični ciklus, apoptoza i transkripcija gena (29).

Na slici 5 je shematski prikazan protein BRCA1 (žuto), sa RING domenom označenom narančasto i TAD domenom zeleno. Plavim linijama su prikazani položaji na kojima je pokazana interakcija BRCA1 s ostalim proteinima.



Slika 5. Interakcija gena BRCA1 s ostalim proteinima (preuzeto od 32)

Interakcija s Ciklinom D1 je osobito zanimljiva, jer je Ciklin D1 jedan od proteina koji je povezan sa signalnim putem Hh-Gli. Aktivacija ciklina D1 uzrokuje kompeticiju s BRCA1 pri vezanju na estrogenski receptor, pa je degradacija estrogenskih receptora smanjena (30). Osim toga, pronađeno je da ciklin D1 direktno utječe na fosforilaciju BRCA1, čime je njena aktivnost u aktivaciji transkripcije promijenjena (31).

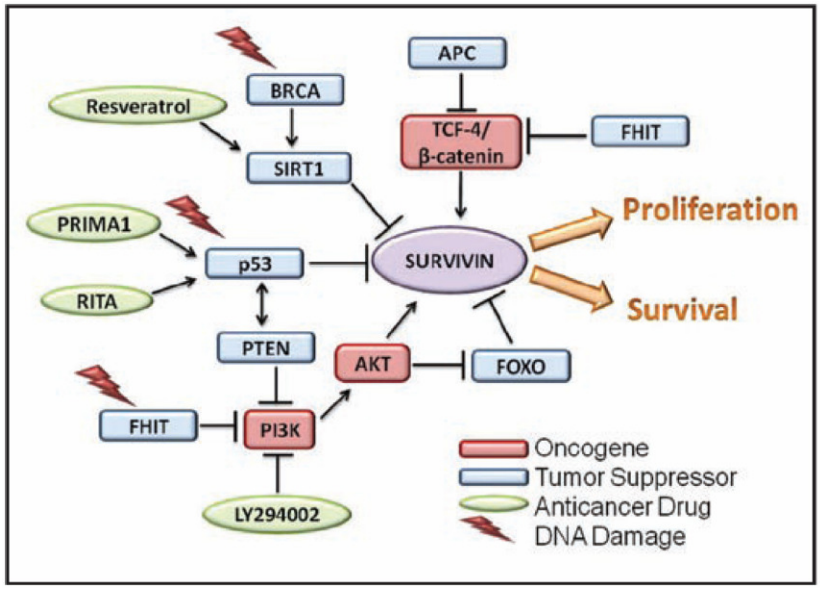
Molekularna regulacija BRCA1 odvija se putem tri klase molekula:

1. hormoni (estrogen, progesteron, prolaktin) povećavaju ekspresiju BRCA1
2. topljivi faktori mikrookoliša (parakrini signali koji djeluju na kratke udaljenosti unutar tkiva), nisu do kraja karakterizirani
3. proteini izvanstaničnog matriksa (laminini, integrini, i sl.) smanjuju ekspresiju BRCA1 i potiču diferencijaciju tkiva (32).

Jedan od transkripcijskih faktora koji regulira ekspresiju BRCA1 je upravo E2F (32). E2F je transkripcijski faktor kojeg regulira aktivnost ciklina D i E – kompleksi Cdk4(6)/ciklin D1 cdk2/ciklin E fosforiliraju pRB, zbog čega se on odvaja od E2F i omogućuje njegovu aktivnost (33).

1.2.3. Veza gena BRCA1 sa survivinom

Funkcije proteina BRCA1 uključuju: degradaciju proteina, progresiju kroz stanični ciklus, apoptozu, popravak oštećenja u DNA, duplikaciju centrosoma, regulaciju transkripcije i starenje. Survivin je inhibitor apoptoze, odgovoran za održavanje vijabilnosti stanice i poticanje rasta tumorskih stanica. Ekspresija survivina regulirana je proteinom BRCA1, ali ne direktno već preko medijatora, proteina SIRT1. Povećanjem eskpresije BRCA1 dolazi do povećanja ekspresije SIRT1, koji uzrokuje smanjenje ekspresije survivina mijenjajući epigenetske modifikacije histona H3. U bolesnim stanjima, kada je ekspresija BRCA1 smanjena, doći će do povećanja ekspresije survivina istim ovim mehanizmom (34). Tumori dojke u prosjeku pokazuju 10 puta povećanu ekspresiju survivina u odnosu na normalno zdravo tkivo, te je ekspresija survivina povećana u nositeljima mutacije u genu BRCA1 (34).



Slika 6. Veza survivina s ostalim genima (preuzeto od 35)

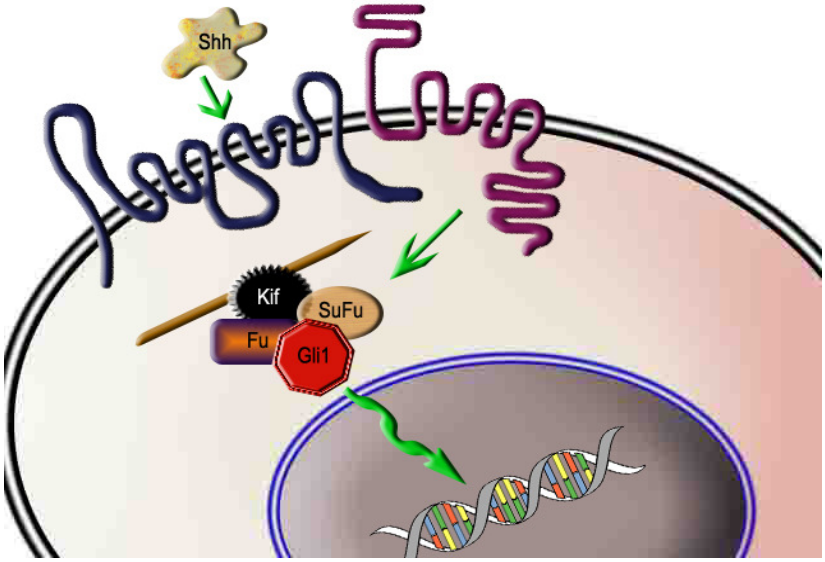
Pretpostavlja se da, još uvijek, postoji neotkrivena skupina gena koji bi u budućnosti mogli predodrediti ove karcinome i pridonijeti novim terapijskim strategijama.

1.3. Signalni put Hh-Gli

Mutacije definiramo kao promjenu slijeda nukleotida uslijed kojega dolazi do povećane, smanjene ili inaktivne funkcije proteinskih produkata gena. Postoje dvije skupine gena koji kontroliraju stanični rast a to su protoonkogeni, odnosno onkogeni u tumorskom tkivu, koji potiču rast tumora i tumor supresor geni koji sprečavaju rast tumora. Postoje dvije vrste tumor supresor gena, oni koji sudjeluju u procesu apoptoze i regulacije rasta stanica i oni koji sudjeluju u popravku i održavanju integriteta stanice. U ovu drugu skupinu spadaju geni BRCA1 i BRCA2 koje ćemo proučavati u ovom istraživanju i koji su već dugo vremena poznati kao značajni geni u nastanku karcinoma jajnika i ostalih tumora. Poremećaj u kontroli signalnih puteva, kojeg uzrokuju mutacije onkogena i tumor supresor gena, dovodi do promjena u staničnom rastu, diferencijaciji i programiranju stanične smrti.

Jedan od takvih signalnih puteva je i signalni put Hedgehog-Gli poznat i pod drugim nazivima kao što su Hh-Gli, Hh-Ptc ili Hh/Ptc/Smo, PTCH-GLI odnosno Hedgehog-Gli ili Hedgehog-Patched. To je evolucijski visoko očuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre. Otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) kod koje je mutacija u genu za protein Hedgehog (eng. jež), dovela do nastanka ličinke koja nalikuje zbog bodljikavih izraslina, ježu. Terminologija koja se koristi za ovaj signalni put vezana je za fenotipska obilježja mutanata mušice (npr. patched, eng. zakrpan; smoothened, eng. gladak; hedgehog). Osnovni principi signalnog puta kod mušice sačuvani su i kod viših organizama, pa se tako mogu poistovjetiti sa signalnim putem u čovjeka (36). Put ima ključnu ulogu u normalnom razvoju, a njegovo poremećeno funkcioniranje povezuje se s razvojnim deformacijama i rakom.

Signalni put Hh-Gli dovodi do promjena u ponašanju stanica putem najmanje dva mehanizma: poticanjem transkripcije ciljnih gena i kontrolom staničnog ciklusa (37). Započinju ga tri proteina, Hedgehog, Patched i Smoothened, pri čemu Hedgehog ima ulogu liganda, Patched (najvjerojatnije) receptora, jer se nalazi na membrani i Smoothened ko-receptora. Izvanstanični ligand Shh veže se na Ptch, pri čemu otpušta Smo i signal se prenosi unutar stanice u citoplazmu, prema kompleksu proteina Fu, SuFu, Kif i Gli1, pri čemu Gli1 odlazi u jezgru. Gli1 ima ulogu u transkripciji (38).



Slika 7. Jednostavna shema prijenosa signala signalnim putem Hh-Gli

1.3.1. Protein Hedgehog (Hh)

U sisavaca su pronađena tri homologa, koji nose nazive Sonic Hh (Shh), Desert Hh (Dhh) i Indian Hh (Ihh). Protein Shh je najbolje eksprimiran u sisavaca, proizvodi se u stanicama i putem proteina Dispatched otpušta se i prenosi do ciljnih stanica na koje djeluje. Protein Hh veže se za svoj receptor na membrani, Patched, i time pokreće prijenos signala u stanici (39, 40).

1.3.2. Protein Patched (Ptch)

Protein Patched je receptor za Hh, građen od 12 transmembranskih hidrofobnih domena, sadrži dvije velike ekstracelularne omče, a unutar stanice mu se nalaze C- i N-terminus (41). Nakon vezanja liganda Hh za Ptch dolazi do otpuštanja represije na protein Smo i okidanja signala. Protein Ptch se smatra tumor supresorom, jer u slučaju njegovog nedostatka dolazi do trajno aktivnog prijenosa signala, budući da se protein Smoothened nalazi u neinhibiranom stanju (39).

1.3.3. Protein Smoothened (Smo)

Smoothened (Smo) je pozitivan regulator signalnog puta, koji aktivira nizvodne komponente. Građen je od sedam transmembranskih hidrofobnih domena. Aktivirajuće mutacije proteina Smo ograničene su na eksone 9 i 10 ovog proteina. Dođe li do mutacije u toj regiji, Smo postaje neosjetljiv na djelovanje proteina Ptch. Fosforilacijskom kaskadom se prenosi signal kroz citoplazmu do konačne mete proteina Gli (39, 42).

1.3.4. Protein Gli

Obitelj Gli su „proteini cinkovog prsta“ te su dobili ime po glioblastomu iz kojeg su prvi put izolirani. Njihova funkcija je reguliranje transkripcije mnogih gena, kao što su geni za ciklin D2 i ciklin E, koji su uključeni u staničnu proliferaciju, članovi Wnt i TGFβ obitelji gena (osobito geni koji kodiraju morfogenetske proteine kosti) te gena Ptch (37). Kod sisavaca postoje tri izoforme proteina Gli, poznate kao Gli1, Gli2 i Gli3. Gli1 je trajni aktivator signalnog puta i smatra se najbitnijim od sva tri Gli proteina. Proteini Gli2 i Gli3 posjeduju aktivacijsku i inhibicijsku domenu te prema potrebi mogu djelovati kao aktivatori ili kao inhibitori transkripcije gena. No, može se generalno reći da je Gli2 uglavnom aktivator signalnog puta, a Gli3 uglavnom inhibitor signalnog puta. Nakon vezanja Hh liganda dolazi do razgradnje represorskih oblika, a u slučaju da liganda nema, represorski oblici koče ekspresiju ciljnih gena (43).

1.3.5. Uloga signalnog puta Hh-Gli u karcinogenezi

O ulozi Hh-Gli puta u posljednjih nekoliko godina otkriva se mnogo te se provlači mogućnost o njegovoj važnoj ulozi u raznim tumorima, primjerice u tumorima pluća, dojke, prostate, probavnog trakta, kože, jajnika i drugima (41, 44, 45, 46).
Prema najnovijim procjenama Hh-Gli put sudjeluje u jednoj trećini svih smrtonosnih tumora, pa prema tome Hh-Gli put postaje vrlo značajnom metom potencijalnih terapija raka.
Malo se zna o ulozi Hh-Gli puta u nastanku karcinoma jajnika (47) i o interakciji tog puta sa genima BRCA 1 i 2.
Jedino što je poznato, u prikazu pacijentice s nasljednim mutacijama u genima PTCH1 i BRCA1, koja pokazuje simptome Gorlinovog sindroma (višestruki bazocelularni karcinomi

kože i keratociste čeljusti) da je razvila karcinom dojke u starijoj životnoj dobi (48). Ustanovljeno je da ove mutacije ne ubrzavaju, ne pojačavaju niti mijenjaju karakteristike niti jednog od ova dva nasljedna sindroma (48).

Drugi, nedavno objavljeni prikaz pacijentice, također, je prezentirao pacijenticu s bazocelularnim karcinomima kože glave i invazivnim duktalnim karcinomom dojke, bez ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora. Naknadno su ustanovljeni dodatni simptomi koji su upućivali na Gorlinov sindrom, te je pronađena mutacija gena PTCH1. Začuđujuće, nije pronađena mutacija u genima BRCA1 i BRCA2 (49).

Do sada je poznato da je ekspresija Shh, Dhh, Ptch, Smo i Gli proteina povećana u benignim i malignim tumorima jajnika dok je kod normalnih stanica nema. Imunoreaktivnost za Shh, Dhh, Ptch, Smo i Gli1 je znatno povećana kod stanica koje jače proliferiraju, a blokiranje Hh-Gli signalnog puta značajno smanjuje proliferaciju stanica kod karcinoma jajnika (50, 51, 52, 39).

U ovom radu želimo istražiti kakav je mehanizam poremećenog aktiviranja Hh-Gli puta u karcinomima jajnika uključujući i eventualne interakcije signalnog puta Hh-Gli s genima BRCA1 i BRCA2, a napose istražiti mogućnosti da se inhibiranjem ovog signalnog puta spriječi rast tumora.

Očekujemo da će rezultati ovih istraživanja pridonijeti razumijevanju funkcioniranja signalnog puta Hh-Gli u karcinogenezi (eventualno omogućiti klasifikaciju karcinoma jajnika) te pronalaženju djelotvornih metoda za inhibiranje prijenosa signala, odnosno razvoju i evaluaciji terapijskih strategija, uključujući i moguće konkretne kliničke aplikacije.

2. HIPOTEZA

Interakcija nekih od gena Hedgehog, Patched, Smoothened i Gli (Hh, Ptch, Smo, Gli) s genima BRCA1 i BRCA2 mogu dovesti do poremećene regulacije signalnog puta Hh-Gli u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika.

Kako je poremećaj aktivnosti signalnog puta Hh-Gli otkriven u različitim i brojnim tipovima tumora, a isto tako prisutnost mutacija u BRCA1 i BRCA2 genima kod tumora jajnika i mnogim drugima, nametnula se i pretpostavka da bi pojačana aktivnost signalnog puta Hh-Gli i mutacije BRCA1 i BRCA2 mogli biti prisutni i u zloćudnim epitelnim tumorima jajnika.

Obzirom da se u laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ , u suradnji s Klinikom za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, već razvio in vitro model na zrelim teratomima jajnika (53), koji su dobroćudni tumori, logičan slijed je bio istražiti prisutnost Hh-Gli signalnog puta u zloćudnih epitelnih novotvorina jajnika.

3. CILJ RADA

Ciljevi istraživanja su:

1) istraživanje interakcija signalnog puta Hh-Gli s genima koji sudjeluju u popravcima lomova DNA (BRCA1 i BRCA2);
2) ispitati je li poremećaji gena BRCA1 i BRCA2 pogoduju aktiviranju signalnog puta Hh-Gli;
3) korelirati ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli te gena BRCA1, BRCA2 i survivina s kliničkim parametrima kao što su stadij bolesti definiran prema FIGO klasifikaciji te patohistološki nalaz tumora;
4) istražiti mogućnost da se inhibiranjem signalnog puta Hh-Gli (inhibitorom ciklopaminom) spriječi rast tumora;
5) istražiti mogućnost da se RNA utišavanjem inhibira ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli;
6) istražiti kakva je genska ekspresija glavnih komponenti signalnog puta Hh-Gli, te gena BRCA1 i BRCA2 i survivina nakon transfekcije plazmidom koji nosi gen za GLI1;
7) utvrditi je li povećana migratorna sposobnost stanica nakon aktivacije signalnog puta Hh-Gli;
8) utvrditi kakva je vijabilnost stanica nakon aktivacije ili inhibicije signalnog puta Hh-Gli;

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Prikupljanje uzoraka

Prospektivno istraživanje se provelo u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i u Laboratoriju za nasljedni rak, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu. Kod svih zloćudnih tumora jajnika indicirana je histerektomija s obostranom adneksektomijom kao minimalni terapijski zahvat. Tkivo se prikupljalo tijekom operativnog zahvata, a nakon kirurškog odstranjenja jajnika. Od svake pacijentice uključene u istraživanje uzeta su dva mala komadića tkiva (promjera oko 0,5 cm) za gensku analizu: komadić tumorskog tkiva i komadić tkiva jajnika koji nije zahvaćen tumorom (kontrolno tkivo). U jedinici intenzivne skrbi prilikom rutinskog uzimanja krvi uzeta je mala količina pune krvi za analizu (oko 5 mL).

Koristili smo dvije metode u prikupljanu i analizi istraživanog materijala: kliničke i laboratorijske metode.

Nakon detaljno obavljene anamneze i ginekološkog statusa te ostalih dijagnostičkih postupaka učinio se operativni zahvat, histerektomija s obostranom adneksektomijom, ablacija peritoneuma, omentektomija te je uzet ispirak ili slobodna tekućina iz trbušne šupljine za citološku analizu.

Neposredno nakon operacije, u jedinici intenzivne skrbi, prikupilo se oko 5mL pune krvi koja je pohranjena u epruvetu koja sadrži antikoagulans EDTA. Dobiveno tkivo se patohistološki verificiralo bojanjem hemalaun-eozinom te se posebno karcinom spremao u epruvetu sa medijem za rast stanica MEM (Minimal essential medium) i ampulu s RNALater otopinom, posebno komadić tkiva koji nije zahvaćen karcinomom u ampulu s RNALater otopinom i zajedno s krvi transportiralo do laboratorija gdje se započelo s molekularno genetičkim metodama.

Istraživanje je provedeno u skladu sa zakonima Republike Hrvatske, uz poštivanje etičkih, pravnih i moralnih principa rada s bolesnicama. Tijekom prikupljanja uzoraka, od svake bolesnice dobivena je suglasnost, na posebnom obrascu, o dobrovoljnom sudjelovanju u ovom istraživanju i korištenju uzoraka u znanstvene svrhe. Prethodno je bolesnica bila detaljno upoznata s metodama prikupljanja i analizom kliničkog materijala. Da je istraživanje provedeno u skladu s dobrom kliničkom praksom potvrdilo je i Etičko povjerenstvo Klinike za ženske bolesti i porode, Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Kao predmet našeg istraživanja odabrali smo zloćudne epitelne novotvorine jajnika i „borderline“ tumore jajnika. Kontrolni uzorci su bili tkivo zdravog jajnika. Poznato je da je signalni put Hh-Gli prisutan u komunikaciji između strome i epitela, stoga smo u istraživanje uključili i fibrome jajnika. Oni su dobroćudni tumori, građeni od stanica vezivnog tkiva jajnika, a pripadaju tumorima specijalizirane strome jajnika.

U periodu od 2007. do 2010. prikupljeno je 23 uzorka. Obzirom da je ekstrakcija RNA i DNA ovisna o količini i kvaliteti prikupljenog materijala, RNA dovoljno dobre kvalitete je uspješno ekstrahirana iz 18 uzoraka, te je qRT-PCR analiza rađena na 18 uzoraka. DNA je uspješno ekstrahirana iz 17 uzoraka, tako da je analiza gubitka heterozigotnosti rađena na tih 17 uzoraka. U tablici 3 prikazan je popis svih prikupljenih uzoraka s pripadajućim FIGO stadijem bolesti i patohistološkom dijagnozom.

Tablica3. Popis svih prikupljenih uzoraka s pripadajućim rednim brojem, FIGO stadijem bolesti i patohistološkom dijagnozom

R. br.	FIGO stadij bolesti	Patohistološka dijagnoza tumora
1	III C	Adenocarcinoma serosum
2	I C	Cystadenocarcinoma serosum
3	IA	Tumor atypicum proliferans serosum
4	I A	Tumor atypicum proliferans mucinosum
5	I C	Carcinosarcoma
6	IA	Cystadenocarcinoma endometrioides
7	II C	Cystadenocarcinoma serosum
8	IIIA	Tumor atypicum proliferans serosum
9	III C	Carcinoma clarocellulare
10	I C	Cystadenocarcinoma clarocellulare
11	III C	Cystadenocarcinoma endometrioides
12	III C	Cystadenocarcinoma serosum
13	I A	Tumor atypicum proliferans serosum
14	I C	Tumor atypicum proliferans serosum
15	III C	Cystadenocarcinoma papillare mixtum
16	III B	Cystadenocarcinoma papillare serosum
17	II B	Adenocarcinoma endometrioides
18	I B	Tumor atypicum proliferans serosum
19		Fibroma
20	III C	Cystadenocarcinoma papillare serosum
21	IA	Tumor atypicum proliferans serosum
22		Fibroma
23		Adenofibroma

Svaki od uzoraka označen je rednim brojem kako bi se lakše prikazao u sljedećim tablicama.
Za zamjetiti je da je u istraživanju prikupljeno 7 "borderline" tumora jajnika od koji je 6 bolesnica imalo prvi stadij bolesti prema FIGO klasifikaciji, a samo jedna bolesnica imala je treći stadij bolesti. U skupini s karcinomima jajnika ukupno je bilo 13 uzoraka, prvi stadij bolesti prema FIGO klasifikaciji imalo je 4 bolesnice, drugi stadij bolesti 2 bolesnice i treći stadij bolesti prema FIGO klasifikaciji imalo je 7 bolesnica. Kada govorimo o stupnju diferenciranosti tumora možemo reći da je u skupini s karcinomima jajnika u 4 uzorka tumor bio dobro diferenciran, odnosno imao je histološki gradus I, dok je u preostalih 9 uzoraka tumor bio slabo diferenciran, odnosno imao je histološki gradus III.
Prosječna dob ispitanica je bila 61 godina, a jedna petina bolesnica nisu nikad rađale. Od serumskih tumorskih biljega koji su korišteni u preoperativnoj obradi jedini koji je bio signifikantno povišen je tumorski biljeg CA-125.

4.2. Metode

Metode koje smo koristili u ovom istraživanju su: ekstrakcija RNA iz tkiva i stanica, ekstrakcija DNA iz tkiva i krvi, mjerenje koncentracije DNA, provjera kvalitete i koncentracije RNA, reverzna transkripcija, kvantitativni real-time PCR, statistička obrada podataka, analiza mutacija gena BRCA1 i BRCA2 (fragmentalna analiza i određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)), analiza gubitka heterozigotnosti, uzgoj i održavanje stanica u kulturi, MTT test, transfekcija, migracija i RNA utišavanje.

4.2.1. Ekstrakcija RNA

4.2.1.1. Ekstrakcija RNA iz tkiva

Tkivo pohranjeno u RNALater otopini dopremljeno je na Institut Ruđer Bošković gdje su ekstrahirane DNA i RNA iz uzoraka. Uzorak je sterilnim škaricama prerezan na dva podjednaka komada, od čega se jedna polovica koristila za ekstrakciju RNA, a druga za ekstrakciju DNA.
Ekstrakcija RNA radi se pomoću TRIzol reagensa (Invitrogen). Svi postupci pri ekstrakciji RNA izvode se na ledu, osim ako nije drugačije naznačeno.
Stavi se komadić tkiva 50x50x50 mm u 1 ml TRIzola, homogenizira se na homogenizatoru IKA Ultra Turrax T18 Basic dok smjesa ne postane homogena, potom se inkubira 10 minuta

na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 200 µl kloroforma na svakih 1 ml TRIzola korištenog u reakciji, promućka se 10 sekundi i ostavi stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga se centrifugira u centrifugi ohlađenoj na +4^{o}C, 15 minuta, pri najvećoj brzini (13200 x g) u centrifugi Eppendorf 5415R.

Gornja vodena faza (prozirna) se prebaci u čistu mikroepruvetu, doda se 500 µl izopropanola na svakih 1 ml TRIzola korištenog u reakciji, promućka se 10 sekundi i ostavi stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom se centrifugira u centrifugi ohlađenoj na +4^{o}C 30 minuta pri najvećoj brzini (13200 x g).

RNA se nalazi u talogu na dnu mikroepruvete, pažljivo se ukloni supernatant i doda se 1 ml 75% EtOH, potom se vorteksira i centrifugira u centrifugi ohlađenoj na +4^{o}C 10 minuta pri najvećoj brzini (13200 x g).

Ukloni se supernatant i osuši talog na zraku nekoliko minuta.

Nakon toga potrebno je otopiti talog RNA u 30-50 µl ultračiste vode.

4.2.1.2. Ekstrakcija RNA iz stanica

Radi se na isti način kao i RNA iz tkiva, osim koraka homogenizacije na homogenizatoru. Umjesto toga, na talog stanica doda se TRIzol, resuspendira pipetom i inkubira na sobnoj temperaturi kako je naznačeno u poglavlju 4.2.1.1. Svi ostali postupci opisani su u poglavlju 4.2.1.1.

4.2.2. Ekstrakcija DNA

4.2.2.1. Ekstrakcija DNA iz tkiva

DNA iz tkiva ekstrahira se pomoću pufera za ekstrakciju. Sastav pufera priprema se na slijedeći način:1 ml 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 + 10 ml 0.5 M EDTA pH 8.0+ 1.25 ml 20% SDS te se potom doda voda do ukupnog volumena od 50 ml.

Postupak ekstrakcije DNA odvija se kroz dva dana.

Prvo se usitni tkivo sterilnim škaricama u komadiće u 1 ml pufera za ekstrakciju, potom se doda 20 µl proteinaze K (otopina koncentracije 12.5 mg/ml), a zatim inkubira preko noći na 56^{o}C dok se tkivo ne rastopi.

Drugi dan se doda 1 ml fenola i dobro protrese, centrifugira se na sobnoj temperaturi 10 minuta, pri najvećoj brzini (13200 x g), a zatim se gornju vodenu fazu (prozirnu) prebaci u čiste mikroepruvete. Doda se 1 ml mješavine kloroform/izoamilni alkohol (omjer 24:1) i

dobro protrese. Centrifugira se na sobnoj temperaturi 10 minuta pri najvećoj brzini (13200 rpm) te se iz gornje faze izvadi 600 µl tekućine i prebaci u čistu mikroepruvetu.
Doda se 1.2 ml ledeno hladnog EtOH (čuva se na -20^{o}C) i promiješa se izvrtanjem – DNA se istaloži u obliku niti.
U čiste mikroepruvete stavi se 200-500 µl TE pufer. Sterilnom staklenom kukicom izvuče se istaložena DNA i otopi u priređenom TE puferu.

4.2.2.2. Ekstrakcija DNA iz krvi

DNA iz krvi ekstrahira se metodom isoljavanja. Krv se vadi u vakutejnere sa antikoagulansom i pohranjuje na -20^{o}C do ekstrakcije. Prije ekstrakcije krv se ostavi na sobnoj temperaturi da se otopi otprilike sat vremena. Zamrzavanje prije ekstrakcije pogoduje razbijanju eritrocita i producira čišću DNA.

1. faza

Krv iz vakutejnera pretoči se u epruvetu od 50 ml i dopuni sa RCLB puferom (Tris 2,42g+ MgCl2 x6 H2O 2,032g+ NaCl 1,168g+ nadopuniti do 2l H2O, podesiti pH 7.6, autoklavirati) do 40 ml, izmiješa se okretanjem nekoliko puta i stavi 15 minuta na led. Centrifugira se u centrifugi ohlađenoj na +4^{o}C 10 minuta pri 5000 rpm (centrifuga Eppendorf 5403, r = 10 cm). Pažljivo se ukloni supernatant i na talog doda 5-10 ml RCLB, vorteksira se da se razbije talog i dopuni sa RCLB do 25 ml.
Potom se centrifugira u centrifugi ohlađenoj na +4^{o}C 10 minuta pri 5000 rpm.
Odlije se supernatant i falkonice se stave na papir da se talog što bolje ocijedi.
Na talog se doda 2ml SE-pufera (NaCl 2,195 g+ EDTA 4,2g+ do 500 ml H2O, podesiti pH 8.0, autoklavirati), 200µl 10% SDS-a i 20µl proteinaze K, vorteksira se i epruvete se postave u kupelj na 37°C preko noći.

2. faza

Izvade se epruvete iz kupelji i prelije se sadržaj u plastične epruvete od 15 ml. Doda se 750 µl 5M NaCl i vorteksira se do mliječno bijele boje. Centrifugira se 15 minuta na sobnoj temperaturi pri 5000 rpm. Prelije se sadržaj u nove epruvete. Centrifugira se 15 minuta na sobnoj temperaturi pri 5000 rpm. Prelije se sadržaj u nove epruvete i doda se 3,5 ml izopropanola, lagano se mućka dok se ne istaloži DNA u obliku niti. DNA se uhvati sterilnom kukicom, ispere u apsolutnom etanolu i otopi u određenoj količini TE-pufera u mikroepruvetama od 2 ml, ovisno o količini DNA (500 µl na niže). DNA se ostavi da se otapa preko noći na +4°C te joj se zatim izmjeri koncentracija i pohrani se na +4°C.

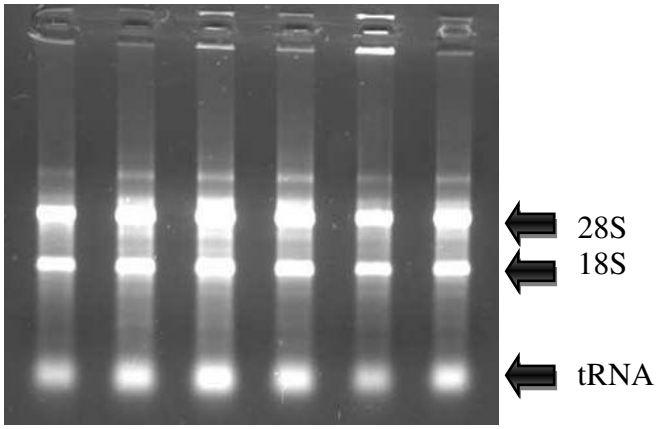
4.2.3. Mjerenje koncentracije DNA

Koncentracija DNA mjerila se na Qubit fluorometru (Invitrogen, USA) pomoću Qubit® dsDNA BR Assay Kit-a (Invitrogen, USA). Kit sadrži boju koja fluorescira samo kada je vezana za DNA, pufer u kojem se otapa boja te dva standarda za kalibraciju fluorometra. Za mjerenje koncentracije treba koristiti posebne prozirne mikroepruvete od 0,5 ml s tankom stijenkom, Qubit™ assay Tubes (Invitrogen, USA).
Potrebno je pripremiti odgovarajući broj mikroepruveta od 0,5 ml, uključujući i dva standarda te označiti poklopce. Potom pripremiti Qubit radnu otopinu tako da se boja razrijedi u puferu 1:200. Za pripremu standarda dodati 190 µl radne otopine i dodati 10 µl odgovarajućeg standarda, a za pripremu uzoraka dodati 190 µl radne otopine i 1 µl uzorka.
Protresti mikroepruvete na tresilici i spustiti u centrifugi, zatim ostaviti mikroepruvete 2 minute na sobnoj temperaturi. Izmjeriti koncentraciju na Qubit fluorometru.

4.2.4. Provjera kvalitete i koncentracije RNA

Za uspješno izvođenje kvantitativnog real-time PCR-a ključno je da je analizirana RNA čista i dobre kvalitete. Kvaliteta RNA provjerava se elektroforezom u agaroznom gelu, a čistoća mjerenjem apsorbancije pri 260 i 280 nm.

4.2.4.1. Provjera kvalitete RNA
Priprema 50x TAE pufera: 242 g Tris+ 57.1 ml ledene octene kiseline+ 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 te se potom nadopuni vodom do 1 L.
TAE pufer priprema se 50x koncentriran i razrjeđuje za korištenje u omjeru 20 ml TAE u 1 L dH_2O.
Priprema 1% agaroznog gela:
Otopi se pažljivo 1 g agaroze u staklenoj tikvici u 100 ml TAE pufera u mikrovalnoj pećnici. Potom treba djelomično ohladiti tikvicu pod mlazom hladne vode te dodati oko 10 µl etidij-bromida (radna otopina koncentracije 5 mg/ml) i promiješati. Izliti u kadicu za elektroforezu i pričekati oko pola sata da gel polimerizira. Nakon toga se 2 µl RNA pomiješa sa 1 µl LB pufera (pufer za nanošenje na gel, sadrži 50% glicerol i boje bromfenol-blue i xylen-cijanol) i nanese u jažice na gelu. Gel se podvrgne elektroforezi u polju istosmjerne struje napona 100 V 10-15 minuta. RNA se detektira pomoću aparata UVITec (Cambridge).



Slika 8. Izgled RNA na 1% agaroznom gelu. Gornja jaka pruga predstavlja 28S RNA, srednja jaka pruga 18S RNA, a donja tRNA i degradiranu RNA. mRNA se nalazi između pruga 28S i 18S. RNA se smatra kvalitetnom ako je 28S pruga dvostruko jačeg intenziteta od 18S pruge.

4.2.4.2. Mjerenje koncentracije RNA

Koncentracija se mjerila spektrofotometrijski, izračunavajući iz apsorbancije pri 260 nm, a dodatno se provjeravala i čistoća određujući omjer apsorbancija pri 260 nm i 280 nm. Čista RNA ima taj omjer blizu 2 kada je otopljena u TE puferu, ili između 1.5 i 2 kada je otopljena u vodi.

Razrijedi se 1µl RNA sa 99µl destilirane vode (razrjeđenje 100x), kalibrira se spektrofotometar prvo sa čistom destiliranom vodom. Razrijeđeni uzorak RNA nanese se u kivetu i izmjeri se apsorbancija pri 260 i 280 nm.

Primjer izračuna koncentracije RNA na temelju apsorbancije:

A_{260} = 0.059

A_{280} = 0.033

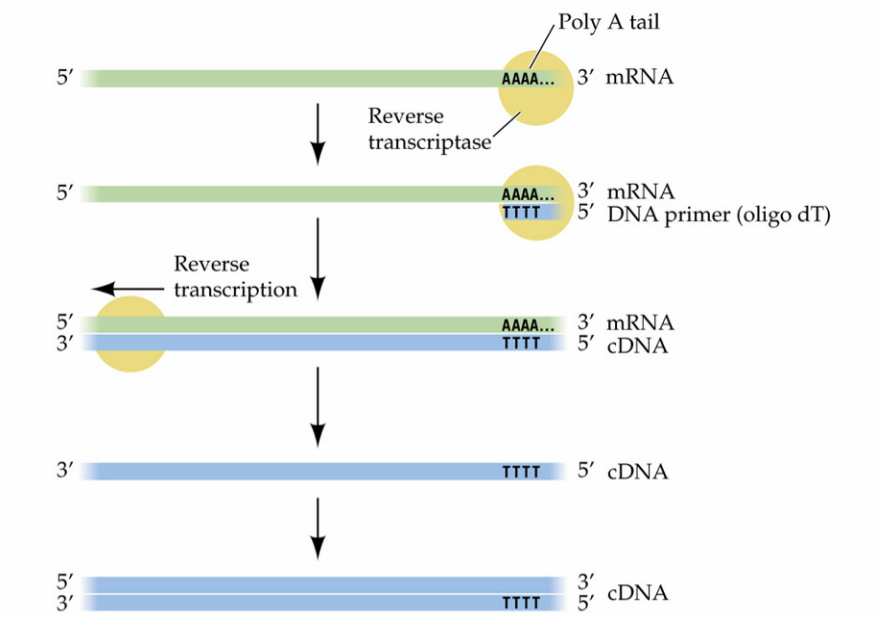
$A_{260/280}$ = 1.788

C = A_{260} x razrjeđenje x 40 (ng/µl)

C = 0.059 x 100 x 40 = 236 ng/µl

4.2.5. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je postupak prepisivanja RNA u komplementarnu DNA (cDNA) radi kvantifikacije u kvantitativnom real-time PCR-u. RNA je prefragilna molekula da bi se koristila direktno, pa je zato potreban korak prevođenja u cDNA. Postupak se izvodi komercijalnim kompletom kemikalija (kitom) koji sadrži enzim reverznu transkriptazu, koji vrši reakciju prevođenja (slika 9).



Slika 9. Princip reakcije reverzne transkripcije

Potrebno je u sterilnoj mikroepruveti napraviti smjesu tzv. „master mix“ za određeni broj uzoraka RNA koji se prevodi u cDNA. U tablici 4. prikazan je mix za 5 uzoraka.

Nakon toga vorteksirati „master mix“, zatim kratko centrifugirati i razdijeliti po 15,375 µl po mikroepruveti.

U svaku mikroepruvetu doda se 500 ng RNA (izračunato na temelju izmjerene koncentracije) i vode do ukupnog volumena od 50 µl.

Staviti u PCR mašinu (Applied Biosystems Gene Amp 2700) na sljedeći program:

25°C 10:00 minuta

37°C 60:00 minuta

95°C 5:00 minuta

4°C ∞

Tablica 4. Volumeni pojedinačnih komponenata u reakciji reverzne transkripcije ukupnog volumena 25 µl

Komponenta	volumen za 1 uzorak	volumen za 5 uzoraka	konačna koncentracija
10 x pufer	2,5 µl	12,5 µl	1 x
$MgCl_2$	5,5 µl	27,5 µl	5,5 mM
dNTP	5 µl	25 µl	2 mM
oligo dT	0,625 µl	3,125 µl	1,25 mM
random hexamers	0,625 µl	3,125 µl	1,25 mM
Rnase inhibitor	0,5 µl	2,5 µl	10 U
Reverse transcriptase	0,625 µl	3,125 µl	31,25 U
ukupni volumen	15,375 µl		

4.2.6. Kvantitativni real-time PCR

Kvantitativni real-time PCR (qRT-PCR) se koristi kako bi se odredila količina pojedine mRNA u uzorku, na temelju čega se određuje koliko je pojedini gen eksprimiran. Postupak se sastoji od umnažanja cDNA sa specifičnim početnicama za pojedinu mRNA od interesa uz dodatak interkalirajuće fluorescentne boje. Boja se ugrađuje u dvolančanu DNA te se svakim ciklusom umnažanja intenzitet boje pojačava. Ciklus u kojem se ta fluorescencija može uočiti na kameri aparata naziva se Ct vrijednost. Što je Ct vrijednost za neki gen niža to je gen jače eksprimiran.

Tablica 5. Slijedovi početnica korišteni u kvantitativnim real-time PCR eksperimentima. Oznaka F označava „forward“ odnosno 5'→3' smjer sekvence gena, dok su R „reverse“, odnosno u 3'→5' smjeru.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed	Referenca
Arp F	5' GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG 3'	Eichberger i sur, 2004 (46)
Arp R	5' TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC 3'	Eichberger i sur, 2004 (46)
Ptch1 F	5' TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC 3'	Regl i sur, 2002 (45)
Ptch1 R	5' CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA 3'	Regl i sur, 2002 (45)
Smo F	5' CTGGTACGAGGACGTGGAGG 3'	Kallassy i sur, 1997 (54)
Smo R	5' AGGGTGAAGAGCGTGCAGAG 3'	Kallassy i sur, 1997 (54)
Gli1 F	5' GCCGTGTAAAGCTCCAGTGAACACA 3'	Regl i sur, 2002 (45)
Gli1 R	5' TCCCACTTTGAGAGGCCCATAGCAAG 3'	Regl i sur, 2002 (45)
Shh F	5' GAAAGCAGAGAACTCGGTGG 3'	Kallassy i sur, 1997 (54)
Shh R	5' GGTAAGTGAGGAAGTCGCTG 3'	Kallassy i sur, 1997 (54)
SuFu F	5' AACAGCAAACCTGTCCTTCC 3'	Koch i sur, 2004 (55)
SuFu R	5' TCAGATGTACGCTCTCAAGC 3'	Koch i sur, 2004 (55)
BRCA1 F	5' GATTTGACGGAAACATCTTAC 3'	Williamson i sur, 2002 (56)
BRCA1 R	5' CCAGCAGTATCAGTAGTATGA 3'	Williamson i sur, 2002 (56)
BRCA2 F	5' GCAGTGAAGAATGCAGCAGA 3'	Wu i sur, 2000 (57)
BRCA2 R	5' CAATACGCAACTTCCACACG 3'	Wu i sur, 2000 (57)
survivin F	5' ATGGGTGCCCCGACGTTG 3'	Song i sur, 2006 (58)
survivin R	5' CAACCGGACGAATGCTTTTT 3'	Hoffmann i sur, 2007 (59)

Relativna ekspresija gena izražava se u odnosu na tzv. „housekeeping“ gen, a to je gen koji je jednako eksprimiran u svim tkivima u svako doba. U ovim pokusima korišten je gen ARP koji kodira za ribosomalni protein. Relativna ekspresija gena računa se po formuli $2^{-\Delta Ct}$, gdje je ΔCt razlika Ct vrijednosti gena od interesa i gena ARP.

Eksperiment se postavlja u pločice sa 96 jažica, i svaki uzorak se za svaki gen slaže minimalno u duplikatu. Za svaki gen radi se „master mix“ .

Tablica 6. Master mix za pojedini par početnica u qRT-PCR eksperimentu

Komponenta	volumen za 1 jažicu	volumen za 12 jažica
iqSYBR Green Supermix	5 µl	60 µl
početnica F	0,3 µl	3,6 µl
početnica R	0,3 µl	3,6 µl
H_2O	3,4 µl	40,8 µl
ukupni volumen	9 µl	

Razdijeli se po 9 µl „master mixa“ po svakoj jažici, potom se doda 1 µl odgovarajuće cDNA, poklopi folijom za qRT-PCR i centrifugira se cijela pločica 1 minutu pri 1200 rpm u centrifugi Harrier 18/80 (SANYO, r = 10 cm).

Program pri kojem se odvija reakcija qRT-PCR-a:

95^{o}C 3 minute

40 ciklusa: 95^{o}C 15 sekundi, 61^{o}C 1 minutu i potom očitanje fluorescencije

krivulja mekšanja 70-95^{o}C.

Krivulja mekšanja koja se izvodi na kraju qRT-PCR eksperimenta služi provjeri specifičnosti produkta. Za svaki set početnica točno je poznat oblik krivulje mekšanja, koji mora biti specifičan. Samo eksperimenti sa specifičnom krivuljom mekšanja su uzeti u obzir.

4.2.7. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rađena je u programima MedCalc for Windows program (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) i Microsoft Excel program (Microsoft). Za vrijednosti ekspresije gena svi pokusi su rađeni minimalno u duplikatu, te je za svaku vrijednost izračunata srednja vrijednost i standardna pogreška, koja je prikazana na grafovima u programu Microsoft Excel.

Rezultati genske ekspresije analizirani su za normalnost distribucije Kolmogorov-Smirnov testom. Skupine podataka koje su pokazivale normalnu distribuciju analizirane su ANOVA testom, dok je za analizu podataka koji nisu pokazivali normalnu distribuciju korišten

Kruskal-Wallis test. Za analizu korelacije ekspresija korištena je neparametrijska korelacija po Spearmanu. Statistički značajnim se smatra sve sa P-vrijednošću manjom od 0.05.

4.2.8. Analiza mutacija gena BRCA1 i BRCA2

4.2.8.1. Fragmentalna analiza

Fragmentalna analiza služi za određivenje dužine fragmenata DNA umnoženih PCR reakcijom. Uz korištenje fluorescentno obilježenih početnica i analizom uzoraka na sekvenceru (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD), moguće je i točno kvantificirati jačinu signala svakog fragmenta.

Fragmentalnom analizom određivale su se mutacije gena BRCA1 i BRCA2 te gubitak heterozigotnosti regije gena BRCA1 i BRCA2.

U analizi mutacija gena BRCA1 i BRCA2 korištena je metoda kvantitativni multipleks PCR (QMP) s fluorescentno obilježenim početnicama i ”gene scan” analiza. Nakon toga korištena je metoda sekvenciranja. Eksoni gena BRCA1 i BRCA2 podijeljeni su u tri multipleks PCR reakcije, kao što se može vidjeti u tablici 7. F početnice svakog fragmenta su fluorescentno obilježene (FAM – plavo – svi eksoni gena BRCA1 i BRCA2), te kontrolni fragmenti F IX i DSCR1, VIC – zeleno – markeri WI-16130, D17S1323 i WI-20922 i NED – crno – marker SHGC-30296.

Reakcija PCR odvijala se u volumenu od 25 µl kojeg je sačinjavalo 12,5 µl kita za multipleks PCR (QIAGEN, SAD) (HotStarTaq DNA polimeraza, pufer za multipleks PCR, smjesa dNTP-a), početnice (200-1000 nM), 200 ng DNA te QH_2O. PCR reakcija se sastojala od početne denaturacije od 15 minuta na 95°C, zatim 19 ciklusa od kojih se svaki sastojao od tri faze. Denaturacija je trajala 30 sekundi na 95°C, faza sparivanja trajala je 110 sekundi na 55°C, a faza produljivanja lanaca 60 sekundi na 72°C. Završno umnažanje trajalo je 30 minuta na 72°C.

”Gene scan” analiza izvodila se nakon reakcije PCR, po 1 µl svakog PCR produkta pomiješa se s 12 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems, SAD) i 0,35 µl molekularnog markera LIZ-500 (Applied Biosystems, SAD) te denaturira 2 minute na 95°C. Uzorci se zatim nanesu na 1 kapilarni sekvencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) i nakon elektroforeze analiziraju programom GeneMapper v. 3.0 (Applied Biosystems, SAD).

Tablica 7. Fragmenti umnoženi u pojedinim multipleks reakcijama, s odgovarajućim veličinama fragmenata. Referentni geni, F IX i DSCR1 označeni su u tablici žutom bojom, a kontrolni fragmenti sivom.

Boje teksta odgovaraju boji fluorescentnog biljega na svakom od fragmenata.

BRCA1

Ekson	duljina
23	91
3	96
2	112
24	129
17	135
14	152
20	161
11-1	176
8	182
12	203
22	208
F IX	214
5	229
7	234
DSCR1	236
9	242
21	257
19	261
15	295
11-2	305
16	319.69
4	388
1	398
13	469

BRCA2

Ekson	duljina
10-1	104
10-2	115
4	125
12	144
7	162
8	169
19	195
13	205
F IX	214
DSCR1	236
27-2	260
2	269
25	280
21	288
11-1	301
26	309
1	323
15	332
16	348
11-2	359
18	413
23+24	451
14	468
3	490

BRCA1+BRCA2

Ekson	Duljina
B2 9	131
B1 6	170
B1 10	182
B2 17	199
F IX	214
B1 18	223
B2 22	230
DSCR1	236
B2 5+6	282
B2 20	327
B2 11.3	3
B1 11-3	348
B2 27-1	369
WI-16130	100
D17S1323	155
WI-20922	218
SHGC-30296	125

4.2.8.2. Određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)

Sekvenciranje je postupak kojim se određuje slijed baza u fragmentu DNA.

Prije same reakcije sekvenciranja potrebno je PCR produkte pročistiti od genomske DNA i početnica. To se radi s kitom ExoSAP- IT (usb, SAD): 0,4 µl enzima se doda na 10 µl PCR produkta i zatim se inkubiraju 30 minuta na 37°C, zagriju 15 minuta na 85°C i tada su spremni za sekvenciranje.

Reakcija sekvenciranja se radi u volumenu od 10 µl i sadrži 1 µl kita za sekvenciranje BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, SAD), jednu od početnica, 2 µl PCR produkta

i QH2O. Uvjeti reakcije su slijedeći: 1 minuta na 96°C i zatim 25 ciklusa od 10 sekundi na 96°C, 5 sekundi na 50°C i 4 minute na 60°C.
Uzorci se zatim precipitiraju s 25 µl apsolutnog etanola, s dodatkom 1 µl 0,125 M EDTA i 1µl 3 M Na-acetata 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci se centrifugiraju 50 minuta na 3000 rpm (Universal 320, Hettich Zentrifugen, Njemačka, r=8,5 cm), supernatant se odlije, isperu se s 125 µl 70% etanola, ponovno centrifugiraju 50 minuta na 3000 rpm i osuše. Uzorci se tada otope u 20 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems, SAD), denaturiraju 2 minute na 95°C i ohlade u ledenom stalku.
Uzorci se zatim nanesu na sekvencer i nakon toga analiziraju programom Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems, SAD), te se zatim uspoređuju s referentnom sekvencom programom BioEdit.

4.2.9. Analiza gubitka heterozigotnosti

Za određivanje gubitka heterozigotnosti korištena je metoda multipleks PCR s fluorescentno obilježenim početnicama i potom ”gene scan” analiza na sekvenceru (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer). Jedna od početnica svakog umnažanog fragmenta fluorescentno je obilježena fluorescentnom bojom (FAM – plava, VIC – zelena) zbog lakšeg razlikovanja.
Analizirani fragmenti:

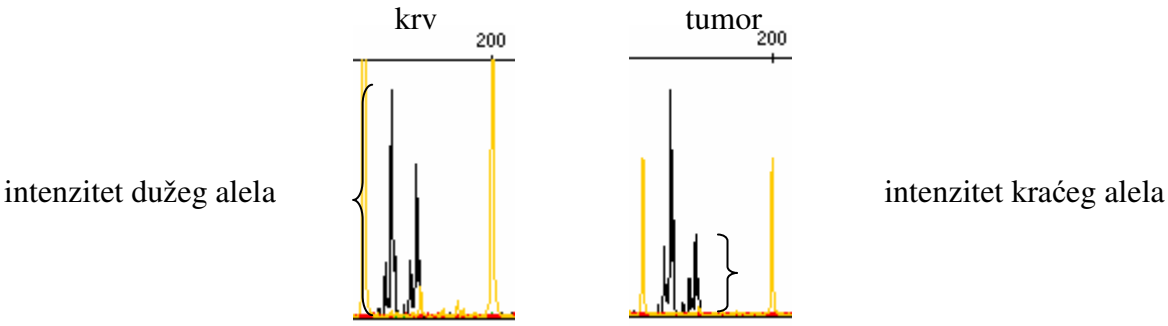
STS-marker D17S1323 (VIC)
Factor IX (FAM)
DSCR1 (FAM)
BRCA1 ekson 23 (FAM)
BRCA1 ekson 11-1 (FAM)
BRCA2 ekson 10-2 (FAM)
BRCA2 ekson 2 (FAM)
BRCA2 ekson 21 (FAM)

Reakcija PCR odvijala se u volumenu od 25 µl kojeg je sačinjavalo 12,5 µl kita za multipleks PCR (QIAGEN, SAD) (HotStarTaq DNA polimeraza, pufer za multipleks PCR, smjesa dNTP-a), početnice (200-400 nM), 200 ng DNA te QH_2O. PCR reakcija se sastojala od početne denaturacije od 15 minuta na 95°C, zatim 19 ciklusa od kojih se svaki sastojao od tri faze. Denaturacija je trajala 30 sekundi na 95°C, faza sparivanja trajala je 110 sekundi na 55°C, a faza produljivanja lanaca 60 sekundi na 72°C. Završno umnažanje trajalo je 30 minuta na 72°C.

”Gene scan” analiza izvodi se nakon reakcije PCR, po 1 µl svakog PCR produkta pomiješa se s 12 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems, SAD) i 0,35 µl molekularnog markera LIZ-500 (Applied Biosystems, SAD) te denaturira 2 minute na 95°C. Uzorci se zatim nanesu na 1 kapilarni sekvencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) i nakon elektroforeze analiziraju programom GeneMapper v. 3.0 (Applied Biosystems, SAD) (slika 10).

Za određivanje LOH-a s polimorfnim STS markerom D17S1323, dobivene vrijednosti dužina fragmenata i njihovog intenziteta analizirale su se u programu Microsoft Office Excel po formuli:

$$\frac{\dfrac{\text{intenzitet kraćeg alela}}{\text{intenzitet dužeg alela}}\ \text{krv}}{\dfrac{\text{intenzitet kraćeg alela}}{\text{intenzitet dužeg alela}}\ \text{tumor}} = \text{LOH<0,66<nor<1,5<LOH}$$



Slika 10. LOH analiza. Izračunavanje gubitka heterozigotnosti iz podataka dobivenih ”gene scan” analizom na sekvenceru.

Za određivanje LOH-a eksonima gena BRCA1 i BRCA2, dobivene vrijednosti dužina fragmenata i njihovog intenziteta analizirale su se u programu Microsoft Office Excel na slijedeći način:

Intenzitet svakog fragmenta u reakciji normalizira se prema kontrolnim fragmentima (Factor IX i DSCR1) i zatim se uspoređuje relativni intenzitet svakog fragmenta između uzorka tumora i uzorka krvi od istog pacijenta (slika 10).

Računski to izgleda ovako:

	Tumor	Krv
Factor IX	1390	2280
DSCR1	590	910
Fragment	690	1922

Intenzitet (relativni/Factor IX))=Intenzitet(Fragment)/Intenzitet(Factor IX)

I – intenzitet fragmenta od interesa

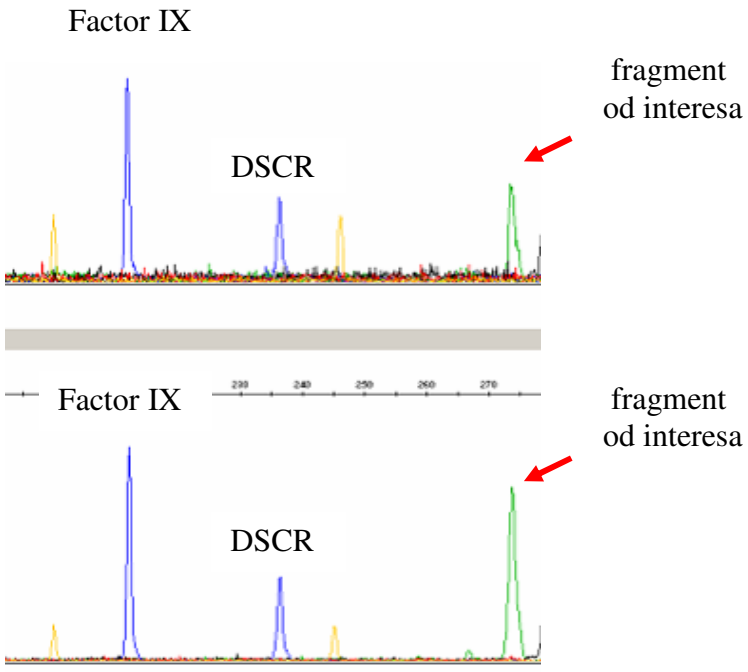
$I_{R(Factor\ IX)}$ – relativni intenzitet, vrijednost razlike intenziteta fragmenta u odnosu na intenzitet Factora IX (npr. tumor=690/1390=0,50, krv=1922/2280=0,84)

$I_{R(DSCR1)}$ – relativni intenzitet, vrijednost razlike intenziteta fragmenta u odnosu na intenzitet DSCR1 (npr. tumor=690/590=1,17, krv=1922/910=2,11)

$O_{Factor\ IX}$ – omjer relativnog intenziteta fragmenta u tumoru i krvi (npr. 0,50/0,84=**0,60**)

O_{DSCR1} - omjer relativnog intenziteta fragmenta u tumoru i krvi (npr. 1,17/2,11=**0,55**)

Ako su oba omjera (i $O_{Factor\ IX}$ i O_{DSCR1}) između 0,4 i 0,66 smatra se da je fragment smanjen, tj. da je došlo do delecije jednog alela.



Slika 11. Usporedba deletiranog fragmenta u uzorku i kontrolnoj DNA.

4.2.10. Uzgoj stanične kulture

Svi postupci pri radu sa staničnim kulturama rade se sa sterilnim otopinama i posuđem u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima sa laminarnim protokom zraka. Između korištenja se kabinet sterilizira UV svjetlom i alkoholom.

4.2.10.1. Odmrzavanje stanica

Stanične linije pohranjene su u spremniku s tekućim dušikom i odmrzavanje treba napraviti što je brže moguće.

Potrebno je izvaditi ampulu sa stanicama iz tekućeg dušika, pripremiti epruvetu s 5 ml MEM (Minimal Essential Medium), medijem sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS).

U ruci smo lagano otopili ampulu sa stanicama da se sadržaj odvoji od stijenke, ali da većina sadržaja i dalje bude zamrznuta. Izlije se sadržaj u pripremljenu epruvetu s medijem, centrifugira 5 minuta pri 1200 rpm u centrifugi Harrier 18/80 (SANYO, r = 10 cm). Izlije se supernatant, a talog stanica resuspendira u 5-10 ml medija MEM+10% FBS i nasadi u plastičnu petrijevku promjera 10 cm. Petrijevku se čuva u inkubatoru na 37^{o}C sa 5% CO_2.

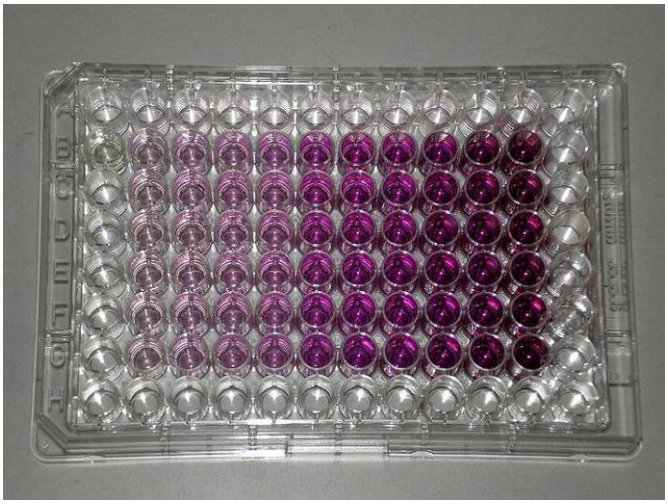
4.2.10.2. Održavanje stanica u kulturi

Za održavanje stanica nužno je stanicama svaka dva do tri dana promijeniti medij. Staklenom pipetom ukloni se stari medij, doda se na stanice 5-10 ml svježeg MEM+10% FBS.

Kada stanice u potpunosti prekriju podlogu na kojoj rastu kažemo da su konfluentne. Tada ih treba odlijepiti od podloge i razrijediti (taj postupak radi se pomoću tripsina pa se naziva tripsiniziranje) i radi se ovako: staklenom pipetom se ukloni stari medij, na stanice se doda 5 ml PBS pufera (1,7 mM KH_2PO_4, 136 mM NaCl, 1 mM $Na_2KH_2PO_4$, pH 7,2), proljulja se petrijevka i ukloni PBS. Na stanice se doda 1 ml tripsina (0,05%) i ostavi da djeluje 5-10 minuta. Kada se stanice odlijepe doda se 5 ml medija MEM+ 10% FBS i resuspendira se provlačenjem kroz pipetu. Jedna petina sadržaja se ostavi u petrijevki, a ostatak se baci ili nasadi u nove petrijevke. Sadržaj petrijevke se dopuni sa 5 ml medija MEM+ 10% FBS i stanice se vrate u inkubator na 37^{o}C i 5% CO_2.

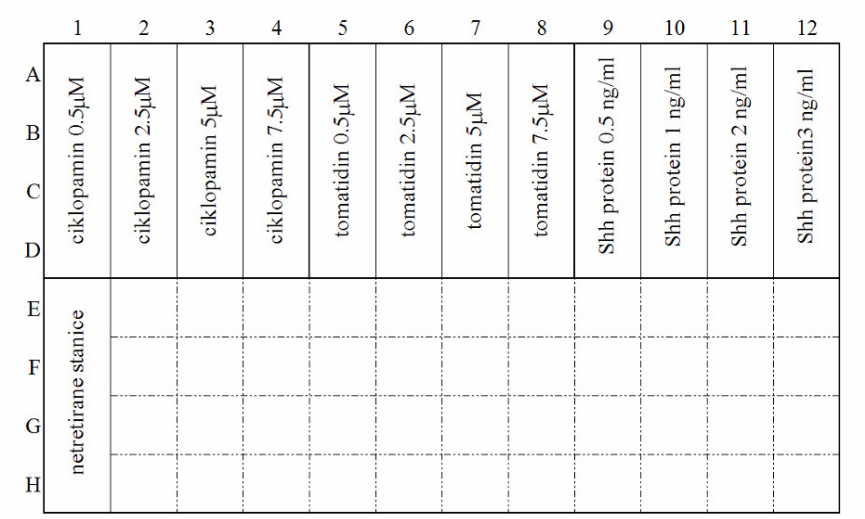
4.2.11. MTT test

MTT test koristi se za praćenje vijabilnost stanica nakon tretmana određenim spojevima u odnosu na netretiranu kontrolu. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) je žuti spoj koji se u živim stanicama reducira u ljubičasti spoj formazan, dok u mrtvim stanicama ostaje žut. Mjerenjem intenziteta ljubičastog obojenja može se odrediti vijabilnost stanica.



Slika 12. Izgled MTT testa u pločici sa 96 bunarića – s lijeva na desno vidi se porast vijabilnosti stanica

Za izvođenje MTT testa potrebno je nasaditi 10^5 stanica/ml u pločicu sa 96 bunarića u ukupni volumen od 180 µl po bunariću, u četiriplikatima za svaku koncentraciju spoja. Nasaditi dodatnu pločicu za kontrolno očitanje netretiranih stanica, tzv. 0. dan, također u četiriplikatu.
24 sata nakon nasađivanja dodati po 20 µl spojeva po bunariću u nekoliko različitih koncentracija (prema tablici 8). Očitavanje raditi nakon 24, 48 ili 72 sata, ili isti dan za kontrolu 0. dan.
Ukloni se medij sa stanica, na stanice se doda 40 µl MTT otopine (otopina koncentracije 1 mg/ml) i ostavi u inkubatoru zaštićeno od svjetla 5 sati. Osim na stanice, čisti MTT se stavlja u 4 dodatna prazna bunarića. Nakon 5 sati na MTT doda se po 160 µl DMSO po bunariću i stavi se na tresilicu 10 minuta da se formazan dobro otopi.
Očitati intenzitet obojenja na čitaču pločica – mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 570 nm.
Vrijednosti se unesu u Excel program i izračuna se postotak vijabilnih stanica.



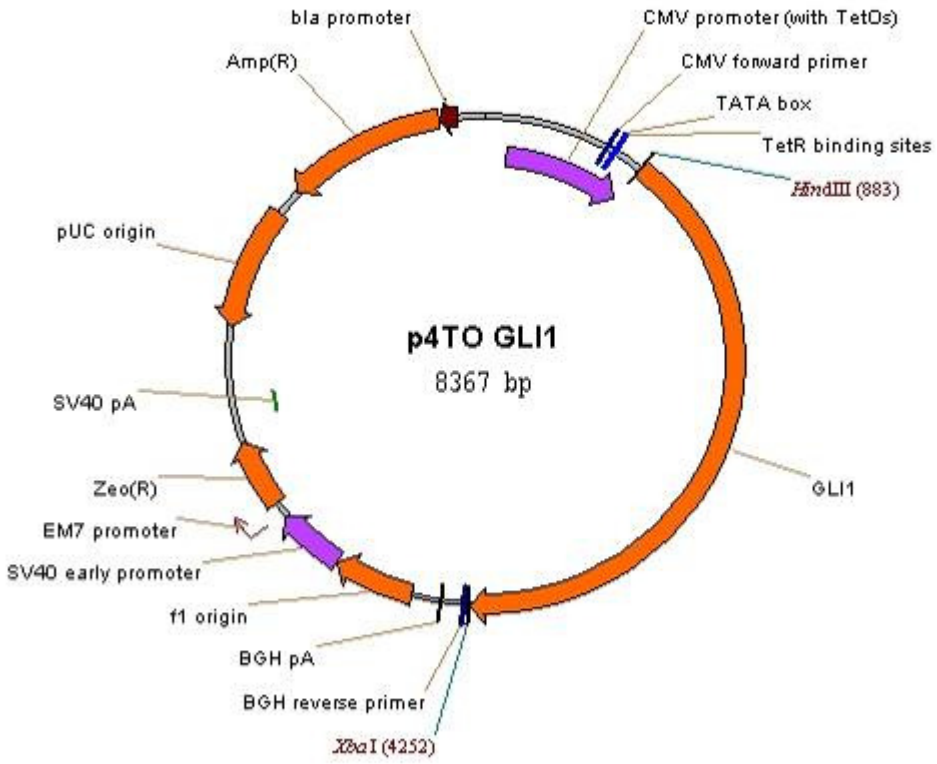
Slika 13. Izgled pločice sa 96 bunarića za MTT test, sa označenim konačnim koncentracijama kemijskih spojeva po bunarićima. Svaki tretman je rađen u četiriplikatu.

Tablica 8. Razrjeđivanje kemijskih spojeva u mediju.

	koncentracija početne otopine	radna koncentracija	volumen spoja	volumen medija	volumen nanesen u bunarić	konačna koncentracija
Ciklopamin	1 mg/ml	5 μM	1 μl	499 μl	20 μl	0,5 μM
	1 mg/ml	25 μM	5 μl	495 μl	20 μl	2,5 μM
	1 mg/ml	50 μM	10 μl	490 μl	20 μl	5 μM
	1 mg/ml	75 μM	15 μl	485 μl	20 μl	7,5 μM
Tomatidin	1 mg/ml	5 μM	1 μl	499 μl	20 μl	0,5 μM
	1 mg/ml	25 μM	5 μl	495 μl	20 μl	2,5 μM
	1 mg/ml	50 μM	10 μl	490 μl	20 μl	5 μM
	1 mg/ml	75 μM	15 μl	485 μl	20 μl	7,5 μM
Shh protein	3 mg/ml	5 mg/ml	0,8 μl	499,2 μl	20 μl	0,5 ng/ml
	3 mg/ml	10 mg/ml	1,65 μl	498,35 μl	20 μl	1 ng/ml
	3 mg/ml	20 mg/ml	3,3 μl	497,60 μl	20 μl	2 ng/ml
	3 mg/ml	30 mg/ml	4,9 μl	495,1 μl	20 μl	3 ng/ml

4.2.12. Transfekcija

Transfekcija je postupak unošenja plazmidne DNA u stanice u svrhu eksprimiranja specifičnog proteina u stanicama. Plazmid koji je korišten u ovim eksperimentima nosi gen za ekpresiju proteina Gli1. Shema plazmida prikazana je na slici 14.



Slika 14. Shematski prikaz ekspresijskog plazmida za Gli1(poklon od dr F.Aberger, Austria)

Transfekcija se izvodi na sljedeći način: nasade se stanice 24 sata prije pokusa u pločicu sa 6 bunarića. Na dan pokusa pomiješa se 0,5 µg plazmida sa 600 µl medija bez seruma (MEM ø) te se ostavi stajati 15 minuta. Pomiješa se 4 µl transfekcijskog reagensa Lipofectamine-a sa 600 µl MEM ø i ostavi stajati 15 minuta.

Pomiješa se otopljeni plazmid s otopljenim Lipofectamine-om i ostaviti stajati 15 minuta.

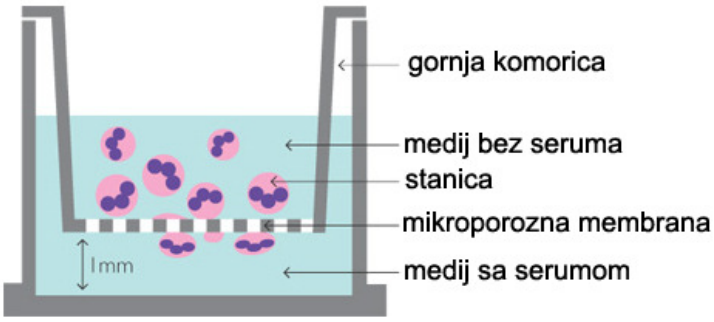
Stanice se isperu 2 puta s PBS-om.

Mješavinu Lipofectamine-a i plazmida pomiješamo sa 1 ml MEM ø i dodamo na stanice te ostavimo stajati 5 sati u inkubatoru. Promijeni se medij na MEM+10% FBS.

Sakupe se stanice nakon 24, 48 ili 72 sata od promjene medija i iz njih se izdvaja RNA na način opisan u poglavlju 4.2.1.2. te dalje analizira kvantitativnim real-time PCR-om.

4.2.13. Migracija

Pokus migracije odvija se u tzv. Boydenovim komoricama. Princip testa je da se u gornju komoricu nasade stanice u mediju bez seruma (MEM ø), dok se u donju komoricu stavi kompletni medij (MEM+10% FBS). Stanice će, privučene kemotaktičkim signalima, migrirati prema mediju sa serumom kroz membranu sa rupicama. Dodavanje kemijskih spojeva na stanice u gornjoj komori može utjecati na njihovu sposobnost migracije prema serumu u odnosu na netretirane stanice.



Slika 15. Shematski prikaz Boydenove komorice za praćenje migracije stanica

Za izvođenje pokusa potrebno je nasaditi stanice 2 dana prije pokusa u kompletni medij (MEM+10%FBS). Dan prije pokusa promijeniti medij na MEM ø. Na dan pokusa stanicama ukloniti medij i na njih staviti 1 ml 0,02% EDTA 5 minuta.

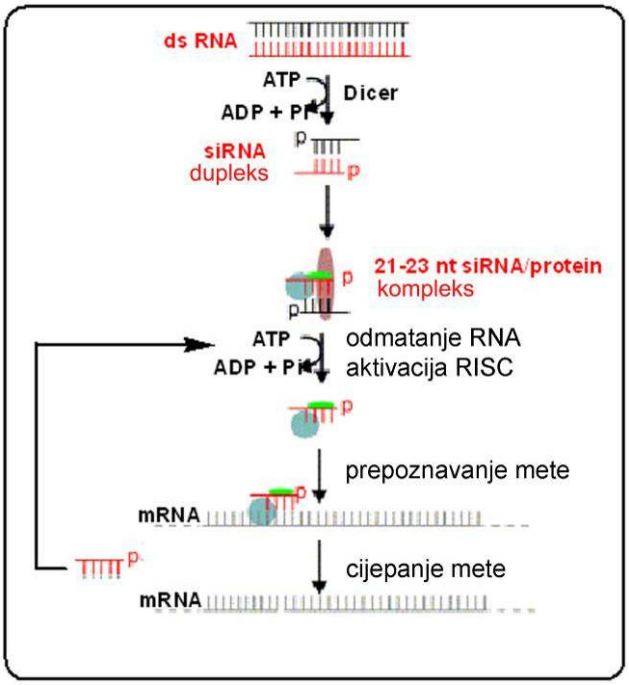
Pripremiti Boydenove komorice u pločicu sa 24 bunarića.

U donji bunarić staviti 1 ml MEM+10%FBS. Sastrugati stanice strugačem i resuspendirati pipetom. U gornju komoricu nasaditi 10^5 stanica/ml u ukupnom volumenu 500 µl. U gornju komoricu dodati kemijski spoj (ciklopamin 0,5 µl za konačnu koncentraciju 2,5 µM, Shh 0,5 µl za konačnu koncentraciju 3 ng/ml). Ostaviti u inkubatoru 4 sata. Isprati stanice 2 puta u PBS-u. Ukloniti stanice s gornje strane membrane štapićem s vatom, fiksirati stanice 10 minuta u 4% formaldehidu. Isprati stanice 2 puta u PBS-u. Potom obojati stanice – crystal violet (1% otopina u vodi) 1 sat, zatim isprati stanice vodovodnom vodom 3 puta. Odvojiti membranu od komorice i uklopiti u medij za uklapanje na predmetno stakalce donjom stranom okrenutom prema gore.

Izbrojati stanice – ukupan broj stanica koji se vidi u 5 vidnih polja povećanja 400x.

4.2.14. RNA utišavanje

RNA utišavanje, odnosno siRNA (small interfering RNA ili silencing RNA) metodologija, je novi i učinkoviti način utišavanja ekspresije gena od interesa u živim stanicama. Prolazno utišavanje radi se pomoću malih molekula, tzv. siRNA, koje se transfeciraju u stanice na sličan način kao i plazmidi. Njihovo djelovanje je prolazno, ali učinkovito, te se efekt može vidjeti i do tjedan dana nakon utišavanja.



Slika 16. Prikaz siRNA mehanizma u stanicama sisavaca. Nakon unosa siRNA na nju se veže RISC (iz eng. RNA-induced silencing complex) kompleks, prepoznaje se ciljna mRNA i razgrađuje.

U ovim pokusima utišavani su geni PTCH1 i SUFU, obzirom da su oba gena tumor supresori, te bi njihovo utišavanje moglo pogodovati tumorigeničnosti stanica. Za izvođenje pokusa potrebno je nasaditi stanice u pločicu sa 6 bunarića – pokus se izvodi kada su stanice 50-70% konfluentne. Pomiješati 10 µl siRNA sa 250 µl MEM ø te ostaviti stajati 5 minuta. Pomiješati 1,25 µl siPORT reagensa sa 250 µl MEM ø i ostavi stajati 5 minuta. Pomiješati siRNA i siPORT mješavine – ostaviti stajati 20 minuta. Stanice isprati 2 puta PBS-om. Na stanice staviti 1,5 ml MEM ø po bunariću. Na stanice dokapati mješavinu siRNA i siPORT-a i

ostaviti 24 sata. Sljedeći dan ukloniti medij i na stanice staviti MEM+10% FBS. Skupiti stanice 24 sata nakon promjene medija radi praćenja utišavanja.

5. REZULTATI

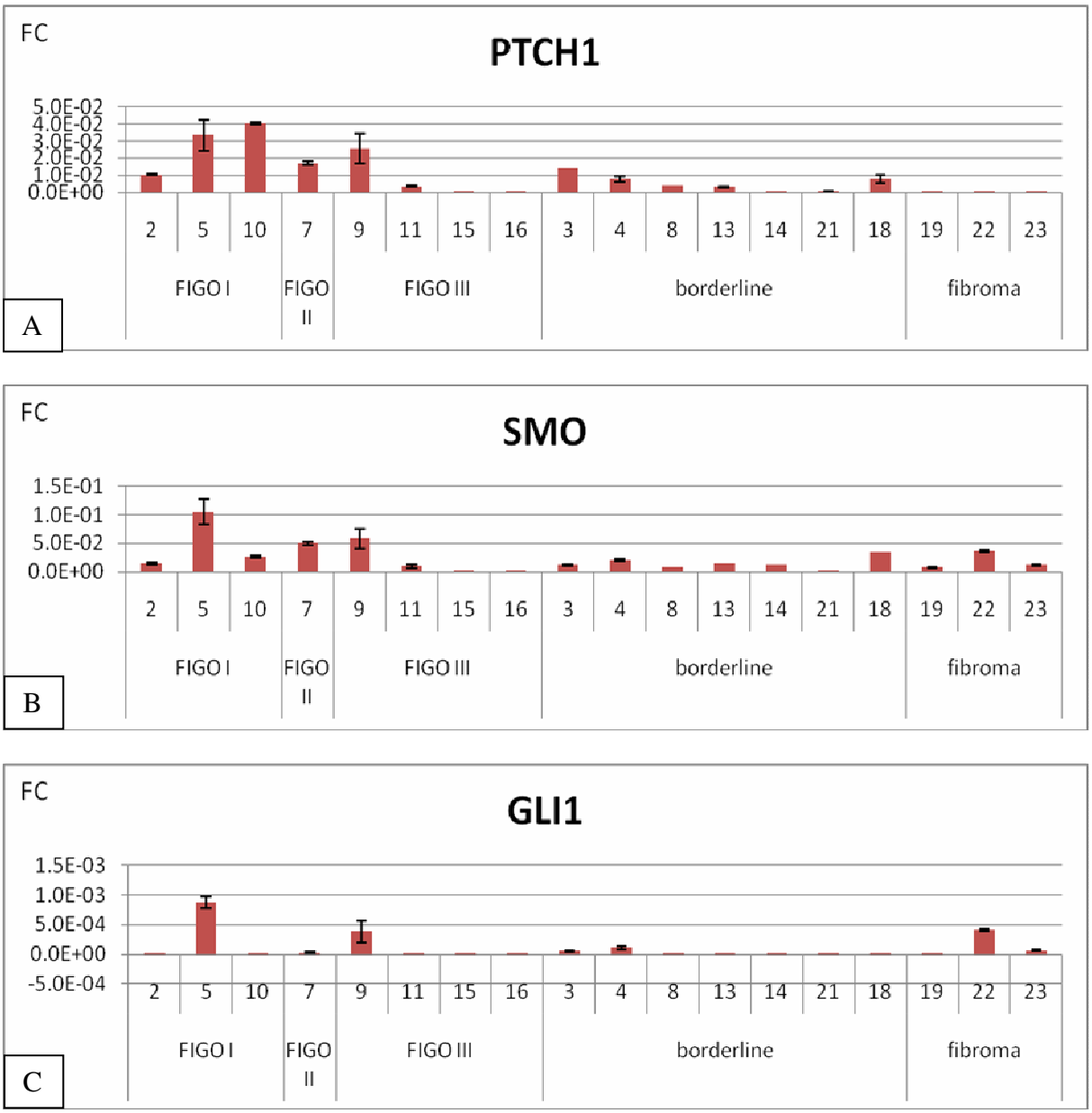
5.1. Ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli u tumorima jajnika

Ekspresija gena PTCH1, SMO, SUFU, GLI1, BRCA1 i BRCA2 detektirana je u svim testiranim uzorcima tumora. Genska ekspresija SHH i SURVIVINA detektirana je u 17 od 18 uzoraka (94,4%). Tablica 9 prikazuje prosječne vrijednosti (sr.vr.) te vrijednosti standardne pogreške (SEM) relativne ekspresije gena (fold change) u odnosu na gen ARP. Ekspresija svakog gena mjerena je minimalno u duplikatu.

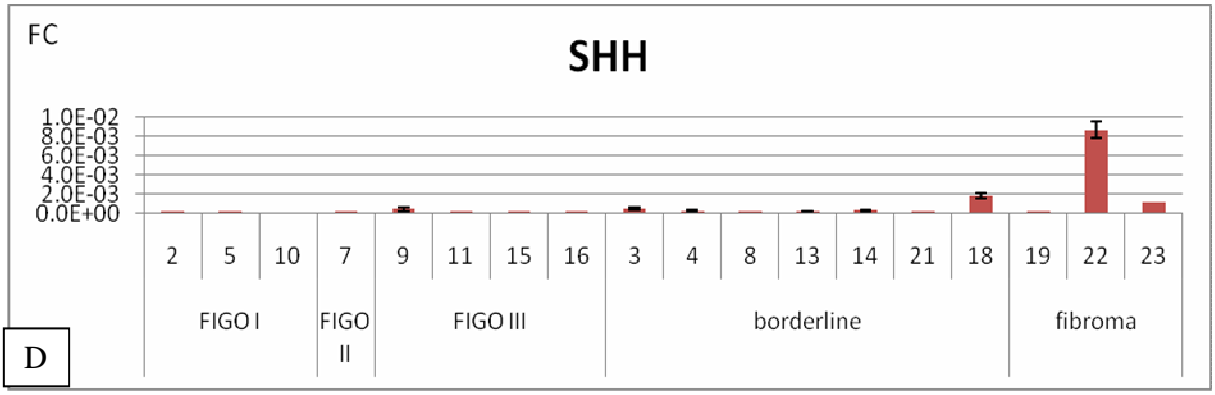
Tablica 9. Vrijednosti relativne ekspresije pojedinih gena u odnosu na gen ARP izmjerene u uzorcima tkiva tumora jajnika. „sr.vr.“ je izračunata srednja vrijednost, dok je SEM standardna pogreška.

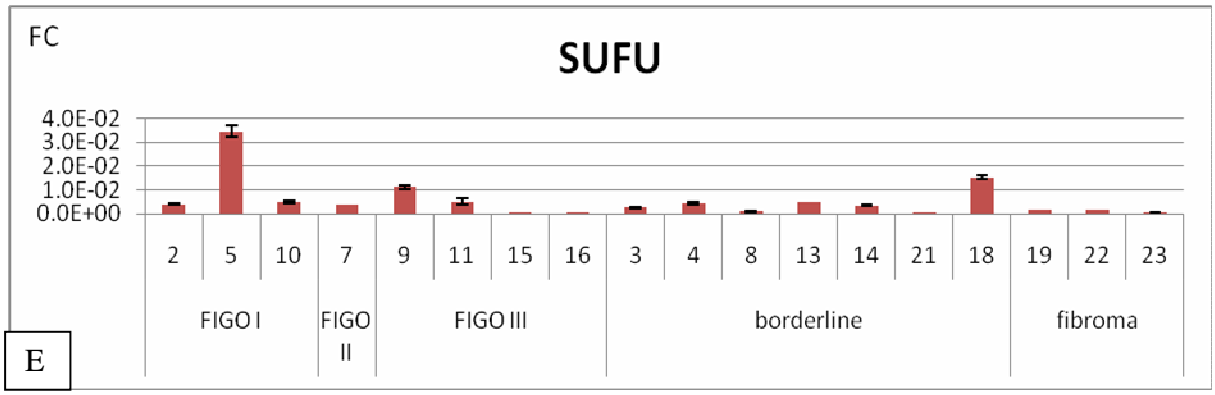
broj uzorka	PTCH1		SMO		GLI1		SHH		SUFU		BRCA1		BRCA2		SURVIVIN	
	sr.vr.	SEM	sr.vr.	SEM	sr.vr.	SEM	sr.vr.	SEM	sr.vr.	SEM	sr.vr.	SEM	sr.vr.	SEM	sr.vr.	SEM
2	1.02 X 10 $^{-2}$	3.13 X 10 $^{-4}$	1.42 X 10 $^{-2}$	1.40 X 10 $^{-3}$	6.22 X 10 $^{-6}$	3.15 X 10 $^{-7}$	1.74 X 10 $^{-6}$	6.22 X 10 $^{-7}$	4.00 X 10 $^{-3}$	3.07 X 10 $^{-4}$	2.86 X 10 $^{-5}$	2.71 X 10 $^{-5}$	2.47 X 10 $^{-3}$	8.42 X 10 $^{-5}$	5.40 X 10 $^{-4}$	2.20 X 10 $^{-5}$
3	1.41 X 10 $^{-2}$	2.43 X 10 $^{-4}$	1.15 X 10 $^{-2}$	3.52 X 10 $^{-4}$	4.94 X 10 $^{-5}$	8.49 X 10 $^{-7}$	4.27 X 10 $^{-4}$	1.04 X 10 $^{-4}$	2.52 X 10 $^{-3}$	1.77 X 10 $^{-4}$	1.24 X 10 $^{-3}$	1.37 X 10 $^{-4}$	1.20 X 10 $^{-3}$	1.15 X 10 $^{-4}$	8.78 X 10 $^{-5}$	1.80 X 10 $^{-5}$
4	7.89 X 10 $^{-3}$	1.93 X 10 $^{-3}$	2.02 X 10 $^{-2}$	2.49 X 10 $^{-3}$	1.14 X 10 $^{-4}$	3.05 X 10 $^{-5}$	2.10 X 10 $^{-4}$	8.13 X 10 $^{-5}$	4.41 X 10 $^{-3}$	6.63 X 10 $^{-4}$	3.29 X 10 $^{-5}$	6.37 X 10 $^{-6}$	3.24 X 10 $^{-4}$	1.51 X 10 $^{-4}$	1.04 X 10 $^{-4}$	3.43 X 10 $^{-5}$
5	3.34 X 10 $^{-2}$	8.86 X 10 $^{-3}$	1.05 X 10 -01	2.28 X 10 $^{-2}$	8.71 X 10 $^{-4}$	9.95 X 10 $^{-5}$	1.21 X 10 $^{-5}$	2.90 X 10 $^{-7}$	3.46 X 10 $^{-2}$	2.43 X 10 $^{-3}$	1.15 X 10 $^{-3}$	2.37 X 10 $^{-5}$	1.85 X 10 $^{-3}$	1.42 X 10 $^{-4}$	7.12 X 10 $^{-4}$	1.61 X 10 $^{-4}$
7	1.71 X 10 $^{-2}$	1.15 X 10 $^{-3}$	5.01 X 10 $^{-2}$	3.35 X 10 $^{-3}$	2.47 X 10 $^{-5}$	6.05 X 10 $^{-6}$	6.66 X 10 $^{-5}$	5.10 X 10 $^{-6}$	3.67 X 10 $^{-3}$	7.55 X 10 $^{-5}$	2.10 X 10 $^{-4}$	3.09 X 10 $^{-5}$	3.39 X 10 $^{-4}$	2.60 X 10 $^{-5}$	6.20 X 10 $^{-4}$	1.34 X 10 $^{-4}$
8	4.33 X 10 $^{-3}$	5.97 X 10 $^{-5}$	7.79 X 10 $^{-3}$	2.69 X 10 $^{-5}$	6.15 X 10 $^{-6}$	4.12 X 10 $^{-7}$	8.31 X 10 $^{-5}$	4.21 X 10 $^{-6}$	9.80 X 10 $^{-4}$	9.37 X 10 $^{-5}$	1.30 X 10 $^{-4}$	2.37 X 10 $^{-5}$	8.84 X 10 $^{-5}$	9.56 X 10 $^{-6}$	1.67 X 10 $^{-5}$	8.08 X 10 $^{-6}$
9	2.56 X 10 $^{-2}$	8.93 X 10 $^{-3}$	5.77 X 10 $^{-2}$	1.76 X 10 $^{-2}$	3.80 X 10 $^{-4}$	1.79 X 10 $^{-4}$	4.30 X 10 $^{-4}$	2.17 X 10 $^{-4}$	1.12 X 10 $^{-2}$	6.78 X 10 $^{-4}$	2.07 X 10 $^{-4}$	1.54 X 10 $^{-4}$	1.91 X 10 $^{-3}$	4.46 X 10 $^{-4}$	2.59 X 10 $^{-3}$	3.73 X 10 $^{-4}$
10	4.02 X 10 $^{-2}$	6.91 X 10 $^{-4}$	2.65 X 10 $^{-2}$	2.78 X 10 $^{-3}$	3.88 X 10 $^{-6}$	1.34 X 10 $^{-8}$	0	0	4.83 X 10 $^{-3}$	5.22 X 10 $^{-4}$	3.64 X 10 $^{-3}$	4.28 X 10 $^{-4}$	9.59 X 10 $^{-3}$	1.65 X 10 $^{-4}$	3.80 X 10 $^{-3}$	3.93 X 10 $^{-5}$
11	3.71 X 10 $^{-3}$	4.24 X 10 $^{-4}$	9.62 X 10 $^{-3}$	2.72 X 10 $^{-3}$	8.16 X 10 $^{-7}$	2.94 X 10 $^{-7}$	3.15 X 10 $^{-6}$	1.04 X 10 $^{-6}$	5.14 X 10 $^{-3}$	1.44 X 10 $^{-3}$	2.78 X 10 $^{-4}$	5.90 X 10 $^{-5}$	4.33 X 10 $^{-3}$	1.23 X 10 $^{-3}$	5.13 X 10 $^{-3}$	1.66 X 10 $^{-3}$
13	3.15 X 10 $^{-3}$	4.34 X 10 $^{-5}$	1.47 X 10 $^{-2}$	3.02 X 10 $^{-4}$	1.70 X 10 $^{-5}$	1.87 X 10 $^{-6}$	1.18 X 10 $^{-4}$	1.77 X 10 $^{-5}$	5.15 X 10 $^{-3}$	0	1.40 X 10 $^{-3}$	2.40 X 10 $^{-5}$	1.00 X 10 $^{-3}$	1.50 X 10 $^{-4}$	4.86 X 10 $^{-5}$	1.75 X 10 $^{-5}$
14	7.50 X 10 $^{-4}$	2.27 X 10 $^{-4}$	1.26 X 10 $^{-2}$	4.70 X 10 $^{-4}$	2.70 X 10 $^{-5}$	1.19 X 10 $^{-6}$	2.96 X 10 $^{-4}$	7.49 X 10 $^{-5}$	3.45 X 10 $^{-3}$	2.31 X 10 $^{-4}$	3.95 X 10 $^{-4}$	1.09 X 10 $^{-4}$	8.89 X 10 $^{-4}$	5.09 X 10 $^{-5}$	9.54 X 10 $^{-5}$	5.84 X 10 $^{-5}$
15	9.89 X 10 $^{-6}$	6.00 X 10 $^{-7}$	1.92 X 10 $^{-4}$	3.36 X 10 $^{-6}$	5.69 X 10 $^{-7}$	1.98 X 10 $^{-6}$	3.47 X 10 $^{-5}$	1.85 X 10 $^{-6}$	4.91 X 10 $^{-5}$	4.07 X 10 $^{-6}$	6.36 X 10 $^{-5}$	4.26 X 10 $^{-6}$	3.98 X 10 $^{-4}$	8.46 X 10 $^{-5}$	8.11 X 10 $^{-5}$	1.27 X 10 $^{-5}$
16	2.29 X 10 $^{-5}$	3.60 X 10 $^{-6}$	3.80 X 10 $^{-5}$	-1.32 X 10 $^{-7}$	4.61 X 10 $^{-7}$	1.09 X 10 $^{-7}$	6.40 X 10 $^{-7}$	5.31 X 10 $^{-8}$	4.08 X 10 $^{-5}$	1.39 X 10 $^{-6}$	6.15 X 10 $^{-5}$	3.28 X 10 $^{-6}$	2.80 X 10 $^{-5}$	1.70 X 10 $^{-5}$	3.69 X 10 $^{-5}$	4.72 X 10 $^{-6}$
18	7.89 X 10 $^{-3}$	2.29 X 10 $^{-3}$	3.48 X 10 $^{-2}$	5.98 X 10 $^{-4}$	1.28 X 10 $^{-5}$	4.44 X 10 $^{-8}$	1.86 X 10 $^{-3}$	2.63 X 10 $^{-4}$	1.53 X 10 $^{-2}$	7.25 X 10 $^{-4}$	3.79 X 10 $^{-3}$	1.08 X 10 $^{-3}$	8.03 X 10 $^{-3}$	1.04 X 10 $^{-3}$	1.80 X 10 $^{-5}$	9.46 X 10 $^{-6}$
19	7.58 X 10 $^{-4}$	2.33 X 10 $^{-5}$	7.44 X 10 $^{-3}$	2.54 X 10 $^{-4}$	3.09 X 10 $^{-6}$	8.34 X 10 $^{-7}$	1.78 X 10 $^{-6}$	4.73 X 10 $^{-7}$	1.58 X 10 $^{-3}$	6.96 X 10 $^{-5}$	2.56 X 10 $^{-4}$	3.58 X 10 $^{-6}$	3.71 X 10 $^{-4}$	1.14 X 10 $^{-5}$	4.73 X 10 $^{-5}$	3.03 X 10 $^{-5}$
21	4.57 X 10 $^{-4}$	2.01 X 10 $^{-5}$	3.95 X 10 $^{-4}$	1.21 X 10 $^{-5}$	2.68 X 10 $^{-5}$	4.61 X 10 $^{-7}$	2.12 X 10 $^{-5}$	4.81 X 10 $^{-6}$	2.37 X 10 $^{-4}$	5.67 X 10 $^{-6}$	6.33 X 10 $^{-4}$	4.04 X 10 $^{-5}$	4.72 X 10 $^{-4}$	1.92 X 10 $^{-5}$	4.76 X 10 $^{-4}$	1.06 X 10 $^{-5}$
22	3.07 X 10 $^{-4}$	3.32 X 10 $^{-5}$	3.69 X 10 $^{-2}$	1.87 X 10 $^{-3}$	4.02 X 10 $^{-4}$	2.04 X 10 $^{-5}$	8.67 X 10 $^{-3}$	8.29 X 10 $^{-4}$	1.71 X 10 $^{-3}$	1.42 X 10 $^{-4}$	3.26 X 10 $^{-5}$	2.54 X 10 $^{-5}$	1.93 X 10 $^{-3}$	5.92 X 10 $^{-5}$	2.99 X 10 $^{-5}$	1.43 X 10 $^{-5}$
23	1.11 X 10 $^{-4}$	2.33 X 10 $^{-5}$	1.18 X 10 $^{-2}$	6.34 X 10 $^{-4}$	6.43 X 10 $^{-5}$	6.55 X 10 $^{-6}$	1.14 X 10 $^{-3}$	1.96 X 10 $^{-5}$	3.64 X 10 $^{-4}$	5.04 X 10 $^{-5}$	6.32 X 10 $^{-5}$	6.32 X 10 $^{-5}$	1.88 X 10 $^{-4}$	0	0	0

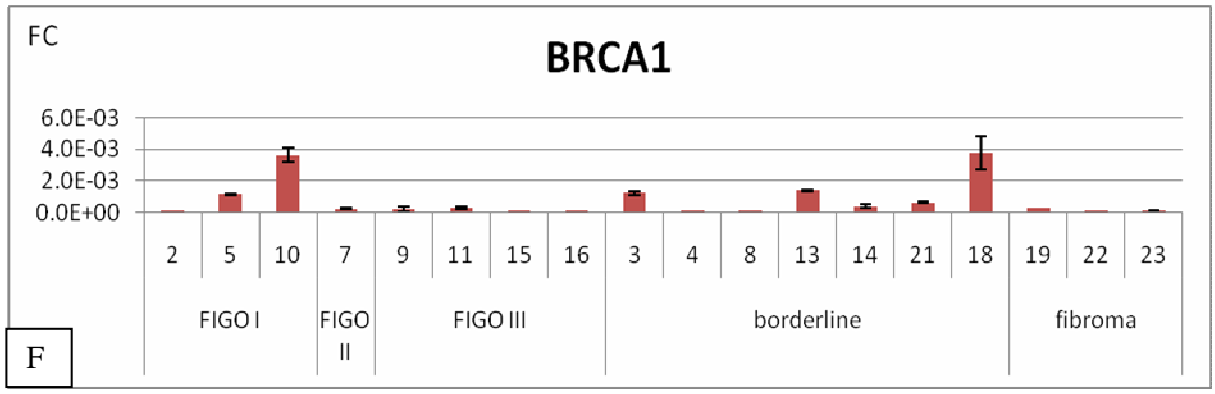
Isti rezultati prikazani su grafički na slici 17, gdje se vidi i relativni omjer jačine ekspresije svih tumorskih uzoraka međusobno. Za jasniji prikaz, rezultati ekspresije prikazani su podijeljeni prema tipu tumora na karcinome FIGO stadija I, FIGO II i FIGO III stadija, „borderline“ tumore te fibrome.



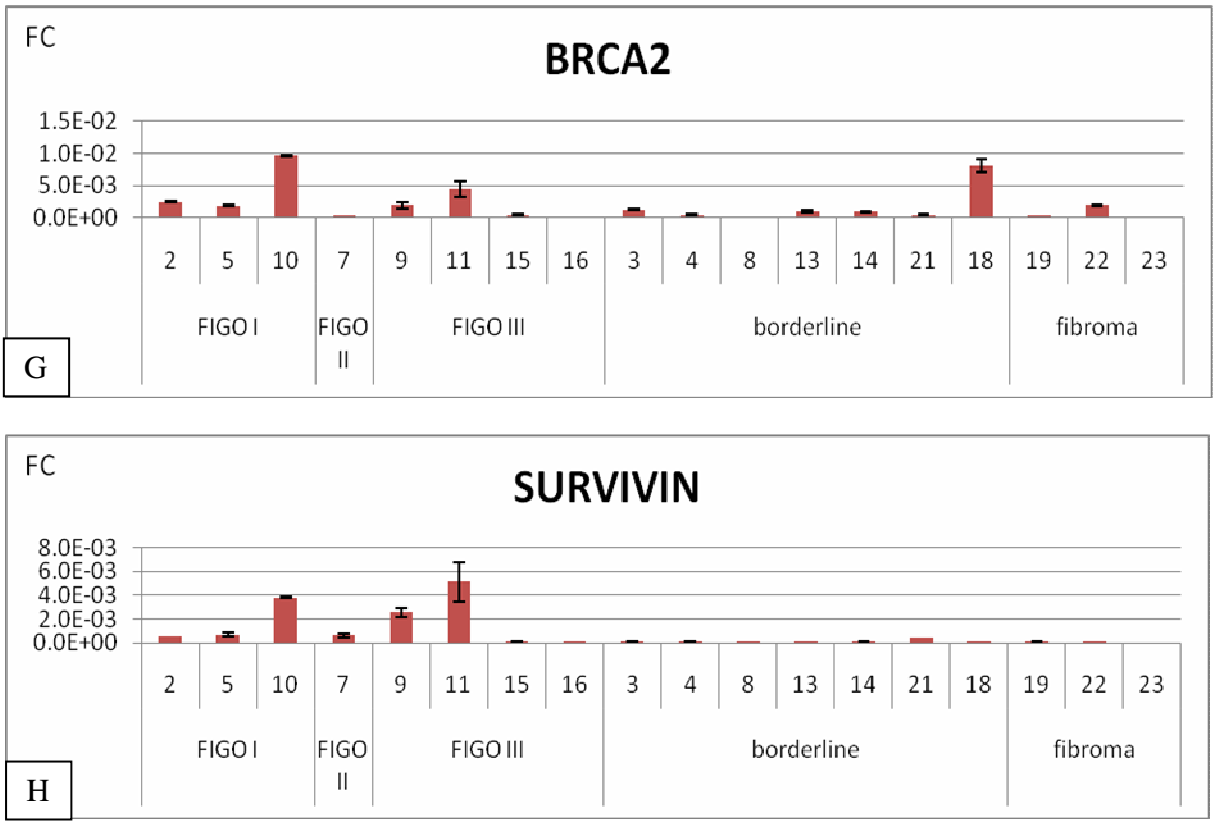
Slika 17. Relativna genska ekspresija (FC) u odnosu na gen ARP za gene signalnog puta Hh-Gli (A-E), BRCA1 (F), BRCA2 (G) i survivin (H). Uzorci su podijeljeni na karcinome FIGO stadija I, FIGO stadija II i FIGO stadija III, „borderline“ tumore i fibrome.





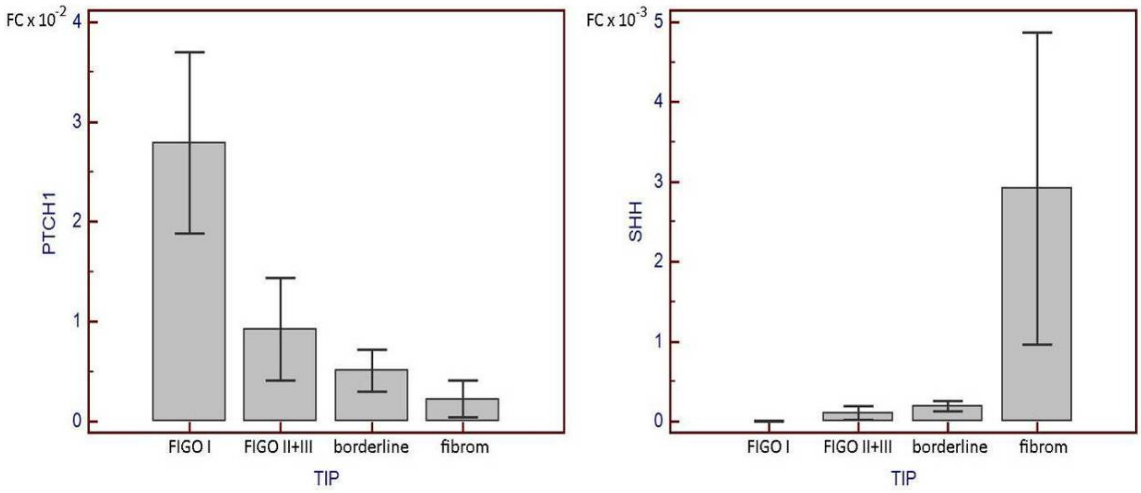


Slika 17. (nastavak) Relativna genska ekspresija (FC) u odnosu na gen ARP za gene signalnog puta Hh-Gli (A-E), BRCA1 (F), BRCA2 (G) i survivin (H). Uzorci su podijeljeni na karcinome FIGO stadija I, FIGO stadija II i FIGO stadija III, „borderline“ tumore i fibrome.



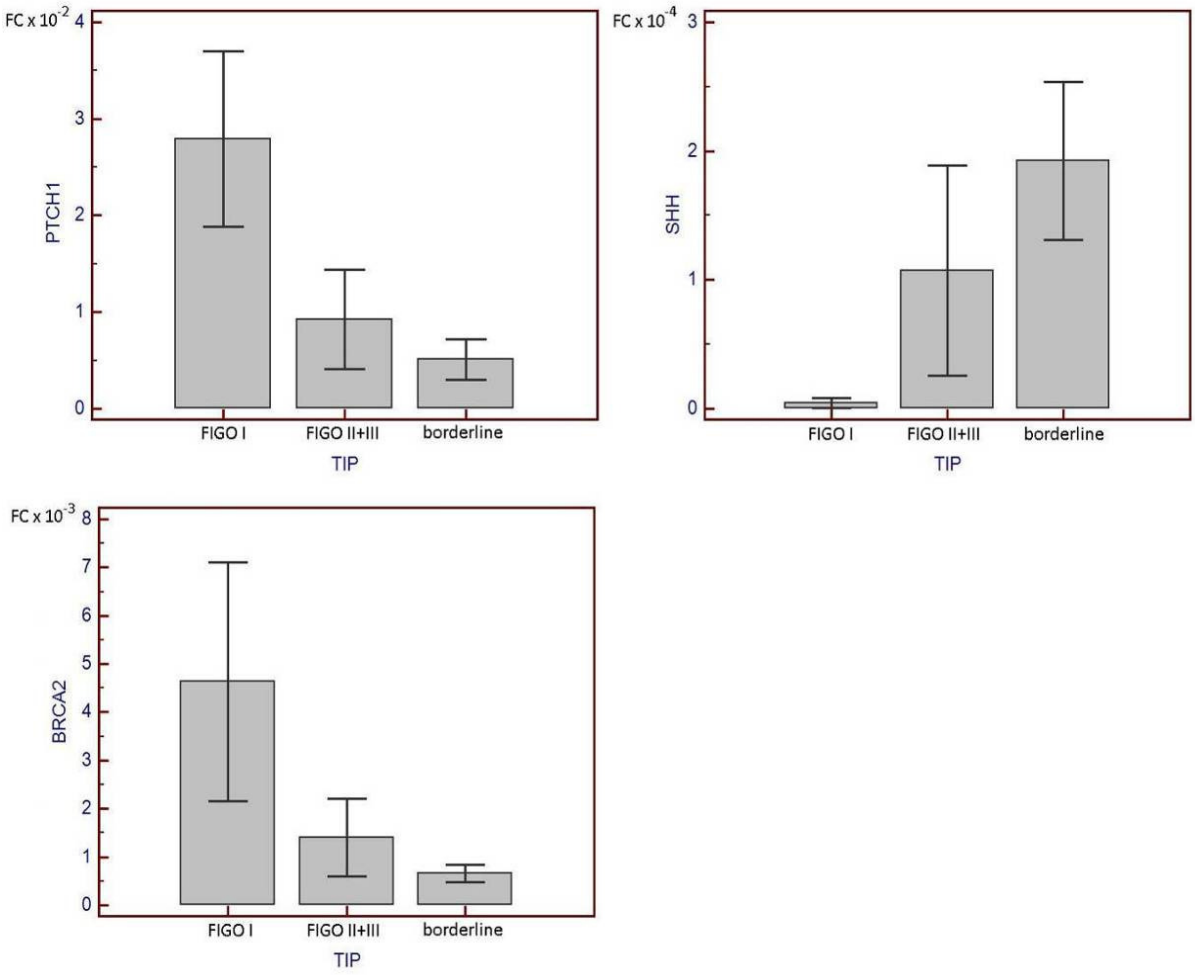
Slika 17. (nastavak) Relativna genska ekspresija (FC) u odnosu na gen ARP za gene signalnog puta Hh-Gli (A-E), BRCA1 (F), BRCA2 (G) i survivin (H). Uzorci su podijeljeni na karcinome FIGO stadija I, FIGO stadija II i FIGO stadija III, „borderline“ tumore i fibrome.

Analizom rezultata ekspresije pokazano je da se ekspresija PTCH1 i SHH mijenja ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti. Obzirom da je samo jedan uzorak bio FIGO II stadija, u statističkoj obradi on je pridružen uzorcima FIGO stadija III, pošto se u oba slučaja radi o bolesti proširenoj na okolna tkiva. Ekspresija PTCH1 viša je u nižim FIGO stadijima karcinoma nego u višima, dok je još niža u „borderline“ tumorima i na kraju najniža u fibromima. Statistička značajnost za ekspresiju PTCH1 iznosi P=0,013. Ekspresija SHH je obrnuta, sa najnižom ekspresijom u karcinomima FIGO stadija I, nešto višom u karcinomima FIGO stadija II i III, još višom u „borderline“ tumorima te najvišom u fibromima. Statistička značajnost za ekspresiju SHH je granična, i iznosi P = 0.0636.



Slika 18. Srednja vrijednost razine ekspresije gena SHH i PTCH1 po tipovima tumora i FIGO stadiju bolesti. Prikazani raspon predstavlja standardnu pogrešku.

Obzirom da su fibromi sasvim drugačiji tip tumora od epitelnih zloćudnih novotvorina, analiza ekspresije ponovljena je samo na grupi karcinoma i „borderline“ tumora, kako bi se dobila pouzdanija slika. Ograničavanjem analize samo na karcinome i „borderline“ tumore, pronađeno je da se ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti razlikuju ekspresije gena PTCH1 ($P = 0.027$), SHH ($P = 0.050$) i BRCA2, s time da je vrijednost za BRCA2 granična ($P = 0.065$).



Slika 19. Srednja vrijednost razine ekspresije gena PTCH1, SHH i BRCA2 po tipovima tumora i stadiju bolesti, bez fibroma. Prikazani raspon predstavlja standardnu pogrešku.

5.2. Korelacija ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli, BRCA1 i BRCA2 i survivina u tumorima jajnika

Kako bi se ustanovila veza između svih ovih gena međusobno, napravljena je analiza korelacije i dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 10 i 11. Tablica 10 prikazuje korelacije genske ekspresije za cijeli set uzoraka (karcinomi, „borderline“ tumori i fibromi), dok je u tablici 11 prikazan odnos gena za set bez fibroma.

Tablica 10. Koeficijenti korelacije i P vrijednosti za izmjerene genske ekspresije kompletnog seta uzoraka. Crvenim slovima označeni su značajni koeficijenti korelacije i njihove pripadajuće P vrijednosti.

BRCA2	*GLI1*	*PTCH1*	*SHH*	*SMO*	*SUFU*	*SUR*		
0.858 *<0.0001* *18*	*-0.052* *0.8369* *18*	*0.497* *0.0357* *18*	*-0.043* *0.8640* *18*	*0.196* *0.4352* *18*	*0.353* *0.1503* *18*	*0.221* *0.3773* *18*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*BRCA1*
	-0.048 *0.8485* *18*	*0.524* *0.0256* *18*	*0.079* *0.7566* *18*	*0.186* *0.4602* *18*	*0.287* *0.2484* *18*	*0.565* *0.0145* *18*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*BRCA2*
		0.478 *0.0449* *18*	*0.298* *0.2305* *18*	*0.868* *<0.0001* *18*	*0.796* *0.0001* *18*	*0.013* *0.9580* *18*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*GLI1*
			-0.207 *0.4101* *18*	*0.696* *0.0013* *18*	*0.603* *0.0080* *18*	*0.469* *0.0499* *18*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*PTCH1*
				0.143 *0.5710* *18*	*-0.073* *0.7744* *18*	*-0.178* *0.4791* *18*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*SHH*
					0.875 *<0.0001* *18*	*0.125* *0.6220* *18*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*SMO*
						0.120 *0.6346* *18*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*SUFU*

Tablica 11. Koeficijenti korelacije i P vrijednosti za izmjerene genske ekspresije za set bez uzoraka sa fibromima. Crvenim slovima označeni su značajni koeficijenti korelacije i njihove pripadajuće P vrijednosti.

BRCA2	*GLI1*	*PTCH1*	*SHH*	*SMO*	*SUFU*	*SUR*		
0.794 *0.0007* *14*	*0.061* *0.8363* *14*	*0.658* *0.0105* *14*	*-0.097* *0.7418* *14*	*0.165* *0.5726* *14*	*0.178* *0.5426* *14*	*0.369* *0.1941* *14*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*BRCA1*
	-0.020 *0.9451* *14*	*0.651* *0.0117* *14*	*-0.224* *0.4406* *14*	*0.117* *0.6910* *14*	*0.122* *0.6776* *14*	*0.777* *0.0011* *14*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*BRCA2*
		0.574 *0.0319* *14*	*0.093* *0.7527* *14*	*0.902* *<0.0001* *14*	*0.965* *<0.0001* *14*	*0.022* *0.9413* *14*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*GLI1*
			0.061 *0.8365* *14*	*0.744* *0.0023* *14*	*0.619* *0.0183* *14*	*0.418* *0.1367* *14*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*PTCH1*
				0.077 *0.7945* *14*	*-0.031* *0.9165* *14*	*-0.139* *0.6351* *14*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*SHH*
					0.914 *<0.0001* *14*	*0.130* *0.6574* *14*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*SMO*
						0.118 *0.6867* *14*	*Correlation Coefficient* *Significance Level P* *n*	*SUFU*

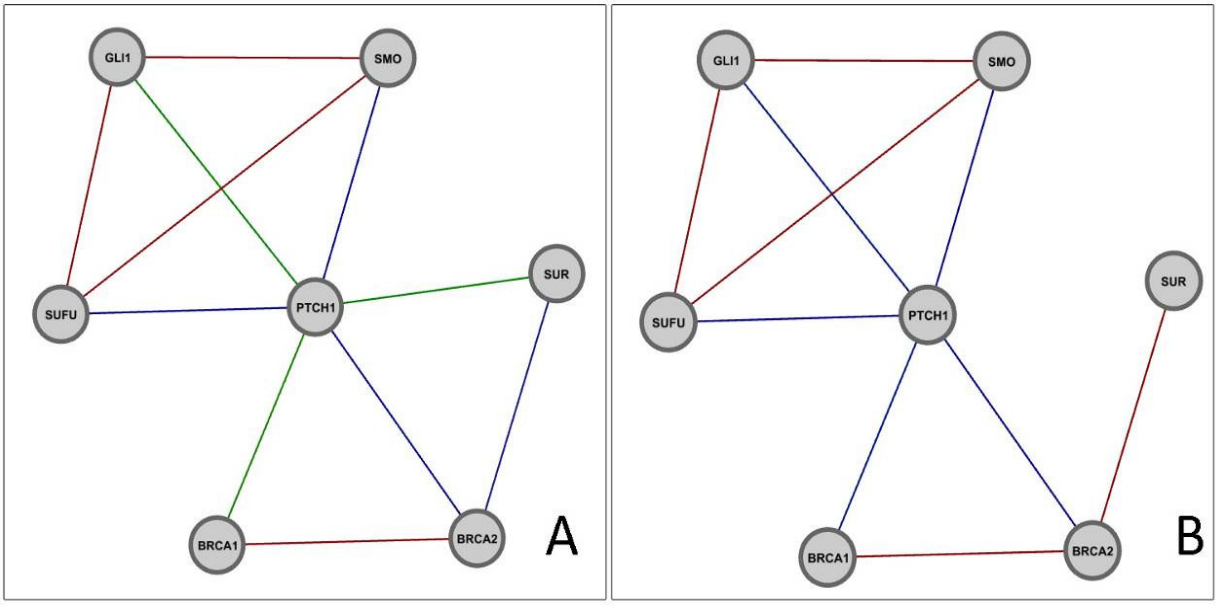
Usporedbom ove dvije tablice korelacije ustanovljeno je da se isti geni koreliraju u oba slučaja, s time da je stupanje korelacije veći kada se iz analize izuzmu fibromi. Razina povezanosti određena je na temelju (60):

- 0,26-0,50 slaba korelacija
- 0,51-0,75 umjerena do dobra korelacija
- 0,76-1 vrlo dobra do izvrsna korelacija.

Tablica 12. Usporedba koeficijenata korelacije kod analize kompletnog seta uzoraka (karcinomi, „borderline“ tumori i fibromi) ili kada se iz analize izuzmu fibromi. Vrlo dobra do izvrsna korelacija označena je crvenim slovima, umjerena do dobra plavim, a slaba zelenim slovima.

povezani geni	***korelacija/svi uzorci***	***povezanost***	***korelacija/bez fibroma***	***Povezanost***
BRCA1-BRCA2	*0,858*	*vrlo dobra do izvrsna*	*0,794*	*vrlo dobra do izvrsna*
BRCA1-PTCH1	*0,497*	*Slaba*	*0,658*	*umjerena do dobra*
BRCA2-PTCH1	*0,524*	*umjerena do dobra*	*0,651*	*umjerena do dobra*
BRCA2-SUR	*0,565*	*umjerena do dobra*	*0,777*	*vrlo dobra do izvrsna*
PTCH1-GLI1	*0,478*	*Slaba*	*0,574*	*umjerena do dobra*
GLI1-SMO	*0,868*	*vrlo dobra do izvrsna*	*0,902*	*vrlo dobra do izvrsna*
GLI1-SUFU	*0,796*	*vrlo dobra do izvrsna*	*0,965*	*vrlo dobra do izvrsna*
PTCH1-SMO	*0,696*	*umjerena do dobra*	*0,744*	*umjerena do dobra*
PTCH1-SUFU	*0,603*	*umjerena do dobra*	*0,619*	*umjerena do dobra*
PTCH1-SUR	*0,469*	*Slaba*		*Nema*
SMO-SUFU	*0,875*	*vrlo dobra do izvrsna*	*0,914*	*vrlo dobra do izvrsna*

Odnos gena koji su pronađeni u korelaciji grafički je prikazan na slici 20. Ova slika pokazuje da je većina odnosa zapaženih u ukupnom setu uzoraka slična odnosima unutar seta bez fibroma. Razlike postoje kod tri slabe korelacije zapažene na ukupnom setu uzoraka: PTCH1-GLI1 i PTCH1-BRCA1 veze postaju jače u setu bez fibroma, dok se u setu bez fibroma korelacija PTCH1-SUR gubi.



Slika 20. Prikaz korelacijske mreže kod analize kompletnog seta uzoraka (A) ili kada se iz analize izuzmu fibromi (B). Boje na slici odgovaraju stupnjevima korelacije iz tablice 12: vrlo dobra do izvrsna korelacija označena je crvenim linijama, umjerena do dobra plavim, a slaba zelenim linijama.

5.3. Analiza gubitka heterozigotnosti gena PTCH1 i BRCA1

Gubitak heterozigotnosti (LOH) analiziran je za oba gena na aparatu ABI Prism 310 Genetic Analyser. LOH gena PTCH1 pronađen je u 3 od 12 uspješno analiziranih uzoraka (25%). LOH za PTCH je obrađen u prethodnom istraživanju, publikacija u tisku (Maurac i sur.,2011, Int J Gynecol Pathol). LOH gena BRCA1 pronađen je u 5 od 15 uspješno analiziranih uzoraka (33.3%). Osobito je zanimljivo da je u jednom od uzoraka pronađen LOH oba gena. LOH gena BRCA2 nije pronađen niti u jednom uzorku.

Tablica 13. Prikaz LOH-a PTCH1 i BRCA1 kod pojedinih uzoraka: LOH = gubitak heterozigotnosti, Het = heterozigot, Ho = homozigot, - = nije uspješno analizirano.

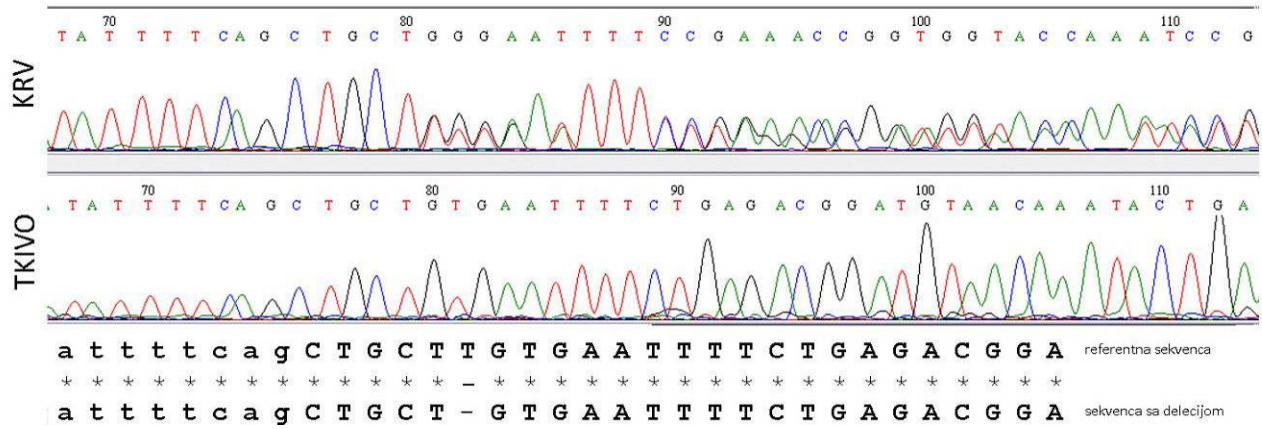
R.br.uzorka	*PTCH1*	*BRCA1*
1	-	LOH
2	LOH	LOH
3	Het	Ho
5	Ho	LOH
6	Het	Ho
7	Ho	LOH
8	Ho	Het
9	LOH	-
10	Het	Ho
11	Het	Ho
12	Ho	-
15	LOH	Ho
16	Het	Het
20	-	LOH
21	-	Het
22	-	Het
23	-	Ho

5.4. Analiza mutacija u genima BRCA1 i BRCA2

Mutacije u genima BRCA1 i BRCA2 povezane su sa nasljednim rakom dojke i jajnika. Kako bi se ispitao eventualni utjecaj mutacija na ove uzorke, geni BRCA1 i BRCA2 analizirani su QMP metodom na prisutnost većih delecija i/ili insercija.

U analiziranim uzorcima pronađena je jedna mutacija, i to upravo u uzorku broj 2 u kojem su detektirani LOH gena PTCH1 i BRCA1 (uzorak broj 2, slika 21). Mutacija c.676delT stop 233 (p.C266VfsX8) nalazi se u eksonu 11 gena BRCA1 i dovodi do nastanka skraćenog

proteina i njegove poremećene funkcije. Ova mutacija dobro je poznata kao klinički značajna mutacija, te je objavljena u on-line bazi podataka Breast Cancer Information Core (BIC, *http://research.nhgri.nih.gov/bic/*).



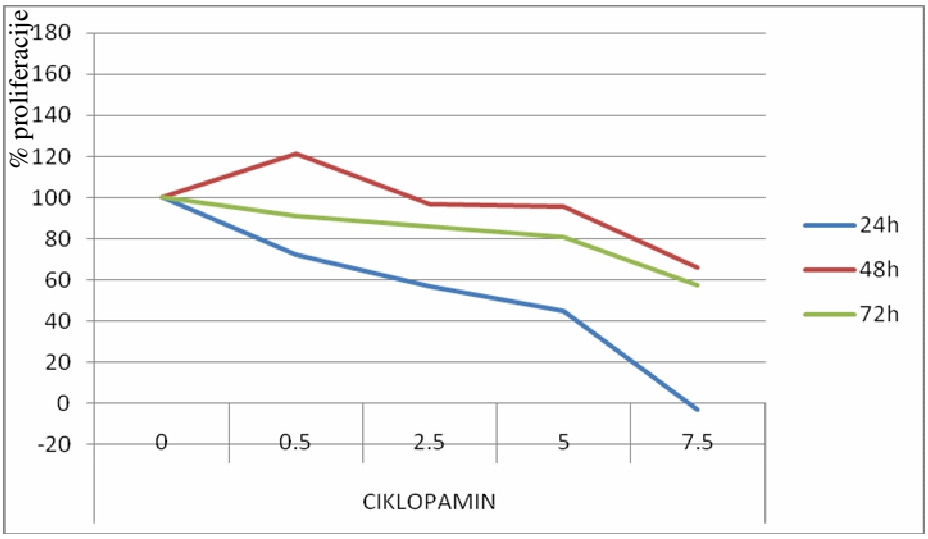
Slika 21. Slika pokazuje slijed nukleotida gena BRCA1 u krvi (konstitutivna DNA) koja je heterozigotna, jer ima jedan zdravi alel i drugi s mutacijom c.676delT stop 233. U krvi se detektiraju oba alela, zbog čega se nakon 80. baze u sekvenci mogu očitati po dva signala na istom mjestu. U tumorskom tkivu detektira se samo alel s mutacijom što znači da je došlo do potpunog gubitka zdravog alela. Na dnu slike prikazani su dijelovi referentne sekvence i sekvence s delecijom.

5.5. Pokusi na staničnim linijama

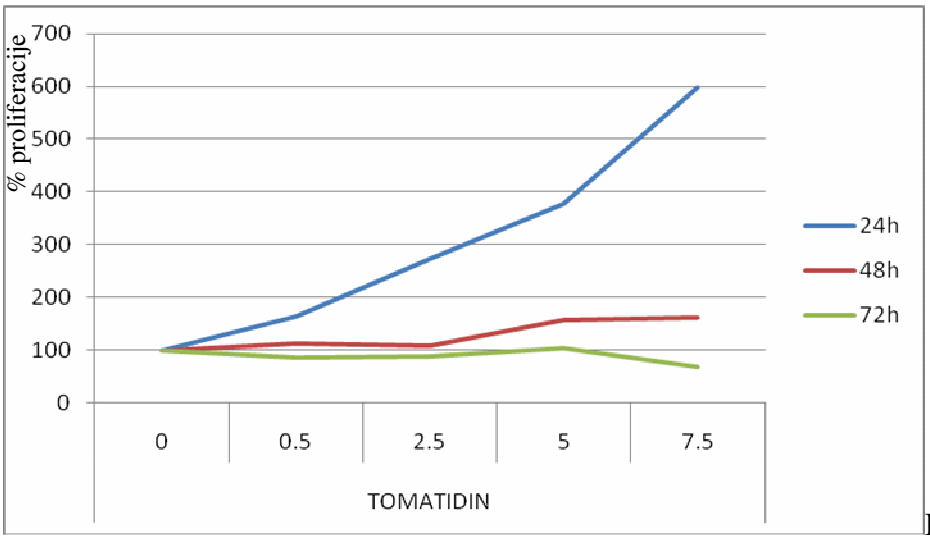
Obzirom da je ustanovljeno da se u tumorima jajnika signalni put Hh-Gli eksprimira, dodatni pokusi napravljeni su na trajnoj staničnoj linija tumora jajnika SkOv3. To je adherentna stanična kultura razvijena iz adenokarcinoma jajnika 64-godišnje žene (*http://www.lgcstandards-atcc.org/*).

5.5.1. Vijabilnost stanica nakon tretmana Hh-Gli specifičnim aktivatorom ili inhibitorom

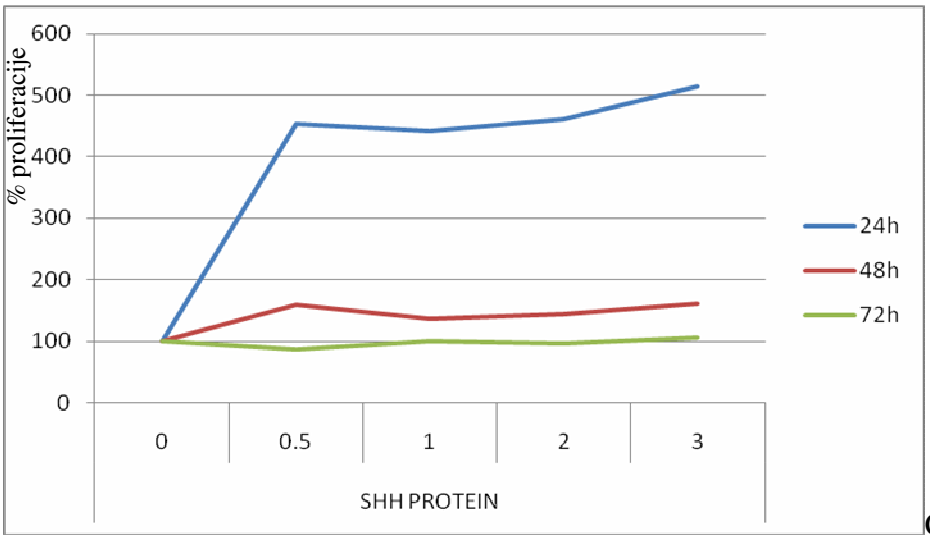
Vijabilnost stanica mjerena je MTT testom, u tri vremenska perioda te sa po četiri različite koncentracije ciklopamina (inhibitor), tomatidina (neaktivni analog ciklopamina) ili Shh proteina (ligand koji aktivira signalni put). Rezultati su prikazani na slici 22.



A



B



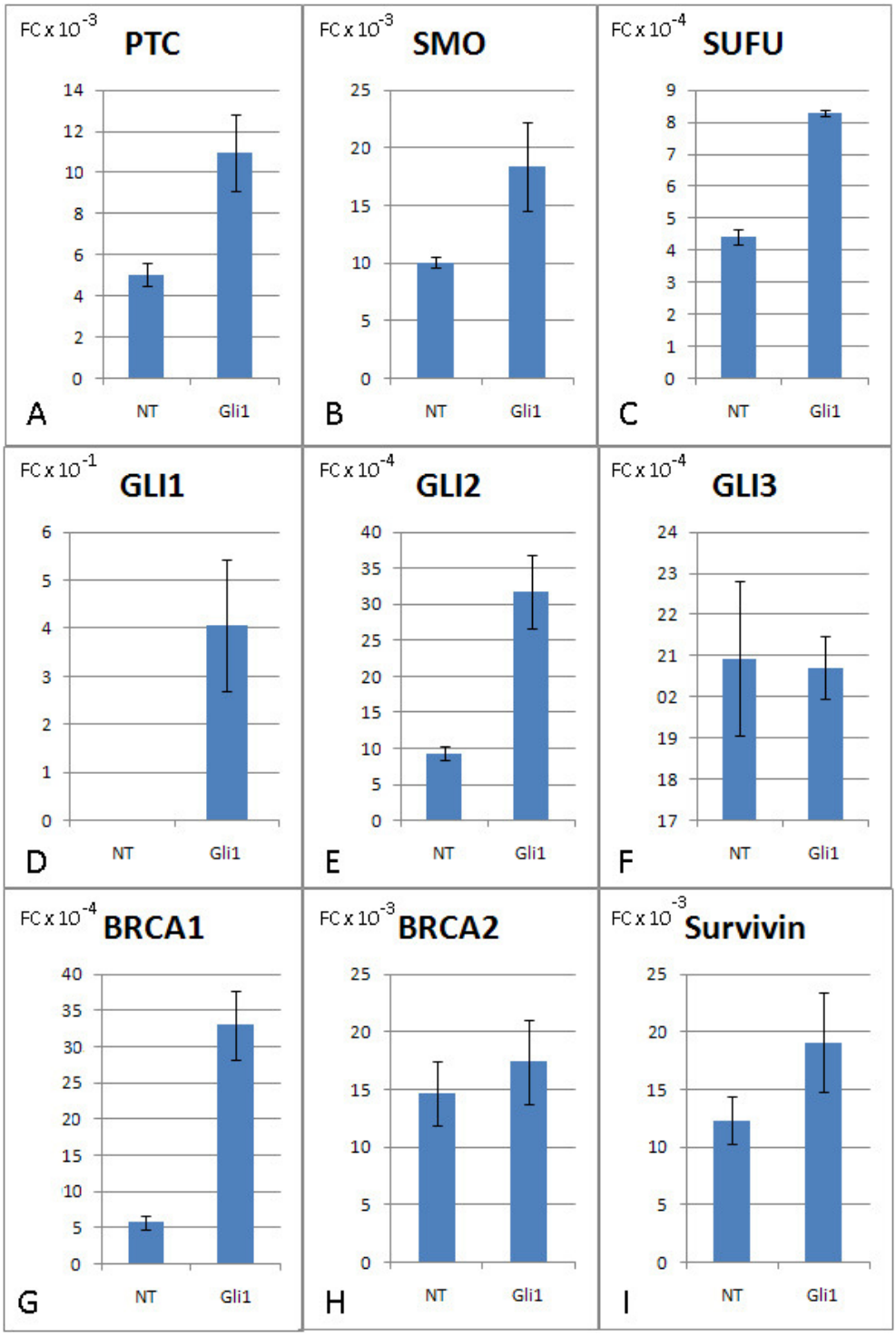
C

Slika 22. Rezultati MTT testa na SkOv3 staničnoj linija nakon 24, 48 ili 72sata s 4 različite doze ciklopamina (A), tomatidina (B) ili Shh proteina (C). Netretirane stanice imaju proliferaciju 100% u svakoj točki.

Ovim pokusom pokazano je da ciklopamin smanjuje vijabilnost stanica pri koncentracijama od 2.5 μM na više, te da je efekt ciklopamina najizraženiji već 24 sata nakon tretmana. Također je vidljivo da protein Shh djeluje proliferativno na stanice; već i male doze vidljivo povećavaju broj stanica. Tomatidin je ovdje upotrijebljen kao kontrola, vidi se da pokazuje proliferativni efekt nakon 24-satnog tretmana i pri većim dozama.

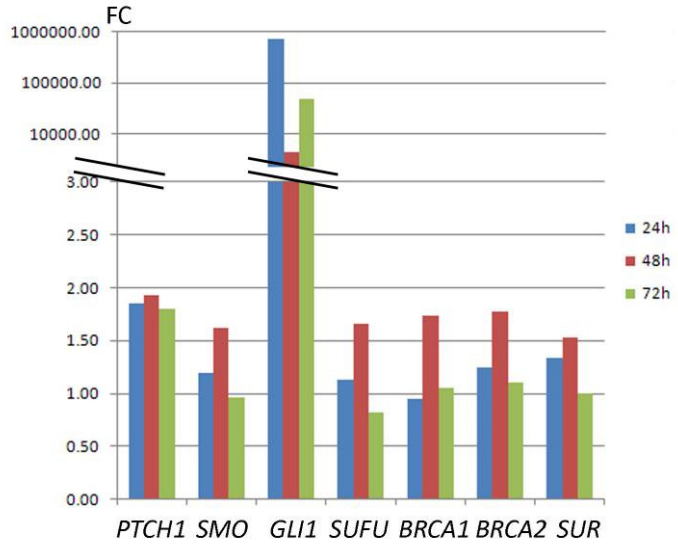
5.5.2. Aktivacija signalnog puta transfekcijom transkripcijskog faktora GLI1

SkOv3 stanice transfecirane su plazmidom koji nosi gen za proizvodnju transkripcijskog faktora Gli1. Već 24 sata nakon transfekcije vidljive su promjene u aktivnosti signalnog puta Hh-Gli koje odgovaraju aktivaciji signalnog puta. Ekspresija GLI1 je, kao što se može i očekivati, izrazito povećana. Također je uočeno povećanje ekspresije PTCH1, SMO, GLI2 i SUFU, koji su svi važni faktori u aktivnosti signalnog puta Hh-Gli. Suprotno tome, ekspresija GLI3, koji je inhibitor signalnog puta, nepromijenjena je nakon transfekcije, što nam govori da je signalni put funkcionalan u ovim stanicama. Rezultati genske ekpresije mjereni 24 sata nakon transfekcije prikazani su na slici 23.



Slika 23. Genska ekspresija glavnih komponenti signalnog puta Hh-Gli u SkOv3 staničnoj liniji nakon transfekcije plazmidom koji nosi gen za GLI1, nakon 24 sata.

Kako bi se usporedili efekti i nakon duljeg vremena pokus je ponovljen i na 48 sati i 72 sata nakon transfekcije. Ovi rezultati pokazuju očitu dinamiku porasta signalnog puta Hh-Gli već nakon 24 sata, vrhunac aktivnosti nakon 48 sati te vraćanje na početne vrijednosti nakon 72 sata (slika 24). Zanimljivo je da se i ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 kreće na vrlo sličan način kao i ekspresije gena samog signalnog puta, što dodatno potvrđuje mogućnost da je ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 povezana sa signalnim putem Hh-Gli.



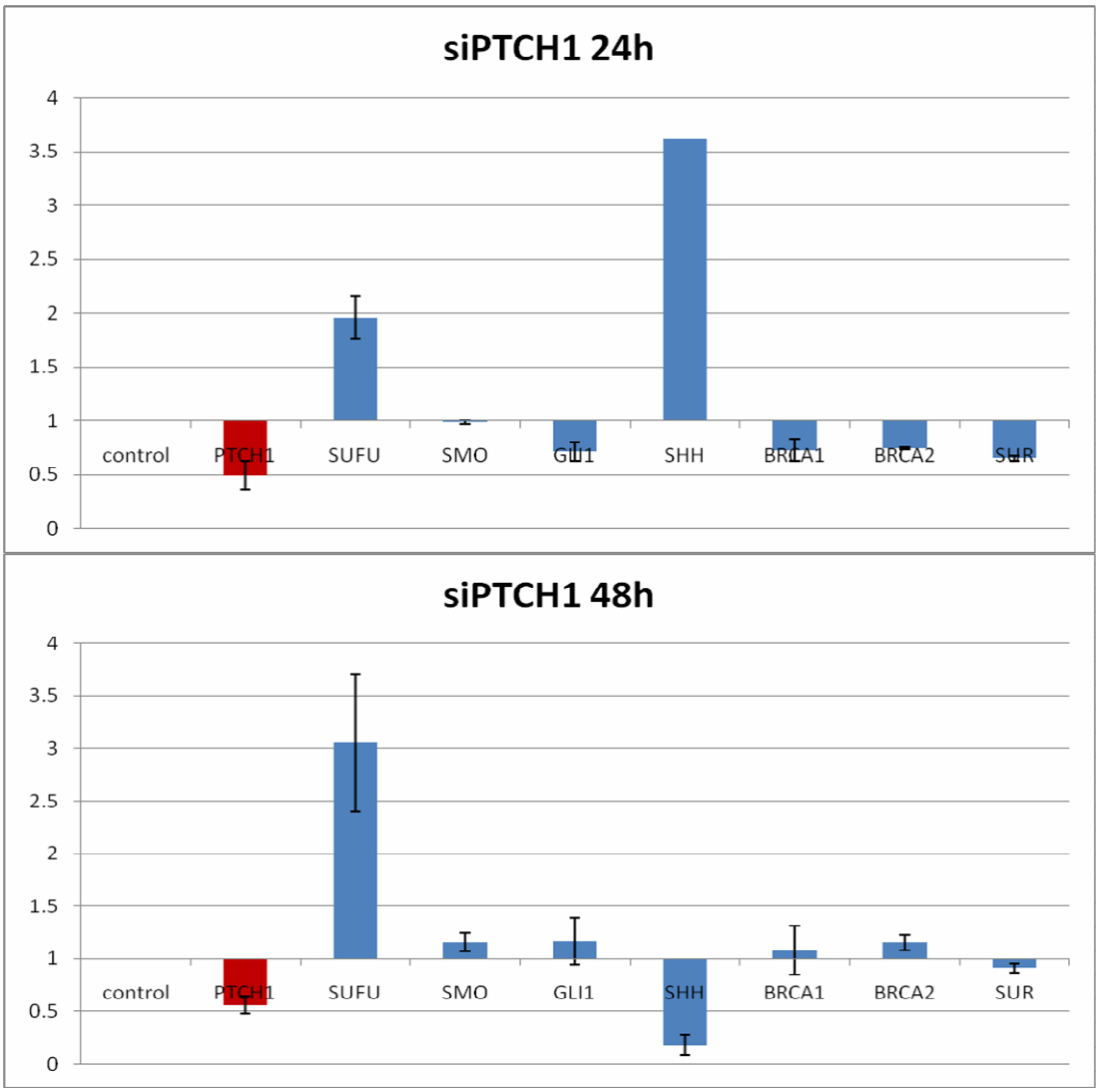
Slika 24. Vrijednosti ekspresije gena 24, 48 i 72 sata nakon transfekcije sa Gli1 plazmidom. Vrhunac aktivnosti puta odvija se nakon 48 sati, nakon čega aktivnost pada na početne vrijednosti. Vrijednost kontrolnih netretiranih stanica za svaki od gena iznosi 1,00.

5.5.3. Utišavanje signalnog puta pomoću siRNA molekula

Signalni put Hh-Gli utišan je na dvije razine, u oba slučaja djelovanjem na tumor supresorske gene: PTCH1 i SUFU. Postignuto je utišavanje od 50% za oba gena, što nije idealno, ali je dovoljno da se vide efekti na razini genske ekspresije.

Utišavanje gena PTCH1 vidljivo je 24 i 48 sati nakon transfekcije, u oba slučaja se održava na 50%. Utišavanje PTCH1 u oba slučaja izaziva povećanje ekspresije gena SUFU, koji je drugi tumor supresor u ovom signalnom putu. Za pretpostaviti je da se ovdje radi o nekakvom mehanizmu kompenzacije, gdje gubitak jednog tumor supresora izaziva povećanje ekspresije

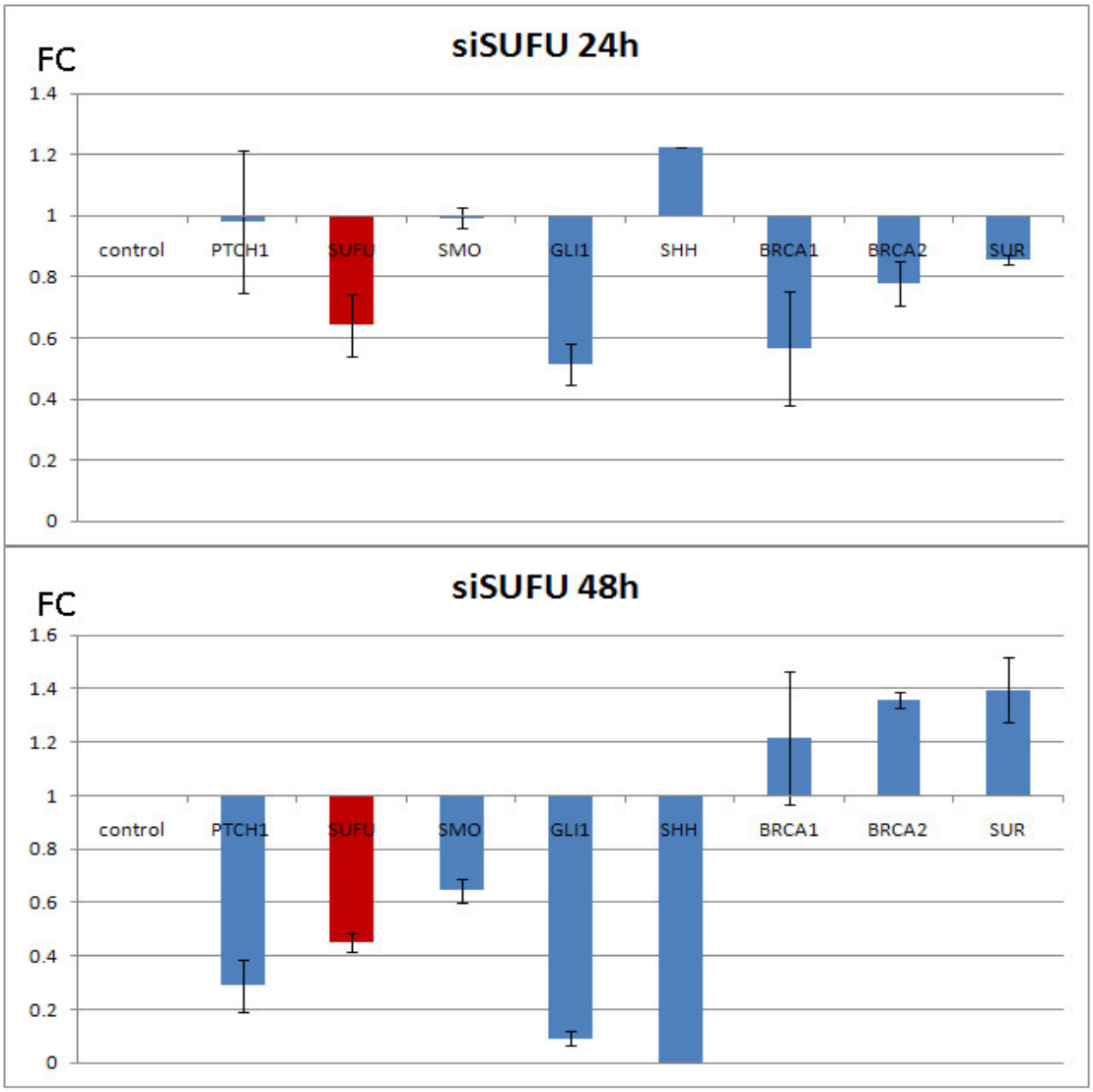
drugog kako bi se održalo stanje ravnoteže. Ekspresija BRCA1, BRCA2 i survivina prati smanjenje ekspresije gena PTCH1 nakon 24 sata, dok se nakon 48 sati polako vraća u razinu kontrole. To bi se moglo objasniti činjenicom da smanjenje ekspresije PTCH1 vjerojatno utječe na smanjenje proliferacije stanica, a time i replikacije DNA. Kako se BRCA geni aktiviraju uglavnom kada dolazi do pogrešaka u replikaciji DNA, a replikacija je smanjena utišavanjem PTCH1, logično je da je došlo i do smanjenja ekspresije BRCA gena. Slična situacija je i sa survivinom, koji je inhibitor apoptoze i vezan uz stanični ciklus. Kada je proliferacija smanjena, smanjena je i potreba za regulatorima proliferacije. Ekspresija GLI1 također prati ekspresiju gena PTCH1 nakon 24 sata, što je također logično pošto su oba ta gena markeri aktivnosti signalnog puta Hh-Gli. Smanjenje oba gena vrlo vjerojatno znači smanjenje aktivnosti signalnog puta. Nakon 48 sati već dolazi do korekcije i vraćanja u normalne razine. Razina gena SMO uglavnom se ne mijenja utišavanjem PTCH1, što bi značilo da genska ekspresija koreceptora nije regulirana transkripcijskim faktorom GLI1, što je i poznato.



Slika 25. Relativna razina ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli, te BRCA1, BRCA2 i survivina, u stanicama tumora jajnika nakon utišavanja ekspresije gena PTCH1 (crveno). Sve ekspresije su normalizirane u odnosu na kontrolne stanice tretirane kontrolnom siRNA koja nema utjecaj na ekspresiju ovog signalnog puta. Sve što je s gornje strane apscise označava povećanje, dok sve što je sa donje strane označava smanjenje ekspresije pojedinog gena.

Utišavanje gena SUFU, koji je jedan od regulatora aktivnosti proteina Gli1, ima jaki utjecaj na ekspresiju samog gena GLI1. U oba slučaja (24 i 48 sati) došlo je do smanjenja ekspresije gena GLI1, koja se čak pojačava s vremenom. Osim toga, primijećen je zanimljiv učinak na ostale gene signalnog puta. Utišavanje SUFU ima za posljedicu utišavanje cijelog signalnog puta s malim vremenskim odmakom, tj. 48 sati nakon utišavanja: PTCH1, SMO, GLI1 i SHH su svi vidljivo sniženi nakon 48 sati utišavanja. Efekt na BRCA gene i survivin sličan je kao

efekt utišavanja PTCH1 nakon 24 sata, gdje dolazi do smanjenja aktivnosti svih ovih gena. Zanimljivo je ipak njihovo povećanje nakon 48-satnog utišavanja, gdje dolazi do povećanja razine njihove ekspresije. Ovaj fenomen je još uvijek neobjašnjen, ali moguće je da utišavanje signalnog puta Hh-Gli ima neki inicijalni efekt na transkripciju ovih gena, ali pošto su oni regulirani i drugim signalnim putevima i proteinima, moguće je da se oni uključuju i kompenziraju taj efekt nakon 48 sati utišavanja.

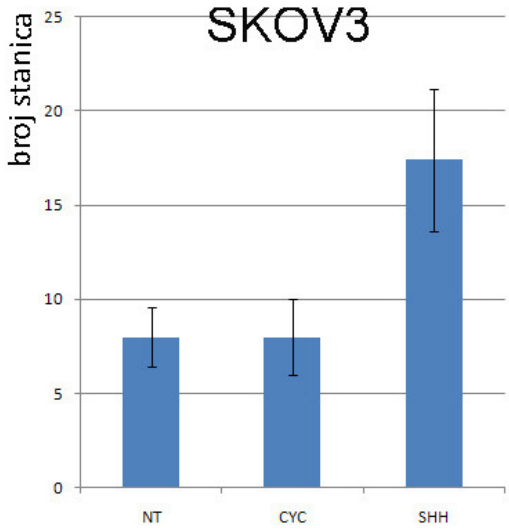


Slika 26. Relativna razina ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli, te BRCA1, BRCA2 i survivina, u stanicama tumora jajnika nakon utišavanja ekspresije gena SUFU (crveno). Sve ekspresije su normalizirane u odnosu na kontrolne stanice tretirane kontrolnom siRNA koja nema utjecaj na ekspresiju ovog signalnog puta. Sve što je s gornje strane apscise označava povećanje, dok sve što je s donje strane označava smanjenje ekspresije pojedinog gena.

Zanimljivo je također iz oba ova pokusa da utišavanje na razini receptora utišava samo dio signalnog puta, dok utišavanje na razini citoplazmatskog regulatora ima znatno izraženiji utjecaj na sve gene signalnog puta. To bi moglo značiti da je u ovim stanicama uključen i neki od nekanoničkih puteva regulacije ovog signalnog puta, koji djeluje negdje na razini između receptora i transkripcijskog faktora.

5.5.4. Migratorna sposobnost stanica nakon aktivacije i inhibicije signalnog puta Hh-Gli

SkOv3 stanice su izrazito migratorne, te u standardnim uvjetima pokusa migracije stanica, koji traje 24 sata, stanice u tolikom broju migriraju da ih nije moguće analizirati. Stoga je migracija praćena 4 sata nakon nasađivanja stanica, jer se to pokazalo kao optimalno vrijeme za praćenje (Slika 27). Stanice tretirane ciklopaminom ne pokazuju značaju promjenu migracijske sposobnosti nakon 4 sata – to je vjerojatno posljedica kratkog izlaganja spoju, jer je već prijašnjim pokusima utvrđeno da je optimalno vrijeme djelovanja ciklopamina 24-48 sati. Stimulacija stanica proteinom Shh ima dramatičan efekt na migraciju stanica, koja se udvostručava u odnosu na netretirane kontrolne stanice. Ovo je još jedan dokaz da je signalni put Hh-Gli aktivan u stanicama tumora jajnika, jer trenutačno može reagirati na ligand Shh. Test migracije pokazuje koliko su stanice sposobne širiti se u okolno tkivo, te se posredno može zaključivati o mogućnosti stvaranja metastaza. SkOv3 stanice imaju bazično visoku migratornu sposobnost, koja se stimulacijom još više povećava, što znači da bi signalni put Hh-Gli mogao imati ulogu u metastaziranju.



Slika 27. Broj migriranih stanica nakon 4sata tretmana sa ciklopaminom (CYC) ili Shh proteinom (SHH) u odnosu na netretirane stanice (NT).

5.6. Sažeti prikaz rezultata

Na tkivima tumora utvrđena je povećana ekspresija gena PTCH1, SMO, GLI1, SUFU, BRCA1 i BRCA2 u svim testiranim uzorcima, a ekspresija SHH i survivina detektirana je u 17 od 18 uzoraka (94,4%).

Utvrđeno je da se ekspresija PTCH1 i SHH mijenja ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti. Ekspresija PTCH1 viša je u nižim FIGO stadijima karcinoma nego u višima, dok je još niža u „borderline" tumorima i na kraju najniža u fibromima.

Ekspresija SHH je obrnuta, sa najnižom ekspresijom u karcinomima FIGO stadija I, nešto višom u karcinomima FIGO stadija II i III, još višom u „borderline" tumorima te najvišom u fibromima.

Korelacija /povezanost :

- izvrsna između GLI-SUFU-SMO te BRCA1-BRCA2 kod svih ispitivanih tumora te slaba PTCH sa apoptozom putem Survivina;
- umjerena povezanost PTCH sa SUFU i SMO, a sa GLI1 slaba ili umjerena

Gubitak heterozigotnosti (LOH):

LOH u genu PTCH1 pronađen u 3 uzorka, a LOH u genu BRCA1 u 5 uzoraka. Od toga, jedan uzorak pokazivao je LOH oba gena.

IN VITRO analize (Slika 28):

Pokretanje ili pojačavanje puta

1) protein SHH djeluje proliferativno na stanice;

2) pokretanje puta ubacivanjem Gli1 konstrukta:

24 sata nakon transfekcije: ekspresija GLI1 izrazito povećana (očekivano) te povećanje ekspresije PTCH1, SMO, GLI2 i SUFU, a ekspresija GLI3 smanjena;

48 sati nakon transfekcije: vrhunac aktivnosti - ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 kreće na vrlo sličan način kao i ekspresije gena samog signalnog puta, što dodatno potvrđuje mogućnost da je ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 povezana sa signalnim putem Hh-Gli.

72 sata nakon transfekcije: vraćanje na početne vrijednosti;

3) Migracijska sposobnost: SHH jako povećava sposobnost migracije stanica.

Inhibitori signalnog puta Hh-Gli:

1) blokiranje prijenosa signala:

- ciklopamin smanjuje vijabilnost stanica pri koncentracijama od 2.5 μM na više, efekt je najizraženiji već 24 sata nakon tretmana.

2) utišavanje puta:

- utišavanje gena PTCH1 - 50% nakon 24 i 48 sati izaziva povećanje ekspresije gena SUFU, (da li se radi o mehanizmu kompenzacije, gdje gubitak jednog tumor supresora izaziva povećanje ekspresije drugog kako bi se održalo stanje ravnoteže):

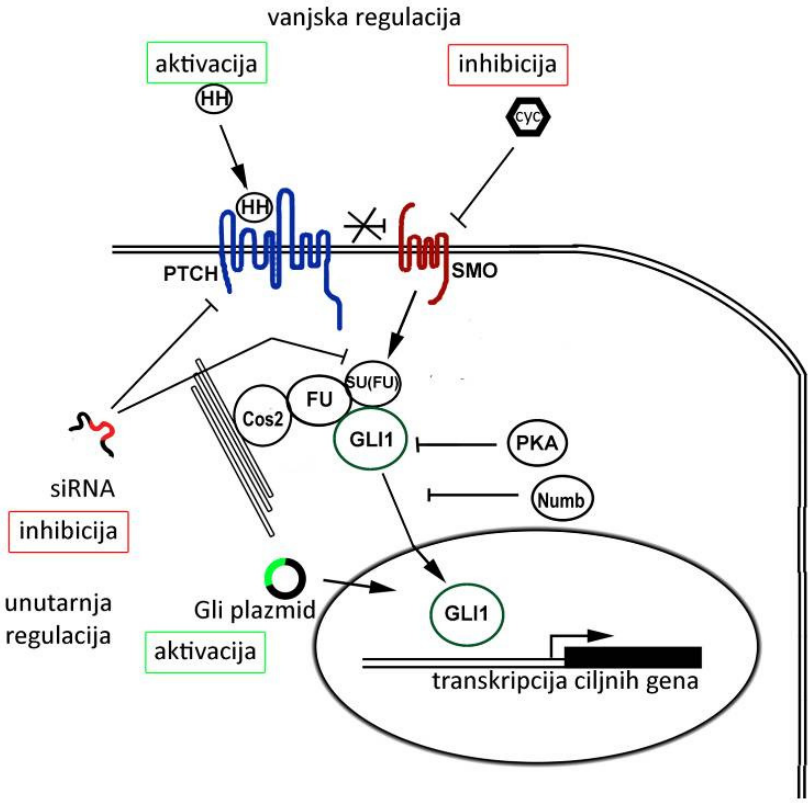
nakon 24 sata – uz smanjeni PTCH su i BRCA1, BRCA2 i survivin

nakon 48 sati - vraćanje u razinu kontrole.

To bi se moglo objasniti činjenicom da smanjenje ekspresije PTCH1 vjerojatno utječe na smanjenje proliferacije stanica, a time i replikacije DNA. Kako se BRCA geni aktiviraju uglavnom kada dolazi do pogrešaka u replikaciji DNA, a replikacija je smanjena utišavanjem PTCH1, logično je da je došlo i do smanjenja ekspresije BRCA gena. Slična situacija je i sa survivinom, koji je inhibitor apoptoze i vezan uz stanični ciklus. Kada je proliferacija smanjena, smanjena je i potreba za regulatorima proliferacije. Ekspresija GLI1 također prati ekspresiju PTCH1 gena nakon 24 sata, što je također logično pošto su oba ta gena markeri aktivnosti signalnog puta Hh-Gli. Smanjenje oba gena vrlo vjerojatno znači smanjenje aktivnosti signalnog puta. Nakon 48 sati već dolazi do korekcije i vraćanja u normalne razine. Razina gena SMO uglavnom se ne mijenja utišavanjem PTCH1, što bi značilo da genska ekspresija koreceptora nije regulirana GLI1 transkripcijskim faktorom, što je i poznato.

- utišavanje gena SUFU- 24 i 48 sati- smanjenje ekspresije gena GLI1, PTCH1.

Efekt na BRCA gene i survivin sličan je kao efekt utišavanja PTCH1 nakon 24 sati, gdje dolazi do smanjenja aktivnosti svih ovih gena. Zanimljivo je ipak njihovo povećanje nakon 48-satnog utišavanja, gdje dolazi do povećanja razine njihove ekspresije. Ovaj fenomen je još uvijek neobjašnjen, ali moguće je da utišavanje Hh-Gli signalnog puta ima neki inicijalni efekt na transkripciju ovih gena, ali pošto su oni regulirani i drugim signalnim putevima i proteinima, moguće je da se oni uključuju i kompenziraju taj efekt nakon 48 sati utišavanja.



Slika 28. Shematski prikaz razina na kojima je praćena aktivacija i inhibicija signalnog puta Hh-Gli u staničnoj liniji tumora jajnika: regulacija izvana ligandom Shh (aktivacija) ili ciklopaminom (inhibicija), regulacija iznutra korištenjem Gli plazmida (aktivacija na razini transkripcijskog faktora) ili siRNA (inhibicija na razini PTCH1 i SUFU).

6. RASPRAVA

Uzrok nastanka karcinoma jajnika još uvijek nije razjašnjen.

Neke studije ukazuju da je loša prognoza karcinoma jajnika uzrokovana ne samo pojavom prvih simptoma u uznapredovalom stadiju (kasnom simptomatologijom) i metastazama nego i visokom proliferacijskom aktivnošću samih stanica karcinoma (4,5,6).

Poznato je da je svaki histološki tip tumora jajnika i stupanj diferenciranosti stanica povezan s određenim molekularno-genetičkim promjenama. Serozni i endometrioidni tip tumora, viskog gradusa, nastaje uslijed mutacija p53 i disfunkcije gena BRCA1 i BRCA2. Serozni tip tumora, niskog gradusa, vjerojatno nastaje postupno zbog mutacije K-ras i BRAF. Mucinozni tip uslijed mutacija u K-ras. Endometrioidni tip, niskog gradusa mutacijama u CTNNB1 (beta-katenin) i PTEN. Vjerojatno je da većina tumora jajnika niskog gradusa nastaje iz postojećih cistadenoma ili endometrioze, dok oni visokog gradusa nastaju spontano bez prijašnjih lezija (13).

Atipični epitelni proliferativni tumori („borderline“ tumori) imaju obilježja dobroćudnih i zloćudnih novotvorina. Imaju jaču sposobnost proliferacije nego dobroćudne novotvorine, ali ne pokazuju nekrozu, destruirajuću invaziju strome, niti sposobnost metastaziranja (8, 9). Još uvijek nije razjašnjeno jesu li „bordeline“ tumori jajnika međustepenica u procesu karcinogeneze ili su zaseban patohistološki, a time i klinički entitet (7).

Putem analize haplotipa (tzv. ’linkage analize’) dokazano je da su geni BRCA1 i BRCA2 udruženi s genetskom predispozicijom nastanka i karcinoma jajnika i karcinoma dojke. Gubitak heterozigotnosti (LOH) kromosomske regije 17q21 (BRCA1) također je relativno čest događaj u patogenezi karcinoma jajnika, može se pronaći u 40 do 70% uzoraka, ali LOH ne utječe direktno na razinu transkripta gena BRCA1 (16, 17) . U našem slučaju, LOH gena BRCA1 pronađen je u 5/15 uzoraka (33,3%), dok LOH gena BRCA2 nije pronađen niti u jednom uzorku.

Survivin je inhibitor apoptoze, odgovoran za održavanje vijabilnosti stanice i poticanje rasta tumorskih stanica. Ekspresija survivina regulirana je proteinom BRCA1, ali ne direktno već preko medijatora, proteina SIRT1. Povećanjem eskpresije BRCA1 dolazi do povećanja ekspresije SIRT1, koji uzrokuje smanjenje ekspresije survivina mijenjajući epigenetske modifikacije histona H3. U bolesnim stanjima, kada je ekspresija BRCA1 smanjena, doći će do povećanja ekspresije survivina istim ovim mehanizmom (34). To se poklapa s rezultatima opaženima u našoj studiji, gdje je survivin eksprimiran u većini uzoraka, ali ipak najviše u karcinomima, u odnosu na „borderline“ tumore ili fibrome.

Malo se zna o ulozi signalnog puta Hh-Gli u nastanku karcinoma jajnika (47) i o interakciji tog puta sa genima BRCA 1 i BRCA2. Signalni put Hh-Gli otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) kod koje je mutacija u genu za protein Hedgehog (eng. jež), dovela do nastanka ličinke koja nalikuje zbog bodljikavih izraslina, ježu. Osnovni principi signalnog puta kod mušice sačuvani su i kod viših organizama, pa se tako mogu poistovjetiti sa signalnim putem u čovjeka (36). Put ima ključnu ulogu u normalnom razvoju, a njegovo poremećeno funkcioniranje povezuje se s razvojnim deformacijama i rakom. Prema najnovijim procjenama Hh-Gli put sudjeluje u jednoj trećini svih smrtonosnih tumora, pa prema tome Hh-Gli put postaje vrlo značajnom metom potencijalnih terapija raka. Do sada je poznato da je ekspresija Shh, Dhh, Ptch, Smo i Gli proteina povećana u benignim i malignim tumorima jajnika dok je kod normalnih stanica nema. Imunoreaktivnost za Shh, Dhh, Ptch, Smo i Gli1 je znatno povećana kod stanica koje jače proliferiraju, a blokiranje Hh-Gli signalnog puta značajno smanjuje proliferaciju stanica kod karcinoma jajnika (50, 51, 52, 39). Zna se, također, da su somatske matične stanice u jajniku odgovorne za zacjeljivanje oštećenja nastalih nakon prsnuća zrelog folikula (ovulacije) te da pojačana aktivacija signalnog puta Hh-Gli može dovesti do povećane proliferacije tih stanica. Povećana proliferacija potom može dovesti do nakupljanja mutacija i zloćudne transformacije (61).

Kao predmet našeg istraživanja odabrali smo zloćudne epitelne tumore jajnika i „borderline“ tumore jajnika. Kontrolni uzorci su bili tkivo zdravog jajnika. Poznato je da je signalni put Hh-Gli prisutan u komunikaciji između strome i epitela, stoga smo u istraživanje uključili i fibrome jajnika. Oni su dobroćudni tumori, građeni od stanica vezivnog tkiva jajnika, a pripadaju tumorima specijalizirane strome jajnika. Usporedbom genske ekspresije u fibromima, kao i u ostalim tumorima jajnika, htjeli smo istražiti je li aktivacija signalnog puta Hh-Gli vezana sa svim tumorima jajnika, ili samo onima epitelnog porijekla.

Rezultati koje smo dobili jasno ukazuju na pojačanu aktivnost gena signalnog puta Hh-Gli, BRCA1, BRCA2 i survivina u karcinomima jajnika i „bordeline tumorima. Iako je početna namjera bila usporediti ekspresiju gena u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo, to se u analizama pokazalo neizvedivo, obzirom da je čak i okolno tkivo pokazivalo odlike promjena na molekularnoj razini, osobito kod viših stadija tumora. U prilog ovim eksperimentalnim opažanjima govori i FIGO klasifikacija (slika 2) iz čega bi se moglo pretpostaviti da i zdravi jajnik (korišten kao zdravo tkivo u eksperimentu) može biti infiltriran pojedinačanim tumorskim stanicama koje se makroskopski i mikroskopski ne vide. Stoga su podaci ekspresije gena u ovom radu primarno bazirani na ekpresiji u tumorskom tkivu. Prilog tome su tablica 9 i grafički prikaz na slici 17 navedeni u rezultatima.

Iz literature je poznato da zdravo tkivo jajnika ima vrlo nisku ili nepostojeću ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli (51). „Zdravo tkivo“ koje smo analizirali u našem istraživanju nije pokazivalo razlike u ekspresiji gena signalnog puta Hh-Gli u odnosu na tumorsko tkivo stoga smo zaključili da je već došlo do molekularnih promjena.

Analizom rezultata ekspresije pokazano je da se ekspresija gena PTCH1 i SHH mijenja ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti. Ekspresija PTCH1 viša je u nižim FIGO stadijima karcinoma nego u višima, dok je još niža u „borderline“ tumorima i na kraju najniža u fibromima. Statistička značajnost za ekspresiju PTCH1 iznosi P=0,013. Ekspresija SHH je obrnuta, sa najnižom ekspresijom u karcinomima FIGO stadija I, nešto višom u karcinomima FIGO stadija II i III, još višom u „borderline“ tumorima te najvišom u fibromima. Statistička značajnost za ekspresiju SHH je granična, i iznosi P = 0.0636.

Fibromi se svakako najviše razlikuju od ostalih tipova tumora jajnika, te je uloga gena SHH u njima osobito izražena. Na temelju toga možemo zaključiti da je signalni put Hh-Gli uključen u nastanak epitelnih i stromalnih tumora, ali očito različitim mehanizmima. Dok kod epitelnih tumora ključnu ulogu igraju geni PTCH1 i BRCA2, kod stromalnih tumora očito je prekomjerna proizvodnja liganda SHH jedan od čimbenika maligne transformacije.

Ako analiziramo korelaciju ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli, BRCA1 i BRCA2 i survivina u zloćudnim tumorima jajnika dobijemo da je vrlo dobra do izvrsna korelacija između BRCA1-BRCA2, BRCA2-survivin, GLI1-SMO, GLI1-SUFU i SMO-SUFU. Ukoliko se iz analize izbace fibromi, u kojima je mehanizam očito različit od epitelnih tumora jajnika, dolazimo do malo jasnije korelacijske slike: PTCH1 je jače povezan sa ostalim komponentama signalnog puta, kao i s genima BRCA1 i BRCA2, dok se njegova veza sa survivinom gubi. Njegov središnji položaj u korelacijskoj mreži mogao bi značiti da on ima ključnu ulogu u koordinaciji signalnog puta sa staničnim odgovorom na oštećenje genskog materijala.

Klasifikacija „borderline“ tumora je još nejasna, naime ne zna se je li „borderline“ tumor samo rani stadij progresije do karcinoma, ili nezavisna klasa tumora. Ova analiza govori u prilog teoriji da su ovi tumori zapravo posebna grupa tumora. Kada bi „borderline“ tumori bili samo početni stadij razvoja karcinoma, ekspresija gena koja se progresivno pojačava ili smanjuje tijekom progresije, što je ovdje pokazano za PTCH1, SHH i BRCA2 gene, pokazivala bi sličan trend i za „borderline“ tumore. U ovom setu uzoraka, „borderline“ tumori djeluju kao da su sličniji tumorima višeg stadija bolesti nego tumorima nižeg stadija bolesti, pa prema tome zaključujemo da su vrlo vjerojatno posebna klasa tumora.

Kada smo analizirali LOH gena PTCH1 i BRCA1 zanimljivo da je u uzorku broj 2 pronađen LOH oba gena, što je od velike kliničke važnosti. U uzorku 2, također, je pronađena i mutacija c.676delT stop 233 (p.C266VfsX8) koja se nalazi u eksonu 11 gena BRCA1 i dovodi do nastanka skraćenog proteina i njegove poremećene funkcije. Ova mutacija dobro je poznata kao klinički značajna mutacija, te je objavljena u on-line bazi podataka Breast Cancer Information Core (BIC). Pacijentica o kojoj je ovdje riječ naslijedila je mutaciju gena BRCA1 od nekog od svojih roditelja, što znači da njezina djeca imaju 50% šanse naslijediti oštećeni gen, te se time svrstavaju u rizičnu skupinu pacijenata sa nasljednom sklonošću raku dojke i jajnika. Takvim pacijentima mora se posvetiti posebna pozornost, obzirom da imaju veliku vjerojatnost od obolijevanja od raka dojke ili raka jajnika, te su potrebne redovite kontrole i praćenje. Gubitak heterozigotnosti gena PTCH1 mogao je doprinijeti razvoju bolesti, zajedno s gubitkom zdravog alela gena BRCA1. Na žalost, još uvijek ne postoje metode kojima bi se moglo pokazati koji je od ovih događaja nastao prvi, međutim jasno je da je gubitak oba značio brži razvoj bolesti. Do sada postoje svega dva prikaza sličnih poveznica signalnog puta Hh-Gli i gena BRCA. U prikazu pacijentice s nasljednim mutacijama u genima PTCH1 i BRCA1, koja pokazuje simptome Gorlinovog sindroma (višestruki bazocelularni karcinomi kože i keratociste čeljusti), ustanovljeno je da je razvila karcinom dojke u starijoj životnoj dobi (48). Drugi, nedavno objavljeni prikaz pacijentice, također, je prezentirao pacijenticu s bazocelularnim karcinomima kože glave i invazivnim duktalnim karcinomom dojke, bez ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora. Naknadno su ustanovljeni dodatni simptomi koji su upućivali na Gorlinov sindrom, te je pronađena mutacija gena PTCH1. Začuđujuće, nije pronađena mutacija u genima BRCA1 i BRCA2 (49).

Analiziranjem vijabilnosti stanica nakon tretmana Hh-Gli specifičnim aktivatorom ili inhibitorom pokazano je da ciklopamin smanjuje vijabilnost stanica pri koncentracijama od 2.5 μM na više, te da je efekt ciklopamina najizraženiji već 24 sata nakon tretmana. Također je vidljivo da protein SHH djeluje proliferativno na stanice; već i male doze vidljivo povećavaju broj stanica. Tomatidin (neaktivni analog ciklopamina) je ovdje upotrijebljen kao kontrola i vidi se da pokazuje proliferativni efekt nakon 24-satnog tretmana.

Pokusima u kulturi stanica utjecali smo na aktivnost signalnog puta izvana i iznutra, i to aktivacijski i inhibicijski u oba slučaja. Vanjska aktivacija je tretman ligandom, proteinom SHH; a vanjska inhibicija je tretman ciklopaminom, spojem koji inhibira djelovanje proteina Smo. Unutarnja aktivacija postignuta je unosom Gli1, koji je glavni efektor signalnog puta, u stanicu; a unutarnja inhibicija postignuta je korištenjem malih interferirajućih RNA, za koje je poznato da djeluju na način da utišavaju ekspresiju ciljnog gena.

Kada smo analizirali promjene u aktivnosti signalnog puta Hh-Gli nakon transfekcije s plazmidom koji nosi gen za proizvodnju transkripcijskog faktora Gli1 vidjeli smo da su, već 24 sata nakon transfekcije, vidljive promjene u aktivnosti signalnog puta Hh-Gli koje odgovaraju aktivaciji signalnog puta. Ekspresija GLI1 je, kao što se može i očekivati, izrazito povećana. Također je uočeno povećanje ekspresije PTCH1, SMO, GLI2 i SUFU, koji su svi važni faktori u aktivnosti signalnog puta Hh-Gli. Suprotno tome, ekspresija GLI3, koji je inhibitor signalnog puta, nepromijenjena je nakon transfekcije, što nam govori da je signalni put funkcionalan u ovim stanicama. Kako bi se usporedili efekti i nakon duljeg vremena pokus je ponovljen i na 48h i 72h nakon transfekcije. Ovi rezultati pokazuju očitu dinamiku porasta signalnog puta Hh-Gli već nakon 24 sata, vrhunac aktivnosti nakon 48h te vraćanje na početne vrijednosti nakon 72 sata. Zanimljivo je da se i ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 kreće na vrlo sličan način kao i ekspresije gena samog signalnog puta, što dodatno potvrđuje mogućnost da je ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 povezana sa signalnim putem Hh-Gli.

Utišavanjem signalnog puta na dvije razine PTCH1 i SUFU postignuto je utišavanje od 50% za oba gena, što nije idealno, ali je dovoljno da se vide efekti na razini genske ekspresije.

Utišavanje gena PTCH1 vidljivo je 24 i 48 sati nakon transfekcije, u oba slučaja se održava na 50%. Utišavanje PTCH1 u oba slučaja izaziva povećanje ekspresije gena SUFU, koji je drugi tumor supresor u ovom signalnom putu. Za pretpostaviti je da se ovdje radi o nekakvom mehanizmu kompenzacije, gdje gubitak jednog tumor supresora izaziva povećanje ekspresije drugog kako bi se održalo stanje ravnoteže. Ekspresija BRCA1, BRCA2 i survivina prati smanjenje ekspresije gena PTCH1 nakon 24 sata, dok se nakon 48 sati polako vraća u razinu kontrole. To bi se moglo objasniti činjenicom da smanjenje ekspresije PTCH1 vjerojatno utječe na smanjenje proliferacije stanica, a time i replikacije DNA. Kako se BRCA geni aktiviraju uglavnom kada dolazi do pogrešaka u replikaciji DNA, a replikacija je smanjena utišavanjem PTCH1, logično je da je došlo i do smanjenja ekspresije BRCA gena. Slična situacija je i sa survivinom, koji je inhibitor apoptoze i vezan uz stanični ciklus. Kada je proliferacija smanjena, smanjena je i potreba za regulatorima proliferacije. Ekspresija GLI1 također prati ekspresiju gena PTCH1 nakon 24 sata, što je također logično pošto su oba ta gena markeri aktivnosti signalnog puta Hh-Gli. Smanjenje oba gena vrlo vjerojatno znači smanjenje aktivnosti signalnog puta. Nakon 48 sati već dolazi do korekcije i vraćanja u normalne razine. Razina gena SMO uglavnom se ne mijenja utišavanjem PTCH1, što bi značilo da genska ekspresija koreceptora nije regulirana transkripcijskim faktorom GLI1, što je i poznato (36,37).

Utišavanje gena SUFU, koji je jedan od regulatora aktivnosti proteina Gli1, ima jaki utjecaj na ekspresiju samog gena GLI1. U oba slučaja (24 i 48 sati) došlo je do smanjenja ekspresije gena GLI1, koja se čak pojačava s vremenom. Osim toga, primijećen je zanimljiv učinak na ostale gene signalnog puta. Utišavanje SUFU ima za posljedicu utišavanje cijelog signalnog puta s malim vremenskim odmakom, tj. 48 sati nakon utišavanja: PTCH1, SMO, GLI1 i SHH su svi vidljivo sniženi nakon 48 sati utišavanja. Efekt na BRCA gene i survivin sličan je kao efekt utišavanja PTCH1 nakon 24 sata, gdje dolazi do smanjenja aktivnosti svih ovih gena. Zanimljivo je ipak njihovo povećanje nakon 48-satnog utišavanja, gdje dolazi do povećanja razine njihove ekspresije. Ovaj fenomen je još uvijek neobjašnjen, ali moguće je da utišavanje signalnog puta Hh-Gli ima neki inicijalni efekt na transkripciju ovih gena, ali obzirom da su oni regulirani i drugim signalnim putevima i proteinima, moguće je da se oni uključuju i kompenziraju taj efekt nakon 48 sati utišavanja. U prilog tome govori efekt nakon 48 sati utišavanja koji se poklapa s izračunima korelacije (prikazanim u poglavlju Rezultati na slici 20).

Zanimljivo je također iz oba ova pokusa da utišavanje na razini receptora utišava samo dio signalnog puta, dok utišavanje na razini citoplazmatskog regulatora ima znatno izraženiji utjecaj na sve gene signalnog puta. To bi moglo značiti da je u ovim stanicama uključen i neki od nekanoničkih puteva regulacije ovog signalnog puta, koji djeluje negdje na razini između receptora i transkripcijskog faktora. Da je to moguće govore i radovi drugih autora: pokazana je veza signalnog puta Hh-Gli sa signalnim putem Ras-Akt, odnosno da se regulacija odvija na razini proteina Gli (62).

Kada smo promatrali migratornu sposobnost stanica nakon aktivacije i inhibicije signalnog puta Hh-Gli uvidjeli smo da stanice tretirane ciklopaminom ne pokazuju značaju promjenu migracijske sposobnosti nakon 4 sata – to je vjerojatno posljedica kratkog izlaganja spoju, jer je već prijašnjim pokusima utvrđeno da je optimalno vrijeme djelovanja ciklopamina 24-48 sati. Stimulacija stanica SHH proteinom ima dramatičan efekt na migraciju stanica, koja se udvostručava u odnosu na netretirane kontrolne stanice. Ovo je još jedan dokaz da je signalni put Hh-Gli aktivan u stanicama tumora jajnika, jer trenutačno može reagirati na ligand SHH. Test migracije pokazuje koliko su stanice sposobne širiti se u okolno tkivo, te se posredno može zaključivati o mogućnosti stvaranja metastaza. SkOv3 stanice imaju bazično visoku migratornu sposobnost, koja se stimulacijom još više povećava, što znači da bi signalni put Hh-Gli mogao imati ulogu u metastaziranju.

7. ZAKLJUČCI

1. Tumori jajnika pokazuju povećanu ekspresiju svih gena signalnog puta Hh-Gli: PTCH1, SMO, GLI1, SHH, SUFU, kao i gena vezanih uz preživljenje stanica (SURVIVIN) te gena uključenih u popravak oštećenja DNA (BRCA1, BRCA2).

2. Ekspresija PTCH1, SHH i BRCA2 mijenja se ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti.

3. Ekspresija PTCH1 viša je u karcinomima nižeg FIGO stadija nego u karcinomima višeg FIGO stadija, dok je još niža u „borderline“ tumorima i na kraju najniža u fibromima.

4. Ekspresija SHH je obrnuta, s najnižom ekspresijom u karcinomima FIGO stadija I, nešto višom u karcinomima FIGO stadija II i III, još višom u „borderline“ tumorima te najvišom u fibromima.

5. Korelacija /povezanost :

- izvrsna između GLI-SUFU-SMO te BRCA1-BRCA2 kod svih ispitivanih tumora te slaba korelacija PTCH s apoptozom putem survivina;
- umjerena povezanost PTCH sa SUFU i SMO, a sa GLI1 slaba ili umjerena

6. Egzogeni SHH protein djeluje proliferativno i pojačava migraciju stanica tumora jajnika.

7. Pokretanje putem Gli1 konstrukta uzrokuje povećanje ekspresije PTCH1, SMO, GLI2 i SUFU, ali ne i GLI3.

8. Ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 povezana je sa signalnim putem Hh-Gli.

9. Signalni put Hh-Gli se može blokirati ciklopaminom već nakon 24 sata.

10. Utišavanje gena PTCH1 izaziva povećanje ekspresije gena SUFU mehanizmom kompenzacije, i smanjenje i BRCA1, BRCA2 i survivina.

11. Razina gena SMO uglavnom se ne mijenja utišavanjem PTCH1, što bi značilo da genska ekspresija koreceptora SMO nije regulirana GLI1 transkripcijskim faktorom.

12. Utišavanje gena SUFU smanjuje ekspresiju gena cijelog signalnog puta, te BRCA1, BRCA2 i survivina.

8. SAŽETAK

Uvod: Zloćudna novotvorina jajnika ili karcinom jajnika je sedmi po redu karcinom u žena, čineći 3% svih maligniteta i 6% svih smrtnosti od karcinoma u žena. Uzrok nastanka karcinoma jajnika, još uvijek, nije razjašnjen. Postoji nekoliko čimbenika koji su povezani s povećanom ili smanjenom opasnošću od nastanka zloćudnog tumora (rađanje, dojenje, neplodnost, oralna kontracepcija, hormonsko nadomjesno liječenje, K-ras i HER-2/neu onkogeni, BRCA1 i BRCA2 te p53 tumor supresor geni). Prema najnovijim procjenama signalni put Hh-Gli sudjeluje u jednoj trećini svih smrtonosnih tumora, pa prema tome postaje vrlo značajnom metom potencijalnih terapija raka. Malo se zna o ulozi signalnog puta Hh-Gli u nastanku karcinoma jajnika i o interakciji tog puta s genima BRCA1 i BRCA2. U ovom istraživanju željeli smo ispitati značaj signalnog puta Hh-Gli na zloćudnim epitelnim tumorima jajnika, posebice u komunikaciji između strome i epitela.

Materijali i metode: U periodu od 2007. do 2010. godine prikupljeno je 13 karcinoma jajnika, 7 "borderline" tumora jajnika i 3 fibroma jajnika. Metode koje smo koristili u ovom istraživanju su: ekstrakcija RNA iz tkiva i stanica, ekstrakcija DNA iz tkiva i krvi, mjerenje koncentracije DNA, provjera kvalitete i koncentracije RNA, reverzna transkripcija, kvantitativni real-time PCR, statistička obrada podataka, analiza mutacija gena BRCA1 i BRCA2 (fragmentalna analiza i određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)), analiza gubitka heterozigotnosti, uzgoj i održavanje stanica u kulturi, MTT test, transfekcija, migracija i RNA utišavanje.

Rezultati: Rezultati koje smo dobili jasno ukazuju na pojačanu aktivnost gena signalnog puta Hh-Gli, BRCA1, BRCA2 i survivina i u karcinomima jajnika i u „borderline" tumorima jajnika. Tumori jajnika pokazuju povećanu ekspresiju svih gena signalnog puta Hh-Gli: PTCH1, SMO, GLI1, SHH, SUFU, kao i gena vezanih uz preživljenje stanica (SURVIVIN) te gena uključenih u popravak oštećenja DNA (BRCA1, BRCA2). Također smo utvrdili da se ekspresija PTCH1, SHH i BRCA2 mijenja ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti. Značajno je zapažanje da je ekspresija PTCH1 viša u nižim FIGO stadijima karcinoma nego u višima, dok je još niža u „borderline" tumorima i na kraju najniža u fibromima. Naprotiv, ekspresija SHH je obrnuta, s najnižom ekspresijom u karcinomima FIGO stadija I, nešto višom u karcinomima FIGO stadija II i III, još višom u „borderline" tumorima te najvišom u fibromima. Pokazali smo da je izvrsna korelacija između GLI-SUFU-SMO te BRCA1-BRCA2 kod svih ispitivanih tumora te slaba povezanost gena PTCH1 s apoptozom putem survivina dok je umjerena povezanost PTCH1 sa SUFU i SMO, a sa GLI1 slaba ili umjerena.

Značajno je da ligand SHH protein djeluje proliferativno i pojačava migraciju stanica. Pokazali smo da se signalni put Hh-Gli pokreće ubacivanjem konstrukta Gli1, što uzrokuje povećanje ekspresije PTCH1, SMO, GLI2 i SUFU, ali ne i GLI3. Važno je otkriće da je ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 povezana sa signalnim putem Hh-Gli, čime se dodatno daje veliki značaj važnosti povezanosti patologije dojke i jajnika. Pokazali smo da se signalni put Hh-Gli može blokirati ciklopaminom već nakon 24 sata, te da utišavanje gena PTCH1 izaziva povećanje ekspresije gena SUFU mehanizmom kompenzacije, a smanjenje GLI1, BRCA1, BRCA2 te survivina.

Naša su ispitivanja pokazala da se razina gena SMO uglavnom ne mijenja utišavanjem PTCH1, što bi značilo da genska ekspresija koreceptora nije regulirana GLI1 transkripcijskim faktorom, te da utišavanje gena SUFU smanjuje ekspresiju gena GLI1 i PTCH1.

Zaključak: Pojačana aktivnost gena signalnog puta Hh-Gli, BRCA1, BRCA2 i survivina prisutna je i u karcinomima jajnika i u „borderline“ tumorima jajnika. Utvrdili smo da se ekspresija PTCH1, SHH i BRCA2 mijenja ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti. Pokazali smo da je izvrsna korelacija između GLI-SUFU-SMO te BRCA1-BRCA2 kod svih ispitivanih tumora. Signalni put Hh-Gli se pokreće ubacivanjem konstrukta Gli1, što uzrokuje povećanje ekspresije PTCH1, SMO, GLI2 i SUFU, ali ne i GLI3. Važno je otkriće da je ekspresija gena BRCA1 i BRCA2 povezana sa signalnim putem Hh-Gli. SHH protein djeluje proliferativno i pojačava migraciju stanica. Signalni put Hh-Gli može se blokirati ciklopaminom već nakon 24 sata. Utišavanje gena PTCH1 izaziva povećanje ekspresije gena SUFU mehanizmom kompenzacije, a smanjenje GLI1, BRCA1, BRCA2 te survivina dok utišavanje gena SUFU smanjuje ekspresiju gena GLI1 i PTCH1.

9. SUMMARY (Interaction of the Hh-Gli signaling pathway with BRCA1 and BRCA2 gene in ovarian cancer, Ivana Maurac, dr.med., 2011.)

Introduction: Ovarian cancer is the seventh most common cancer in women, taking 3% of malignancies and 6% of mortality of all cancers in women. Etiology of ovarian cancer is still not ascertained. There are several factors associated with genesis of ovarian cancer (gestation, lactation, sterility, oral contraception, hormone replacement therapy, K-ras and HER-2/neu oncogenes, BRCA1 and BRCA2 gene and p53 tumor supresor gene). The Hh-Gli signaling pathway participate in one third of all lethal tumors and therefore is very important target as potential cancer therapy. Interaction of the Hh-Gli signaling pathway with BRCA1 and BRCA2 gene in genesis of ovarian cancer is insufficient and our plan was to explore the importance of the Hh-Gli signaling pathway in ovarian cancer genesis, especially in communication between stromal and epithelial tissue.

Materials and methods: In period from 2007 till 2010 year there are collected 13 ovarian cancers, 7 borderline ovarian tumors and 3ovarian fibromas. Methods which we used in our study were: extraction of RNA and DNA from tissue, cells and blood, measurement of DNA concentration, verification of RNA quality and concentration, reverse transcription, qRT-PCR, statistical data analysis, mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 gene, LOH, cultivation and preservation of cell culture, MTT test, transfection, migration and RNA silencing.

Results: We found that the enhanced gene expression of the Hh-Gli signaling pathway, BRCA1 and BRCA2 gene and survivin is present in ovarian cancers and bordeline ovarian tumors. Ovarian tumors show enhanced expression of all genes: PTCH1, SMO, GLI1, SHH, SUFU, BRCA1, BRCA2 and survivin. The expression of PTCH1, SHH and BRCA2 genes is changing in different types of tumors and FIGO stages. The higher expression of PTCH1 gene is present in lower FIGO stages of ovarian cancers, and lower expression of PTCH1 gene is present in borderline ovarian tumors and fibromas. The expression of SHH gene is the lowest in FIGO stages I, II and III of ovarian cancer, higher in borderline ovarian tumors and the highest in fibromas. Remarkably correlation was found between GLI-SUFU-SMO and BRCA1-BRCA2 gene, mild between PTCH1-SUFU and PTCH1-SMO and low correlation between PTCH1-survivin and PTCH1-GLI1. The SHH ligand has a major effect on cell proliferation and migration. Transfection of GLI1 construct enhance the expression of PTCH1, SMO, GLI2 and SUFU, but not GLI3. Very important finding is that the expression of BRCA1 and BRCA2 gene is connected with the Hh-Gli signalig pathway. Cyclopamin,

after 24 hours, can inhibit the Hh-Gli signalig pathway. Silencing of PTCH1 enhance the expression of SUFU by compensation mechanism, and reduce the expression of GLI1, BRCA1, BRCA2 gene and survivin. Silencing of PTCH1 does not change the expression of SMO indicating that the expression of SMO is not regulated by transcription factor GLI1. Silencing of SUFU reduce the expression of GLI1 and PTCH1.

Conclusion: The enhanced gene expression of the Hh-Gli signaling pathway, BRCA1 and BRCA2 gene and survivin is present in ovarian cancers and bordeline ovarian tumors. The expression of PTCH1, SHH and BRCA2 genes is changing in different types of tumors and FIGO stages. Remarkably correlation was found between GLI-SUFU-SMO and BRCA1-BRCA2 gene in all ovarian tumors. Transfection of GLI1 construct enhance the expression of PTCH1, SMO, GLI2 and SUFU, but not GLI3. Very important finding is that the expression of BRCA1 and BRCA2 gene is connected with the Hh-Gli signalig pathway. The SHH ligand has a major effect on cell proliferation and migration. Cyclopamin, after 24 hours, can inhibit the Hh-Gli signalig pathway. Silencing of PTCH1 enhance the expression of SUFU by compensation mechanism, and reduce the expression of GLI1, BRCA1, BRCA2 gene and survivin. Silencing of SUFU reduce the expression of GLI1 and PTCH1.

10. LITERATURA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, i sur., Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin 2006;56:106-130.
2. Registar za rak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo.
3. Scully RE, Young RH Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. In: Atlas of tumor pathology. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1998; Fascicle 23, 3rd series.
4. Khalifeh I, Munkarah AR, Schimp V, Morris R, Lawrence WD, Ali-Fehmi R. The impact of c-kit and ki-67 expression on patients prognosis in advanced ovarian serous carcinoma. Int J Gynecol Pathol 2005;24:228-34.
5. Eder AM, Sui X, Rosen DG i sur. Atypical PKCiota contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:12519-24.
6. Hsu CY, Bristow R, Cha MS i sur. Characterization of active mitogenactivated protein kinase in ovarian serous carcionomas. Clin Cancer Res 2004;10:6432-6.
7. Russell P. Ovarian epithelial tumors with atypical proliferation. In: Lowe D, Fox H. eds. Advances in gynaecologic pathology, Edinburg, Churchill Livingstone;1992;299-320.
8. Kurman RJ, (izd.) Blaustein-s Pathology of the Female Genital Tract, pogl.18-20. New York: Springer-Verlag, 2001;791-1035.
9. Kurman RJ, Trimble CL: The behavior of serous tumors of low malignant potential: are they ever malignant? Int J Gynecol Pathol 1993;12:120-7.
10. FIGO stagings and classification of ovarian cancer, in Clinical Gynecologic Oncology, DiSaia PJD, Creasman WT, eds, 5. izd., St Louis: Mosby, 2002:597-99.
11. DiSaia PJ, Creasman WT. Clinical Gynecologic Oncology 6. izd. St Louis: Mosby, 2002;253-593.
12. Negri E, Franceschi S, Tzonou A, i sur. Pooled analysis of three European case-control studies of epithelial ovarian cancer: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. Int J Cancer 1991;49:50-6.
13. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. Moderm Pathol 2005; 18Suppl 2:19-32.
14. Lynch HT, Cavalieri RJ, Lynch JF, i sur. Gynecologic cancer clues to Lynch syndrome II diagnosis: a family report. Gynecol Oncol 1992;44:198-203.

15. Whittemore AS, Gong G, Itnyre J. Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. Am J Hum Genet 1997;60:496-504.
16. Tahakashi H, Behbakht K, McGovern PE. Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancer. Cancer Res 1995;55:2998-3002.
17. Russel PA, Pharoah PDP, De Foy K, Ramus SJ, Symmonds I, Wilson A, Scott I, Ponder BAJ, Gayther SA. Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. Int J Cancer 2000;87:317-21.
18. Wilcox CB, Baysal BE, Gallion HH, Strange MA, DeLoia JA. High-resolution methylation analysis of the BRCA1 promoter in ovarian tumors. Cancer Genet Cytogenet 2005;159:114-22.
19. Al-Mulla F, Abdulrahman M, Varadharaj G, Akhter N, Anim JT. BRCA1 gene expression in breast cancer: a correaltive study between real-time RT-PCR and immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2005;53:621-29.
20. Thrall M, Gallion HH, Kryscio R, Kapali M, Armstrong DK, Deloia JA. BRCA1 expression in a large series of sporadic ovarian carcinomas: a Gynecologic Oncology Group study. Int J Gynecol Cancer 2006;16Suppl 1:166-71.
21. Gras E, Cortes J, Diez O, Alonso C, Matias-Guiu X, Baiget M, Prat J. Loss of heterozygosity on chromosome 13q14-q14 BRCA-2 mutations and lack of BRCA-2 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors. Cancer 2001; 92(4): 787-95.
22. Rajan JV, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA. BRCA2 is coordinately regulated with BRCA1 during proliferation and differentiation in mammaray epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:13078-83.
23. Vissac C, Peffalt De Latour M, Communal Y, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Expression of BRCA1 and BRCA2 in different tumor cell lines with various growth status. Clin Chim Acta 2002;320:101-10.
24. Promkan M, Liu G, Patmasiriwat P, Chakrabarty S. BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells. Int J Cancer 2009;125:2820-28.
25. Press JZ, De Luca A, Boyd N, Young S, Troussard A, Ridge Y, Kaurah P, Kalloger SE, Blood KA, Smith M, Spellman PT, Wang Y, Miller DM, Horsman D, Faham M, Blake Gilks C, Gray J, Huntsman DG. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. BMC Cancer 2008;8:17.

26. Chen Y, Farmer AA, Chen CF, Jones D, Chen PL, Lee WH. BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. Cancer Res 1996;56:3168-72.
27. Olivier RI, van Beurden M, van't Veer LJ. The role of gene expression profiling in the clinical management of ovarian cancer. Eur J Cancer 2006;2930-38.
28. Rosen EM, Fan S, Ma Y. BRCA1 regulation of transcription. Cancer Letters 2006;236: 175-85.
29. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Cancer Sci 2004;95:866-71.
30. Wang C, Fan S, Li Z, Fu M, Rao M, Ma Y, Lisanti MP, Albanese C, Katzenellenbogen BS, Kushner PJ, Weber B, Rosen EM, Pestell RG. Cyclin D1 antagonizes BRCA1 repression of estrogen receptor alpha activity. Cancer Res 2005;65:6557-67.
31. Kehn K, Berro R, Alhaj A, Bottazzi ME, Yeh WI, Klase Z, Van Duyne R, Fu S, Kashanchi F. Functional consequences of cyclinD1/BRCA1 interaction in breast cancer cells. Oncogene 2007;26:5060-69.
32. Mueller CR, Roskelley CD. Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. Breast Cancer Res 2003;5:45-52.
33. Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. Cancer Sci 2007;98:629-35.
34. Wang RH, Zheng Y, Kim HS i sur. Interplay among BRCA1, SIRT1, and survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. Mol Cell 2008;32:11-20.
35. Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression metworks. Cell Cycle 2009;8:2708.
36. Ogden SK, Casso DJ, Ascano M, Yore MM, Kornberg TB, Robbins DJ. Smoothened regulates activator and repressor functions of Hedgehog signaling via two distinct mechanisms. J Biol Chem. 2006 Mar 17;281:7237-43.
37. Cross SS, Bury JP. The Hedgehog signaling pathways in human pathology. Curr. Diag. Pathol. 2004;10:157-68.
38. Ruiz i Altaba A (izd.) Hedgehog-Gli Signaling in Human Disease, Springer Science+ Business Media inc, New York, 2006.
39. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. Exp Cell Res 1999;253:25-33.

40. Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP, Roelink H. Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. PNAS 2000;97:12044-49.
41. Levanat S, Musani V, Komar A, Orešković S. Role of the hedgehog/patched signaling pathway in oncogenesis: a new polymorphism in the PTCH gene in ovarian fibroma. Ann N Y Acad Sci 2004;1030:134-43.
42. Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M, Hooper JE. The Drosophila smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. Cell 1996;86:221-32.
43. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. J Biol Chem 1999;12:8143-52.
44. Levanat S, Pavelić B, Crnić I, Šitum M, Manojlović S, Mubrin-Končar M, Basta-Juzbašić A. Role of PTCH in Cancer and Development. Period Biol.1998;100:319-24.
45. Regl G, Neill GW, Eichberger T, Kasper M, Ikram MS, Koller J, Hintner H, Quinn AG, Frischauf AM, Aberger F. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. Oncogene. 2002;21:5529-39.
46. Eichberger T, Regl D, Ikram MS, Neill GW, Philpott MP, Aberger F, Frischauf AM. FOXE1, A New Transcriptional Target of Gli2 Is Expressed in Human Epidermis and Basal Cell Carcinoma. J. Invest. Derm. 2004;122:1180-1187.
47. Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T, Konishi I. Hedgehog Signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: It's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. Cancer Sci 2007;98:68-76
48. Reifenberger J, Arnold N, Kiechle M, Reifenberger G, Hauschild A. Coincident PTCH and BRCA1 germline mutations in a patient with neviod basal cell carcinoma syndrome and famillial breast cancer. J Invest Dermatol 2001;116:472-74.
49. Quist SR, Franke I, Helmdach M i sur. Complete basal cell carcinoma remission with imiquimod in a patient with nevoid basal cell carcinoma syndrome and associated basal cell caricnoma of the scalp and invasive ductal breast cancer. J Am Acad Dermatol 2011; 64:611-13.
50. Bustin, SA. Quantification of mRNA, using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J. Mol. Endocrinol. 2002;29:23-39.
51. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition oh Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. Genes and Development 2002;16:2743-48.

52. Nybakken K, Perrimon N. Hedgehog signal transduction: recent findings. Curr. Opin. Genet. Dev. 2002;12:503-11.
53. Čretnik M, Musani V, Orešković S, Leović D, Levanat S. The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. Int J Mol Med 2007;19:875-83.
54. Kallassy M, Toftgard R, Ueda M, Nakazawa K, Vorechovsky I, Yamasaki H, Nakazawa H. Patched (ptch)- associated preferential expression of smoothened (smoh) in human basal cell carcinoma of the skin. Cancer Res 1997;57:4731-35.
55. Koch A, Waha A, Hartmann W, Milde U, Goodyer CG, Sorensen N, Berthold F, Digon.Sontgerath B, Kratzschmar J, Wiestler OD, Pietsch T. No evidence for mutations or altered expression of the Suppressor of Fused (SUFU) in primitive neuroectodermal tumours. Neuropath Applied Neurobiol 2004;30:532-539.
56. Williamson EA, Dadmanesh F, Koeffler HP. BRCA1 transactivates the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. Oncogene 2002;21:3199-206.
57. Wu K, Jiang SW, Thangaraju M, Wu G, Couch FJ. Induction of the BRCA2 promoter by nuclear factor-κB. J Biol Chem 2000;275:35548-56.
58. Song H, Xin XY, Xiao F, Wang DT, Yue QH, Han X. Survivin gene RNA interference inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in HeLa cells. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008;136:83–9.
59. Hoffmann A-C, Warnecke-Eberz U, Luebke T, i sur. Survivin mRNA in peripheral blood is frequently detected and significantly decreased following resection of gastrointestinal cancers. J Surg Oncol 2007;95:51–4.
60. Colton T (izd.) Statistics in Medicine, pogl.6, Boston: Little, Brown & Co. 1974;189-217.
61. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B i sur. Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. Hum Cancer Biol 2008;14:7659-65.
62. Barakat MT, Humke EW, Scott MP. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. Trends Mol Med. 2010;16:337-48.

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Maurac rođena je u Našicama 02.11.1979.godine. Osnovnu i srednju školu završila je u Našicama. Diplomirala je 2004.godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom dodiplomskog studija bila je demonstrator na Katedri za anatomiju i Katedri za histologiju i embriologiju.
Obvezni pripravnički staž obavila je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, a državni ispit položila je 2005.godine.
Od 2005. do 2006. godine volontirala je u Klinici za Ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, a od 2006. do 2007. godine radila je kao znansteveni novak na znanstvenom projektu Ministarstva znanosti Republike Hrvatske pod nazivom „Utjecaj antenatalnih zbivanja na dugoročni neonatalni ishod“ br. 108261 te na znanstvenom projektu „Prikaz perinatalnih čimbenika značajnih za dugoročni neurorazvojni ishod“ br. 108-1081870-1947 voditeljice prof. dr. sc. Snježane Škrablin, u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb.
2007. godine završila je doktorski poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“, a temu doktorata pod nazivom „Hh-gli signalni put i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika“ obranila je 2008. godine.
Od 2007. godine radi kao specijalizantica iz ginekologije i porodništva u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb.
Objavila je znanstveni rad i nekoliko kongresnih sažetaka u časopisima indeksiranim u Current Contents-u.