



Središnja medicinska knjižnica

Kalafatić, Držislav (2011) *Aktivacija Hh-Gli signalnog puta u zloćudnim epitelnim tumorima jajnika*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/976>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Držislav Kalafatić

**Aktivacija Hh-Gli signalnog puta u
zloćudnim epitelnim tumorima jajnika**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ te u Klinici za ženske bolesti i porođaje Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Slavko Orešković

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Slavku Oreškoviću, na podršci pri odabiru teme i pomoći tijekom izrade disertacije.

Također zahvaljujem na svesrdnoj pomoći dr. sc. Maji Sabol te svim djelatnicima Laboratorija za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ te djelatnicima Zavoda za ginekološku patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koji su na bilo koji način pomogli u realizaciji ove disertacije.

Posebna zahvala mojoj supruzi Tei na nesebičnoj pomoći pri pisanju, uređivanju i izradi disertacije.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Novotvorine jajnika	1
1.1.1. Klasifikacija novotvorina jajnika	1
1.1.2. Liječenje karcinoma jajnika	3
1.2. Signalni put Hh-Gli	4
1.2.1. Protein Hedgehog	5
1.2.2. Patched.....	5
1.2.3. Smoothened.....	6
1.2.4. Gli.....	6
1.3. Signalni put Wnt	7
1.4. Važnost signalnog puta Hh-Gli u tumorima jajnika	8
2. Hipoteza i ciljevi istraživanja	11
2.1. Hipoteza	11
2.2. Ciljevi istraživanja	12
3. Bolesnice i metode	13
3.1. Bolesnice	13
3.2. Laboratorijske metode	16
3.2.1. Prikupljanje uzoraka	16
3.2.1.1. Materijali	16
3.2.1.2. Metode	16
3.2.2. Rad sa staničnim kulturama	17
3.2.2.1. Materijali	17
3.2.2.2. Metode	17
3.2.2.3. Uspostavljanje primarne stanične kulture	17
3.2.2.4. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi	18
3.2.2.5. Zamrzavanje stanica	18
3.2.2.6. Odmrzavanje stanica.....	18
3.2.2.7. Pokusi inhibicije i aktivacije signalnog puta u kulturi stanica	19
3.2.2.8. MTT test.....	19
3.2.2.9. Tretman kurkuminom.....	20
3.2.3. Izdvajanje DNA iz tkiva.....	20
3.2.3.1. Materijali.....	20
3.2.3.2. Metode.....	21
3.2.4. Izdvajanje RNA iz tkiva	21
3.2.4.1. Materijali	21
3.2.4.2. Metode	22
3.2.5. Izdvajanje DNA iz krvi	23
3.2.5.1. Materijali	23
3.2.5.2. Metode	23
3.2.6. Izdvajanje RNA iz stanica	24
3.2.6.1. Materijali	24
3.2.6.2. Metode	24
3.2.7. Određivanje koncentracije DNA i RNA	25
3.2.7.1. Materijali.....	25

3.2.7.2. Metode.....	25
3.2.8. Provjera kvalitete RNA na agaroznom gelu.....	25
3.2.8.1. Materijali.....	25
3.2.8.2. Metode.....	26
3.2.9. Reverzna transkripcija.....	26
3.2.9.1. Materijali.....	26
3.2.9.2. Metode.....	26
3.2.10. Kvantitativni real-time PCR.....	28
3.2.10.1. Materijali.....	28
3.2.10.2. Metode.....	28
3.2.11. Imunohistokemijsko bojanje tkivnih rezova.....	29
3.2.11.1. Materijali.....	29
3.2.11.2. Metode.....	30
3.2.12. Detekcija polimorfizama gena Ptch1 i Smo.....	31
3.2.12.1. Materijali.....	31
3.2.12.2. Metode.....	34
3.2.13. Sekvenciranje.....	35
3.2.13.1. Materijali.....	35
3.2.13.2. Metode.....	36
3.2.14. LOH analiza.....	36
3.2.14.1. Materijali.....	36
3.2.14.2. Metode.....	37
3.2.15. Statistička analiza.....	37
3.2.15.1. Materijali.....	37
3.2.15.2. Metode.....	38
4. Rezultati.....	39
4.1. Analiza ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli u karcinomima jajnika.....	39
4.1.1. Veza ekspresije gena i kliničkih parametara.....	43
4.1.2. Korelacije ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli.....	44
4.2. Analiza ekspresije glavnih proteina signalnog puta Hh-Gli u karcinomima jajnika.....	45
4.2.1. Veza ekspresije proteina i kliničkih parametara.....	46
4.3. Analiza polimorfizama i mutacija u genima PTCH i SMO.....	47
4.4. Djelovanje ciklopamina, tomatidina i proteina SHH na primarnu staničnu kulturu iz tkiva karcinoma jajnika.....	54
4.5. Djelovanje kurkumina na primarnu staničnu kulturu iz tkiva karcinoma jajnika.....	57
5. Rasprava.....	59
6. Zaključci.....	67
7. Sažetak.....	69
8. Summary.....	71
9. Literatura.....	73
10. Životopis.....	77

POPIS SKRAĆENICA

FIGO – Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara)

CDC – Center for Disease Control and Prevention (Centar za kontrolu i prevenciju bolesti)

Hh – Hedgehog

Ptch – Patched

Smo – Smoothened

SSD – Sterol Sensing Domain

Fz – Frizzled

Dsh – Dishevelled

APT – Atipični proliferativni tumor

SD – Standardna devijacija

NBCS – Sindrom nevusa bazalnih stanica (Nevus Basal Cell Syndrome)

BCC – Bazeocelularni karcinom (Basocellular Carcinoma)

LOH – Gubitak heterozigotnosti (Loss of Heterozigosity)

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

MEM - Minimal Essential Eagle's Medium

RNA – Ribonukleinska kiselina

DNA – Deoksiribonukleinska kiselina

DMSO – Dimetilsulfoksid

MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid

DAB – Diaminobenzidin

BSA – Albumin iz seruma goveda (Bovine Serum Albumine)

PCR – Reakcija lančane polimeraze (Polymerase Chain Reaction)

1. UVOD

1.1. Novotvorine jajnika

Rak jajnika je četvrto najčešće sjelo raka u žena, s najvišom incidencijom u dobi od 70. do 74. godine života i ukupnom učestalošću od 5% u ženskoj populaciji. U Republici Hrvatskoj u 2000. godini zabilježeno je 567 novooboljelih i 272 umrle žene od raka jajnika (stope 24,6 i 12 na 100.000 žena) (1).

Iako na karcinom jajnika otpada oko 23% svih ginekoloških karcinoma, 47% svih smrti zbog genitalnog raka uzrokovano je upravo rakom jajnika. Za razliku od većine drugih ginekoloških karcinoma, karcinom jajnika često se dijagnosticira u poodmaklome stadiju, kad kirurško liječenje i kemoterapija, kao dva osnovna modaliteta liječenja, imaju nepovoljne rezultate glede preživljenja bolesnica. Na žalost, još uvijek ne postoji učinkovita metoda primarnoga probira bolesnica, kao ni osjetljiva klinička ili laboratorijska detekcija ranoga stadija bolesti. Iz navedenih razloga, preživljenje od raka jajnika nije se značajnije mijenjalo tijekom godina, što nameće potrebu boljeg razumijevanja biologije stanica karcinoma jajnika, čija visoka proliferacijska aktivnost svakako utječe na nepovoljni ishod bolesti, ali i otvara niz mogućnosti ciljanog terapijskog djelovanja (2).

Prema izvješću Centra za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD-u (engl. *Center for Disease Control and Prevention, CDC*), u zadnjem desetljeću prošloga stoljeća došlo je do porasta ukupne stope mortaliteta od karcinoma jajnika, što se vjerojatno može objasniti općim starenjem populacije. Ipak, specifični mortalitet u skupini žena mlađih od 65 godina je manji u odnosu na žene starije od 65 godina, što se objašnjava uzimanjem kontracepcijskih tableta, kao dokazanog zaštitnog čimbenika za rak jajnika, te značajnom napretku i uspješnosti u liječenju karcinoma zametnog epitela, koji je značajno češći u mlađoj skupini bolesnica. Uz hormonsku kontracepciju, kao zaštitni čimbenik također se navodi i veći broj trudnoća i duže trajanje dojenja, što je sve povezano s manjim ukupnim brojem ovulacija (3).

1.1.1. Klasifikacija novotvorina jajnika

Prema histogenetskoj klasifikaciji, novotvorine jajnika mogu biti epitelnoga porijekla, porijekla zametnih (germinativnih) stanica te mezenhimalnoga porijekla. Sukladno preporuci Svjetske zdravstvene organizacije i Međunarodne federacije ginekologa i porodničara

(FIGO), epitelni tumori jajnika se razvrstavaju u tri kategorije: dobroćudni, atipični epitelni proliferativni tumori (tumori niskog zloćudnog potencijala) i zloćudni tumori (4).

Više od 90% zloćudnih novotvorina jajnika su primarni tumori jajnika, od kojih su najzastupljeniji karcinomi pokrovnog epitela (85-90%). Vjeruje se kako svi epitelni tumori jajnika imaju zajedničko histogenetsko porijeklo iz stanica pokrovnog (celomnog) epitela jajnika. Procesom neoplastične diferencijacije ovi tumori poprimaju različite histološke, a time i kliničke osobine. Prema histološkoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije razlikujemo sljedeće tumore pokrovnog epitela jajnika (4):

1. Serozni tumori
 - a. Dobroćudni serozni cistadenomi
 - b. Atipično proliferirajući serozni tumor (niski zloćudni potencijal)
 - c. Serozni cistadenokarcinom
2. Mucinozni tumori
 - a. Benigni mucinozni cistadenom
 - b. Atipično proliferirajući mucinozni cistadenom (niski zloćudni potencijal)
 - c. Mucinozni cistadenokarcinom
3. Endometrioidni tumori
 - a. Benigni endometrioidni cistadenom
 - b. Atipično proliferirajući
 - c. Endometrioidni adenokarcinom
 - d. Epitelno-stromalni tumori
4. Paramezonefoidni tumori
 - a. Cistadenom
 - b. Atipično proliferirajući
 - c. Adenokarcinom, adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom
5. Nediferencirani karcinom
6. Tumori prijelaznih stanica
 - a. Brennerov tumor
 - b. Brennerov tumor granične zloćudnosti
 - c. Zloćudni Brennerov tumor; Karcinom prijelaznog epitela (ne-Brennerov tumor)
7. Miješani epitelni tumori
8. Ekstraovarijski peritonealni karcinom
9. Metastatski tumori jajnika

Za razliku od histološkog tipa karcinoma, anatomska proširenost bolesti (ili stadij bolesti) potvrđena je kao najjači neovisni prognostički čimbenik. Iz tog je razloga uvedena kirurško-patološka FIGO klasifikacija stadija bolesti (tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija tumora jajnika prema FIGO stadiju

Stadij	Opis
I	Tumor ograničen na jajnik(e)
IA	Tumor ograničen na jedan jajnik
IB	Tumor zahvaća oba jajnika, bez ascitesa
IC	Stadij IA ili IB, s ascitesom ili pozitivnim peritonealnim ispirkom
II	Tumor se širi u malu zdjelicu
IIA	Širenje tumora na maternicu i/ili jajovod
IIB	Tumor proširen na druga tkiva male zdjelice
IIC	Stadij IIA ili IIB, s ascitesom ili pozitivnim peritonealnim ispirkom
III	Metastaze izvan zdjelice i/ili pozitivni retroperitonealni limfni čvorovi
IV	Udaljene metastaze (izvan abdomena), pozitivan pleuralni izljev

Posebnu skupinu epitelnih novotvorina jajnika čine atipični epitelni proliferativni (*borderline*) tumori, na koje otpada oko 15% svih epitelnih tumora jajnika. Još uvijek nije sa sigurnošću razjašnjeno predstavljaju li ti tumori tek međustadij u procesu karcinogeneze ili su zaseban patohistološki i klinički entitet, s obzirom da imaju elemente i dobroćudnih i zloćudnih novotvorina. Posebnu podvrstu atipičnog proliferativnog tumora jajnika čini mikropapilarni serozni karcinom jajnika, sa složenom mikropapilarnom građom i mogućim žarištima jasno ograničene tumorske invazije. Biološki potencijal takvih tumora veći je od atipičnog proliferativnog tumora i mnogi ga istraživači svrstavaju u skupinu zloćudnih tumora. Desetogodišnje preživljenje bolesnica s takvim oblikom tumora kreće se od 58 do 70% (naspram 98%-tnog preživljenja bolesnica s atipičnim seroznim proliferativnim tumorom), češće je obostran, češće je udružen s invazivnim implantatima potrbušnice, recidivira kao pravi invazivni tumor, a bolesnice obično umiru zbog intraabdominalne karcinomatose (5).

1.1.2. Liječenje karcinoma jajnika

Kirurško citoredukcijsko liječenje čini osnovu liječenja karcinoma jajnika i neophodno je za točno utvrđivanje proširenosti bolesti (prema FIGO klasifikaciji), a radikalnost u kirurškom odstranjenju tumorskoga tkiva značajno reducira katabolički učinak tumorske

bolesti, pojačava imunološki odgovor organizma te poboljšava prokrvljenost rezidualnoga tumora, što ga čini osjetljivijim na adjuvantno liječenje kemoterapijom i poboljšava ukupno preživljavanje bolesnice (6).

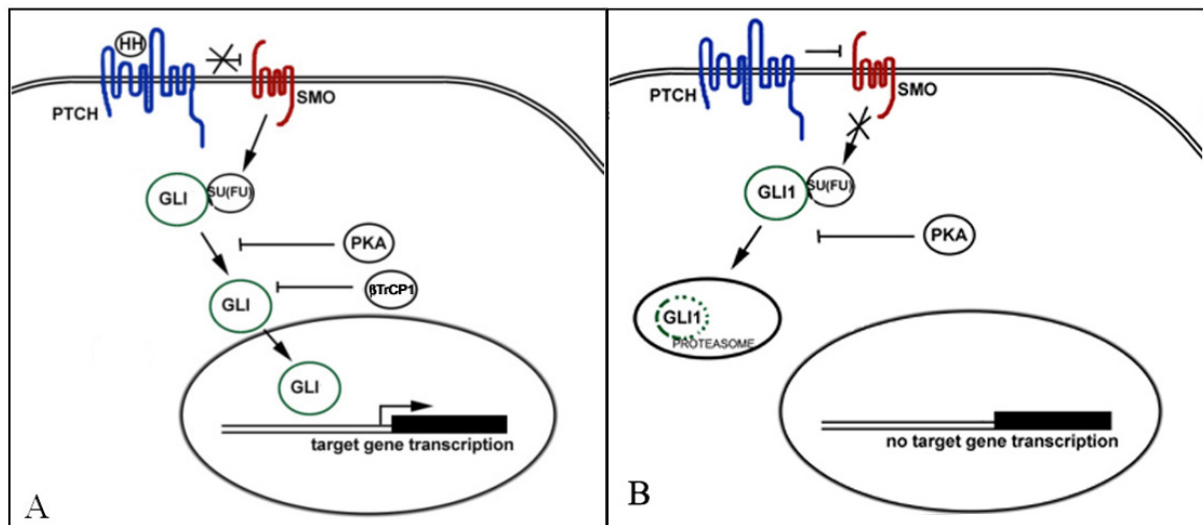
U patogenezi epitelnog karcinoma i atipičnih epitelnih proliferativnih tumora jajnika istražen je značaj brojnih onkogeni. Nađene su mutacije K-ras i HER-2/neu onkogeni, koji predstavljaju GTP-stanični protein, odnosno receptor čimbenika rasta. Zaključci brojnih studija ukazuju na značajno kraće vrijeme preživljavanja i veću vjerojatnost opetovanog javljanja bolesti u bolesnicima s pojačanom ekspresijom navedenih onkogeni (7). Od tumor-supresorskih gena najčešće se navode geni BRCA1 i BRCA2, koji su vezani za obiteljsku pojavu karcinoma jajnika te tumor-supresorski gen p53. Genski mehanizmi koji dovode do prigušenja tumor-supresorskih gena su mutacije, gubitak heterozigotnosti ili delecija dijela kromosoma (8).

1.2. Signalni put Hh-Gli

Signalni put Hh-Gli, poznat i pod drugim nazivima, kao što su Hh-Ptc ili Hh/Ptc/Smo, odnosno Hedgehog-Gli ili Hedgehog-Patched, evolucijski je visoko očuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre. Signalni put Hedgehog-Gli (Hh-Gli) ima ključnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja beskralješnjaka i kralješnjaka. Otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*), u koje je mutacija u genu za protein Hedgehog (engl. jež), dovela do nastanka ličinke, koja zbog bodljikavih izraslina nalikuje ježu. Kao i ostali fundamentalni signalni putevi, i ovaj je signalni put konzerviran od mušice do čovjeka, često uz mutacije, duplikacije ili druge promjene koje su se dogodile kroz evoluciju (9).

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 i drugih organa (10). Prema najnovijim procjenama, Hh-Gli put sudjeluje u nastanku jedne trećine svih zloćudnih tumora i, stoga, postaje značajnom metom potencijalnih terapija raka (9,10).

Signalni put Hh-Gli dovodi do promjena u ponašanju stanica putem najmanje dvaju mehanizama: poticanjem transkripcije ciljnih gena i kontrolom staničnog ciklusa. Započinju ga tri proteina, Hedgehog (Hh), Patched (Ptch) i Smoothed (Smo), pri čemu Hh ima ulogu liganda, Ptch (najvjerojatnije) receptora jer se nalazi na membrani te Smo, koji se također nalazi na membrani, kao koreceptora (11).



Slika 1. Pojednostavljena shema signalnog puta Hh-Gli. **A:** Izvanstanični ligand Hh veže se na Ptch, pri čemu dolazi do otpuštanja Smo i signal se prenosi unutar stanice u citoplazmu, prema kompleksu proteina SuFu i Gli1, pri čemu se Gli1 otpušta i odlazi u jezgru. Gli1 ima ulogu u transkripciji. **B:** u nedostatku Hh nema prijenosa signala jer Ptch drži Smo u neaktivnom obliku, što uzrokuje razgradnju Gli1 u preteasomima.

1.2.1. Protein Hedgehog

Obitelj Hedgehog (Hh) molekula čine sekrecijski proteini koji prolaze nekoliko posttranslacijskih modifikacija da bi poprimili potpuno aktivnu formu (12). U sisavaca su pronađena tri homologa, koji nose nazive Sonic Hh (Shh), Desert Hh (Dhh) i Indian Hh (Ihh). Shh je najbolje okarakteriziran i eksprimiran je u sisavaca u najširem opsegu (9). Protein Shh se proizvodi u stanicama i putem proteina Dispatched se otpušta i prenosi do ciljnih stanica na koje djeluje. Djelovanje Shh može biti autokrino (na stanice iz kojih se izlučuje) ili parakrino (na druge stanice iz bliže ili dalje okoline). Proteini Hh vežu se za svoj receptor Patched i time pokreću prijenos signala u stanici.

1.2.2. Patched

Protein Patched (Ptch) je receptor za Hh. Građen je od 12 transmembranskih hidrofobnih domena, sadrži dvije velike ekstracelularne omče, a unutar stanice mu se nalaze C- i N-terminus (13). Unutar strukture se nalazi i sterol-osjetljiva domena (SSD, engl. *sterol*

sensing domain), kakvu nalazimo i kod enzima uključenih u metabolizam kolesterola (9). Strukturom i topologijom Patched je nalik na membranske nosače, koji su također građeni od 12 transmembranskih domena, a funkcija im je olakšavanje prolaza malim molekulama (šećeri, mali peptidi) i ionima kroz membranu (13). Nakon vezanja liganda dolazi do otpuštanja represije na protein Smo i okidanja signala. Mehanizam još nije u potpunosti razjašnjen, ali vjerojatno se radi o internalizaciji receptora, zbog koje je omogućena translokacija proteina Smo na staničnu membranu i njegova aktivacija. Protein Ptch smatra se tumor supresorom, jer u slučaju nedostatka Ptch dolazi do trajno aktivnog prijenosa signala, budući da se protein Smo nalazi u neinhibiranom stanju.

1.2.3. Smoothened

Smoothened (Smo) je pozitivan regulator signalnog puta, koji aktivira nizvodne komponente (11). Građen je od sedam transmembranskih hidrofobnih domena i strukturno je sličan receptorima vezanim uz G-protein. On je samo signalna komponenta receptorskog kompleksa. U odsutnosti Ptch, protein Smo je konstitutivno aktivan (9). 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. Smo signal prema citoplazmi prenosi fosforilacijskom kaskadom, kojoj je konačna meta protein Gli.

Interakcija između Hh, Ptch i Smo veoma je kompleksna.

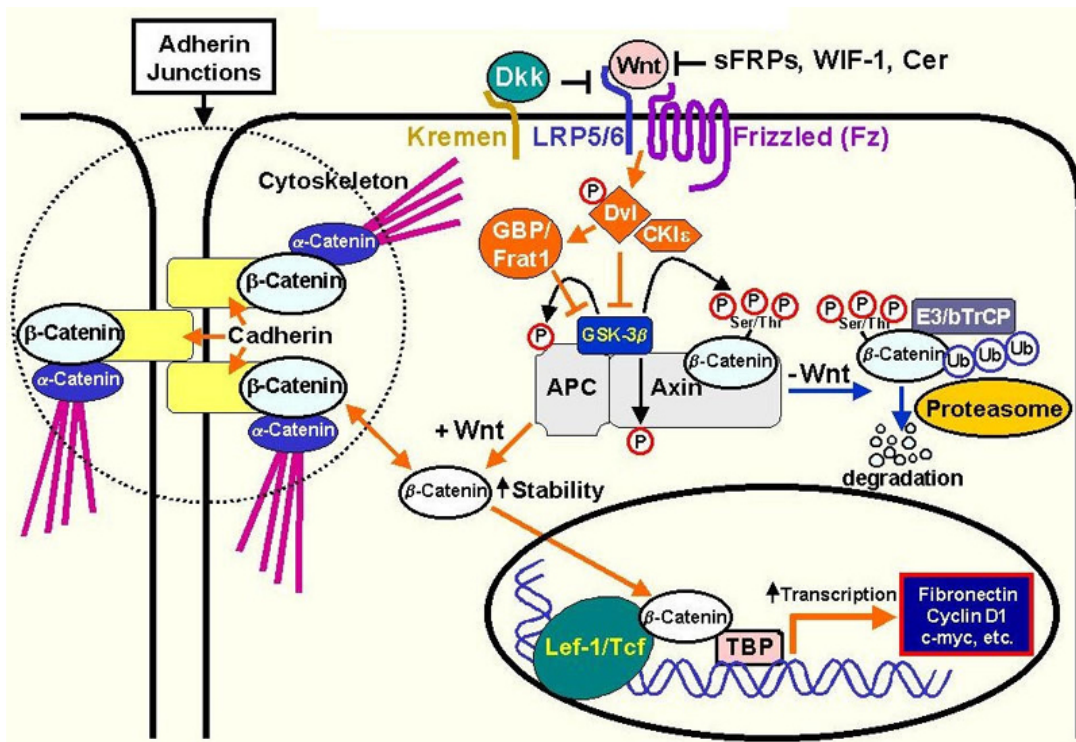
1.2.4. Gli

Obitelj Gli su „proteini cinkovog prsta”, koji su ime dobili po glioblastomu iz kojeg su prvi put izolirani. Njihova je funkcija reguliranje transkripcije mnogih gena, kao što su geni za ciklin D2 i ciklin E, koji su uključeni u staničnu proliferaciju, članovi Wnt i TGF β obitelji gena (osobito geni koji kodiraju morfogenetske proteine kosti), kao i sam Ptch (11). Kod sisavaca postoje tri izoforme proteina Gli, nazvane Gli1, Gli2 i Gli3. Gli1 posjeduje samo aktivacijsku domenu i trajni je aktivator signalnog puta. Također se smatra 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. Nastanak aktivatorske ili represorske forme ovisi o aktivnosti signala i fino je regulirana na više razina signalnoga puta. Ipak, može se generalno reći da je Gli2 uglavnom aktivator, a Gli3 uglavnom

repressor signalnog puta. Nakon vezanja liganda Hh dolazi do razgradnje represorskih oblika, a u slučaju da liganda nema, represorski oblici kože ekspresiju ciljnih gena.

1.3. Signalni put Wnt

Proteini Wnt skupine (od engl. *wingless*) poput β -katenina, GSK-3 β i drugih, čine Wnt signalni put, koji predstavlja složeni kompleks proteina u tzv. *Wnt network*-u. Wnt signalni put srodan je Hh-Gli signalnom putu i uključen je u veoma slične procese. Igra važnu ulogu u embriogenezi, primjerice u određivanju simetrije tijela, i kao morfogen. Također je uključen u normalne fiziološke procese u odraslom organizmu, kao što je održavanje matičnih stanica (14). Kao i Hh-Gli signalni put, visoko je konzerviran tijekom evolucije od *Drosophila* do čovjeka, a poremetnje puta nađene su u brojnim tumorima. Protein Wnt veže se na svoj receptor Frizzled (Fz), što aktivira obitelj proteina Dishevelled (Dsh) i, konačno, uzrokuje aktivaciju β -katenina i njegovu translokaciju u jezgu. Dsh također inhibira kompleks proteina koji se sastoji od aksina, GSK-3 β i APC, koji u neinhibiranom stanju inhibira β -katenin. β -katenin nakon ulaska u jezgu intereagira s TCF/LEF obitelji transkripcijskih faktora i potiče transkripciju specifičnih gena. Kao i kod Hh-Gli signalnog puta, točna veza između membranskih receptora i aktivnosti transkripcijskog faktora na kraju kaskade nije u potpunosti razjašnjena. Aktivacija ovog signalnog puta povezana je s nastankom raka. Veza Wnt i Hh-Gli signalnog puta je poznata, ali također nedovoljno istražena. Prema nekim autorima, β -katenin je jedan od ciljnih gena koji se transkribiraju nakon aktivacije Hh-Gli signalnog puta. S druge strane, Wnt signalni put može izravno utjecati na Hh-Gli signalni put, na način da djeluje antagonistički. Upravo je fina kontrola i omjer ova dva signalna puta bitan u formiranju mnogih organa (15).



Slika 2: Proširena shema Wnt signalnog puta

1.4. Važnost signalnog puta Hh-Gli u tumorima jajnika

Hh-Gli signalni put uključen je u niz različitih tumora. Postoje podaci da je ovaj signalni put uključen u čak trećinu svih zloćudnih tumora. Mutacije u genu Ptch uzrok su Gorlinovog sindroma, koji karakteriziraju različiti tumori i malformacije. Sam sindrom je poznati i pod drugim nazivima, kao što je sindrom nevusa bazalnih stanica (NBCS, iz engl. *Nevus Basal Cell Syndrome*). Samo ime govori da se u sindromu često javljaju tumori bazalnih stanica, bazocelularni karcinomi (BCC, iz engl. *Basocellular Carcinoma*) (16). Osim njih, u sindromu su česti i meduloblastomi, rabdomiosarkomi, fibromi srca i jajnika, meningiomi i ciste čeljusti (17). Razvoj sporadičnih BCC-a, koji nisu vezani uz sindrom, posljedica je poremetnje ovog signalnog puta (18). Slični podaci dobiveni su i za zrele teratome jajnika (19), ciste čeljusti (20) i meduloblastome (21,22). Također i glioblastomi, po kojima su Gli proteini i dobili ime, nastaju kao izravna posljedica poremetnje ovog signalnog puta (23).

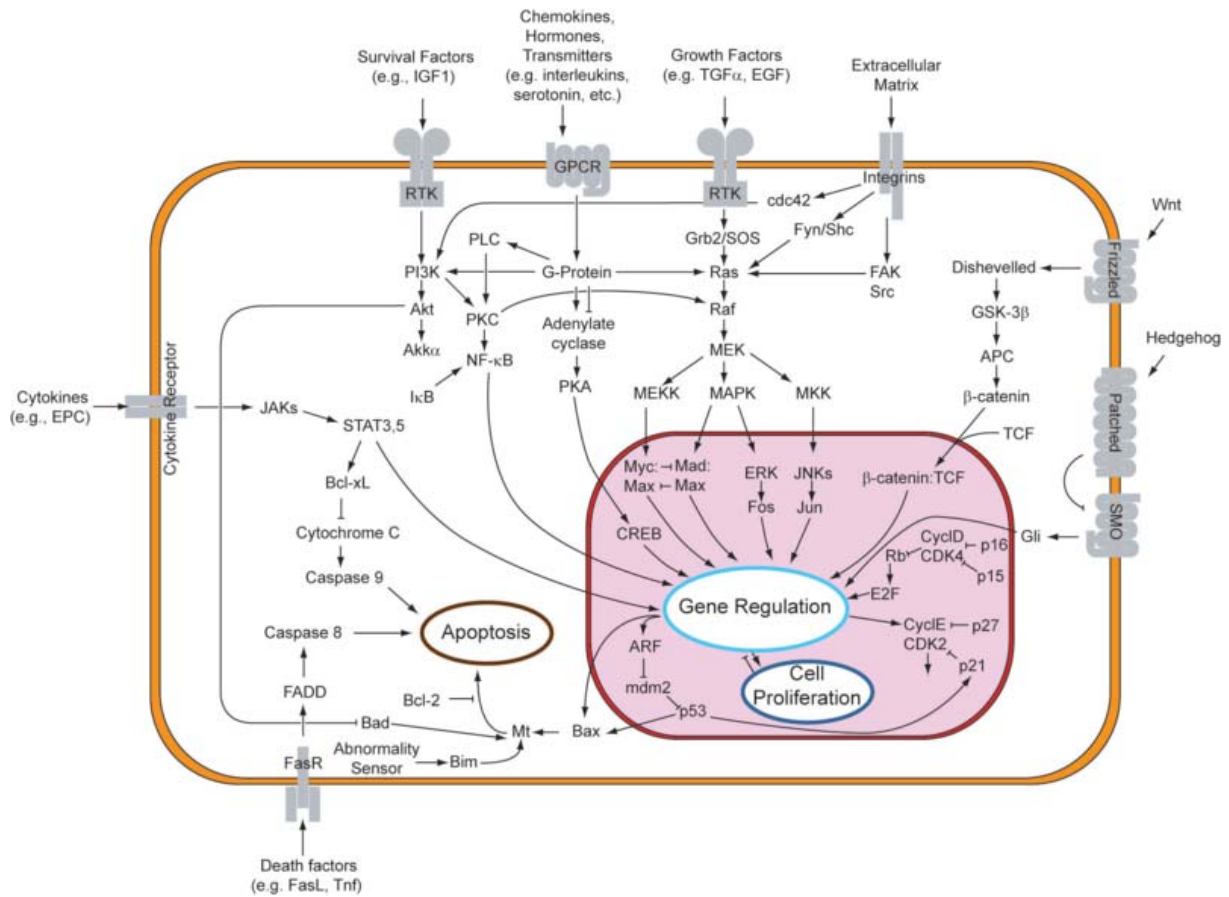
Osim očite veze ovih tumora sa signalnim putem Hh-Gli, u zadnje vrijeme otkriva se sve više i više različitih tipova tumora u kojima je ovaj signalni put na neki način poremećen.

Do sada je to pokazano za: melanome (24,25), trihoepiteliome (26), rabdomiome i rabdomiosarkome (27,28), tumore probavnog sustava (29), tumore prostate (30), karcinom malih stanica pluća (31), skvamozni karcinom pluća (32), rak gušterače (33), mokraćnog mjehura (34,35), adenome hipofize (36), rak dojke (37), rak jajnika (38,39) te kroničnu mijeloičnu leukemiju (40). Uz to, polimorfizmi u genu *Ptch* mogu djelovati na način da povećavaju sklonost organizma da razviju određeni tip tumora u određenim uvjetima, primjerice BCC-a (41) ili raka dojke u kombinaciji s oralnom kontracepcijom (42).

Najnoviji rezultati pokazuju da se, osim mutacijama, ovaj signalni put može poremetiti i epigenetski, točnije metilacijom promotora gena. Do sada je pokazano da je metilacija promotora gena *Ptch* povećana u zrelim teratomima i fibromima jajnika (43) te raku dojke (44), dok u drugim tumorima nema utjecaja, primjerice BCC (43) i meduloblastomu (45).

Kod sisavaca je u embrionalnom razvoju signalni put Hh-Gli aktivan na granicama epitela i mezenhima tijekom embriogeneze, dok je u odraslom organizmu prisutan na granici epitela i strome u svim tkivima koji su bitni za razmnožavanje ili vezani uz spolne hormone, kao što su gonade, maternica, dojke i prostata (46). Signalni put Hh-Gli je u odraslom jajniku aktivan u stanicama granulose i može se i dodatno aktivirati egzogenim Shh proteinom, koji stimulira rast i proliferaciju tih stanica. Ciklopamin, najpoznatiji inhibitor signalnog puta Hh-Gli, ne smanjuje proliferaciju stanica granulose, ali može poništiti učinak egzogenog proteina Shh ako se doda u isto vrijeme (47). Smatra se da su somatske matične stanice u odraslom jajniku sisavaca odgovorne za zacjeljivanje oštećenja nastalih tijekom prsnuća zrelog folikula (ovulacije), te da pojačana aktivacija signalnog puta može dovesti do povećane proliferacije stanica i nakupljanja mutacija, koje mogu dovesti do zloćudne transformacije (48).

U zloćudnim tumorima jajnika uloga signalnog puta Hh-Gli otkrivena je tek nedavno. Chen i suradnici ustanovili su da, za razliku od normalnog epitela jajnika, karcinomi jajnika pokazuju ekspresiju proteina signalnog puta Hh-Gli. Tretman ciklopaminom trajnih staničnih linija karcinoma jajnika uzrokuje smanjenu proliferaciju stanica i zastoj u G1 fazi staničnog ciklusa (38). Također, u tumorima jajnika često dolazi do gubitka jednog alela *Ptch* gena (tzv. LOH, engl. *loss of heterozygosity*), što znači poremećenu autoregulaciju puta, koja može dovesti do izraženije proliferacije stanica (48). Osim LOH-a, u dobroćudnim je tumorima jajnika pokazana i metilacija promotora gena *Ptch* (43).



Slika 3. Mreža različitih signalnih puteva uključenih u diobu i rast stanice. Važno mjesto među njima zauzimaju upravo signalni putevi Hh-Gli i Wnt.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Od svih poznatih prognostičkih čimbenika, do sada su se samo klinički stadij bolesti i veličina ostatnog tumora pokazali kao nezavisni prognostički čimbenici karcinoma jajnika. Današnji terapijski modaliteti još uvijek nisu doveli do značajnijeg napretka u liječenju raka jajnika. S obzirom da su poremećaji aktivnosti signalnog puta Hh-Gli otkriveni u različitim i brojnim tipovima tumora, naša je hipoteza bila da i u zloćudnim tumorima jajnika postoji povećana aktivnost pojedinih sudionika Hh-Gli i Wnt signalnoga puta. Pretpostavili smo kako je promijenjena genska aktivnost u korelaciji s proliferacijskom aktivnošću tumorskih stanica i kako detekcija aktivnosti signalnog puta može postati značajnim prognostičkim parametrom u bolesnica s karcinomom jajnika.

Očekivane promjene u ekspresiji u tumorima iz kojih je uspostavljena primarna kultura mogle bi omogućiti ciljano blokiranje signalnog puta, što bi bio i prvi pokazatelj specifičnosti tumora i njegove ovisnosti o ovom signalnom putu. Očekujemo da bi navedeni agensi mogli utjecati na rast tumora blokiranjem Hh-Gli signalnog puta, kao i ponovno pokretanje ligandom Hh. Također očekujemo da će rezultati ovog istraživanja pridonijeti razumijevanju funkcioniranja Hh-Gli puta u karcinogenezi jajnika te pronalaženju djelotvornih metoda za inhibiranje prijenosa signala, odnosno razvoju i evaluaciji terapijskih strategija, uključujući i moguće konkretne kliničke aplikacije.

Aktivacija Hh-Gli puta u zloćudnim novotvorinama jajnika do sada, naime, nije istražena. Laboratorij za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, u suradnji s Klinikom za ženske bolesti i porode Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, razvili su *in vitro* model na zrelim teratomima jajnika (43). Kako oni spadaju u vrlo heterogene, ali dobroćudne tumore, nametnula se potreba za analizom zloćudnih novotvorina jajnika. Ovaj rad je, stoga, usmjeren na istraživanje Hh-Gli signalnog puta u zloćudnim epitelnim tumorima jajnika te na ispitivanje aktivnosti glavnih sudionika toga puta i iznalaženje mogućnosti regulacije njihove aktivnosti.

2.2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja su:

1. u tkivu zloćudnih tumora jajnika istražiti poremećaje aktivacije gena vezanih za signalni put Hh-Gli te interakcije s drugim signalnim putevima;
2. korelirati stupanj ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli u tkivima zdravog jajnika s genskom ekspresijom u karcinomima jajnika te atipičnim proliferativnim tumorima jajnika;
3. imunohistokemijski detektirati aktivnost proteina signalnog puta Hh-Gli;
4. istražiti moguću nazočnost mutacija gena Ptch u tkivu karcinoma jajnika;
5. korelirati ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli i eventualnu nazočnost genskih mutacija s kliničkim parametrima bolesnica;
6. ispitati mogućnosti da se različitim mehanizmima inhibicije signalnog puta *in vitro* spriječi rast tumora.

Istraživanja u ovom radu provedena su na tkivu tumora, arhivskom materijalu te na primarnim kulturama, koje su razvijene u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ iz svježeg tumorskog tkiva.

3. BOLESNICE I METODE

3.1. Bolesnice

Prikupljeni uzorci su zloćudni epitelni tumori i atipični proliferativni tumori jajnika u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u razdoblju od 2007. do 2009. godine. Sve bolesnice su primarno kirurški liječene, prema smjernicama za pravilno kirurško-patološko stupnjevanje raka jajnika (6). Prilikom operacijskoga zahvata u svake je bolesnice uzet ispirak iz trbušne šupljine ili slobodna tekućina (ascites) za citološku pretragu. Potom je učinjena ablacija zdjelične pottrbušnice (peritoneja), potpuna resekcija trbušne maramice (omentuma) te histerektomija i obostrana adneksektomija. Inicijalno prikupljeni biološki materijal iz Klinike za ženske bolesti i porode obuhvaćao je svježe tumorsko tkivo, tkivo jajnika ili jajovoda, koje nije zahvaćeno tumorom i punu krv bolesnica. Metode prikupljanja i pohrane uzoraka detaljnije su opisane u poglavlju 3.2.1.

Inicijalno su prikupljeni uzorci 35 bolesnica. Ovisno o kvaliteti uzoraka, kvaliteti kontrolnog uzorka i količini materijala, napravljen je uži izbor uzoraka, koji su korišteni u pokusima *in vitro* te je na taj način dobijen konačni ispitivani uzorak od 18 bolesnica.

Ovo istraživanje u skladu je sa zakonima Republike Hrvatske i provedeno je uz poštivanje etičkih, pravnih i moralnih principa rada s bolesnicama. Prilikom uzimanja uzoraka tkiva i krvi bolesnica, dobivena je njihova suglasnost na posebnom obrascu o korištenju uzoraka tkiva u znanstvene svrhe, uz prethodno detaljno upoznavanje bolesnica s predviđenim metodama prikupljanja kliničkog materijala i njegovom analizom. Da je provedeno istraživanje u skladu s dobrom kliničkom praksom, potvrdilo je i Etičko povjerenstvo Klinike za ženske bolesti i porode, Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ur. br. 021-1/49-2006).

Raspodjela bolesnica prema patohistološkoj dijagnozi tumora prikazana je u tablici 2. Ukupno 6 bolesnica imalo je atipični proliferativni tumor jajnika, dok se u preostalih 12 radilo o karcinomu jajnika. Svaki uzorak je brojčano označen radi prepoznavanja u sljedećim tablicama i slikama.

Tablica 2. Raspodjela bolesnica prema patohistološkoj dijagnozi

Patohistološka dijagnoza tumora	Broj bolesnica (N=18)	Brojčana oznaka ispitivanog uzorka
Atipični serozni proliferativni tumor	6	4,6,7,10,12,18
Serozni papilarni karcinom	1	16
Endometrioidni adenokarcinom	3	5,13,17
Karcinom svijetlih stanica	2	2,9
Serozni adenokarcinom	4	1,3,11,19
Karcinosarkom	1	8
Miješani papilarni karcinom	1	14

Prosječna životna dob (+/- S.D.) bolesnica u vrijeme operacijskog zahvata bila je 59 +/- 15 godina. Prosječna dob u podskupini bolesnica s epitelnim karcinomom jajnika bila je 65 +/- 9 godina, a u podskupini bolesnica s atipičnim seroznim proliferativnim tumorom jajnika 45 +/- 15 godina. Medijan broja poroda bio je 1 (40% analiziranih bolesnica); 26,7% bolesnica rodilo je dvaput, 20% tri puta, dok 13,3% bolesnica nije imalo djece.

Kirurško-patološki stadij bolesti prema FIGO klasifikaciji prikazan je u tablici 3. Za zamijetiti je kako je 5 od 6 bolesnica (83,3%) s atipičnim proliferativnim tumorom jajnika imalo prvi stadij bolesti prema FIGO klasifikaciji, dok je u skupini s epitelnim karcinomom jajnika tek 4/12 (33,3%) bolesnica imalo početni kirurško-patološki stadij proširenosti tumora ($p<0,01$).

Tablica 3. Raspodjela bolesnica prema FIGO kirurško-patološkom stadiju (APT – atipični proliferativni tumor jajnika, K – karcinom jajnika)

		Ukupno (APT+K)	%	N (APT)	%	N (K)	%
FIGO stadij	IA	3	16,7	2	33,3	1	8,3
	IB	1	5,6	1	16,7	0	0
	IC	5	27,8	2	33,3	3	25,0
	IIB	1	5,6	0	0	1	8,3
	IIC	1	5,6	0	0	1	8,3
	IIIB	1	5,6	0	0	1	8,3
	IIIC	6	33,3	1	16,7	5	41,7
	Ukupno	18	100,0	6	100,0	12	100,0

U jedne trećine bolesnica s karcinomom jajnika radilo se o dobro diferenciranom tumoru (histološki gradus 1), dok je preostalih 66,7% bolesnica imalo slabo diferencirani karcinom (histološki gradus 3). Intraoperacijski uzorak ispirka zdjelišta ili slobodne tekućine (ascitesa) bio je citološkom analizom pozitivan na zloćudne stanice u 3/6 (50%) bolesnica s atipičnim proliferativnim tumorom, odnosno u 10/12 (83,3%) bolesnica s karcinomom jajnika. Histološki potvrđenih tumorskih žarišta na trbušnoj maramici (omentumu) bilo je u 1/6 (16,7%) bolesnica s atipičnim proliferativnim tumorom, odnosno u 6/12 (50%) bolesnica s karcinomom jajnika.

Jedna bolesnica s atipičnim proliferativnim tumorom stadija IIIC dobila je postoperacijski kemoterapiju, dok je 10/12 (83,3%) bolesnica s karcinomom jajnika liječeno kemoterapijom, od toga je 9 bolesnica primilo adjuvantnu, a jedna bolesnica neoadjuvantnu kemoterapiju (tablica 4).

Tablica 4. Provedeni kemoterapijski protokoli

Kemoterapija - protokol	Broj bolesnica	%
<i>Paclitaxel+Carboplatina</i>	<i>5</i>	<i>45,5</i>
<i>Carboplatina+Ciklofosfamid</i>	<i>2</i>	<i>18,2</i>
<i>Više protokola</i>	<i>1</i>	<i>9,1</i>
<i>Ciklofosfamid per os</i>	<i>1</i>	<i>9,1</i>
<i>CP (Cisplatina+Ciklofosfamid)</i>	<i>1</i>	<i>9,1</i>
<i>CEP (Epirubicin+Endoxan+Cisplatina)</i>	<i>1</i>	<i>9,1</i>
<i>Ukupno</i>	<i>11</i>	<i>100,0</i>

Prosječne vrijednosti veličine tumora i preoperacijskih vrijednosti serumskih biljega u skupini bolesnica s atipičnim proliferativnim tumorom i bolesnica s karcinomom jajnika prikazane su u tablici 5. Prosječna veličina atipičnih proliferativnih tumora nešto je veća, ali

ne i statistički značajna u odnosu na karcinome. Od tri analizirana serumska biljega, jedino je CA 125 bio statistički značajno povišen u bolesnica s karcinomom jajnika.

Tablica 5: Veličina tumora i serumski tumorski biljezi u bolesnica s atipičnim proliferativnim tumorom (APT) i karcinomom jajnika

	APT	Karcinom	p
Veličina tumora (cm)	15,4	12,8	0,482
CA 125 (kI/l)	143,8	401,5	0,037
CA 15-3 (kI/l)	20,5	57,5	0,141
CA 19-9 (kI/l)	31,3	42,3	0,418

3.2. Laboratorijske metode

3.2.1. Prikupljanje uzoraka

3.2.1.1. Materijali

Sterilne epruvete za prikupljanje uzoraka krvi s EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), sterilne epruvete s MEM medij – Minimal Essential Eagle's Medium (Gibco), RNALater otopinom (Ambion) za uzorke tkiva.

3.2.1.2. Metode

Uzorci tumora jajnika prikupljeni su u Klinici za ženske bolesti i porode Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom operacije dio tkiva je pohranjen u MEM (Minimal essential medium) medij za rast stanica, dio je pohranjen u RNALater otopinu, a dio poslan na standardnu patološku obradu. Uz tumorsko tkivo je iz istog pacijenta također prikupljen i uzorak tkiva (jajnika ili jajovoda), koje nije zahvaćeno tumorom.

Tkivo pohranjeno u MEM mediju čuvano je na +4°C maksimalno 2-3 sata nakon operacije prije obrade, odnosno uspostavljanja primarne kulture stanica. Tkivo pohranjeno u RNALater, također na +4°C, stajalo je manje od 24 sata prije izdvajanja DNA i RNA iz tkiva. Bolesnicama je uzeto i 5 ml krvi u epruvete koje sadrže antikoagulans EDTA, koje su pohranjene na -20°C prije izdvajanja DNA.

3.2.2. Rad sa staničnim kulturama

3.2.2.1. Materijali

MEM medij – Minimal Essential Eagle's Medium (Gibco)

Tripsin - 0,05% otopina tripsina u vodi (Gibco)

DMSO – dimetilsulfoksid (Kemika)

Humani serum (HS) termički inaktiviran humani serum za laboratorijski rad (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)

PBS bez Ca i Mg - 1,7 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄, pH 7,2

Medij za zamrzavanje stanica - 50% HS, 40% MEM, 10% DMSO

Ciklopamin (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada) otopina u etanolu koncentracije 1 mg/ml

Tomatidin (Sigma)– otopina u etanolu koncentracije 1 mg/ml

Protein Shh (poklon od dr. Kenney) vodena otopina pročišćenog proteina Shh koncentracije 3 mg/ml

Kurkumin (Sigma) otopina u DMSO koncentracije 7,36 mg/ml

MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (Sigma)

Sterilne plastične petrijevke promjera 10 cm (Sarstedt)

Sterilne plastične pločice s 96 bunarića (Sarstedt)

Krio-ampule za zamrzavanje stanica (Sarstedt)

Sterilne staklene epruvete volumena 10 ml i pipete volumena 5 ml i 20 ml

3.2.2.2. Metode

Sav rad sa staničnim kulturama odvija se u sterilnim uvjetima. Sve otopine, puferi i mediji su također sterilni. Rukovanje svime što je vezano uz stanične kulture odvija se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka, čija se radna površina briše alkoholom prije i nakon svake upotrebe, te sterilizira UV svjetlom.

3.2.2.3. Uspostavljanje primarne stanične kulture

Uzorak tkiva dopremljen u MEM mediju izvadi se sterilnom pincetom iz medija i kratko ispere u otopini tripsina. Zatim se uzorak tkiva prenese u sterilnu petrijevku promjera 10 cm (Sarstedt) i sterilnim škarcicama nasjecka na sitne komadiće u 5 ml tripsina. Takva mješavina se ostavi u inkubatoru preko noći (37^oC, 5% CO₂). Sljedeće jutro na nasjeckano tkivo se doda 10 ml MEM medija kompletiranog s 20% HS. Mješavina se tada razdijeli na 8

sterilnih petrijevki promjera 10 cm i svaka se petrijevka dopuni MEM medijem s 20% HS do ukupnog volumena 10 ml. Nakon 2-3 dana u petrijevka se mogu uočiti prihvaćene stanice. Stanice su dalje održavane u kulturi opisanim postupcima.

3.2.2.4. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Stanicama u kulturi poželjno je promijeniti medij svaka dva do tri dana. Kad stanice narastu toliko da gotovo potpuno prekriju podlogu (postanu konfluentne), treba ih presađiti. Prvo im se ukloni sav medij. Tada se na stanice stavi 5 ml PBS bez Ca i Mg, da se isperu od zaostalog seruma iz medija tako da se petrijevka kratko proljulja i PBS se izvadi i baci. Zatim se na stanice doda 1 ml tripsina te ostavi da djeluje 5-10 min, toliko da se stanice odvoje od podloge (tripsinizacija). Kad se stanice odvoje, na njih se doda 5 ml kompletiranog medija i dobro resuspendira propuhivanjem nekoliko puta kroz pipetu. Jedan ml otopine se nasadi u čistu petrijevku, te dopuni do 10 ml MEM medijem.

3.2.2.5. Zamrzavanje stanica

Za dugotrajno pohranjivanje stanice je najbolje zamrznuti. Bitno je zamrzavati stanice kad su optimalne gustoće (80-90% konfluentne). Postupak zamrzavanja počinje slično kao postupak presađivanja, dakle stanicama se ukloni medij, isperu se PBS-om bez Ca i Mg i tripsiniziraju. Tripsinizirane stanice se resuspendiraju u 5 ml medija i prenesu u sterilnu staklenu epruvetu te ostave na hladnom (u hladnjaku na +4°C ili na ledu) pola sata do sat, da se polako ohlade. Nakon toga stanice se centrifugiraju na 1200 rpm 5 min u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Odmah nakon centrifugiranja sa stanica se odlije supernatant, a talog se resuspendira u 1 ml hladnog medija za zamrzavanje stanica i odmah prebaci u krio-ampulu. Takva ampula se odmah pohranjuje u hladnjak na -80°C, gdje treba stajati barem 1-2 dana (a može i do nekoliko mjeseci). Za dulje skladištenje takve ampule se pohranjuju u tekući dušik.

3.2.2.6. Odmrzavanje stanica

Prilikom odmrzavanja bitno je stanice odlediti što brže. U sterilnu staklenu epruvetu stavi se 5 ml medija, u kojem stanice rastu. Ampula sa zamrznutim stanicama se malo zagrije u ruci, toliko da se zaleđena smjesa odvoji od stijenke ampule, ali da većina sadržaja još ostane zaleđena. Sadržaj se brzo prelije u staklenu epruvetu s medijem te centrifugira na 1200 rpm 5 minuta. Na taj način se stanice isperu od krioprotektanta DMSO i istalože na dno epruvete. Odmah nakon centrifugiranja supernatant se odlije, a talog stanica se resuspendira u

10 ml medija s 10% HS i prenese u petrijevku promjera 10 cm. Petrijevka se malo proljulja da se sadržaj sa stanicama jednoliko rasporedi, te se pohrani u inkubator (37°C, 5% CO₂).

3.2.2.7. Pokusi inhibicije i aktivacije signalnog puta u kulturi stanica

Stanice su nasađene u 4 petrijevke u po 10 ml kompletnog medija (s 10% seruma). Nakon 24 sata, što je stanicama koje rastu zalijepljene na podlogu dovoljno da se uhvate, u medij su dodani ciklopamin (konačna koncentracija 1 µg/ml), tomatidin (konačna koncentracija 1 µg/ml) ili Shh protein (2,8 µg/ml). Stanice su sa odgovarajućim spojem inkubirane još 24 h u inkubatoru, a zatim je iz njih izdvojena RNA.

3.2.2.8. MTT test

MTT je žuti spoj koji se reducira u ljubičasti formazan u živim stanicama. Koristi se za mjerenje preživljenja stanica nakon tretmana kemijskim agensima. U ovom radu MTT test korišten je za praćenje rasta i preživljenja stanica nakon tretmana kurkuminom.

Stanice se nasade u pločicu s 96 bunarića gustoće 10⁵ stanica/ml, u ukupni volumen 180 µl medija po bunariću, u četiriplikatima. Uz to se na dodatnu pločicu s 96 bunarića nasade stanice u još 4 bunarića za kontrolno očitavanje, tzv. „multi dan“. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja, kad se stanice uhvate za podlogu, na njih se dodaje po 20 µl kemijskih spojeva koje testiramo u različitim koncentracijama. U tablici 6 prikazano je na koji način su spojevi razrjeđivani u mediju u kojem se obično uzgajaju stanice.

Tablica 6: Razrjeđivanje kemijskih spojeva u mediju.

Početna koncentracija	Ciljna koncentracija radne otopine	Volumen spoja za radnu otopinu	Volumen medija za radnu otopinu	Volumen radne otopine koji se dodaje na stanice	Konačna koncentracija na stanicama
20 mM	0 µM	0 µL	250 µL	20 µL	0 µM
20 mM	50 µM	0.625 µL	249.37 µL	20 µL	5 µM
20 mM	100 µM	1.25 µL	248.75 µL	20 µL	10 µM
20 mM	150 µM	1.875 µL	248.12 µL	20 µL	15 µM
20 mM	200 µM	2.5 µL	247.5 µL	20 µL	20 µM
20 mM	250 µM	3.125 µL	246.87 µL	20 µL	25 µM
20 mM	300 µM	3.75 µL	246.25 µL	20 µL	30 µM
20 mM	350 µM	4.375 µL	245.62 µL	20 µL	35 µM

Istoga dana, stanice nasadene „nulti dan“ tretiraju se otopinom MTT, na način da se ukloni medij sa stanica te se na njih doda 40 µl MTT otopine koncentracije 1 mg/ml. Pločica se zamota u aluminijsku foliju kako bi se zaštitila od svjetla i inkubira 5 sati u inkubatoru na 37°C i pri 5% CO₂. Osim na stanice, čisti MTT se dodaje u 4 dodatna bunarića, kako bi se izmjerila osnovna obojenost MTT otopine za normalizaciju. Nakon 5 sati na stanice s MTT otopinom doda se 160 µl DMSO i stavi na tresilicu 10 minuta, kako bi se kristalići formazana dobro otopili. Što je otopina ljubičastija, to je više vijabilnih stanica, dok bunarići s mrtvim stanicama uglavnom ostaju obojani žuto. Obojenost otopine mjerena je fluorimetrijski, na uređaju Labsystems Multiskan MS pri apsorpciji od 570 nm. Isto očitavanje napravi se i u pločicama koje su tretirane kemijskim spojevima, i to 24, 48 ili 72h nakon tretmana. Sve su vrijednosti unesene i matematički obrađene u programu Excel, kako bi se dobio postotak preživljenja stanica pri svakoj koncentraciji kemijskog agensa u odnosu na netretirane stanice.

3.2.2.9. Tretman kurkuminom

Stanice su nasadene u 4 petrijevke u po 10 ml kompletnog medija (s 10% seruma). Nakon 24 sata, u medij je dodan kurkumin (konačna koncentracija 10µM). Stanice su s kurkuminom inkubirane 24, 48 i 72 sata te je nakon odgovarajućih perioda iz njih izdvojena RNA.

3.2.3. Izdvajanje DNA iz tkiva

3.2.3.1. Materijali

Pufer za izdvajanje DNA - 0.01 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0

Proteinaza K (Sigma) – vodena otopina koncentracije 12.5 mg/ml

TE pufer - 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6

Fenol (Kemika)

Kloroform (Kemika)

Izoamilni alkohol (Kemika)

Etilni alkohol (etanol) (Kemika)

Sterilne staklene Pasteurove pipete sa zataljenim vrhom

Sterilne škariće

Mikroeprovete volumena 2 ml

3.2.3.2. Metode

Tkivo tumora pohranjeno u RNALater otopini izvadi se sterilnom pincetom i sterilnim škaricama razdijali na dva dijela, od kojih jedan služi za izdvajanje DNA a drugi za izdvajanje RNA. Tkivo za izdvajanje DNA istim se sterilnim škaricama usitni na male komadiće i stavi u 1 ml pufera za izdvajanje DNA. U mješavinu se doda još 20 µl proteinaze K te se sve stavi na termoblok tresilicu na 37°C preko noći ili dulje, koliko je potrebno da se komadići tkiva djelovanjem proteinaze razgradi. Nakon proteolitičke razgradnje tj. kada je smjesa gusta i homogena, prelazi se na drugu fazu izolacije. Prvo se u uzorak doda 1ml fenola (ekvilibriranog s Tris-HCl), dobro protrese, i centrifugira 10 minuta pri 13000xg. Nakon centrifugiranja smjesa se razdvoji u dvije faze, gornju bistru vodenu fazu, i donju žućkastu fenolnu fazu. Pipetom se pažljivo gornja faza prenesu u novu mikroeprijetu i na nju se doda 1 ml mješavine kloroform:izoamilni alkohol (24:1), dobro protrese i centrifugira 10 minuta pri 13000xg. I ovaj put dolazi do razdvajanja u dvije faze, gornju vodenu i donju alkoholnu fazu, i u ovom slučaju su obje prozirne. Iz gornje faze se pipetom izvadi 600 µl sadržaja i prenese u čistu mikroeprijetu, te se na to doda 1200 µl ledenog apsolutnog alkohola. Nakon dodavanja alkohola dolazi do precipitacije DNA što se može vidjeti golim okom kao stvaranje i agregiranje bijelih niti u otopini. Te bijele niti se izvrtanjem mikroepriete nekoliko puta agregiraju u grudicu, koja se onda izvadi iz otopine sterilnom staklenom kukom odnosno Pasteurovom pipetom s zataljenim vrhom i prenesu u čistu mikroeprijetu. Grudica DNA otopi se u odgovarajućem volumenu TE pufera ovisno o veličini grudice, obično između 100 i 500 µl.

3.2.4. Izdvajanje RNA iz tkiva

3.2.4.1. Materijali

TRIZOL reagens (Invitrogen) komplet za izdvajanje RNA iz stanica (Roche High Pure RNA Isolation Kit), sadrži:

- pufer za vezanje/ lizu (Lysis/Binding Buffer: 4.5 M gvanidin hidroklorid, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton, pH 6.6)
- DNaza I – otopljena u pripadajućem puferu (DNase Incubation Buffer: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7.0), nanosi se 200 U po kolonici
- Pufer za ispiranje I (Wash buffer I: 5 M gvanidin hidroklorid, 20 mM Tris-HCl, 38% etanol, pH 6.6)

- Pufer za ispiranje II (Wash buffer II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 8% etanol, pH 7.5)
- Pufer za eluciju (Elution buffer: sterilna voda bez prisutnosti nukleaza)
- Kolonice za izolaciju

Izopropanol (2-propanol)

Kloroform

Etilni alkohol (etanol)

Mikroeprevete volumena 1.5-2 ml

Sterilne škarice

Sterilna staklena epruveta volumena 10 ml

3.2.4.2. Metode

Svi koraci izdvajanja RNA rade se na ledu, osim ako je drugačije navedeno, kako bi RNA očuvala svoj integritet. Također, svi koraci centrifugiranja se rade u centrifugi ohlađenoj na +4°C. Prvo se tkivo usitni sterilnim škaricama u 1 ml TRIZOL reagensa, te se dodatno usitni homogeniziranjem u TRIZOL reagensu na ledu (homogenizator IKA Ultra Turrax). Takav homogenat se ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi da dođe do dobrog razaranja tkiva. Na mješavinu se doda 200 µl kloroforma, dobro promućka, i ostavi stajati još dodatnih 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se uzorak centrifugira 15 minuta pri 13000xg u hlađenoj (+4°C) centrifugi. Nakon centrifugiranja dolazi so razdvajanja faza u gornju bezbojnu vodenu fazu, bijelu gustu međufazu, te donju ružičastu fenolnu fazu. RNA se nalazi u gornjoj fazi, koja se pipetom prenese u čistu mikroeprevetu i na to se doda još 500 µl izopropanola, promućka i ostavi stajati 15 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi došlo do taloženja RNA. Tada se mikroepreveta opet centrifugira 30 minuta pri 13000xg u hlađenoj centrifugi, nakon čega dolazi do taloženja RNA na dno mikroeprevete u obliku poluprozirnog bijelog taloga. S taloga se pažljivo izlije supernatant, te se na talog doda 1.5 ml 70% etanola kako bi se talog dobro isprao. Slijedi još jedno centrifugiranje u hlađenoj centrifugi pri 13000xg 10 minuta. Nakon toga se etanol izlije s taloga, koji je sada postao bijel, te se talog otopi u 100 µl vrlo čiste vode. Sada slijedi dodatni postupak pročišćavanja RNA koristeći otopine iz kompleta za izdvajanje RNA iz stanica (Roche High Pure RNA Isolation Kit). Prvo se u otopljenu RNA doda 200 µl pufera za vezanje/lizu (Lysis/Binding Buffer) i mješavina se nanese na kolonice za izdvajanje RNA. Kolonice se kratko centrifugiraju (13000xg, 15 s),

kako bi se RNA vezala na kolonu. Nakon toga se eluat s kolonice baca, a na kolonicu se nanosi 100 µl otopine DNaze I, koja se tada inkubira 15 min na sobnoj temperaturi, kako bi DNaza razgradila eventualno preostalu DNA u uzorku. Nakon inkubacije, na kolonicu se nanosi 500 µl pufera za ispiranje I (Wash Buffer I) i kratko centrifugira (1300xg, 15 s). Eluat se opet baca, a na kolonicu nanosi 500 µl pufera za ispiranje II (Wash Buffer II) te centrifugira na 1300xg 15 s. Slijedi još jedan ciklus ispiranja, ovaj put se nakon bacanja eluata dodaje 200 µl pufera za ispiranje II i centrifugira na 1300 rpm kroz 2 minute. Nakon ovog ispiranja slijedi skidanje RNA s kolonice, i to tako da se kolonica prenese u čistu mikroeprevetu volumena 1,5 ml, na nju se doda 30-50 µl pufera za eluciju (Elution Buffer) i centrifugira na 1300xg 1 min. Eluat sakupljen u mikroepreveti sadrži pročišćenu RNA. RNA se pohranjuje u hladnjaku na -80°C.

3.2.5. Izdvajanje DNA iz krvi

3.2.5.1. Materijali

RCLB pufer - 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, pH 7,6

SE pufer - 20 mM Tris-HCl, 4 mM Na₂EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4

10% SDS

Proteinaza K – vodena otopina koncentracije 12,5 mg/ml

5M NaCl

Izopropanol

Staklene epruvete za prikupljanje uzoraka krvi koje sadrže EDTA

Plastične epruvete volumena 50 ml (Sarstedt)

Plastične epruvete volumena 13 ml (Sarstedt)

Sterilne staklene pasterove pipete sa zataljenim vrhom

3.2.5.2. Metode

DNA je najbolje izdvajati iz krvi koja je prethodno bila zamrznuta, jer dolazi do bolje lize eritrocita i dobiva se čišća DNA. Prvo se krv u epruvetama ostavi na sobnoj temperaturi da se potpuno otopi. Krv se prelije iz staklene epruvete u plastičnu epruvetu volumena 50 ml te se do vrha dopuni puferom RCLB, lagano promućka i ostavi stajati na ledu 15 minuta. Zatim se epruvete centrifugiraju 10 minuta na 4100xg, nakon čega se dobije crvenkasti talog na dnu epruvete. Supernatant se izlije, a na talog doda 5-10 ml RCLB pufera, epruveta se vorteksira da se razbije talog, dopuni do 25 ml RCLB puferom te centrifugira pod istim

uvjetima kao u prethodnom koraku. Nakon centrifugiranja provjeri se boja taloga; ukoliko je crven, cijeli postupak ispiranja ponavlja se do bijele boje taloga te se zatim nastavlja sa sljedećim korakom. Iz epruveta se izlije supernatant i epruvete se izvrtu na papir, da se što bolje ocijede. Tada se doda 2 ml SE pufera, 200 μ l 10% SDS-a i 15-20 μ l proteinaze K. Takve epruvete stave se u vodenu kupelj na 37°C preko noći. Sljedeći dan sadržaj se prelije u čiste epruvete volumena 13 ml, doda se 750 μ l 5M NaCl i vorteksira dok otopina ne postane mliječno bijela. Centrifugira se 15 minuta pri 4100xg, prelije u čiste epruvete i ponovno centrifugira pri istim uvjetima. Nakon toga se sadržaj opet prelije u čiste epruvete i doda se 3.5 ml izopropanola, nakon čega dolazi do taloženja DNA u obliku bijelih niti i grudica. Grudica se uhvati i otopi na isti način kako je već opisano kod izdvajanja DNA iz tkiva.

3.2.6. Izdvajanje RNA iz stanica

3.2.6.1. Materijali

Komplet za izdvajanje RNA iz stanica (Roche High Pure RNA Isolation Kit), sadrži:

- pufer za vezanje/lizu (Lysis/Binding Buffer: 4.5 M gvanidin hidroklorid, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton, pH 6.6)
- DNaza I – otopljena u pripadajućem puferu (Dnase Incubation Buffer: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7.0), nanosi se 200 U po kolonici
- Pufer za ispiranje I (Wash buffer I: 5 M gvanidin hidroklorid, 20 mM Tris-HCl, 38% etanol, pH 6.6)
- Pufer za ispiranje II (Wash buffer II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 8% etanol, pH 7.5)
- Pufer za eluciju (Elution buffer: sterilna voda bez prisutnosti nukleaza)
- Kolonice za izolaciju

Mikroepruvete volumena 1,5-2 ml

3.2.6.2. Metode

Izdvajanje RNA iz stanica radi se na identičan način kao i druga faza izolacije iz tkiva. Točnije, sa stanica se prvo ukloni medij te se na njih stavi 5 ml PBS-a. Stanice se skinu strugačem s podloge i pipetom prenesu u plastičnu epruvetu od 13 ml. Epruveta se centrifugira pri 4100xg 5 minuta u centrifugi ohlađenoj na +4°C, te se nakon toga supernatant izlije, a stanice ostanu na dnu epruvete kao bijeli talog. Tada se na stanice doda 400 μ l pufera za vezanje/lizu (Lysis/Binding Buffer), iz kompleta za izdvajanje RNA iz stanica (Roche

High Pure RNA Isolation Kit), a svi daljni koraci identični su već opisanim u poglavlju 3.2.4.

3.2.7. Određivanje koncentracije DNA i RNA

3.2.7.1. Materijali

Destilirana voda

Mikroeprevete volumena 1.5-2 ml

Kivete od kvarcnog stakla

3.2.7.2. Metode

Koncentracija se mjeri na spektrofotometru pri valnim duljinama apsorpcije 260 nm i 280 nm. RNA se razrijedi 100 puta u destiliranoj vodi (1 µl RNA + 99 µl vode), dok se DNA obično razrijedi 200 puta (5 µl DNA + 995 µl vode). Spektrofotometar se kalibrira tako da voda korištena za razrjeđivanje bude vrijednost 0. Tada se uzorak nanese u kivetu i mjeri apsorpcija pri 260 nm i 280 nm. Koncentracija se izračuna prema sljedećoj formuli:

Za RNA: $C = A_{260} \times 40 \times R$

Za DNA: $C = A_{260} \times 50 \times R$,

gdje je C koncentracija, A_{260} vrijednost apsorpcije pri valnoj duljini od 260 nm, a R faktor razrjeđenja (u ovom slučaju 100 za RNA i 200 za DNA). Također, provjeravajući omjer A_{260}/A_{280} , može se provjeriti i čistoća izdvojene RNA, naime, što je RNA čistija, taj omjer je bliži 2, dok je za čistu DNA taj omjer 1,7. DNA se razrijedi vodom, tako da konačna koncentracija iznosi 50 ng/µl.

3.2.8. Provjera kvalitete RNA na agaroznom gelu

3.2.8.1. Materijali

Agaroz (Sigma)

TAE pufer - 0,04 M Tris acetat, 0,001 M EDTA

Etidij-bromid (Sigma) vodena otopina koncentracije 5 mg/ml

Pufer za nanošenje - 50% glicerol, 0,05% ksilen-cijanol, 0,05% bromfenol blue

3.2.8.2. Metode

Kvalitetu RNA najjednostavnije je provjeriti elektroforezom u 1% (w/v) agaroznom gelu. Gel se radi tako da se 0,6 g agaroze pomiješa sa 60 ml TAE pufera i zagrije u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Tada se zrnca agaroze rastope. Toplu agarozu treba malo ohladiti pod mlazom hladne vode, i zatim dodati 10 µl otopine etidij-bromida. Takav gel se izlije u pripremljenu kadnicu za elektroforezu, dodaju se češljevi za jažice, i ostavi da se ohladi i polimerizira pola sata do sat vremena. Nakon što gel polimerizira, ukloni se češljčić i gel se položi u sistem za elektroforezu, koji je napunjen TAE puferom. 2-3 µl uzorka RNA se pomiješa s 1-2 µl pufera za nanošenje i nanese u jažicu na gelu. Elektroforeza se odvija 15-20 minuta pri 100 V. Nakon toga se pruge na gelu vizualiziraju na aparatu ImageMaster. Ukoliko se na gelu vide dvije do tri jasne pruge, i bez signala pri samom vrhu gela kod jažica, RNA se smatra dobre kvalitete. Zagađenje pri vrhu jažica bi ukazivalo na kontaminaciju s DNA, dok bi difuzne i slabo vidljive pruge značile da je došlo do degradacije RNA.

3.2.9. Reverzna transkripcija

3.2.9.1. Materijali

Komplet za reverznu transkripciju, sadrži:

- enzim MultiScribe® reverzna transkriptaza
- 2 vrste početnica – nasumični heksamerni and oligo(dT)
- Inhibitor RNaza
- 25 mM MgCl₂
- 10x RT pufer
- 10 mM mješavina dNTP-ova

sterilna voda bez prisutnosti nukleaza

mikroeprovete volumena 200 µl

3.2.9.2. Metode

Za potrebe analize ekspresije gena potrebno je napraviti *real-time* PCR. Kako je RNA osjetljiva molekula, potrebno ju je prvo prevesti u komplementarnu DNA (cDNA), koja je znatno stabilnija. To se radi pomoću enzima reverzna transkriptaza, koja transkribira RNA u cDNA.

U reakciju reverzne transkripcije ide se s poznatom količinom RNA, obično 1 µg. Iz koncentracije RNA prvo je potrebno preračunati koliki volumen uzorka treba odmjeriti da ukupna količina bude 1 µg. Zatim se radi reakcijska smjesa svih komponenata, osim RNA i vode. Reakcijska smjesa sadrži 10x pufer (10% v/v), 5,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 1,25 µM nasumičnih heksamera, 1,25 µM oligo dT početnica, 20 U inhibitora Rnaza te 62,5 U reverzne transkriptaze za reakciju od 50 µl. Ukupni volumen ovih komponenata iznosi 30,75 µl, što znači da se do 50 µl reakcija još nadopuni određenim volumenom RNA (kako bi u reakciji bio 1 µg RNA) i vodom.

Tablica 7: Komponente za reakciju kvantitativnog *real-time* PCR-a

komponenta	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen (za reakciju od 50 µl)
10x pufer	10 x	1 x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	5,5 mM	11 µl
dNTP	10 mM	2 mM	10 µl
oligo dT	50 µM	1,25 µM	1,25 µl
nasumični heksameri	50 µM	1,25 µM	1,25 µl
Inhibitor RNAze	20 U/µl	20 U	1 µl
reverzna transkriptaza	50 U/µl	62,5 U	1,25 µl

Reakcija se odvija u uređaju za PCR na sljedećem programu:

25°C 10:00 min

37°C 60:00 min

95°C 5:00 min

4°C ∞

Nakon reakcije cDNA se pohranjuje na -20°C do korištenja.

3.2.10. Kvantitativni real-time PCR

3.2.10.1. Materijali

IQ SYBR Green Supermix (2x mješavina)

Parovi početnica za korištene gene (u zagradi je pripadajuća referenca):

- Arp F 5' GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG 3' (49)
- Arp R 5' TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC 3' (49)
- Ptch F 5' TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC 3' (50)
- Ptch R 5' CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA 3' (50)
- Smo F 5' CTGGTACGAGGACGTGGAGG 3' (51)
- Smo R 5' AGGGTGAAGAGCGTGCAGAG 3' (51)
- Gli1 F 5' GCCGTGTAAAGCTCCAGTGAACACA 3' (50)
- Gli1 R 5' TCCCACCTTTGAGAGGCCCATAGCAAG 3' (50)
- Shh F 5' GAAAGCAGAGAACTCGGTGG 3' (51)
- Shh R 5' GGTAAGTGAGGAAGTCGCTG 3' (51)
- SuFu F 5' AACAGCAAACCTGTCCTTCC 3' (52)
- SuFu R 5' TCAGATGTACGCTCTCAAGC 3' (52)
- β -cat F 5'-GCGTGGACAATGGCTACTCA-3' (53)
- β -cat R 5'-CCGCTTTTCTGTCTGGTTCC-3' (53)

10 mM mješavina dNTP-ova (Roche)

sterilna voda bez prisutnosti nukleaza

pločica s 96 bunarića za korištenje u real-time aparatu (BioRad)

3.2.10.2. Metode

Kvantitativni *real-time* PCR se radi u pojedinačnim mikroepruvetama ili pločicama s 96 bunarića za *real-time* uređaj. Ovdje je opisan postupak s pločicama s 96 bunarića, ali sam postupak za jedan ili drugi tip se ne razlikuje.

Za svaki od uzoraka se analiziralo 6 različitih gena: Ptch, Smo, Gli1, Shh, SuFu, β katenin, te referentni gen Arp. Prvo je potrebno napraviti reakcijsku mješavinu za svaki gen

odvojeno. U reakcijsku mješavinu se dodaje IQ SYBR Green Supermix 1x, početnica u 5'→3' smjeru (F) (0,3 mM), početnica u 3'→5' smjeru (R) (0,3 mM) te voda do ukupnog volumena 9 µl po uzorku. Mješavina se obično radi za veći broj uzoraka i tada razdijeli po 9 µl u odgovarajuće bunariće. *Real-time* PCR se izvodi minimalno u duplikatu za svaki uzorak, te svaki uzorak mora imati prateću reakciju s genom Arp, a dok se za reakcijsku mješavinu za svaki gen radi i jedna dodatna negativna kontrola, u koju se ne stavlja uzorak. Slika 4 prikazuje primjer jedne pločice s 96 bunarića, gdje je analizirano 3 para uzoraka na 7 različitih gena.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ARP 1-Z	ARP 1-Z	ARP 1-B	ARP 1-B	ARP 2-Z	ARP 2-Z	ARP 2-B	ARP 2-B	ARP 3-Z	ARP 3-Z	ARP 3-B	ARP 3-B
B	PTCH 1-Z	PTCH 1-Z	PTCH 1-B	PTCH 1-B	PTCH 2-Z	PTCH 2-Z	PTCH 2-B	PTCH 2-B	PTCH 3-Z	PTCH 3-Z	PTCH 3-B	PTCH 3-B
C	SMO 1-Z	SMO 1-Z	SMO 1-B	SMO 1-B	SMO 2-Z	SMO 2-Z	SMO 2-B	SMO 2-B	SMO 3-Z	SMO 3-Z	SMO 3-B	SMO 3-B
D	GLI1 1-Z	GLI1 1-Z	GLI1 1-B	GLI1 1-B	GLI1 2-Z	GLI1 2-Z	GLI1 2-B	GLI1 2-B	GLI1 3-Z	GLI1 3-Z	GLI1 3-B	GLI1 3-B
E	SHH 1-Z	SHH 1-Z	SHH 1-B	SHH 1-B	SHH 2-Z	SHH 2-Z	SHH 2-B	SHH 2-B	SHH 3-Z	SHH 3-Z	SHH 3-B	SHH 3-B
F	SUFU 1-Z	SUFU 1-Z	SUFU 1-B	SUFU 1-B	SUFU 2-Z	SUFU 2-Z	SUFU 2-B	SUFU 2-B	SUFU 3-Z	SUFU 3-Z	SUFU 3-B	SUFU 3-B
G	βCAT 1-Z	βCAT 1-Z	βCAT 1-B	βCAT 1-B	βCAT 2-Z	βCAT 2-Z	βCAT 2-B	βCAT 2-B	βCAT 3-Z	βCAT 3-Z	βCAT 3-B	βCAT 3-B
H	ARP n.k.	PTCH n.k.	SMO n.k.	GLI1 n.k.	SHH n.k.	SUFU n.k.	βCAT n.k.					

Slika 4: Raspored uzoraka na pločici s 96 bunarića u jednom tipičnom kvantitativnom *real-time* PCR eksperimentu.

Na jednaki način analizirana je i ekspresija gena nakon tretmana ciklopaminom, tomatidinom i Shh proteinom.

3.2.11. Imunohistokemijsko bojanje tkivnih rezova

3.2.11.1. Materijali

- tkivni parafinski prerezi debljine 5 µm na silaniziranim predmetnim stakalcima
- ksilen
- etilni alkohol (etanol)

- destilirana voda
- otopina za renaturaciju proteina (Epitope Retrieval Solution, Dako Cytomation)
- hidrofobna olovka (PapPen, Invitrogen)
- tekućina za blokiranje nespecifičnog vezanja (Protein Block, Dako Cytomation)
- Primarna antitijela: goat anti-Ptch IgG (Santa Cruz, sc-6147)
 rabbit anti-Smo IgG (Santa Cruz, sc-13934)
 rabbit anti-Gli1 IgG (Santa Cruz, sc-20678)
 rabbit anti-Shh IgG (Santa Cruz, sc-9024)
- komplet za imunohistokemijsko bojanje (Dako LSAB+ System-HRP K0679), sadrži:
 - univerzalno sekundarno antitijelo protiv mišjih, kozjih i zečjih antitijela konjugirano s biotinom (Biotinylated link)
 - otopina peroksidaze konjugirane sa streptavidinom (Streptavidin-HRP)
 - DAB – diaminobenzidin, supstrat za peroksidazu, s pripadajućim puferom
- hematoksilin (DAKO Cytomation)
- Kanada balzam (Kemika)
- BSA – albumin iz seruma goveda

3.2.11.2. Metode

Tkivni parafinski prerezi debljine 0,6 μm zaljepljeni su na predmetnim stakalcima. Prvi korak u bojanju takvih rezova je deparafinizacija i rehidracija takvih rezova. Deparafinizacija se radi uranjanjem stakalaca u ksilen tri puta po tri minute. Ksilen otapa parafin i uklanja ga s tkiva, dok tkivo ostaje prilijepljeno na stakalce. Poslije deparafinizacije rezove je potrebno rehidrirati. To se radi postupno, uranjanjem stakalaca u niz alkohola sa sve većim udjelom vode. Počinje se uranjanjem u apsolutni etanol jednu minutu, a zatim još tri minute. Slijedi 90% (v/v) alkohol jednu minutu, pa 70% alkohol jednu minutu, i na kraju destiliranu vodu barem minutu. U međuvremenu je dobro pripremiti otopinu za renaturaciju proteina (Epitope Retrieval Solution) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici gotovo do vrenja. Stakalca se urone u zagrijani pufer i inkubiraju 10 minuta u hibridizacijskoj pećnici na 85°C. Nakon toga stakalca se u puferu ostave na sobnoj temperaturi 20 minuta da se ohlade. Prilikom hlađenja dolazi do renaturacije proteina, što olakšava kasniju detekciju antitijelima. Slijedi ispiranje u PBS-u 5 minuta, tijekom kojeg treba pripremiti tzv. vlažnu komoru. Vlažna komora je pokrivena posuda na čije dno se stavi sloj papirnatih ubrusa i sloj filter papira, i

dobro se namoči destiliranom vodom. To omogućava zadržavanje vlažnosti tijekom sljedećeg koraka inkubacije, kako ne bi došlo do isušivanja tkivnih rezova. Stakalca se nakon ispiranja izvade iz pufera, a uzorak na njima se okruži hidrofobnom olovkom (Pap-Pen) koja će spriječiti izlivanje tekućine s preparata. Unutar nacrtanog obrisa nakapa se kap-dvije tekućine za blokiranje nespecifičnog vezanja (Protein Block), toliko koliko je potrebno da preparat bude potpuno prekriven, i inkubira pola sata na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Nakon inkubacije tekućina se pokupi filter papirom, te se na rez dodaje 50 µl otopine primarnog antitijela, razrijeđeno 1:100 u 2%BSA/PBS. Rezovi se inkubiraju preko noći na +4°C u vlažnoj komori. Barem jedan rez koristi se kao negativna kontrola, koji se tretira na identičan način osim koraka dodavanja primarnog antitijela. Umjesto njega, na rez se dodaje jednaki volumen 2%BSA/PBS. Sljedeći dan rezovi se prvo ispiru tri puta po 5 minuta u PBS-u. Nakon toga na njih se nanosi univerzalno sekundarno antitijelo (Biotinylated Link), kap-dvije da prekrije preparat. Inkubacija traje 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se rezovi opet ispiru tri puta po 5 minuta u PBS-u. Nakon toga na rezove se nakapava otopina streptavidin-peroksidaze (Streptavidin-HRP), kap-dvije da prekrije preparat, te inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se opet ispiru tri puta po 5 minuta u PBS-u. Slijedi inkubacija sa substratom peroksidaze, DAB, svježe pripremljen prije nanošenja u priloženom puferu (LSAB + System-HRP K0679) i nanosi na preparat, oko 50 µl ili koliko je potrebno da prekrije preparat, u trajanju od 7 minuta. Tada se ispiru u vodovodnoj vodi 10 minuta. Zatim se rezovi urone u svježe filtrirani hematoksilin i drže pola minute do minutu, kako bi se dobilo pozadinsko bojanje preparata. Nakon hematoksilina rezovi su obojani blijedo ljubičasto. Još malo se ispiru u vodovodnoj vodi, oko 5 minuta, nakon čega počinje postupak dehidracije i uklapanja preparata. Dehidracija počinje uranjanjem preparata u 70% alkohol dva puta po minutu, zatim u 90% alkohol dva puta po minutu, i na kraju u apsolutni alkohol dva puta po minutu. Slijedi kupanje u ksilenu tri puta po tri minute, i na kraju uklapanje u kanada balzam. Uklapanje se radi na način da se kap kanada balzama kapne na sredinu preparata, te pažljivo preko toga položi čista pokrovnica, pazeći da ne ostanu mjehurići zraka. Nakon uklapanja preparati su spremni za mikroskopiranje.

3.2. 12. Detekcija polimorfizama gena Ptch1 i Smo

3.2.12.1. Materijali

10 mM mješavina dNTP-ova (Roche)

FastStart Taq DNA polimeraza (Roche)

fluorescentna boja LCGreen Plus (Idaho Technology)

pufer s 20 mM MgCl₂ (Idaho Technology)

parovi početnica za svaki fragment

mineralno ulje

kapilare za PCR (Roche LightCycler Capillaries)

Tablica 8: Parovi početnica za eksone gena Ptch1

Ekson	Početnica	Referenca
Ekson 1	F – GCAACATGGCCTCGGCTGGT R – CCTTGAAATCTGCTCCAGAG	vlastiti dizajn
Ekson 2	F – ACTCCTCCCTTCTGCTTCGT R – GCTCTTACCTTCCACCCACA	(54)
Ekson 3	F – CTATTGTGTATCCAATGGCAGG R – ATTAGTAGGTGGACGCGGC	(55)
Ekson 4+5	F – GAGAAATTTTGTCTCTGCTTTTCA R – TGGAACAAACAATGATAAGCAA	(55)
Ekson 6	F – CCTACAAGGTGGATGCAGTG R – TTTGCTCTCCACCCTTCTGA	(55)
Ekson 7	F – GTGACCTGCCTACTAATTCCC R – GGCTAGCGAGGATAACGGTTTA	(55)
Ekson 8	F – GAGGCAGTGGAAACTGCTTC R – TTGCATAACCAGCGAGTCTG	(55)
Ekson 9	F – GTGCTGTTCGAGGCTTGTG R – AGAAGCAGGAGCAGTCATGG	(55)
Ekson 10	F – TTCGGCTTTTGTCTGTGC R – CCGGTGGCATTGTCAAC	(54)
Ekson 11	F – GTGTTAGGTGCTGGTGGCA R – CTTAGGAACAGAGGAAGCTG	(55)
Ekson 12	F – GACCATGTCCAGTGCAGCTC R – CGTTCAGGATCACCACAGCC	(56)
Ekson 13	F – TGCTTCAAGAGGAAAGGGAA R – ATCAAAAGGCCACAGCAGTC	(54)
Ekson 14a	F – CCATTTCCCTGTTTCAGCAT R – AGCTGAGGGTGTCTGTGTC	(54)
Ekson 14b	F – TCCGAGATCTCTGTGCAGC R – TTTTGAAGACAGGAAGAGCC	(54)
Ekson 15	F – GACAGCTTCTCTTTGTCCAG R – ACGCAAAGACCGAAAGGACGA	(55)
Ekson 16	F – AGGGTCCTTCTGGCTGCGAG R – TCAGTGCCAGCAGCTGGAGTA	(55)
Ekson 17	F – AACCCATTCTCAAAGGCCTCTGTTC R – CACCTCTGTAAGTTCCAGACCT	(55)
Ekson 18	F – AACTGTGATGCTCTTCTACCCTGG R – AA ACTTCCCGGCTGCAGAAAGA	(55)
Ekson 19	F – TTTGATCTGAACCGAGGACACC R – CAAACAGAGCCAGAGGAATGG	(55)
Ekson 20	F – ACCAGGTGAAGTCCAGCAAC R – GGCCCAATCACAATGATTTC	(54)
Ekson 21	F – TGTTCCCGTTTCCTCTTG R – GCACAGGAAACACAGCATTC	(56)
Ekson 22	F – CGTGCTTTGAGCTTTGAGTG R – CACTACCACGGGTGGGAAGAC	(56)
Ekson 23a	F – AAACCCAGGGAGGGAAGTGT R – GCCAGAATGCCCTTCAGTAG	(54)
Ekson 23	F – AGAAAAGGCTTGTGGCCAC R – TCACCCTCAGTTGGAGCTG	(55)

Tablica 9: Parovi početnica za ekson 9 i 10 gena Smo

Ekson	Početnica	Referenca
Ekson 9	F- CCTGTCTACGTTCCCTCACTG R – GTGAGGCGGGCAGGGCAGGAG	(57)
Ekson 10	F – CAGCTTCTTCACGCTCCTTCCC R – CGGGGCCAGGCGGCTCCGGTA	(57)

3.2.12.2. Metode

Ptch1 gen se sastoji od 24 eksona i ukupne duljina kodirajuće regije iznosi 7941 pb. To znači da je za kompletnu analizu cijelog gena potrebno više PCR reakcija koje prekrivaju cijeli gen. U ovom slučaju kodirajuća regija PTCH1 gena podijeljena je na 24 PCR produkta, duljina 168 do 428 pb. Gen Smo se sastoji od 12 eksona i ukupna duljina kodirajuće regije iznosi 3738 pb. Za gen Smo je poznato da sadrži tzv. vruća mjesta (engl. *hot spots*) za mutacije, koja se nalaze u eksonima 9 i 10. Stoga je analiza mutacija gena Smo ograničena na ova dva eksona. Mješavina komponenti PCR-a za oba gena je u osnovi ista, razlikuje se samo po nukleotidnim slijedovima korištenih početnica. Volumen mješavine iznosi 10 µl, te sadrži: 50 ng DNA, 0,2 mM mješavine dNTP-ova, 0,4 U FastStart Taq DNA polimeraze, 1x fluorescentnu boju LCGreen Plus, 2 mM MgCl₂ i po 0.5 mM F i R početnice za pojedini ekson. Na kraju se mješavina nadsvodi s 3-5 µl mineralnog ulja kako bi se izbjeglo isparavanje uzorka tijekom reakcije. Reakcija se odvijala u kapilarama (Roche LightCycler Capillaries) u instrumentu RapidCycler2 (Idaho Technology). Nakon početne denaturacije od 4 minute na 95°C, slijedi 40 ciklusa, svaki od 10 sekundi na 95°C, 10 sekundi na temperaturi sparivanja (ovisno o fragmentu, temperature prikazane u tablici 10), i 20 sekundi na 95°C. Nakon završne elongacije od 4 minute na 72°C, slijedi stvaranje heterodupleksa od 1 minute na 98°C i 5 minuta na 40°C.

Tablica 10. Prikaz uvjeta PCR reakcija po eksonima - temperature lijepljenja početnica

Gen	Ekson	Temperatura lijepljenja početnica
Ptch1	1	62°C
	2	57°C
	3	57°C
	4+5	57°C
	6	57°C
	7	60°C
	8	55°C
	9	55°C
	10	52°C
	11	55°C
	12	60°C
	13	56°C
	14A	57°C
	14B	57°C
	15	59°C
	16	62°C
	17	64°C
	18	64°C
	19	61°C
	20	55°C
	21	52°C
	22	61°C
	23	56°C
23A	57°C	
Smo	9	59°C
	10	59°C

Nakon PCR reakcije svaka kapilara je analizirana na HR-1 instrumentu (Idaho Technology), čime je za svaki PCR produkt dobivena krivulja taljenja. Sve krivulje taljenja za pojedini ekson su uspoređene međusobno te dodatno analizirane računalnom pretvorbom u derivacijsku krivulju (prva negativna derivacija fluorescencije ovisno o temperaturi) i krivulju razlike (oduzimanje vrijednosti fluorescencije svake od krivulja od referentne poznate krivulje). Sve krivulje koje su se razlikovale od poznatih uzoraka su dodatno sekvencirane, a također i poneke krivulje poznatih oblika kako bi se potvrdili dobiveni rezultati.

3.2.13. Sekvenciranje

3.2.13.1. Materijali

ExoSAP-IT enzim (USB)

Komplet za sekvenciranje (BigDye Terminator 1.1, Applied Biosystems)

Specifična početnica za određeni fragment

Etilni alkohol (etanol)

0.25 M EDTA

3 M NaCl

HiDi formamid

Mikroeprovete volumena 200 μ l

Mikroeprovete za aparat za sekvenciranje (Applied Biosystems)

3.2.13.2. Metode

Reakcija sekvenciranja počinje pročišćavanjem PCR produkta čija sekvenca nas zanima. 10 μ l PCR produkta se pipetom prenese u čistu mikroeprovetu te se u svaku mikroeprovetu doda 0,4 μ l ExoSAP-IT enzima. Uzorci se inkubiraju 30 minuta na 37°C, a potom zagriju 15 minuta na 85°C. Nakon pročišćavanja, na 2 μ l produkta se dodaje po 4 μ l otopine kompleta za sekvenciranje (BigDye Terminator 1.1) u vodi u omjeru 1:3, te po 1 μ l specifične početnice u jednom smjeru (koncentracije 10 mM). Mikroeprovete se podrgnu reakciji u PCR uređaju sa sljedećim uvjetima: 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. Po završetku reakcije radi se taloženje. Pomiješaju se etanol, 0,25 M EDTA i 3 M NaCl u omjeru 25:1:1, te se po 27 μ l takve mješavine dodaje u svaku mikroeprovetu, koja sadrži produkt sekvenciranja. Takva mješavina se ostavi stajati pola sata u mraku, nakon čega se mikroeprovete centrifugiraju 20 minuta pri 13000xg. Supernatant se izlije, i na talog se doda 125 μ l 70% etanola i centrifugira dodatnih 15 minuta pri 13000xg. Supernatant se opet istrese i talog se osuši na termobloku minutu do dvije na 95°C. Nakon toga se talog otopi u 20 μ l HiDi formamida, denaturira na 95°C 5 minuta i brzo ohladi na ledu, nakon čega je uzorak spreman za kapilarnu elektroforezu na aparatu za sekvenciranje ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Gotove sekvence analiziraju se u programu BioEdit.

3.2.14. LOH analiza

3.2.14.1. Materijali

Komplet za multipleks reakcije - QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN)

Fluorescentno obilježene početnice u 5'→3' smjeru (F) za određeni fragment

Početnice u 3'→5' smjeru (R) za određeni fragment

Mikroeprovete volumena 200 μ l

Mikroeprovete za aparat za sekvenciranje (Applied Biosystems)

3.2.14.2. Metode

LOH analiza se radi tako da se napravi PCR reakcija, nakon koje slijedi kapilarna elektroforeza na aparatu za sekvenciranje ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Za razliku od uobičajenih PCR reakcija ili reakcija sekvenciranja, za LOH analizu koristi se jedna fluorescentno obilježena početnica, dok je druga početnica standardna.

LOH analiza je korištena kako bi se potvrdili rezultati dobiveni analizom krivulje mekšanja. LOH analiza je bila ograničena samo na gen Ptch1, budući da se radi o tumor supresorskom genu čiji gubitak može dovesti do tumorigeneze. Za svaki uzorak učinjene su dvije paralelne reakcije s istim početnicama, jedna iz konstitutivne DNA (DNA iz krvi) a druga iz tumorske DNA. Jedan μl svakog PCR produkta pomiješan je s 12 μl Hi-Di formamida (Applied Biosystems, SAD) i 0,35 μl molekularnog markera LIZ-500 (Applied Biosystems, SAD) te denaturiran 2 minute na 95°C. Uzorci su zatim naneseni na kapilarni sekvencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) i nakon elektroforeze analizirani programom GeneMapper v. 3.0 (Applied Biosystems, SAD).

PCR reakcija se odvija pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija na 95°C 10 minuta, zatim 30 ciklusa 95°C 30 s, 61°C 2 min, 72°C 1 min te konačna elongacija 72°C 30 minuta. Uzorci su prvo analizirani na Ptch1 promotorsku regiju, a ukoliko se ta regija pokazala neinformativnom, analiza je proširena na dodatna 4 polimorfna markera (WI-19346, 203 WH8, D9S287 and D9S180) iz regija ispred i iza gena Ptch1. Uvjeti za dodatna 4 markera bili su: početna denaturacija na 95°C 15 minuta, zatim 19 ciklusa 95°C 30 s, 55°C 90 s, 72°C 1 min, te konačna elongacija 72°C 30 minuta, s kemikalijama iz kompleta za multipleks reakcije QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN).

3.2.15. Statistička analiza

3.2.15.1. Materijali

Microsoft Excel program (Microsoft)

MedCalc for Windows program (MedCalc Software)

3.2.15.2. Metode

Za vrijednosti ekspresije gena svi pokusi su rađeni u duplikatu te je za svaku vrijednost izračunata srednja vrijednost i standardna pogreška, koja je prikazana na grafikonima u programu Microsoft Excel.

Za analizu korelacije genske ekspresije korištena je neparametrijska korelacija po Spearmanu. Za usporedbu genske ekspresije među ispitivanim tumorima korišten je neparametrijski Mann-Whitneyev test. Fisherovim i χ^2 testom ispitivana je raspodjela pozitivnih imunohistokemijskih nalaza, kao i raspodjela pojavnosti genskih polimorfizama između skupina bolesnica definiranih prema kliničkim kriterijima.

Statistički značajnom smatrali smo p vrijednost manju od 0,05. Statistička analiza napravljena je u računalnom programu MedCalc for Windows, verzija 7.2.0.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

4. REZULTATI

4.1. Analiza ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli u karcinomima jajnika

Određivana je ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli (Ptch, Smo, Gli1, Shh, SuFu) i β -katenina u 15 parova uzoraka karcinoma jajnika (u tablici 11 zdravo okolno kontrolno tkivo - Z i tumorsko, bolesno tkivo - B) te je izražena kao Δ Ct vrijednost nakon normalizacije s *housekeeping* genom Arp. Δ Ct računa se na način da se od Ct vrijednosti za *housekeeping* gen oduzme vrijednost ciljnog gena.

Tablica 11. Δ Ct vrijednosti nakon normalizacije *housekeeping* genom Arp. Za svaki gen su prikazane najviša i najniža vrijednost, te srednja vrijednost.

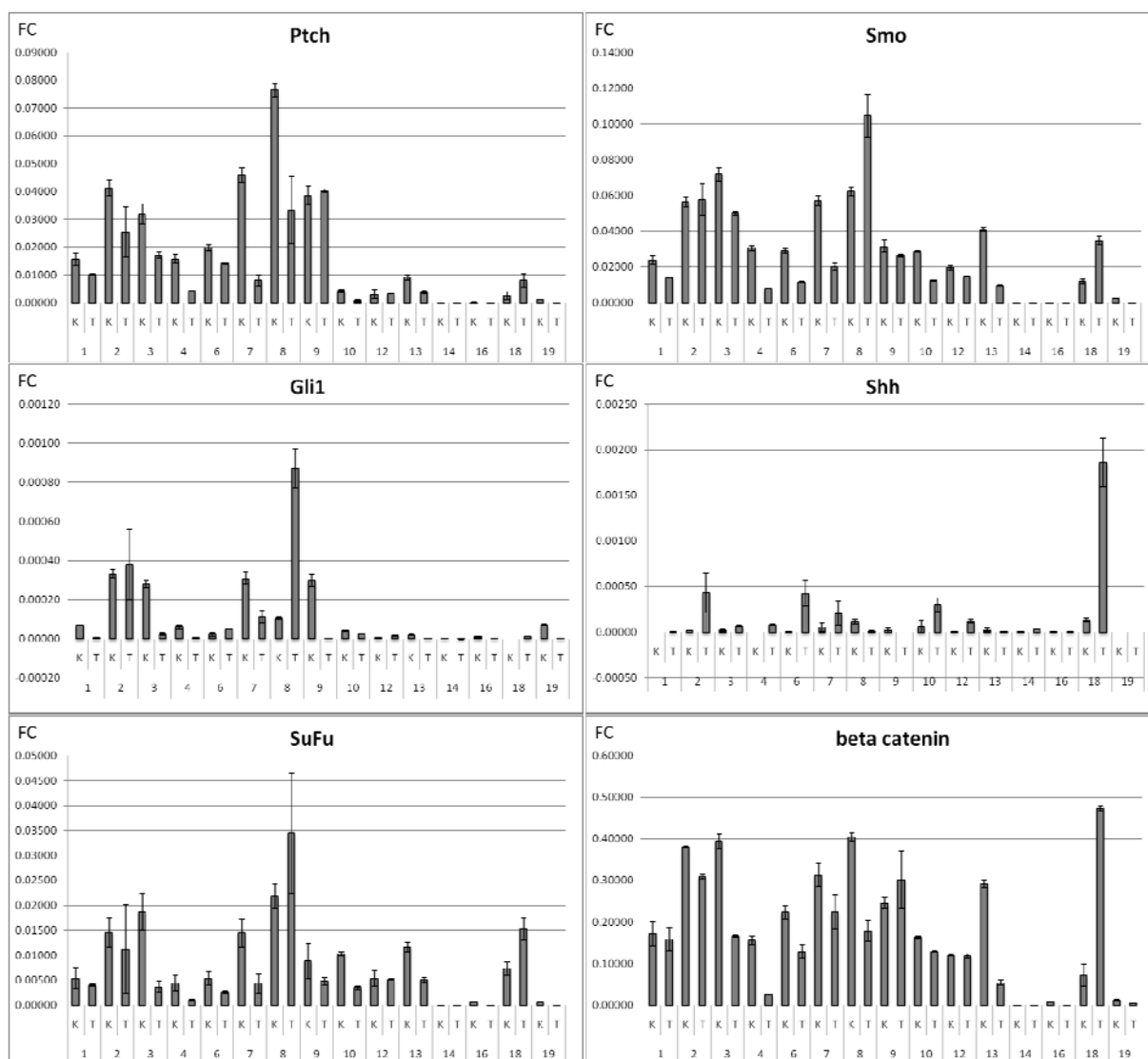
	Ptch		Smo		Gli1		Shh		SuFu		beta	
	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B
1	5.78	6.66	5.25	6.29	13.79	17.22	N/A	19.57	7.18	7.85	2.76	2.37
	6.22	6.57	5.53	5.99	13.81	17.37	N/A	18.69	7.87	8.08	2.31	2.94
	6.00	6.62	5.39	6.14	13.80	17.30	N/A	19.13	7.53	7.97	2.54	2.66
2	4.49	4.67	4.22	4.64	11.46	10.44	16.10	10.17	6.09	6.57	1.39	1.72
	4.70	5.91	4.08	3.59	11.66	12.28	15.56	12.20	6.10	6.39	1.40	1.66
	4.60	5.29	4.15	4.12	11.56	11.36	15.83	11.19	6.10	6.48	1.40	1.69
3	4.79	5.77	3.80	4.22	11.89	15.71	15.91	13.76	5.59	8.06	1.28	2.57
	5.15	5.97	3.79	4.42	11.69	14.90	14.71	13.99	5.89	8.12	1.41	2.61
	4.97	5.87	3.80	4.32	11.79	15.31	15.31	13.88	5.74	8.09	1.35	2.59
4	5.85	7.87	5.02	7.00	13.69	17.21	N/A	13.48	7.62	10.14	2.77	5.22
	6.14	7.83	5.03	7.01	14.27	17.41	N/A	13.63	8.03	9.85	2.60	5.31
	6.00	7.85	5.03	7.01	13.98	17.31	N/A	13.56	7.83	10.00	2.69	5.27
6	5.56	6.17	5.01	6.49	15.78	14.28	17.22	11.60	7.61	8.53	2.06	2.76
	5.76	6.12	5.22	6.40	14.96	14.33	18.60	10.79	7.49	8.74	2.27	3.14
	5.66	6.15	5.12	6.45	15.37	14.31	17.91	11.20	7.55	8.64	2.17	2.95
7	4.53	6.58	4.11	5.44	11.51	12.65	15.21	12.92	5.93	8.06	1.54	1.87
	4.36	7.39	4.14	5.82	11.81	13.55	13.20	11.51	6.29	7.59	1.81	2.44
	4.45	6.99	4.13	5.63	11.66	13.10	14.21	12.22	6.11	7.83	1.68	2.16
8	3.75	5.35	4.09	3.61	13.15	9.99	13.40	16.30	5.57	4.75	1.34	2.68
	3.66	4.46	3.92	2.90	13.29	10.34	12.82	16.37	5.47	4.96	1.27	2.29
	3.71	4.91	4.01	3.26	13.22	10.17	13.11	16.34	5.52	4.86	1.31	2.49
9	4.56	4.66	4.86	5.40	11.56	17.97	16.74	N/A	6.77	7.86	2.10	2.02
	4.83	4.61	5.11	5.08	11.86	17.98	14.54	N/A	6.87	7.53	1.95	1.43
	4.70	4.64	4.99	5.24	11.71	17.98	15.64	N/A	6.82	7.70	2.03	1.73
10	8.01	10.90	5.11	6.26	14.72	15.11	15.06	11.30	6.50	8.28	2.63	2.96
	7.75	9.86	5.15	6.37	14.42	15.24	13.01	12.14	6.69	8.08	2.59	2.94
	7.88	10.38	5.13	6.32	14.57	15.18	14.04	11.72	6.60	8.18	2.61	2.95
12	8.25	8.33	5.58	6.06	16.86	15.99	17.91	13.29	7.63	7.60	3.08	3.02
	7.79	8.29	5.77	6.12	17.22	15.69	19.89	12.82	7.45	7.60	3.06	3.14
	8.37	8.31	5.68	6.09	17.04	15.84	18.90	13.06	7.54	7.60	3.07	3.08
13	6.61	7.90	4.72	6.22	15.38	19.58	16.19	17.70	6.48	7.13	1.73	4.02
	6.93	8.25	4.50	7.18	15.65	20.87	14.59	18.85	6.36	8.08	1.82	4.41
	6.77	8.08	4.61	6.70	15.52	20.23	15.39	18.28	6.42	7.61	1.78	4.22
14	16.45	16.71	13.56	12.37	19.21	22.91	18.24	14.89	13.85	14.43	9.25	8.93
	17.16	16.54	13.80	12.32	19.30	18.58	19.34	14.74	13.66	14.20	9.36	8.97
	16.81	16.63	13.68	12.35	19.26	20.75	18.79	14.82	13.76	14.32	9.31	8.95
16	13.71	15.17	10.48	14.69	16.58	20.66	17.76	20.45	10.99	14.53	7.11	10.83
	14.41	15.66	10.51	14.68	16.12	21.44	16.85	20.70	10.75	14.63	6.92	10.77
	14.06	15.41	10.50	14.69	16.35	21.05	17.30	20.58	10.87	14.58	7.02	10.80
18	9.26	6.49	6.24	4.82	N/A	16.26	13.04	8.85	7.12	5.96	4.23	1.06
	8.01	7.48	6.54	4.87	N/A	16.25	12.71	9.29	7.06	6.10	3.35	1.10
	8.64	6.99	6.39	4.85	N/A	16.26	12.88	9.07	7.09	6.03	3.79	1.08
19	9.68	13.74	8.54	10.45	13.70	20.64	N/A	N/A	11.08	13.19	6.49	7.56
	9.61	13.63	8.71	11.67	13.83	20.75	N/A	N/A	10.59	13.22	6.39	7.56
	9.65	13.69	8.63	11.06	13.77	20.70	N/A	N/A	10.84	13.21	6.44	7.56

Na temelju Δ Ct vrijednosti određena je relativna ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli (Ptch, Smo, Gli1, Shh, SuFu) te β -katenina u 15 parova uzoraka karcinoma jajnika. Relativna ekspresija je izražena kao FC (engl. *fold change*), odnosno vrijednost koja govori koliko je puta ciljani gen više ili manje eksprimiran u odnosu na kontrolni gen Arp. FC se računa po formuli $FC=2^{-\Delta Ct}$, gdje je Δ Ct vrijednost za svaki od gena iz tablice 12.

Tablica 12. "Fold change" vrijednosti u odnosu na housekeeping gen Arp. Prikazane su najviša, najniža i srednja vrijednost za svaki gen.

	Ptch		Smo		Gli1		Shh		SuFu		beta	
	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B
1	0.01820	0.00989	0.02628	0.01278	0.00007	0.00001	0.00000	0.00000	0.00690	0.00433	0.14762	0.19345
	0.01342	0.01053	0.02164	0.01573	0.00007	0.00001	0.00000	0.00000	0.00427	0.00370	0.20166	0.13031
	0.01563	0.01020	0.02385	0.01418	0.00007	0.00001	0.00000	0.00000	0.00543	0.00400	0.17254	0.15877
2	0.04450	0.03928	0.05366	0.04011	0.00035	0.00072	0.00001	0.00087	0.01468	0.01053	0.38156	0.30355
	0.03847	0.01663	0.05913	0.08304	0.00031	0.00020	0.00002	0.00021	0.01458	0.01192	0.37893	0.31644
	0.04138	0.02556	0.05633	0.05771	0.00033	0.00038	0.00002	0.00043	0.01463	0.01120	0.38024	0.30993
3	0.03615	0.01833	0.07179	0.05366	0.00026	0.00002	0.00002	0.00007	0.02076	0.00375	0.41180	0.16840
	0.02816	0.01595	0.07229	0.04671	0.00030	0.00003	0.00004	0.00006	0.01686	0.00359	0.37631	0.16380
	0.03191	0.01710	0.07204	0.05007	0.00028	0.00002	0.00002	0.00007	0.01871	0.00367	0.39365	0.16609
4	0.01734	0.00427	0.03082	0.00781	0.00008	0.00001	0.00000	0.00009	0.00508	0.00089	0.14660	0.02683
	0.01418	0.00439	0.03061	0.00776	0.00005	0.00001	0.00000	0.00008	0.00383	0.00108	0.16494	0.02521
	0.01568	0.00433	0.03071	0.00779	0.00006	0.00001	0.00000	0.00008	0.00441	0.00098	0.15550	0.02601
6	0.02120	0.01389	0.03103	0.01113	0.00002	0.00005	0.00001	0.00032	0.00512	0.00271	0.23982	0.14762
	0.01845	0.01438	0.02683	0.01184	0.00003	0.00005	0.00000	0.00056	0.00556	0.00234	0.20733	0.11344
	0.01978	0.01413	0.02886	0.01148	0.00002	0.00005	0.00000	0.00043	0.00534	0.00252	0.22298	0.12941
7	0.04328	0.01045	0.05791	0.02304	0.00034	0.00016	0.00003	0.00013	0.01640	0.00375	0.34389	0.27357
	0.04870	0.00596	0.05672	0.01770	0.00028	0.00008	0.00011	0.00034	0.01278	0.00519	0.28519	0.18428
	0.04591	0.00789	0.05731	0.02019	0.00031	0.00011	0.00005	0.00021	0.01448	0.00441	0.31317	0.22453
8	0.07433	0.02452	0.05872	0.08190	0.00011	0.00098	0.00009	0.00001	0.02105	0.03716	0.39502	0.15604
	0.07911	0.04544	0.06606	0.13397	0.00010	0.00077	0.00014	0.00001	0.02256	0.03213	0.41466	0.20448
	0.07668	0.03338	0.06228	0.10475	0.00010	0.00087	0.00011	0.00001	0.02179	0.03455	0.40472	0.17862
9	0.04239	0.03955	0.03443	0.02368	0.00033	0.00000	0.00001	0.00000	0.00916	0.00430	0.23326	0.24656
	0.03516	0.04095	0.02896	0.02956	0.00027	0.00000	0.00004	0.00000	0.00855	0.00541	0.25882	0.37113
	0.03861	0.04025	0.03158	0.02646	0.00030	0.00000	0.00002	0.00000	0.00885	0.00483	0.24571	0.30250
10	0.00388	0.00052	0.02896	0.01305	0.00004	0.00003	0.00003	0.00040	0.01105	0.00322	0.16154	0.12851
	0.00465	0.00108	0.02816	0.01209	0.00005	0.00003	0.00012	0.00022	0.00969	0.00370	0.16609	0.13031
	0.00425	0.00075	0.02856	0.01256	0.00004	0.00003	0.00006	0.00030	0.01034	0.00345	0.16380	0.12941
12	0.0032848	0.00311	0.02091	0.01499	0.00001	0.00002	0.00000	0.00010	0.00505	0.00515	0.11826	0.12328
	0.0045183	0.00319	0.01833	0.01438	0.00001	0.00002	0.00000	0.00014	0.00572	0.00515	0.11991	0.11344
	0.00302	0.00315	0.01957	0.01468	0.00001	0.00002	0.00000	0.00012	0.00537	0.00515	0.11908	0.11826
13	0.01024	0.00419	0.03794	0.01342	0.00002	0.00000	0.00001	0.00000	0.01120	0.00714	0.30145	0.06164
	0.00820	0.00328	0.04419	0.00690	0.00002	0.00000	0.00004	0.00000	0.01217	0.00370	0.28322	0.04704
	0.00916	0.00371	0.04095	0.00962	0.00002	0.00000	0.00002	0.00000	0.01168	0.00514	0.29219	0.05385
14	0.00001	0.00001	0.00008	0.00019	0.00000	0.00000	0.00000	0.00003	0.00007	0.00005	0.00164	0.00205
	0.00001	0.00001	0.00007	0.00020	0.00000	0.00000	0.00000	0.00004	0.00008	0.00005	0.00152	0.00199
	0.00001	0.00001	0.00008	0.00019	0.00000	0.00000	0.00000	0.00003	0.00007	0.00005	0.00158	0.00202
16	0.00007	0.00003	0.00070	0.00004	0.00001	0.00000	0.00000	0.00000	0.00049	0.00004	0.00724	0.00055
	0.00005	0.00002	0.00069	0.00004	0.00001	0.00000	0.00001	0.00000	0.00058	0.00004	0.00826	0.00057
	0.00006	0.00002	0.00069	0.00004	0.00001	0.00000	0.00001	0.00000	0.00053	0.00004	0.00773	0.00056
18	0.00163	0.01113	0.01323	0.03540	0.00000	0.00001	0.00012	0.00217	0.00719	0.01606	0.05329	0.47963
	0.00388	0.00560	0.01075	0.03420	0.00000	0.00001	0.00015	0.00160	0.00749	0.01458	0.09807	0.46652
	0.00252	0.00789	0.01192	0.03479	0.00000	0.00001	0.00013	0.00186	0.00734	0.01530	0.07229	0.47303
19	0.00122	0.00007	0.00269	0.00071	0.00008	0.00000	0.00000	0.00000	0.00046	0.00011	0.01113	0.00530
	0.00128	0.00008	0.00239	0.00031	0.00007	0.00000	0.00000	0.00000	0.00065	0.00010	0.01192	0.00530
	0.00125	0.00008	0.00253	0.00047	0.00007	0.00000	0.00000	0.00000	0.00055	0.00011	0.01152	0.00530

Sljedeća slika (slika 5) jasnije pokazuje relativnu ekspresiju gena signalnog puta Hh-Gli (Ptch, Smo, Gli1, Shh, SuFu) te β -katenina, izraženu kao kao FC, u 15 parova uzoraka karcinoma jajnika. Ova vrijednost govori koliko je puta ciljani gen više ili manje ekspimiran u odnosu na kontrolni gen Arp.



Slika 5. Relativna ekspresija gena signalnog puta Hh-Gli u karcinomima jajnika. Za svaki uzorak je prikazana relativna ekspresija zdravog tkiva (Z) i bolesnog tkiva (B) u odnosu na referentni gen Arp (FC vrijednost).

Ekspresija svih gena značajno varira između uzoraka, od izrazito niske (npr. uzorci 14 i 16) do visoke (npr. uzorci 8 i 9). U većini parova uzoraka (zdravo-bolesno tkivo) prisutan je trend niže ekspresije u bolesnom nego u zdravom tkivu, ili su međusobno podjednaki, osim u dva para uzoraka (uzorci 9 i 18).

Na temelju ovih podataka može se uvjetno napraviti nekoliko podskupina tumora prema :

- povećanoj ekspresiji liganda Shh: uzorci 2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 14 i 18 u odnosu na prateću kontrolu (uglavnom atipični proliferativni tumori);
- povećanoj ekspresiji svih ispitivanih gena: uzorci 9 i 18, osobito u uzorku br. 18;

- smanjenoj ekspresiji gotovo svih ispitivanih gena u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo : uzorci 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10 i 13 (u većem broju karcinoma i atipičnih proliferativnih tumora)
- veoma niskoj aktivnosti gotovo svih ispitivanih gena u tumorima i kontrolnom tkivu: uzorci 14, 16 i 19 (karcinomi visokog FIGO stadija).

Pregledom Ct vrijednosti (tablica 12) vidljivo je da su geni Ptch, Smo, SuFu i β -katenin detektirani u svim testiranim uzorcima, dok se Gli1 protein nije mogao detektirati u jednom (zdravo tkivo), a Shh u 5 uzoraka (tri zdravog tkiva i dva tumorska tkiva). Ova tablica nadopuna je slici 5 za slučajeve gdje nije jasno vidljivo radi li se o veoma niskoj razini ili potpunom nedostatku ekspresije.

4.1.1. Veza ekspresije gena i kliničkih parametara

Zbog širokog raspona dijagnoza te relativno malog broja uzoraka, za potrebe statističke analize uzorci su podijeljeni u dvije glavne skupine: atipični proliferativni tumori i karcinomi jajnika. Mann-Whitney test pokazao je da je ekspresija gena Shh povezana s dijagnozom. Analiza pokazuje da je ekspresija gena Shh u pravilu veća u atipičnim proliferativnim tumorima u odnosu na karcinome ($p=0,08$), tablica 13.

Tablica 13. Ekspresija gena Shh u atipičnim proliferativnim tumorima i u karcinomima jajnika ($P=0.08$)

	ekspresija Shh atipični proliferativni tumori	ekspresija Shh karcinomi
Broj uzoraka	6	8
Najniža vrijednost	0,00008	0
Najviša vrijednost	0,00186	0,00043
Medijan	0,000255	0,000005
95 % CI za medijan		0 – 0,0003289
Raspon	0,00012 – 0,00043	0 – 0,00005
p	0,008	

4.1.2. Korelacije ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli

Uspredbom razine ekspresije između pojedinih gena međusobno ustanovljena je pozitivna korelacija između mnogih gena ovog signalnog puta u uzorcima karcinoma jajnika, kao što je prikazano u tablici 14.

Koeficijent korelacije govori o značaju povezanosti pojedinih varijabli:

- Od 0 do $\pm 0,25$ nema povezanosti
- Od 0,26 do $\pm 0,50$ slaba povezanost
- Od 0,51 do $\pm 0,75$ umjerena do dobra povezanost
- Od 0,76 do ± 1 vrlo dobra do izvrsna povezanost
- ± 1 matematička povezanost (Colton, 1974)

Sve značajne korelacije istaknute su crvenom bojom. Koeficijenti korelacije pokazuju umjerenu do dobru pozitivnu povezanost između ekspresije gena Gli1 i Shh, Gli1 i Smo te Ptch i SuFu, te vrlo dobru do izvrsnu povezanost β -katenina s Ptch, Smo i SuFu ekspresijama, te između Ptch i Smo. Za ovu analizu korištena je neparametrijska korelacija po Spearmanu.

Tablica 14. Prikaz koeficijenta korelacije ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli u karcinomima jajnika. Crveno su označene vrijednosti koje se smatraju statistički značajnima.

		Gli1	Ptch	Shh	Smo	SuFu
B-katenin	Koeficijent korelacije	0,547	0,801	0,460	0,903	0,774
	Statistička značajnost (p vrijednost)	0,041	0,003	0,085	0,001	0,004
	broj uzoraka	15	15	15	15	15
Gli1	Koeficijent korelacije		0,510	0,644	0,669	0,488
	Statistička značajnost (p vrijednost)		0,056	0,016	0,012	0,068
	broj uzoraka		15	15	15	15
Ptch	Koeficijent korelacije			0,149	0,822	0,624
	Statistička značajnost (p vrijednost)			0,576	0,002	0,020
	broj uzoraka			15	15	15
Shh	Koeficijent korelacije				0,371	0,288
	Statistička značajnost (p vrijednost)				0,165	0,282
	broj uzoraka				15	15
Smo	Koeficijent korelacije					0,839
	Statistička značajnost (p vrijednost)					0,002
	broj uzoraka					15

4.2. Analiza ekspresije glavnih proteina signalnog puta Hh-Gli u karcinomima jajnika

Rezovi tumorskog tkiva su imunohistokemijski obojani na proteine Ptch, Smo, Gli1 i Shh (18 uzoraka). Shh i Gli1 u većini rezova nisu detektirani, ali Ptch i Smo su prisutni u mnogima od njih, Smo sa slabim do umjerenim intenzitetom u 11 od 14 uzoraka (78,6%), a Ptch sa slabim do jakim intenzitetom u 9 od 14 uzoraka (64,3%). Proteini Shh i Gli1 su detektirani u malom broju uzoraka, Gli1 u dva od 14 (14,3%), a Shh samo u jednom uzorku (7,1%). Rezultati imunohistokemijske detekcije prikazani su u tablici 15.

Tablica 15: Imunohistokemijska detekcija proteina signalnog puta Hh-Gli u tkivnim rezovima tumora jajnika. Intenzitet bojanja označen je kao negativan (-), granično pozitivan (+/-), pozitivan (+) ili jako pozitivan (++)

broj uzorka	kontrola	Ptch	Smo	Gli1	Shh
1	-	-	+/-	-	-
2	-	++	++	-	-
3	-	-	+	+/-	-
4	-	+	-	-	-
5	-	-	+	-	+/-
6	-	-	+	-	-
8	-	-	+	-	-
9	-	+	+	-	-
11	-	+	+/-	-	-
13	-	++	+	-	-
14	-	+	+/-	-	-
16	-	+/-	-	+	-
17	-	+	-	-	-
18	-	+	+/-	-	-

Ptch i Smo detektirani su u većem broju uzoraka i lokalizirani su većinom u istim strukturama. Većina pozitivnih uzoraka pokazuje jako pozitivno obojenje na ova dva proteina u epitelu te nešto slabije, ali sveprisutno obojenje tumorskih stanica.

4.2.1. Veza ekspresije proteina i kliničkih parametara

Uzorci su, na temelju FIGO stadija proširenosti bolesti, u statističkoj analizi podijeljeni na 3 glavne kategorije. χ^2 testom ustanovljeno je da je ekspresija proteina Ptch povezana s FIGO stadijem, na način da su visoki FIGO stadiji češće pozitivni na Ptch (P=0.016). Rezultati analize prikazani su u tablici 16.

Tablica 16. Odnos stadija FIGO i proteina Ptch

FIGO stadij	Imunohistokemija - Ptch		
	Negativna	Pozitivna	
I	4	2	6 (42.9%)
II	1	1	2 (14.3%)
III	0	6	6 (42.9%)
	5 (35.7%)	9 (64.3%)	
χ^2	6.015		
Značajnost	p=0.0494		
χ^2 za trend	5.807		
Značajnost za trend	p=0.0160		

Na sličan način pronađena je povezanost ekspresije proteina Ptch i omentuma. Fisherov test je pokazao da su Ptch-pozitivni tumori češće prošireni na omentum nego Ptch-negativni tumori. Rezultati statističke obrade prikazani su u tablici 17.

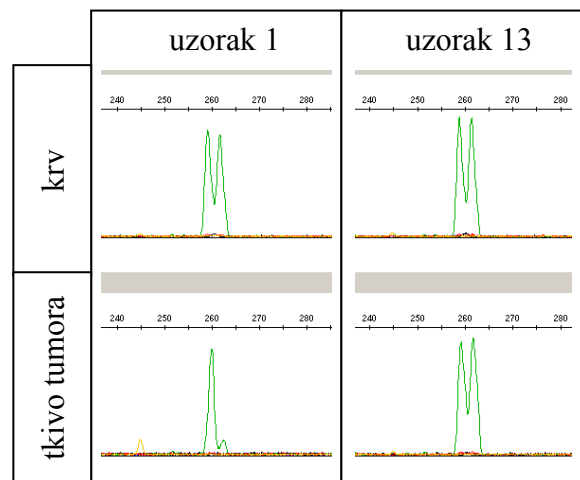
Tablica 17. Odnos ekspresije proteina Ptch i proširenosti tumora na omentum

Omentum	IH – Ptch		
	Negativna	Pozitivna	
Negativan	5	3	8 (57.1%)
Pozitivan	0	6	6 (42.9%)
	5 (35.7%)	9 (64.3%)	
značajnost	p=0.03096		

4.3. Analiza polimorfizama i mutacija u genima Ptch i Smo

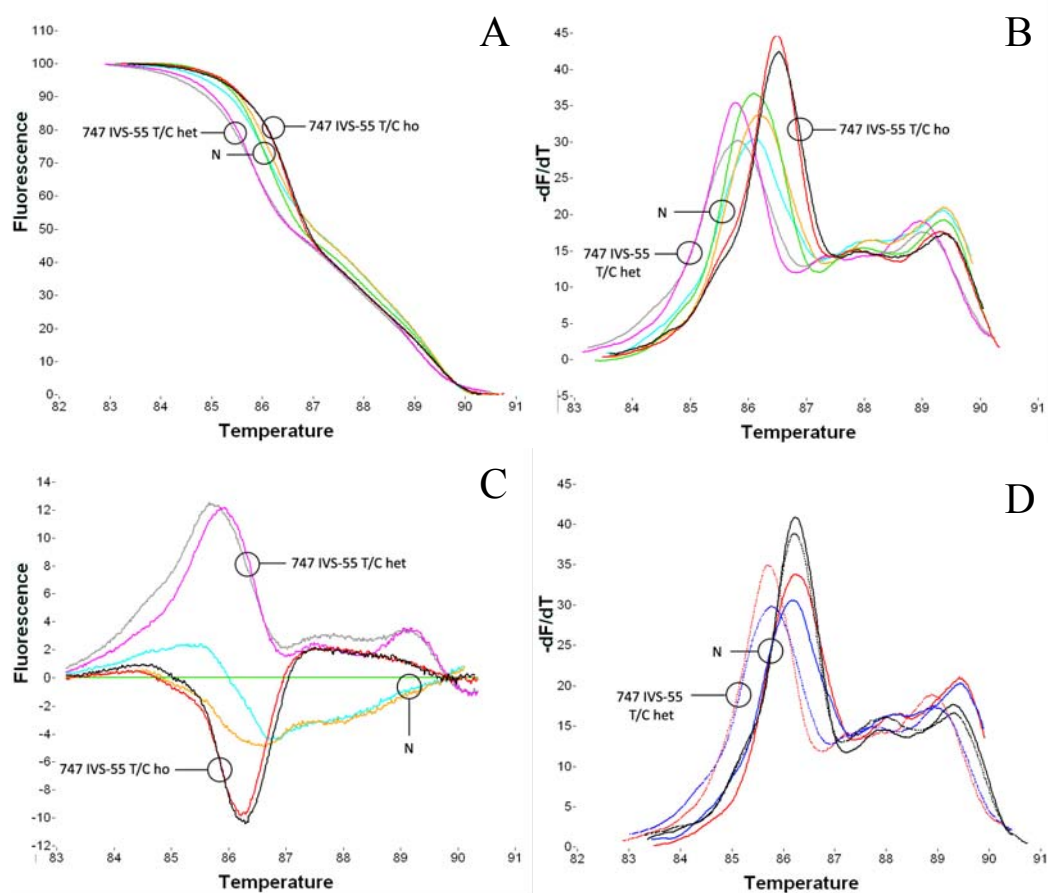
Zbog raznolikosti u ekspresiji na razini gena i proteina u mnogim uzorcima, osobito onima s relativno niskom ekspresijom gena Ptch, proveli smo mutacijsku analizu cijele kodirajuće regije gena Ptch i njegovog promotora. Pretpostavka je bila da bi eventualne mutacije mogle biti razlog smanjenoj ekspresiji Ptch, budući da se radi o tumor supresoru i jednom od glavnih sudionika signalnog puta Hh-Gli. Također je analiziran i gen Smo, koreceptor, koji, kao i receptor Ptch, ima ključnu ulogu u prijenosu signala prema citoplazmi i prema Gli1. Mutacije u dva eksona gena Smo (eksoni 9 i 10) mogu uzrokovati aktivaciju proteina Smo neovisno o regulaciji proteinom Ptch. Zbog toga je analiza gena Smo ograničena na ta dva eksona.

Analizom DNA iz uzoraka tumora i pune krvi nađeno je nekoliko gubitaka heterozigotnosti (LOH) gena Ptch u tumorima (1,2 i 14) u promotorskoj regiji gena Ptch (označena kao PR4 u tablici 18). Četiri su uzorka bili neinformativna za ispitivani lokus u promotorskoj regiji, zbog čega su dodatno ispitani na LOH tri polimorfna biljega koji okružuju gen Ptch: D9S180, D9S287 i D9S196. Ustanovljeno je da tri od četiri neinformativna uzorka nemaju LOH susjednih regija, dok je četvrti uzorak i dalje neinformativan jer je homozigotan na sva 4 testirana lokusa.



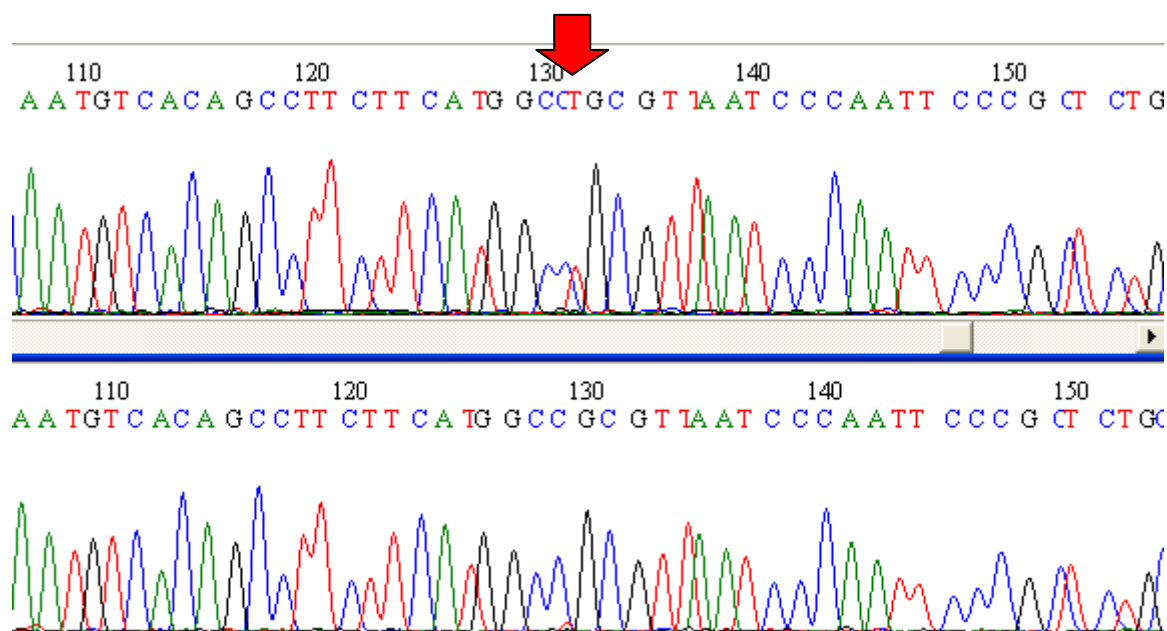
Slika 6. Analiza gubitka heterozigotnosti na aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Uzorak 1 pokazuje dva signala u uzorku krvi, dok se jedan signal izgubio u uzorku tkiva, što znači da je došlo do gubitka jednog alela. Uzorak 13 nema gubitak heterozigotnosti, budući da i u krvi i tkivu postoje oba signala.

Pronađeno je nekoliko polimorfizama gena Ptch u eksonima 6, 11, 12, 15, 18 i 23. Zanimljivo je da je u 6 uzoraka nađen polimorfizam u eksonu 6, od kojih tri imaju LOH u promotorskoj regiji gena Ptch. U eksonu 6 nađen je polimorfizam u heterozigotnom obliku u krvi, ali u tkivu je pronađen samo alel divljeg tipa, što je detektirano analizom krivulje mekšanja. Slika 7 prikazuje analizu krivulje mekšanja na primjeru polimorfizma 747IVS-55 T/C. Razlika u krivuljama vidljiva je na sva tri prikaza (Slika 7A-C). Na istoj slici (slika 7D) prikazan je gubitak heterozigotnosti, također detektiran ovom analizom.

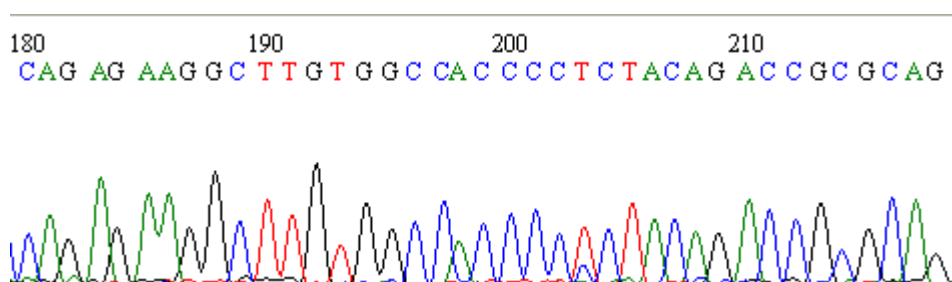


Slika 7. Prikaz analize mekšanja: A: krivulja taljenja, B: derivacijska krivulja, C: krivulja razlike. Na sve tri krivulje lako se mogu razlikovati uzorci divljeg tipa (N) od homozigotnog i heterozigotnog oblika polimorfizma 747 IVS-55 T/C. D: krivulje tri para uzoraka iz krvi (crtkane linije) i tkiva (pune linije) iste bolesnice. Može se vidjeti da kod plavih i crvenih krivulja postoji razlika u profilu, na temelju koje se može zaključiti o gubitku heterozigotnosti u ova dva uzorka, dok se kod crnog uzorka krivulja ne mijenja.

Sve promjene uočene analizom krivulje mekšanja potvrđene su sekvenciranjem. Zbog određenog udjela normalnih stanica u tkivu s gubitkom heterozigotnosti, na sekvenci su vidljive obje varijante, ali je intenzitet deletiranog alela znatno manji od normalnog alela te je jasno da se radi o gubitku heterozigotnosti (slike 8 i 9).



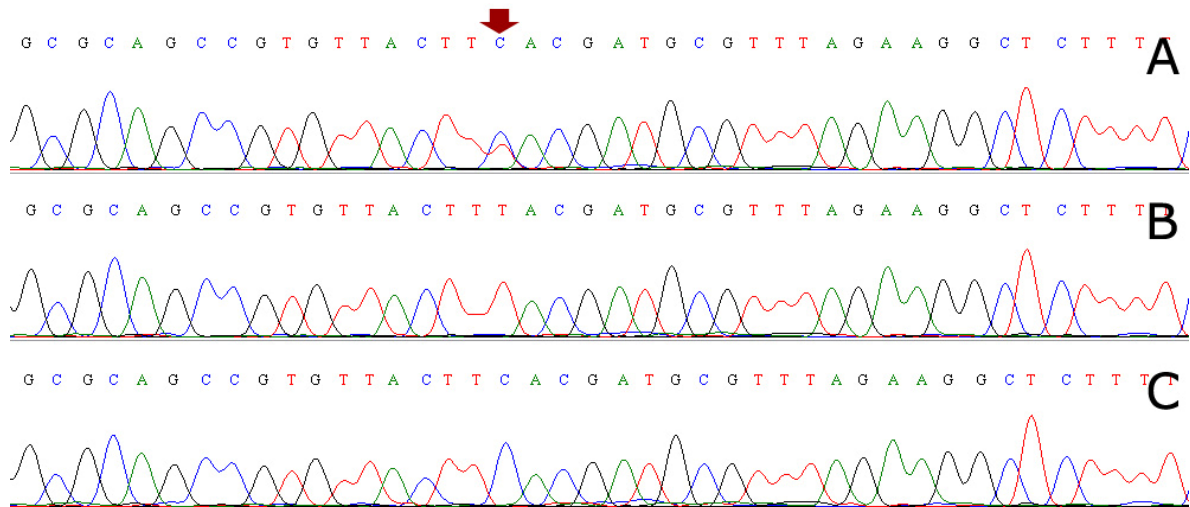
Slika 8. Ptch ekson 12, uzorak 14 (LOH): na sekvenci se vidi da je došlo do gubitka alela divljeg tipa, a alel koji je preostao je alel divljeg tipa.



Slika 9. Ptch ekson 23A, uzorak 1 (LOH): na sekvenci se vide oba signala, ali je C znatno niži od T, što znači da je došlo do gubitka alela divljeg tipa, a u tumoru je ostao samo polimorfizam 2344 C/T.

Nakon analize krivulja mekšanja i sekvenciranja, nisu nađene mutacije u genima Ptch i Smo. Ustanovljen je samo niz polimorfizama u genu Ptch, od toga 5 čestih (747IVS-55T/C, 1504IVS-51 C/G, 1686 C/T, 2560IVS+9 G/C i 3944 C/T) i 2 rijetka (1504IVS-8 T/C i 3141

T/G) polimorfizma. Na slici 10 prikazan je primjer sekvence divljeg tipa te heterozigotnog i homozigotnog polimorfizma 747IVS-55 T/C.



Slika 10. Provjera točnosti analize mekšanja sekvenciranjem uzoraka na aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Na slici A prikazan je heterozigotan uzorak na polimorfizam 747 IVS-55 T/C, na slici B je sekvenca divljeg tipa (normalna sekvenca), a na slici C homozigotan oblik polimorfizma 747 IVS-55 T/C.

Tablica 18 prizuje zbirni pregled svih rezultata mutacijske i LOH analize gena Ptch. Zbirni rezultati za gen Smo nisu prikazani, jer su pronađene samo sekvence divljeg tipa. U tablici su žutom bojom označeni djelovi gdje je detektiran LOH. Kratica K označava da je analizirana DNA iz krvi, dok kratica T označava DNA iz tumorskog tkiva. Eksoni 11, 12 i 23A nisu se mogli jednostavno analizirati krivuljama mekšanja, pa su analizirani izravnim sekvenciranjem samo DNA iz tkiva tumora.

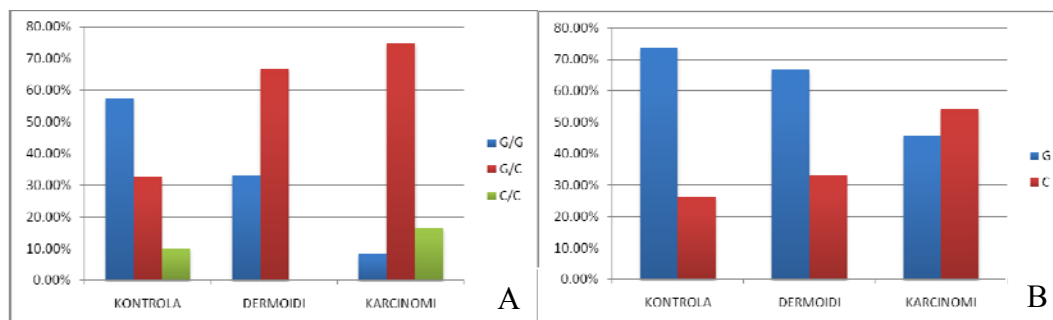
Tablica 18. Prikaz LOH analize i mutacijske analize gena Ptch po eksonima. Žutom bojom označeni su uzorci u kojima je detektiran LOH u promotorskoj regiji gena Ptch (PR4), a također i gdje je bio vidljiv u ostalim regijama gena. Brojevi u zaglavlju tablice označavaju brojeve eksona gena Ptch. Minusima su označeni produkti, koje nije bilo moguće umnožiti PCR reakcijom te stoga nisu analizirani. K predstavlja uzorak DNA iz krvi, a T iz tumora. N- predstavlja normalnu varijantu prema NCBI bazi podataka. Ostali podaci odnose se na polimorfizam određenog eksona.

broj uzorka	PR4	1	2	3	4+5	6	7	8	9	10	11	12	13	14A	14B	15	16	17	18	19	20	21	22	23A
1 K		N	N	N	N	747 IVS-55 T/C	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	
1 T	LOH	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1686 C/T	N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	3944C/T (LOH)
2 K		N	N	N	N	747 IVS-55 T/C	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	
2 T	LOH	-	N	-	N	N	N	-	N	N		1686 C/T	N	N	N	-	-	N	-	-	N	N	-	N
3 K		N	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
3 T	ho	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4 K		N	N	N	N	747 IVS-55 T/C HO	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C HO	N	N	N	N	N	N	N	
4 T	ho	N	N	N	N	747 IVS-55 T/C HO	N	N	N	N	N	1686 C/T HO	N	N	N	2560 IVS+9 G/C HO	N	N	N	N	N	N	N	N
5 K		N	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	
5 T	het	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1504IVS-51 C/G	1686 C/T	N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	3944C/T
6 K		N	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	
6 T	het	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1504IVS-51 C/G	1686 C/T	N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	3944C/T
8 K		N	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	
8 T	ho	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1504IVS-51 C/G	1686 C/T	N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	N
9 K		N	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	3141T/G	N	N	N	N	
9 T	het	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1504IVS-8 T/C	N	N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	3141T/G	N	N	N	N	N
11 K		N	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	
11 T	ho	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	N
13 K		N	N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C HO	N	N	N	N	N	N	N	
13 T	het	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	2560 IVS+9 G/C HO	N	N	N	N	N	N	N	N
14 K		N	N	N	N	747 IVS-55 T/C	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	N
14 T	LOH	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1686 C/T (LOH)	N	N	N	2560 IVS+9 G/C HO	N	N	N	N	N	N	N	N
16 K		N	N	N	N	747 IVS-55 T/C	N	N	N	N			N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	
16 T	het	N	N	N	N	747 IVS-55 T/C	N	N	N	N	1504IVS-51 C/G	1686 C/T	N	N	N	2560 IVS+9 G/C	N	N	N	N	N	N	N	3944 C/T

Na temelju dobivenih podataka izračunali smo učestalost alela. Učestalost alela računa se na način da se broj alela s polimorfizmom u nekom setu uzoraka podijeli s ukupnim brojem alela u tom setu, što bi na primjeru polimorfizma 2560IVS+9 G/C iznosilo 13/24 (54,17%). U ovom setu uzoraka zamijećen je izrazito visoki udio upravo polimorfizma 2560IVS+9 G/C u eksonu 15. Zbog toga smo odlučili usporediti frekvencije alela s prijašnjim podacima polimorfizama u zdravim osobama i zrelih teratomima jajnika dobivenim u Laboratoriju za nasljedni rak (58). Kao kontrole služile su DNA iz krvi zdravih žena starijih od 60 godina, koje nikada nisu oboljele od raka. Ustanovljena je značajna razlika u udjelima genotipova ovog polimorfizma između te tri skupine uzoraka (tablica 19, slika 11A). Također je ustanovljena značajna razlika u frekvencijama alela između te tri skupine, s jasnim trendom povećanja udjela C alela (slika 11B).

Tablica 19. Prikaz raspodjele genotipova polimorfizma 2560 IVS G/C u kontrolnim uzorcima, zrelim teratomima (dermoidima) jajnika i karcinomima jajnika, te frekvencija alela za svaku od skupina

GENOTIP	KONTROLA	DERMOIDI	KARCINOMI	
G/G	57.50%	33.33%	8.30%	p=0.0097
G/C	32.50%	66.67%	75.00%	
C/C	10.00%	0.00%	16.60%	
ALEL				
	KONTROLA	DERMOIDI	KARCINOMI	
G	73.75%	66.67%	45.83%	p=0.0075
C	26.25%	33.33%	54.17%	
N				
	40	18	12	

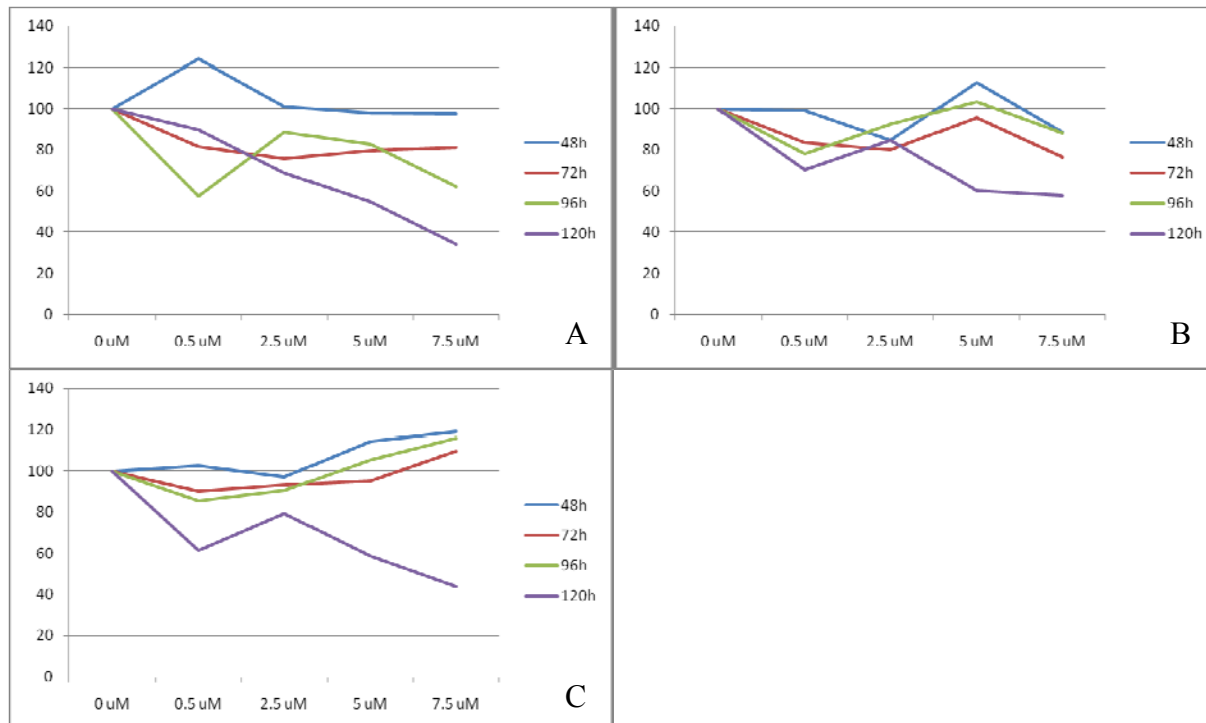


Slika 11: Usporedba frekvencije genotipova (A) i frekvencije alela (B) polimorfizma 2560 IVS G/C u kontrolnim uzorcima, zrelim teratomima (dermoidima) jajnika i karcinomima jajnika

4.4. Djelovanje ciklopamina, tomatidina i proteina Shh na primarnu staničnu kulturu iz tkiva karcinoma jajnika

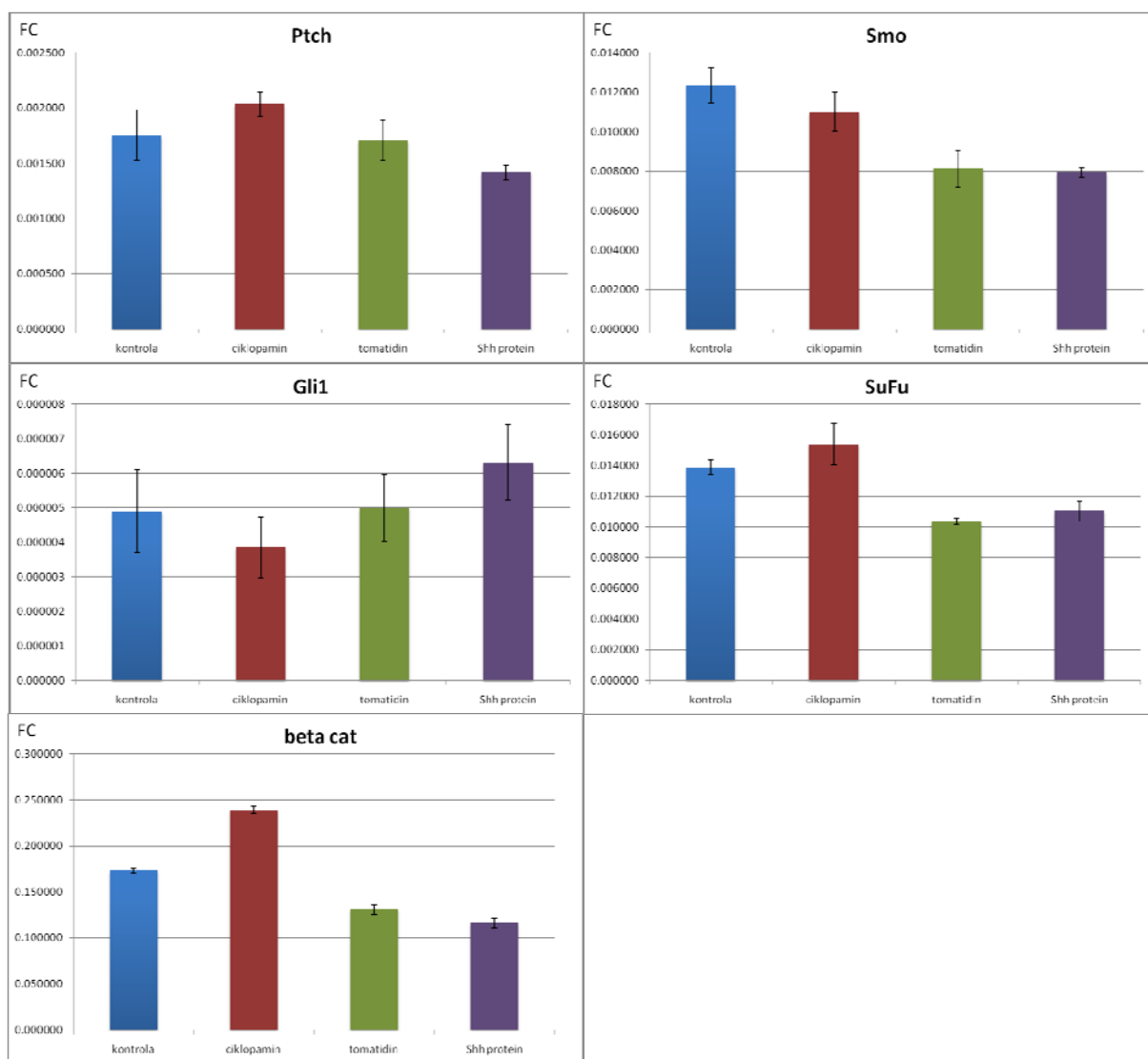
Primarna stanična kultura je uspostavljena iz tkiva uzorka 13, koji je pokazivao prosječnu do nižu gensku ekspresiju i dobru proteinsku ekspresiju komponenti signalnog puta Hh-Gli, dok se histološki radilo o endometrioidnom adenokarcinomu histološkog gradusa 3 i FIGO stadija IIIC.

Primarna kultura tretirana je ciklopaminom, tomatidinom i Shh proteinom u različitim dozama te je djelovanje tih spojeva na stanice ustanovljeno MTT testom. Usporedbom djelovanja ciklopamina s djelovanjem tomatidina može se vidjeti da ciklopamin zaustavlja proliferaciju stanica i djeluje blago letalno na stanice, s preživljenjem do 60%. S druge strane, protein Shh djeluje na stanice tako da potiče njihovu proliferaciju. Također se može uočiti da je trend za sve kemijske spojeve prisutan do 96 h rasta u kulturi, dok se nakon 120 h sve stanice ponašaju kao da im je rast inhibiran. To je posljedica dugog uzgoja u istoj pločici, gdje su nakon 120 h stanice postigle maksimalnu konfluentnost i prestale se dijeliti, te djelomično počele i odumirati.



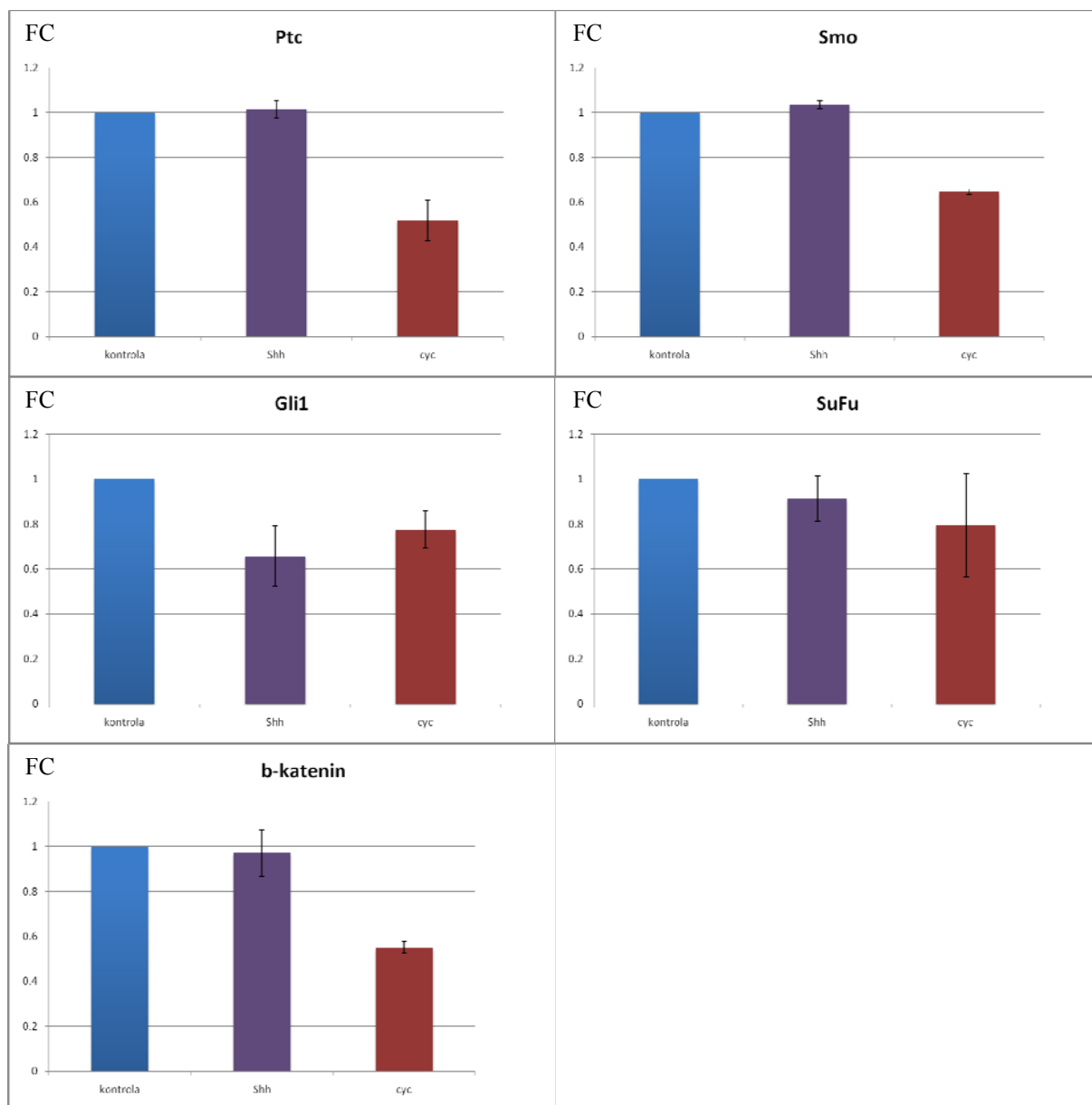
Slika 12. MTT test s ciklopaminom (A), tomatidinom (B) i Shh proteinom (C) kroz 48, 72, 96 ili 120 sati. Vidi se da ciklopamin pri većim dozama i duljem vremenu inhibicije uzorkuje veću smrtnost stanica.

Na primarnoj kulturi također je napravljen pokus inhibicije i aktivacije signalnog puta ciklopaminom i proteinom Shh, a promjena genske ekspresije praćena je kvantitativnim *real-time* PCR-om. Prvo je korištena subletalna doza ciklopamina (2.5 μ M), koja bi trebala imati slab učinak na stanice, te niska koncentracija Shh proteina (1 ng/ml) kroz 24 sata. Pri ovim dozama nema očekivanog odgovora stanica na tretman ciklopaminom ili Shh proteinom, čak se čini da pri ovim dozama stanice reagiraju obrnuto od očekivanoga, te se ekspresije smanjuju dodatkom Shh proteina, a povećavaju dodatkom ciklopamina (slika 13).



Slika 13. Kvantitativni real-time PCR primarne linije nakon tretmana ciklopaminom (2.5 μ M) (crveno), tomatidinom (zeleno) ili Shh proteinom (ljubičasto) u odnosu na netretirane stanice (plavo). Sve ekspresije su izražene u odnosu na kontrolni gen Arp.

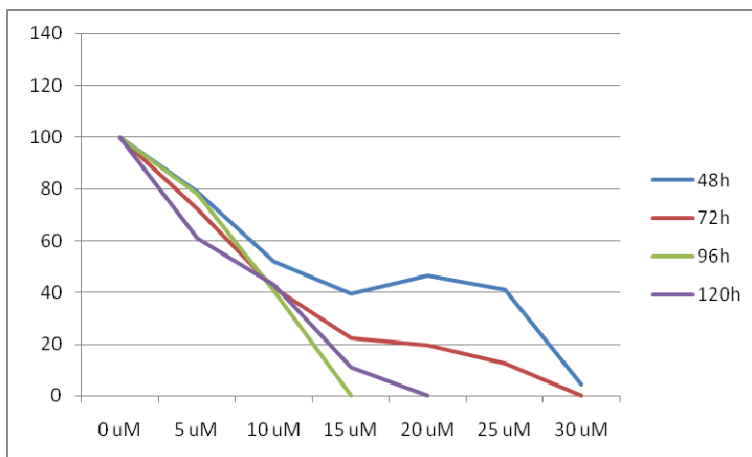
Nakon toga korištene su veće doze ciklopamina (7.5 μ M) i Shh proteina (3 ng/ml), učinak je praćen nakon 96 sati. Rezultati su prikazani na slici 14. Može se vidjeti da stanice reagiraju na ovu dozu ciklopamina smanjivanjem aktivnosti signalnog puta, što je vidljivo iz smanjene ekspresije Ptc, Smo i β -katenina. Na tretman Shh proteinom uglavnom nema jasnog odgovora glede ekspresije gena, iako stanice pokazuju povećanu proliferaciju, što je bilo vidljivo iz MTT testa.



Slika 14. Kvantitativni real-time PCR primarne linije iz uzorka 10 nakon tretmana ciklopaminom (7.5 μ M) (crveno) ili Shh proteinom (ljubičasto) u odnosu na netretirane stanice (plavo). Sve ekspresije su izražene u odnosu na kontrolni gen Arp i normalizirane prema ekspresiji u kontrolnom uzorku koja je izražena kao 1.

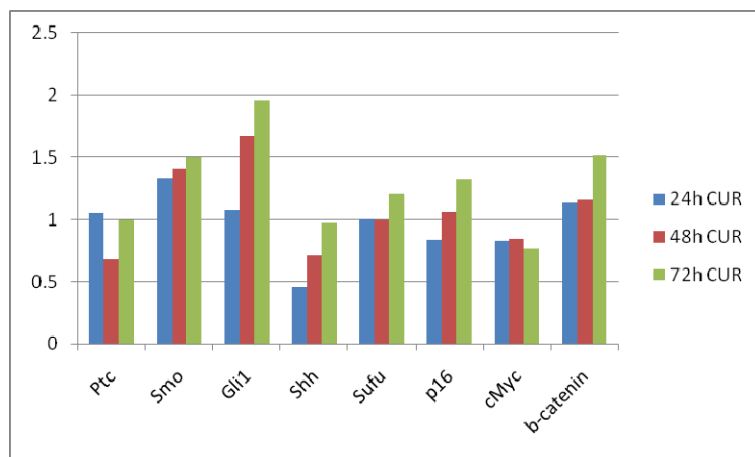
4.5. Djelovanje kurkumina na primarnu staničnu kulturu iz tkiva karcinoma jajnika

MTT testom praćeno je djelovanje kurkumina na ove stanice, budući da je poznato da kurkumin ima inhibicijski učinak na stanice tumora jajnika. Učinak kurkumina je pokazan pri nekoliko različitih doza te je pokazano da je ovisan o dozi korištenog spoja i o trajanju tretmana, s time da dulji tretmani vrlo učinkovito uzorkuju smrt stanica čak i pri malim dozama spoja.



Slika 15. Prikaz preživljenja stanica nakon tretmana kurkuminom 48, 72, 96 i 120 h nakon dodavanja spoja. Preživljenje je izraženo kao postotak preživjelih stanica u odnosu na netretirane kontrolne stanice.

Učinak kurkumina praćen je i na razini genske ekspresije članova signalnog puta Hh-Gli, biljega staničnog ciklusa, proliferacije i signalnog puta Wnt (β -katenin) kvantitativnim real-time PCR-om. Korištena koncentracija kurkumina bila je 10 μM , koja uzrokuje otprilike 40-50% smrtnosti stanica u mjerenim razdobljima (24, 48 i 72 sata). Učinak kurkumina na gensku ekspresiju prikazan je na slici 16, gdje se može vidjeti da kurkumin djeluje na dozno-ovisan način na ekspresiju niza gena Hh-Gli signalnog puta: Smo, Gli1, Shh, ali i na p16 i β -katenin. Budući da je β -katenin jedan od gena, koji je pod transkripcijskom kontrolom Gli1, nije čudno da povećanjem ekspresije Gli1 dolazi do povećanja ekspresije β -katenina, i to s malim zakašnjenjem u odnosu na Gli1.



Slika 16: Kvantitativni real-time PCR primarne linije iz uzorka 10 nakon tretmana kurkuminom (10 μ M) u nakon 24h (plavo), 48h (crveno) ili 72h (zeleno). Sve ekspresije su normalizirane u odnosu na kontrolni gen Arp i izražene kao relativni omjer prema kontrolnoj vrijednosti u netretiranim stanicama, koja je 1 za svaki od gena.

Ovi rezultati govore da je signalni put Hh-Gli aktivan u tumorima jajnika.

Djelovanjem inhibitora signalnog puta, ciklopamina, dolazi do djelomičnog zaustavljanja rasta stanica, što je pokazano MTT testom, ali također i do smanjenja razine ekspresije ciljnih gena. Aktivacijom signalnoga puta proteinom Shh dolazi do pojačavanja proliferacije stanica, ali ta proliferacija nije uzrokovana transkripcijom gena, nego je učinak neposredan, vjerojatno na već postojeće proteine u stanicama. Kurkumin, s druge strane, uzrokuje brzu smrt tumorskih stanica. Kurkumin djeluje na nekoliko različitih proteina unutar stanice, ali njegov učinak na Hh-Gli signalni put do sada nije bio pokazan. Tretiranje stanica subletalnom dozom kurkumina uzrokuje povećanu ekspresiju niza ciljnih gena, vjerojatno putem GSK-3 β proteina, što je detaljnije objašnjeno u raspravi.

5. RASPRAVA

Tumori jajnika, prema literaturnim podacima, nisu jasno određeni u odnosu na aktivnost Hh-Gli puta. Uglavnom, smatra se da je Hh-Gli put promijenjen i da može biti razlogom proliferacijske aktivnosti tumora. Poznato je da je signalni put Hh-Gli uključen u embrionalni razvoj niza struktura u jajniku, od vinske mušice (59) do čovjeka (46). Tijekom embriogeneze signalni put je aktivan na granici epitela i mezenhima tijekom embriogeneze, dok je u odraslom organizmu aktivan u svim tkivima bitnim za reprodukciju ili vezanim uz spolne hormone, kao što su gonade, maternica, dojka i prostata (46). Unutar samog jajnika prisutan je u stanicama granuloze i poznato je da ih se može dodatno stimulirati dodavanjem Shh proteina (47). Smatra se također da su somatske matične stanice u jajniku odgovorne za zacjeljivanje oštećenja koja nastaju 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 (48). Uloga signalnog puta u zloćudnim tumorima jajnika još je nejasna, a prva izvješća o njegovoj ulozi objavljena su 2007. godine. Chen i suradnici ustanovili su da je u tumorima jajnika, za razliku od normalnog epitela jajnika, povećana ekspresija proteina signalnog puta. Isti autori tretirali su trajne kulture karcinoma jajnika ciklopaminom i ustanovili da dolazi do smanjene proliferacije i zastoja u G1 fazi staničnog ciklusa (38).

Analizirajući naše rezultate, zamijetit ćemo kako je ekspresija gena Ptch, Smo, Gli1, Shh, SuFu i β -katenina pronađena u većini uzoraka tumora, ali i u većini pratećih uzoraka tkiva, koja nisu zahvaćena tumorom. Pozitivni nalaz u kontrolama u djelomičnoj je kontradikciji s nalazom Chena i suradnika, budući da ta skupina autora nije pronašla ekspresiju u zdravim tkivima (38). Moguća su dva objašnjenja: prvo, navedeni su istraživači pratili proteinsku, a ne gensku ekspresiju, koje se ne moraju nužno poklapati. Drugo, postavlja se pitanje koliko je prateće kontrolno tkivo uistinu zdravo, budući da je uzeto iz neposredne blizine tumora i postoji vjerojatnost da je u njemu već došlo do promjena na molekularnoj razini. Ovaj koncept poznat je već dugo vremena, i naziva se terorijom kancerizacije polja (engl. *field cancerization*) (60).

U ovom radu su opsežno analizirani tumori jajnika, koji bi se, na osnovi rezultata, mogli svrstati u dvije glavne skupine: jednu čine atipični proliferativni tumori jajnika, dok su drugi epitelni karcinomi jajnika. Atipični proliferativni tumori su prema FIGO klasifikaciji uglavnom stadija I, dok je samo jedan od njih bio stadija III. Važno je naglasiti kako je gotovo

tipična karakteristika tih tumora povećana ekspresija liganda, gena Shh, odnosno okidača Hh-Gli puta, zbog čega bi se mogli svrstati u ligandom inducirani tip tumora. U većini slučajeva imaju povećanu ekspresiju gena Ptch i Smo te β -katenina. Na proteinskoj razini pronađena je povećana vrijednost proteina Ptch i Smo.

Povećana aktivnost Shh mogla bi potaknuti otpuštanje inhibitornog učinka Ptch sa Smo te time omogućiti koreceptoru Smo aktivaciju i prijenos signala prema citoplazmi djelujući na proteine Gli i njihovu aktivaciju. Rezultati pokazuju da je aktivnost SuFu, supresora za Gli, čak povišena, što upućuje na regulaciju aktivacije samoga Gli. To pokazuje osobito uzorak br. 18 (atipični serozni proliferativni tumor), FIGO stadija IB, praćenjem aktivnosti svih gena signalnog puta, i to u tumorskom tkivu u odnosu na prateću kontrolu. U ovom tumoru uočena je povećana ekspresija svih ispitivanih gena u tumorima u odnosu na tkivo koje nije zahvaćeno tumorom. Gen Gli1 ima nešto nižu aktivnost, ali je u tumoru veća. Postoji mogućnost da smo jedino ovdje uspjeli dobiti zdravo tkivo u kojem doista nema graničnih patoloških stanja. Posebno je visoka aktivnost gena Smo, Shh, SuFu i β -katenina. Također, iznenađujuće, na razini proteina dobivena je ekspresija samo za proteine Ptch i djelomice Smo (imunohistokemijska analiza dala je pozitivan nalaz samo za proteine Ptch i djelomice Smo).

Karcinomi jajnika vrlo su heterogeni s različitih aspekata. U skupini karcinoma (uzorci 3,8,9) nađena je povećana ekspresija gena Ptch, Smo, Gli1 i β -katenina te donekle SuFu, ali zato vrlo niska ekspresija za gen Shh. Na proteinskoj razini pozitivni nalazi su za Smo i donekle za Ptch. Ovo bi upućivalo na aktivnost Hh-Gli puta neovisno od Shh, odnosno neovisno od indukcije ligandom.

Uzorak 8, tumor jajnika s mezenhimalnom diferencijacijom (karcinosarkom), zanimljiv je jer ima izrazito visoku vrijednost gena Smo, osobito u odnosu na tkivo koje nije zahvaćeno tumorom, kao i za gene SuFu i Gli1. Još je zanimljivije da je razina liganda Shh izrazito niska, što bi upućivalo, osobito zbog visoke vrijednosti Gli1, na nekanonijski put, međutim visoka aktivnost koreptora Smo upućuje i na aktivnost puta neovisno o ligandu.

Ukratko, analizirani tumori jajnika mogu se svrstati u više kategorija: ovisne o ligandu s povećanom razinom Shh, neovisne o ligandu s povećanom aktivnošću Smo, na tumore s povećanom aktivnošću svih gena Hh-Gli puta uključivo i β -katenina i veze s Wnt putem, aktivnosti Gli1, i na tumore s povećanom aktivnosti Gli1 i SuFu.

Praćenje ekspresije proteina imunohistokemijskim bojanjem daje nešto jasnije podatke: u velikom broju uzoraka dobiva se pozitivan nalaz na proteine Ptch i Smo, dok su proteini Gli1 i Shh slabo zastupljeni: Gli1 u dva, a Shh u jednom uzorku. Postoji mogućnost

da je u ovim tkivima eksprimiran neki od drugih izoformi Gli i Hh proteina: Gli2 ili Gli3, odnosno Dhh ili Ihh. Ipak, ekspresija proteina Ptch pokazala se povezanom s FIGO stadijem tumora: pokazali smo da su tumori višeg FIGO stadija češće pozitivni na Ptch protein. Shodno navedenome, tumori prošireni na omentum češće su pozitivni na Ptch protein. Ovaj nalaz u skladu je sa studijom Chena i suradnika (38), te govori da je ekspresija proteina bitniji biljeg za aktivnost signalnog puta u karcinomima jajnika od genske ekspresije. Kako smo u samo jednom uzorku karcinoma našli povećanu ekspresiju proteina Shh (imunohistokemijski), mogućnost autokrine regulacije u ovim tumorima je malo vjerojatna. Vjerojatnije je da stimulacijski Shh signal dolazi iz susjednih stanica u jajniku, za koje se zna da eksprimiraju Shh protein, primjerice stanice granulose. To također umanjuje vrijednost rezultata iz literature (48), po kojem prekomjerna ekspresija Gli i Smo, a mala Ptch, govori u prilog o aktivnosti puta na razini Smo za tumore jajnika.

Zbog raznolikosti u ekspresiji na razini gena i proteina u mnogim uzorcima, osobito onima s relativno niskom ekspresijom gena Ptch, učinjena je mutacijska analiza. Pretpostavka je bila da bi eventualne mutacije mogle biti razlogom smanjenoj ekspresiji Ptch, budući se radi o tumorskome supresoru i jednom od glavnih sudionika signalnog puta Hh-Gli. Također je analiziran i gen Smo, koreceptor, koji, kao i receptor Ptch, ima ključnu ulogu u prijenosu signala prema citoplazmi i prema Gli1.

Skupina autora (61) pokazala je da je u tumorima jajnika česta pojava gubitka heterozigotnosti (LOH) Ptch regije. Njihov rad bio je usredotočen uglavnom na fibrome, fibrotekome i fibrosarkome te su ustanovili čestu pojavu LOH-a Ptch regije u fibromima. Slični nalazi na fibromima i zrelim teratomima jajnika dobiveni su i u Laboratoriju za nasljedni rak Instituta „Ruđer Bošković“ (19,20).

U našoj skupini uzoraka LOH Ptch regije pronađen je u 3/12 analiziranih uzoraka, odnosno 25%. Tumori s LOH gena Ptch (uzorci 1, 2 i 14) imaju visoki FIGO stadij, ali smanjenu ekspresiju svih ispitanih gena, osobito Ptch, SuFu, Smo i Gli1, a napose uzorak 14. U ovim uzorcima nađen je LOH u promotorskoj regiji gena Ptch, koji se proteže i unutar samog gena. Vjerojatno zato imaju smanjenu ekspresiju na razini gena, ali imunohistokemijska je analiza proteina pokazala da dva uzorka imaju obojenje na protein Smo, dok jedan ima nešto jače obojenje proteina Ptch i Gli1. Mutacija u promotorskoj regiji gena Ptch, i to u dijelu koji nosi početak transkripcije, govori u prilog smanjenoj aktivnosti.

Nađeni LOH u promotorskoj regiji nalazi se u dijelu promotora (regija 4), koji sadrži ATG signal, odnosno početak transkripcije (43). Gubitak tog dijela narušava funkcionalnu sposobnost samog Ptch i njegove regulacijske uloge u cijelom putu. To može pojasniti

razmjerno niska aktivnost gena Ptch, Smo, Gli1, kao i SuFu (osobito uzorak 14) u tumorskom tkivu.

Analizom DNA iz uzoraka tumora i pune krvi nađeno je nekoliko gubitaka heterozigotnosti (LOH) gena Ptch u tumorima (1,2 i 14) te nekoliko polimorfizama gena Ptch u eksonima 6, 11, 12, 15, 18 i 23. Zanimljivo je da je u 6 uzoraka nađen polimorfizam u eksonu 6, od kojih tri imaju LOH u promotorskoj regiji gena Ptch. U eksonu 6 nađen je polimorfizam u heterozigotnom obliku u krvi, ali u tkivu je pronađen samo alel divljeg tipa, što znači da se i ovdje vidi gubitak heterozigotnosti, koji je potvrđen i sekvenciranjem. Zbog određenog udjela normalnih stanica u tkivu s gubitkom heterozigotnosti, na sekvenci su vidljive obje varijante, ali je intenzitet deletiranog alela znatno manji od normalnog alela te je jasno da se radi o LOH-u. Naime, uzorci su analizom krivulje mekšanja i sekvenciranjem analizirani na prisutnost mutacija i polimorfizama u genima Ptch (cijeli gen) i Smo (aktivirajuće mutacije u eksonima 9 i 10) u 12 uzoraka. Nisu nađene mutacije u eksonima ali je ustanovljen niz čestih polimorfizama u Ptch genu.

Dva od pronađenih polimorfizama klasificiraju se kao rijetki polimorfizmi (1504IVS-8 T/C u intronu 10 i 3141 T/G u eksonu 18). Polimorfizam 1504IVS-8 T/C u literaturi je prisutan s učestalošću od 1-6%, slično kao i u našim uzorcima, gdje je njegova učestalost 5%. Polimorfizam 3141 T/G se također poklapa s literaturnim podacima, u ovom setu uzoraka bio je prisutan u 4.1% uzoraka, dok je u literaturi opisan s učestalošću od 5%. Ostali polimorfizmi klasificiraju se kao česti polimorfizmi. U tablici 20 navedena je učestalost polimorfizama u našem setu uzoraka, u usporedbi s podacima iz literature.

Tablica 20. Učestalost alela u testiranom setu uzoraka u usporedbi s literaturnim podacima

Polimorfizam (ekson/intron)	Učestalost alela	Literaturna klasifikacija	Literaturna učestalost alela	Referenca
747IVS-55T/C (intron 5)	25 %	česti	17%	(62)
1504IVS-51 C/G (intron 10)	25 %	česti	14.5-57%	(54,63-65)
1504IVS-8 T/C (intron 10)	5 %	rijetki	1-6%	(64,66)
1686 C/T (ekson 12)	45 %	česti	4.7-43 %	(41,54,63-67)
2560IVS+9 G/C (intron 15)	54.2%	česti	6-57%	(54,63-65)
3141 T/G (ekson 18)	4.1 %	rijetki	5%	(68)
3944 C/T (ekson 23)	16.6 %	česti	25-59%	(63,64,66,67,69)

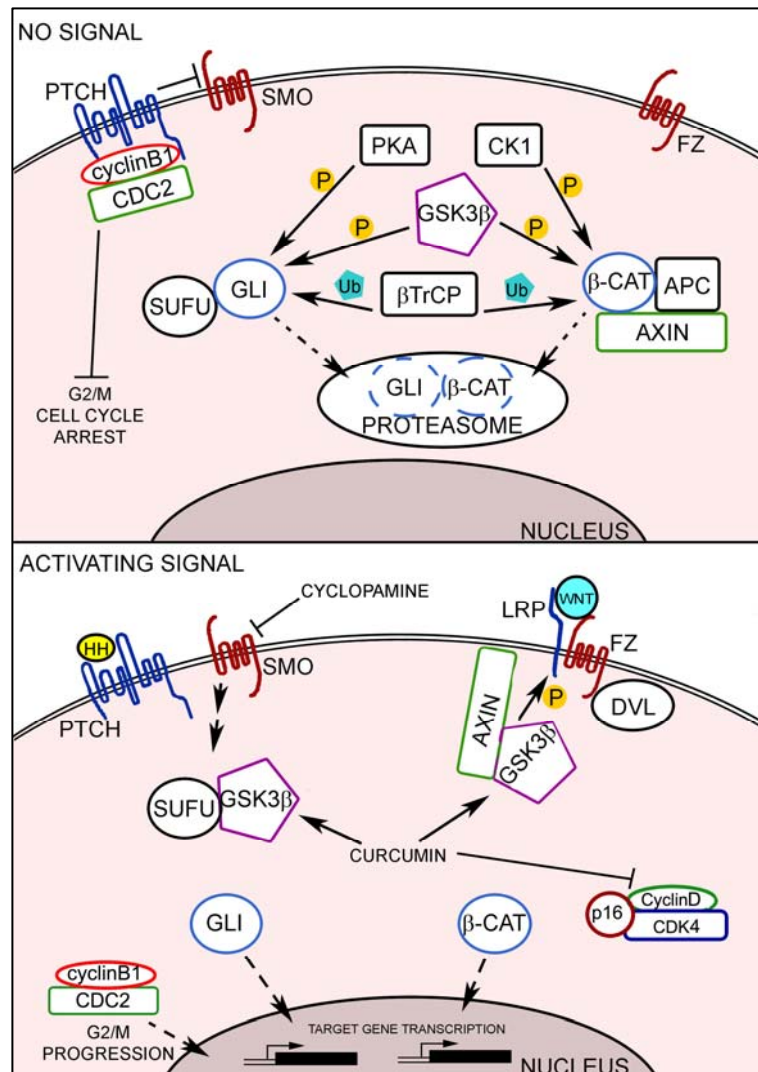
Eksoni 11, 12 i 23A pokazali su se polimorfima u visokom postotku slučajeva. Izrazito visoki udio polimorfizma u eksonu 15 (2560 IVS G/C) uspoređen je s podacima polimorfizama u zdravim osobama i zrelim teratomima jajnika (58). Kao kontrole služile su DNA iz krvi zdravih žena starijih od 60 godina, koje nikada nisu oboljele od raka. Ustanovljena je značajna razlika u udjelima genotipova ovog polimorfizma između te tri skupine uzoraka. Također je ustanovljena značajna razlika u frekvencijama alela između te tri skupine, s jasnim trendom povećanja udjela C alela. Budući da se polimorfizam nalazi u intronskom dijelu gena, *in silico* analizom provjeren je mogući utjecaj na prekrajanje RNA (engl. *splicing*), ali nije pronađen značajni utjecaj.

Ipak, zanimljiva je fenotip/genotip korelacija tumorskih uzoraka, dobroćudnih tumora i kontrola. Postoji mogućnost da se ovaj polimorfizam koristi kao molekularni biljeg za

sklonost ili podložnost razvijanju tumora jajnika, ali bi prije toga ovaj nalaz trebao biti potvrđen puno širom i opsežnijom studijom pacijenata i zdravih pojedinaca.

Drugi zanimljivi polimorfizam je 3944 C/T, koji se nalazi u eksonu 23(70,71). Početno je identificiran kao mutacija te se još uvijek u nekim istraživanjima naziva mutacijom, iako je jedna skupina autora ustanovila da taj polimorfizam čak ima i zaštitno djelovanje, tj. da je njegova učestalost manja u tumorima nego u prosječnoj populaciji (65,72,73). U našem setu uzoraka pokazalo se slično; učestalost ovog polimorfizam je manja nego u podacima iz literature. Svi ostali pronađeni polimorfizmi učestalošću odgovaraju literaturnim podacima. *In silico* analiza je pokazala da polimorfizmi, koji su nađeni u tim uzorcima, nemaju za posljedicu promijenjenu funkciju proteina.

Kakva je mogućnost regulacije Hh-Gli puta? *In vitro* analize primarnih kultura pokazuju da, premda je ekspresija gena puta niska, put je na staničnoj razini veoma aktivan. Na to su ukazale analize genske ekspresije na primarnim kulturama, kojima se utvrdilo i pokazalo da je put ovisan o ligandu Shh, da Smo ima ulogu u prijenosu signala i da se može blokirati ciklopaminom. Blokada puta je ovisna dozi i ekspoziciji. Naime, primarna kultura stanica eksprimira sve gene signalnog puta, uključujući i one koje su u uzorcima tkiva bili slabo izraženi, kao što su Gli1 i Shh. Proliferacija stanica može se regulirati vanjskim dodatkom proteina Shh, koji potiče proliferaciju stanica te one rastu brže nego kontrolne netretirane stanice. Ovaj nalaz govori da je put funkcionalan i inducibilan u stanicama primarne kulture. S druge strane, dodatak ciklopamina, poznatog inhibitora ovog signalnog puta, usporava rast stanica u odnosu na stanice tretirane inaktivnim analogom, tomatidinom. Na temelju literaturnih podataka, kao i neobjavljenih rezultata Laboratorija za nasljedni rak, može se zaključiti da ciklopamin uzrokuje zastoj u G1 fazi staničnog ciklusa (38). Kako bismo provjerili ima li ciklopamin učinak na razinu transkripcije gena, stanice su tretirane dvjema različitim dozama i kroz dva vremenska razdoblja. Primarne kulture su pokazale da reagiraju na inhibiciju većom dozom ciklopamina 96 sati nakon tretmana i da dolazi do smanjenja ekspresije niza gena signalnog puta, kao i β -katenina. Na ovaj način je izravno pokazan utjecaj aktivnosti Hh-Gli signalnog puta na ekspresiju β -katenina.



Slika 17. Veza između signalnih puteva Wnt i Hh-Gli. Na gornjoj slici prikazan je slučaj kada nema liganda (Hh ili Wnt), zbog čega kinaze PKA, CK1 i GSK3 β , i ubikvitin ligaza β TrCP sudjeluju u razgradnji transkripcijskih faktora (Gli ili β -katenin). Na donjoj slici prikazan je slučaj kada dolazi do stimulacije signalnih puteva, GSK3 β je tada uključena u aktivaciju transkripcijskih faktora. Također je prikazano na kojoj razini djeluje kurkumin, koji aktivira GSK3 β .

Kurkumin je žuti spoj koji se dobiva iz biljke *Curcuma longa*, i stoljećima se koristi u narodnoj medicini. Tijekom prošlog stoljeća otkriven je niz pozitivnih učinaka povezanih s kurkuminom, tako da se danas koristi za niz terapijskih tretmana: protuupalno, protiv neurodegenerativnih, kardiovaskularnih, plućnih, metaboličkih, autoimunih i neoplastičnih bolesti (74). Poznat je učinak kurkumina na tumore jajnika: kurkumin inhibira rast tumora na način da djeluje na signalni put NF- κ B (75). Ovaj učinak pokazan je *in vitro* na staničnim

linijama tumora jajnika i *in vivo* u miševima. Od ostalih učinaka poznat je utjecaj kurkumina na aktivnost GSK-3 β . Upravo je taj protein jedan od glavnih poveznica Hh-Gli i Wnt signalnih puteva, budući da na jednaki, ili gotovo jednaki način, regulira aktivnost oba signalna puta nizvodno od membranskih receptora, tj. regulira stabilnost transkripcijskih faktora (76). Kurkumin djeluje na način da degradira ciklin D1 i aktivira GSK3 β (77). Zbog degradacije ciklina dolazi do zastoja u staničnom ciklusu, a zbog aktivacije GSK3 β do aktivacije Gli1 proteina neovisno o kanoničkom prijenosu signala preko Hh-Ptch-Smo osovine (slika 17). U našem istraživanju izravno smo pokazali da kurkumin izaziva staničnu smrt u karcinomima jajnika, i to po prvi put na primarnoj kulturi stanica. Također je prvi put pokazan učinak kurkumina na Hh-Gli signalni put, odnosno na povećanje ekspresije ciljnih gena na način ovisan o dozi.

Iako povećanje ekspresije Gli1 i ostalih gena signalnog puta Hh-Gli može izgledati proturječno s generalnim učinkom kurkumina, mora se uzeti u obzir da je kurkumin spoj s jako širokim rasponom molekularnih meta. Budući da djeluje na niz proteina i signalnih procesa u stanici, vjerojatno je da njegovo poticanje stanične smrti na više drugih razina zapravo nadjačava blagi proliferacijski učinak, koji slijedi iz aktivacije proteina Gli1. Postavlja se pitanje kakav je učinak djelovanja oba spoja zajedno tj. mogu li se koristiti u kombiniranoj terapiji. To je tema budućih istraživanja kojima očekujemo razjasniti barem dio postavljenih pitanja.

6. ZAKLJUČCI

1. Karcinomi jajnika vrlo su heterogeni s aspekata ekspresije gena Ptch, Smo, Gli1, Shh, SuFu i β -katenina, kao i aktivnosti cijelog Hh-Gli puta.
2. Atipični proliferativni tumori jajnika uglavnom imaju povećanu ekspresiju gena Shh.
3. Prema aktivnosti Hh-Gli puta, analizirani tumori jajnika mogu se svrstati u više kategorija:
 - ovisne o ligandu s povećanom razinom Shh (uglavnom atipični proliferativni tumori jajnika) (47 %);
 - neovisne o ligandu s povećanom aktivnošću Smo;
 - s povećanom aktivnošću svih gena Hh-Gli puta i β -katenina i veze s Wnt putem (63%);
 - povećanom aktivnošću Gli1 i SuFu;
 - smanjenoj aktivnosti gotovo svih ispitivanih gena (15%).
4. Usporedbom razine ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli u ispitivanim tumorima ustanovljena je:
 - dobra pozitivna povezanost između ekspresije gena Gli1 i Shh ($\rho=0,644$, $p=0,016$), gena Gli1 i Smo ($\rho=0,669$, $p=0,012$) te gena Ptch i SuFu ($\rho=0,624$, $p=0,02$)
 - izvrsna povezanost β -katenina s Ptch ($\rho=0,801$, $p=0,003$), Smo ($\rho=0,903$, $p=0,001$) i SuFu ($\rho=0,774$, $p=0,004$)
 - izvrsna povezanost Ptch1 i Smo ($\rho=0,822$, $p=0,002$).
5. Analizom ekspresije proteina signalnog puta Hh-Gli u ispitivanim tumorima ustanovljena je povećana ekspresija proteina Ptch (64%) i Smo (78,6%) te, u manjoj mjeri, Gli (14%) i Shh (7%).
6. Analiza ekspresije gena i kliničkih parametara pokazala je da je ekspresija gena Shh veća u atipičnim proliferativnim tumorima u odnosu na karcinome ($p=0,08$).

7. Tumori višeg FIGO stadija značajno su češće pozitivni na Ptch protein ($p < 0,05$).
8. Korelacija fenotip/genotip polimorfizama gena Ptch mogla bi poslužiti kao molekularni biljeg sklonosti ili podložnosti razvijanju tumora jajnika (zastupljenost polimorfizma 2560 IVS G/C u karcinomima jajnika u odnosu na kontrolnu skupinu i dobroćudne tumore, $p < 0,01$).
9. *In vitro* analize primarnih kultura pokazuju na staničnoj razini aktivnost puta Hh-Gli, kao i mogućnost njegove blokade ciklopaminom. Pokazali smo kako je blokada puta ovisna o dozi i ekspoziciji.
10. Prvi je put pokazano na primarnoj kulturi stanica kako kurkumin izaziva staničnu smrt u karcinomima jajnika, kao i učinak kurkumina na Hh-Gli signalni put, odnosno na povećanje ekspresije ciljnih gena na način ovisan o dozi.

7. SAŽETAK

Uvod: Rak jajnika je četvrto najčešće sijelo raka u žena, a preživljenje od raka jajnika nije se značajnije mijenjalo tijekom zadnjih nekoliko desetljeća. Još uvijek ne postoji učinkovita metoda primarnoga probira bolesnica, kao ni osjetljiva klinička ili laboratorijska dijagnostika ranoga stadija bolesti. Hedgehog-Gli (Hh-Gli) put sudjeluje u nastanku barem jedne trećine svih zloćudnih tumora, ali njegov značaj u genezi karcinoma jajnika još uvijek nije istražen.

Bolesnice i metode: Analizirali smo biološki materijal (tumorsko tkivo, tkivo koje nije zahvaćeno tumorom i punu krv) 18 bolesnica, od kojih su 12 imale karcinom jajnika, a preostalih 6 atipični epitelni proliferativni tumor jajnika. Provedena je analiza ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli i β -katenina, njihova međusobna korelacija, korelacija s kliničkim parametrima bolesti, imunohistokemijska analiza ekspresije proteina signalnoga puta te analiza genskih polimorfizama i mutacija gena Ptch i Smo. U konačnici je ispitana mogućnost blokiranja signalnoga puta ciklopaminom i kurkuminom na primarnim staničnim kulturama.

Rezultati: Ekspresija gena Hh-Gli signalnog puta pronađena je u većini analiziranih uzoraka tumora (63-79%), ali i u većini pratećih uzoraka tkiva (68-74%), koja nisu zahvaćena tumorom. Svi uzorci atipičnih proliferativnih tumora pokazali su povećanu ekspresiju liganda, gena Shh (47%), zbog čega bi se mogli svrstati u ligandom inducirani tip tumora. Većina tumora ima povećanu ekspresiju gena Ptch i Smo te β -katenina (63%). Na proteinskoj razini nađena je povećana ekspresija proteina Ptch (64%) i Smo (78%), a pokazali smo i da je ekspresija Ptch proteina značajno povezana s anatomskom proširenošću bolesti ($p < 0,05$). U 6 uzoraka nađen je polimorfizam u eksonu 6 (31,6%), od kojih 3 imaju gubitak heterozigotnosti u promotorskoj regiji gena Ptch, što je značajno češće u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$). Primarne kulture su pokazale inhibiciju ekspresije Hh-Gli gena i β -katenina ciklopaminom, koja je ovisna o dozi, 96 sati nakon tretmana. Po prvi puta smo na primarnoj staničnoj kulturi pokazali i da kurkumin izaziva staničnu smrt u karcinomima jajnika.

Zaključak: Karcinomi jajnika vrlo su heterogeni s aspekta ekspresije gena signalnog puta Hh-Gli i β -katenina. Pojačana ekspresija Ptch proteina značajno je povezana s proširenošću bolesti, a analiza genskih polimorfizama mogla bi poslužiti kao molekularni biljeg sklonosti razvoju zloćudnih tumora jajnika. Budućoj terapiji karcinom jajnika mogla bi doprinijeti činjenica kako je blokada signalnoga puta ovisna o dozi i ekspoziciji ciklopaminom, a

sposobnost izazivanja stanične smrti kurkuminom otvara nove perspektive u istraživanju terapijskih modaliteta karcinoma jajnika.

8. SUMMARY

Introduction: Ovarian cancer is the fourth most common cancer in women, and survival of ovarian cancer has not significantly changed over the past few decades. There is still no effective method of primary screening of patients, as well as sensitive clinical and laboratory diagnosis of early stage disease. Hedgehog-Gli (Hh-Gli) pathway is involved in the occurrence of at least one third of all cancers, but its importance in the genesis of ovarian cancer has not yet been explored.

Patients and Methods: We analyzed the biological material (tumor tissue, the tissue not affected by tumor and blood specimens) of 18 patients, of which 12 had ovarian cancer, and the remaining 6 atypical proliferative ovarian tumor. We performed the analysis of gene expression of Hh-Gli pathway and β -catenin, their mutual correlation and correlation with clinical parameters of disease, immunohistochemical analysis of protein expression and analysis of genetic polymorphisms and the mutation of Ptch and Smo. Finally, the blocking of the signaling pathway with cyclopamine and curcumin on primary cell cultures was investigated.

Results: The gene expression of Hh-Gli pathway was found in most of the analyzed tumor samples (63-79%), but also in the majority of tissue samples not affected by tumor (68-74%). All atypical proliferative tumor samples showed increased expression of the ligand, Shh gene (47%), which could classify them into ligand-induced tumor. Most tumors have increased expression of genes Ptch, Smo and β -catenin (63%). At the protein level increased protein expression of Ptch (64%) and Smo (78%) was found, and we showed that expression of Ptch protein was significantly associated with the anatomical extension of disease ($p < 0,05$). In 6 samples a polymorphism in exon 6 (31,6%) was found, of which 3 had loss of heterozygosity (LOH) in the Ptch gene promotor region, showing significantly higher incidence compared to control group ($p < 0,01$). Primary cell cultures showed inhibition of expression of Hh-Gli genes and β -catenin with cyclopamine, a dose-dependent effect 96 hours after treatment. For the first time we revealed that curcumin caused cell death in ovarian cancer primary cell culture.

Conclusion: The ovarian cancers are very heterogeneous in terms of Hh-Gli pathway and β -catenin gene expression. Increased expression of Ptch protein is significantly associated with extension of disease. The analysis of genetic polymorphisms could serve as a molecular marker of the ovarian cancer. The blocking of Hh-Gli signaling pathway is dose-dependent

after the treatment with cyclopamine and the ability of curcumin to cause cell death opens up new perspectives in the study of therapeutic modalities of ovarian cancer.

9. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj. Bilten br. 21, Zagreb, 2000;10-20.
2. Heintz APM, Odicino F, Naisonneuve P i sur. Carcinoma of the ovary. J Epid Biostat 2001;6:107-38.
3. Riggs JE: Rising ovarian cancer mortality in the elderly: A manifestation of differential survival. Gynecol Oncol 1995;58:64.
4. Lee KR, Tavassoli FA, Prat J, et al. Tumours of the ovary and peritoneum. In: Tavassoli FA, Devillee P, ur. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press, 2003; str. 119–124.
5. Ćorušić A. Prognostička vrijednost pokazatelja proliferacijske aktivnosti atipičnih epitelnih novotvorina jajnika. Doktorska disertacija, Zagreb, 1999.
6. Heintz APM. Management of advanced ovarian cancer. U: Kavanagh JJ, Singletary SE, Einhorn N, DePettrillo AD, ur. Ovarian and fallopian tube cancer. Malden-Winnipeg: Blackwell Science, 1999; str. 50-66.
7. Cuatrecasas M, Erill N, Musulen E, Costa I, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in nonmucinous ovarian epithelial tumors: a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients. Cancer 1998;82:1088-95.
8. Lynch HT, Casey MJ, Lynch JF, Rebberck TR. Hereditary cancer in women. U: Gregg S, Mancuso S, Pecorelli S, ur. Familial and hereditary cancer in women. Milano: Poletto, 1999.
9. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Hedgehog Signal Transduction: From Flies to Vertebrates. Exp Cell Res 1999;253:25-33.
10. Hunter T. Oncoprotein networks. Cell 1997;88:333-46.
11. Cross SS, Bury JP. The Hedgehog signaling pathways in human pathology. Curr Diag Pathol 2004;10:157-168.
12. Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in *Drosophila*. Biochim Biophys Acta 2002;19:280-91.
13. 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.
14. Haegerbarth A, Clevers H. Wnt signaling, *lgr5*, and stem cells in the intestine and skin. Am J Pathol 2009;174:715-21.
15. Quinlan R, Graf M, Mason I, Lumsden A, Kiecker C. Complex and dynamic patterns of Wnt pathway gene expression in the developing chick forebrain. Neural Dev 2009;4:35.
16. Bale AE, Yu KP. The hedgehog pathway and basal cell carcinoma. Hum Mol Genet 2001;10: 757-62.
17. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Fantasia JE, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. Nature Genet 1996;12:85-7.
18. Booth DR. The hedgehog signaling pathway and its role in basal cell carcinoma. Cancer Metast Reviews 1999;18:261-84.
19. Levanat S, Kappler R, Hemmerlein B, i sur. Analysis of alterations of the PTCH1 signaling pathway in ovarian dermoids. Int J Mol Med 2004;14:793-9.
20. Levanat S, Pavelić B, Crnić I, Orešković S, Manojlović S. Involvement of PTCH gene in various noninflammatory cysts. J Mol Med 2000;78:140-6.
21. Pietsch T, Waha A, Koch A, i sur. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila patched*. Cancer Res 1997;57:2085-8.

22. Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, i sur. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nature Cell Biol* 2006;8: 1415-23.
23. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, i sur. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 1987;236:70-3.
24. Stecca B, Mas C, Clement V, i sur. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *PNAS* 2007;104: 5895-900.
25. Bar-Eli M. The HOG-GLI face of melanoma. *Pigment Cell Res* 2007;20: 341-2.
26. Vořechovský I, Undén AB, Sandstedt B, Toftgård R, Stähle-Bäckdahl S. Thichoepitheliomas contain somatic mutations in the overexpressed PTCH gene: support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis. *Cancer Res* 1997;57:4677-81.
27. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom L-G, Toftgård R, Undén B. Deregulation of the hedgehog signaling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* 2006;208:17-25.
28. Zhan S, Helman LJ. Glimpsing the cause of rhabdomyosarcoma. *Nat Med* 1998;45:559-60.
29. Qualthorough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumor cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* 2004;110:831-7.
30. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, i sur. Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004;431:707-12.
31. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003;422:313-7.
32. Fujita E, Khoroku Y, Urase K, i sur. Involvement of *Sonic hedgehog* in the cell growth of LK-2 cells, human lung squamous carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;238:658-64.
33. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, i sur. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-6.
34. Aboukassim TO, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. Alteration of the *PATCHED* locus in superficial bladder cancer. *Oncogene* 2003;22:2969-71.
35. Thievensen I, Wolter M, Prior A, Seifert H-H, Schulz WA. Hedgehog signaling in normal urothelial cells and in urothelial carcinoma cell lines. *J Cell Physiol* 2005;203:372-7.
36. Vila G, Theodoropoulou M, Stalla J, i sur. Expression and function of Sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation. *J Clin Endocrin Metab* 2005;90:6687-94.
37. Katano M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Lett* 2005;227:99-104.
38. Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, i sur. Hedgehog signal is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Sci* 2007;98:68-76.
39. Liao X, Sui MKY, Au CWH, i sur. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis* 2009;30:131-40.
40. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, i sur. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* 2007;21:949-55.

41. Strange RC, El-Genidy N, Ramachandran S, i sur. Susceptibility to basal cell carcinoma: associations with *PTCH* polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2004;68:536-46.
42. Chang-Claude J, Dunning A, Schnitzbauer U, i sur. The *Patched* polymorphism Pro1315Leu (C3944T) may modulate the association between use of oral contraceptives and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2003;103:779-83.
43. 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;196:875-83.
44. Wolf I, Bose S, Desmond JC, i sur. Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of *PTCH* in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007;105:139-55.
45. Pritchard JJ, Olson JM. Methylation of *PTCH1*, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;180:47-50.
46. Walterhouse DO, Lamm ML, Villavicencio E, Iannacone PM. Emerging roles for hedgehog-patched-Gli signal transduction in reproduction 2003;69:8-14.
47. Russel MC, Cowan RG, Harman RM, Walker AL, Quirk SM. The hedgehog signaling pathway in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2007;77:226-36.
48. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, i sur. Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. *Hum Cancer Biol* 2008;14:7659-65.
49. Eichberger T, Sander V, Scnidar H, i sur. Overlapping and distinct regulator properties of the *GLI1* and *GLI2* oncogenes. *Genomics* 2006;87:616-32.
50. Regl G, Neill GW, Eichberger T, i sur. Human *GLI2* and *GLI1* are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene* 2002;21:5529-39.
51. Kallassy M, Toftgard R, Ueda M, i sur. *Patched* - associated preferential expression of *Smoothened* in human basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Res* 1997;57:4731-5.
52. Koch A, Waha A, Hartmann W, i sur. No evidence for mutations or altered expression of the *Suppressor of Fused (SUFU)* in primitive neuroectodermal tumours. *Neuropath Applied Neurobiol* 2004;30:532-9.
53. Wong SCC, Lo SFE, Cheung MT, i sur. Quantification of plasma β -catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:613-7.
54. Boutet N, Bignon YJ, Drouin-Garraud V, i sur. Spectrum of *PTCH* mutations in French patients with Gorlin syndrome. *J Invest Dermatol* 2003;121:478-81.
55. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos P i sur. Mutations of the human homolog of *Drosophila patched* in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996;85:841-51.
56. Lench NJ, Telford EA, High AS, Markham AF, Wicking C, Wainwright BJ. Characterisation of human patched germ line mutations in naevoid basal cell carcinoma syndrome. *Hum Genet* 1997;100:497-502.
57. Xie J, Murone M, Luoh SM, i sur. Activating *Smoothened* mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998;391:90-2.
58. Musani V. Mehanizmi regulacije signalnog puta Hedgehog/Patched/Gli u tumorima i nasljednim oboljenjima. Doktorska disertacija, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 13.05. 2008, 172 str. Voditelj: Levanat, Sonja.
59. Zhang Y, Kalderon D. Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the *Drosophila* ovary. *Nature* 2001;410:599-604.
60. Slaughter DP, Southwick HW. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-8.
61. Tsuji T, Catusus L, Prat J. Is loss of heterozygosity at 9q22.3 (*PTCH* gene) and 19p13.3 (*STK11* gene) involved in the pathogenesis of ovarian stromal tumors? *Hum Pathol* 2005;36:792-6.

62. Mansilla MA, Cooper ME, Goldstein T, i sur. Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J* 2006;43:21-9.
63. Heitzer E, Lassacher A, Quehenberger F, Kerl H, Wolf P. UV fingerprints predominate in the PTCH mutation spectra of basal cell carcinomas independent of clinical phenotype. *J Invest Dermatol* 2007;127:2872-81.
64. Pastorino L, Cusano R, Nasti S, i sur. Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum Mutat* 2005;25:322-3.
65. Hasenpusch-Theil K, Bataille V, Laehdetie J, Obermayr F, Sampson JR, Frischauf AM. Gorlin syndrome: identification of 4 novel germ-line mutations of the human patched (PTCH) gene. *Mutations in brief no. 137. Hum Mutat* 1998;11:480.
66. Calzada-Wack J, Schnitzbauer U, Walch A, i sur. Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma. *Hum Mutat* 2002;20:233-4.
67. Fujii K, Kohno Y, Sugita K, i sur. Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum Mutat* 2003;21:451-2.
68. Sun LS, Li XF, Li TJ. PTCH1 and SMO gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *J Dent Res* 2008;87:575-9.
69. Zedan W, Robinson PA, High AS. A novel polymorphism in the PTC gene allows easy identification of allelic loss in basal cell nevus syndrome lesions. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:41-5.
70. Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T, Reifenberger G. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 1997;57:2581-5.
71. Evans T, Boonchai W, Shanley S, i sur. The spectrum of patched mutations in a collection of Australian basal cell carcinomas. *Hum Mutat* 2000;16:43-8.
72. Asplund A, Gustafsson AC, Wikonkal NM, i sur. PTCH codon 1315 polymorphism and risk for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2005;152:868-73.
73. Liboutet M, Portela M, Delestaing G, i sur. MC1R and PTCH gene polymorphism in French patients with basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* 2006;126:1510-7.
74. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:40-59.
75. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, i sur. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor- κ B pathway. *Clin Cancer Res* 2007;13:3423-30.
76. Kim L, Kimmel AR. GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr Drug Targets* 2006;7:1411-9.
77. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy. *Cell Signalling* 2007;20:581-9.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1970. u Splitu. Osnovnu i srednju školu završio sam u Zagrebu. 1995. godine sam diplomirao na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, s prosječnom ocjenom studija 4,7.

Obvezni temeljni pripravnički staž i sekundarijat obavio sam u KB "Sestre Milosrdnice" od 1995. do 1997. godine.

Od srpnja 1997. do veljače 2001. radio sam kao znanstveni novak Medicinskog fakulteta na znanstvenom projektu Ministarstva znanosti RH br. 108-032 "Čimbenici u nastanku prijevremenog poroda" voditelja prof. dr. Ivana Kuvačića, u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a, Petrova 13, Zagreb.

Od veljače 2001. do travnja 2005. obavljao sam specijalizaciju iz ginekologije i opstetricije u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb. Specijalistički sam ispit položio 5. travnja 2005. Trenutno radim u Zavodu za ginekološku kirurgiju i urologiju Klinike za ženske bolesti i porode, a u listopadu 2010. položio sam subspecijalistički ispit iz ginekološke urologije. Suradnik sam na znanstvenom projektu Ministarstva znanosti RH br. 1897, šifra 074-0982464-1187 "Kliničko značenje tumorske hipoksije u bolesnika liječenih radioterapijom", voditeljice dr. sc. Lidije Beketić-Orešković.

Završio sam znanstveni poslijediplomski studij "Medicinske znanosti" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Magistarski rad „Osobitosti arterijskog protoka krvi u fetusa s trajnim neurološkim oštećenjima“ obranio sam u lipnju 2001. godine.

Do sada sam objavio više znanstvenih i stručnih radova, od toga 17 indeksiranih u Current Contents.