Izražaj Yamanakijevih faktora u tumorima mokraćnog mjehura u miševa

Katunarić, Boran

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:938088

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Boran Katunarić

IZRAŽAJ YAMANAKIJEVIH FAKTORA U TUMORIMA MOKRAĆNOG MJEHURA U MIŠEVA

DIPLOMSKI RAD

Akademska godina

2015./2016.

Mentor:

Prof. dr. sc. Janoš Terzić

Split, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Boran Katunarić

IZRAŽAJ YAMANAKIJEVIH FAKTORA U TUMORIMA MOKRAĆNOG MJEHURA U MIŠEVA

DIPLOMSKI RAD

Akademska godina

2015./2016.

Mentor:

Prof. dr. sc. Janoš Terzić

Split, srpanj 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

1.1. Karcinom mokraćnog mjehura ... **2**

1.1.1. Epidemiologija ... 2

1.1.2. Rizični faktori ... 2

1.1.3. Dijagnostika ... 3

1.1.4. Klinička slika ... 4

1.1.5. Liječenje ... 5

1.1.6. Prognoza ... 5

1.2. Inducirane pluripotentne matične stanice (iPS) ... **6**

1.2.1. Yamanakijevi faktori ... 6

1.2.2. Dediferencijacija tumorskih stanica ... 7

1.2.3. Terapijske mogućnosti ... 8

2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 9

3. MATERIJALI I METODE ... 11

3.1. Miševi i BBN tretman ... 12

3.2. Postupak izolacije RNA iz tkiva ... 12

3.3. Sinteza cDNA i priprema Q-PCR ... 13

3.4. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (Q-PCR) ... 13

3.5. Obrada podataka ... 15

4. REZULTATI ... 17

5. RASPRAVA ... 21

5.1. Sox2 ... 22

5.2. Klf4 ... 22

5.3. Nanog ... 23

5.4. Pogled u budućnost ... 23

6. ZAKLJUČCI ... 24

7. POPIS CITIRANE LITERATURE ... 26

8. SAŽETAK ... 31

9. SUMMARY ... 33

10. ŽIVOTOPIS ... 35

1. UVOD

1.1. Karcinom mokraćnog mjehura

Mjehur je šuplji organ s fleksibilnom mišićnom stijenkom smješten u donjem dijelu abdomena. Uloga mu je sakupljanje i pohrana urina do uriniranja. Karcinom mokraćnog mjehura je bolest u kojem se normalne stanice mjehura promjene u zloćudne - karcinomske stanice, te se nekontrolirano množe (1).

Zloćudni tumor nastane kada se stanice u tijelu, u ovom slučaju stanice mjehura, znatno promjene i kada dobiju sljedeće odlike: stalna stimulacija njihovog umnožavanja i nemogućnost kontroliranja tog procesa, zadobivanje besmrtnosti, otpornost na staničnu smrt, poticanje nastanka novih krvnih žila i stjecanje sposobnosti metastaziranja. Tim procesima koji čine temelj zloćudnih tumora redovito su pridruženi i genomska nestabilnost, poremećena stanična energetika, izbjegavanja tumora imunosnom sustavu i nastanak pro-tumorske upale. Pojam karcinom odnosi se na zloćudne tumore koji su nastali od epitelnih stanica. (2)

Postoje 3 vrste karcinoma koji primarno zahvaćaju mjehur. Nazivaju se po stanicama koje postanu karcinomske. To su (2):

- Karcinom prijelaznih stanica (urotela)
- Karcinom pločastih stanica
- Adenokarcinom

1.1.1. Epidemiologija

Karcinom mjehura je četvrta najčešća maligna bolest među muškarcima u zapadnom svijetu, odmah nakon prostate, pluća i kolona. U Europi i SAD-u, karcinom mokraćnog mjehura uzrokuje 5 do 10% svih karcinoma u muškaraca. Incidencija u žena je četiri puta manja. Srednja dob pri dijagnozi je 65 do 70 godina (3).

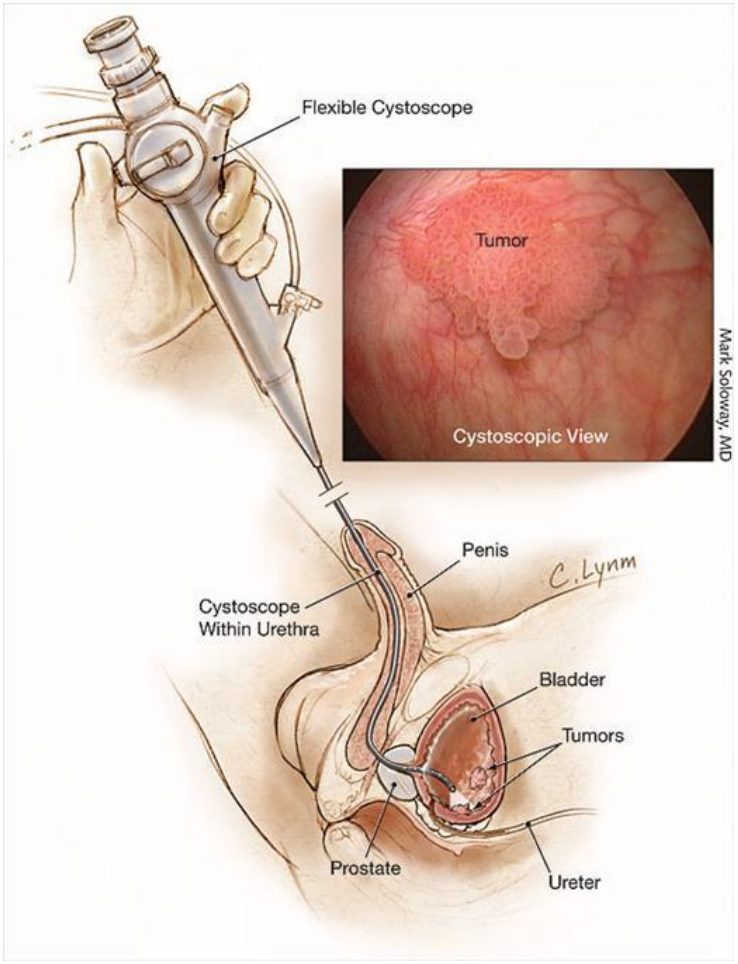
1.1.2. Rizični faktori

Sve što povećava šansu da osoba dobije karcinom zove se rizični faktor. Prisutnost rizičnih faktora ne znači da će osoba dobiti karcinom, kao što ni odsustvo ne znači da osoba neće dobiti karcinom. Poznati rizični faktori za karcinom mjehura uključuju (4):

- Konzumiranje duhana, naročito pušenje cigareta
- Postojanje karcinoma mjehura u obiteljskoj anamnezi
- Prisutnost nekih gena povezanih s karcinomom mjehura
- Tretmani zračenjem u području zdjelice ili korištenje nekih citostatika (ciklofosfamid, ifosfamid)
- Konzumiranje vode s visokom razinom klora ili arsena
- Dugotrajno korištenje urinarnih katetera
- Učestale infekcije mokraćnog mjehura

1.1.3. Dijagnostika

Postavljanje dijagnoze karcinoma mokraćnog mjehura obavlja se putem biokemijske i citološke analize urina, cistoskopije, intravenske urografije, kompjuterizirane tomografije i drugih metoda. Cistoskopija, proces uvlačenja cistoskopa kroz uretru u mjehur, metoda je izbora za neuznapredovale karcinome jer omogućava operateru da vizualizira unutarnju stjenku mjehura, vidi promjene te uzme bioptat na licu mjesta (Slika 1). Druga važna dijagnostička metoda je intravenska urografija pri kojoj, uz pomoć kontrastnog sredstva, liječnik na rentgenskoj slici može pronaći karcinom. Za invazivne karcinome koriste se metode poput kompjuterizirane tomografije, magnetske rezonance i drugih (5).



Slika 1.Shematski prikaz cistoskopije. Cistoskopom se kroz mokraćnu cijev uđe u mokraćni mjehur te se pod kontrolom oka može napraviti dijagnostički pregled ili terapijska intervencija. Preuzeto iz: (5)

1.1.4. Klinička slika

Glavni simptom karcinoma mokraćnog mjehura je bezbolna hematurija koja je prisutna u 85% bolesnika. Može biti makrohematurija ili mikrohematurija. Makrohematurija (vidljiva prostim okom) je najčešće povremena i često praćena ugruščima. Osim hematurije, mogu postojati i poremećaji mokrenja kao što su disurije, polakisurije i urgencije. Nakon isključivanja infekcije, ovi simptomi ukazuju na karcinom mokraćnog mjehura (6).

1.1.5. Liječenje

1.1.5.1. Liječenje površinskih tumora mokraćnog mjehura

Primarni oblik liječenja površinskog raka mokraćnog mjehura jest transuretralna endoskopska resekcija (TUR). S obzirom na visoku stopu lokalnog vraćanja bolesti, nakon resekcije potrebno je u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju. Adjuvantno se intravezikalno aplicira imunoterapija ili kemoterapija. U imunoterapiji površinskog karcinoma mokraćnog mjehura primjenjuje se BCG (*Bacillus Calmette Guérin*) dok se od citostatika najčešće primjenjuje mitomicin C. Intravezikalna imunoterapija i kemoterapija produljuju preživljenje bez znakova bolesti te smanjuju broj recidiva (7).

1.1.5.2. Liječenje invazivnog raka mokraćnog mjehura

Osnovni oblik liječenja invazivnog raka mokraćnog mjehura jest radikalna cistektomija, s neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenom na cisplatini uz adjuvantnu kemoterapiju ovisno o patohistološkoj slici tumora, statusu regionalnih limfnih čvorova i stadiju bolesti. Rjeđe se primjenjuje parcijalna cistektomija. Metastatska bolest liječi se kemoterapijom (7).

1.1.6. Prognoza

Petogodišnje preživljenje najprecizniji je indikator prognoze bolesti. Mane su mu što uključuje pacijente koji su započeli liječenje prije 5 godina, ne uključuje recidive i to što svrstava pacijente samo po stadiju bolesti, a ne i po ostalim čimbenicima poput dobi, fizičkog i socijalnog stanja itd. Sve to uzevši u obzir, stopa petogodišnjeg preživljenja iznosi (8):

- Za stadij 0 stopa petogodišnjeg preživljenja iznosi 98%
- Za stadij 1 stopa petogodišnjeg preživljenja iznosi 88%
- Za stadij 2 stopa petogodišnjeg preživljenja iznosi 63%
- Za stadij 3 stopa petogodišnjeg preživljenja iznosi 46%
- Za stadij 4 stopa petogodišnjeg preživljenja iznosi 15%

1.2. Inducirane pluripotentne matične stanice (iPS)

Inducirane pluripotentne matične stanice potječu od diferenciranih stanica (najčešće fibroblasta) koje su genetski reprogramirane u stanice koje sliče na embrionske matične stanice (EMS) kroz pojačanu ekspresiju gena važnih za održavanje osnovnih svojstava embrionskih matičnih stanica. Iako ove stanice zadovoljavaju definirajuće kriterije za pluripotentne matične stanice, još uvijek nije poznato razlikuju li se iPS i EMS u klinički značajnim varijablama. Mišje iPS demonstrirale su značajne karakteristike EMS, uključujući ekspresiju markera matičnih stanica, formiranje tumora koji se sastoje od sva 3 zametna listića te mogućnost stvaranja mnogo različitih tkiva kad su injicirane u mišji embrio tijekom vrlo ranog stadija razvoja. Iako su potrebna dodatna istraživanja, iPS već se koriste u razvoju lijekova i stvaranju modela za različite bolesti, čak i za transplantacijsku medicinu. Tkiva stvorena ovim putem su ista kao i originalna te budući da potječu od istog organizma izbjegavaju imunološku reakciju primatelja (9).

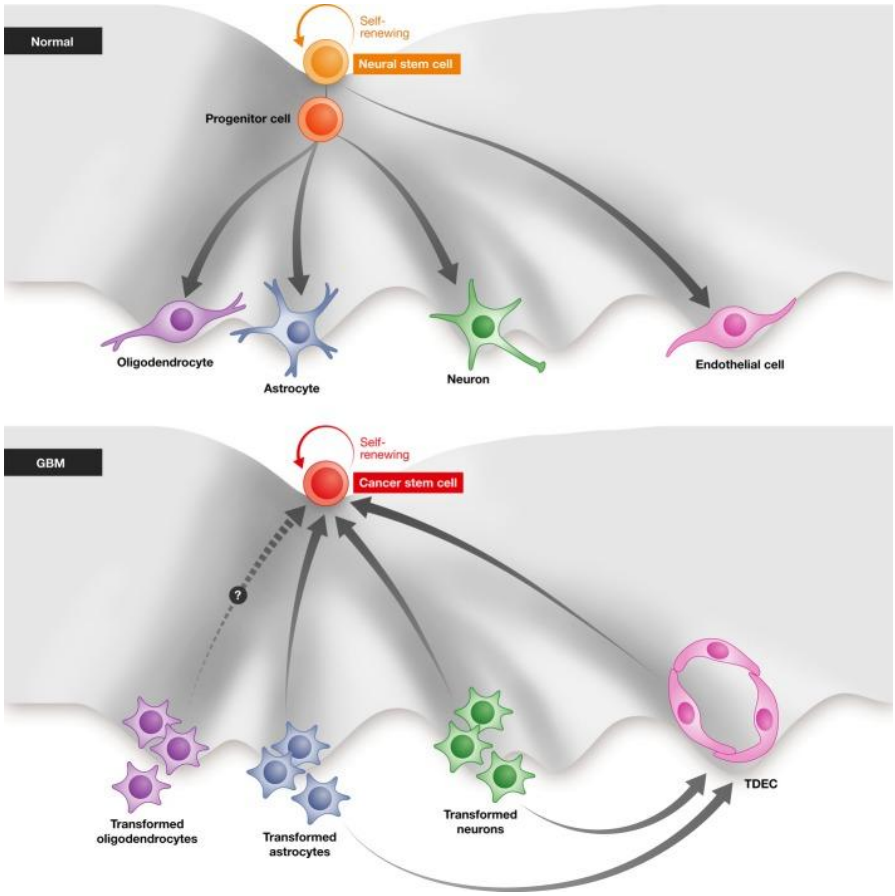
1.2.1. Yamanakijevi faktori

Takahashi i Yamanaka (10) demonstrirali su da retrovirusima posredovano ubacivanje samo 4 gena (*Pou5f1*, *Sox2*, *c-Myc*, i *Klf4*) u fibroblaste odraslih miševa može dovesti stvaranje stanica s karakteristikama matičnih stanica tzv. iPS stanica. Te se stanice mogu diferencirati u endodermalne, ektodermalne i mezodermalne loze stanica (11).

Inducirane pluripotentne matične stanice prvi put su proizvedene 2006. godine ubacivanjem 4 gena - Yamanakijeva faktora (kasnije otkriven i *Nanog* gen koji se pokazao esencijalnim za pluripotenciju iPS-a u miševa (12). Humani fibroblasti pretvoreni su u iPS 2007. godine što označava prekretnicu koja bi potencijalno mogla riješiti etičke i imunološke probleme s upotrebom ljudski embrionalnih stanica u regenerativnoj medicini. Yamanakijevi faktori, vjeruje se, potiču većinu, ako ne i sve, bitne razvojne signalne putove potrebne za indukciju iPS, a bitni su i za održavanje pluripotentnosti matičnih stanica (13).

1.2.2. Dediferencijacija tumorskih stanica

Odavno je poznato da mnoge stanice karcinoma posjeduju biljege i svojstva embrionalnih matičnih stanica i da su neke bile meta terapijama. Otkriće karcinomskih matičnih stanica korak je dalje u tom smjeru (14). Tijekom embrionalnog razvoja organizma, događaji su determinirani i kreću se u jednom smjeru, bez mogućnosti obrata razvojnih procesa. Otkriće Yamanake i Takahashija pokazuje da se konačno diferencirane stanice, poput fibroblasta, mogu vratiti unazad kroz diferencijacijski put prema pluripotentnim stanicama, nešto slično događa se tijekom razvoja karcinoma. Konvergencija i sličnost karcinomskih matičnih stanica i iPS mogla bi utabati novi put za terapeutske pristupe rekurentnim karcinomima (Slika 2) (15).



Slika 2. Shematski prikaz obrata razvojnog procesa u neoplazmama neuralnog tkiva. Već diferencirane stanice pretvaraju se u karcinomske matične stanice. Preuzeto iz: (15)

1.2.3. Terapijske mogućnosti

Budući da karcinomske matične stanice (KMS) igraju važnu ulogu u metastaziranju te u rezistenciji na kemoterapiju i radioterapiju obećavajuća terapija za karcinom mora ciljati ne samo većinu tumorske populacije, već specifično KMS (16). Da terapija koja cilja KMS funkcionira, dokazao je Jin i suradnici kada su 2009., na mišjem modelu, povećali preživljenje od akutne mijeloidne leukemije čije su KMS uništavali specifičnim protutijelima (17). Premda već postoje mogućnosti liječenja ciljanom terapijom protutijelima poput rituksimaba i sl., te terapije trajno ne uništavaju tumorsko tkivo. Tek napadom na karcinomske matične stanice povećavaju se izgledi za trajno izlječenje raka.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Utvrditi postojanje dediferencijacije urotelnih stanica kroz aktivaciju Yamanakijevih faktora (čimbenika indukcije matičnih stanica) tijekom nastanka tumora mokraćnog mjehura u miša.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Miševi i BBN tretman

U istraživanju su se koristili divlji tip (WT) miševa C57BL/6J. Skupine su se sastojale od 8 miševa, a eksperimentalna skupina podvrgnuta je akutnom tretmanu korištenjem kemikalije N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN) u vodi za piće u koncentraciji od 0,05% sa svrhom indukcije tumora mokraćnog mjehura. Indukcija tumora s BBN-om slijedila je već objavljene i ustaljene protokole (18). Miševi iz kontrolne skupine bili su ujednačene dobi od 6 do 8 tjedana te su boravili u istim uvjetima kao i miševi tretirani BBN-om. Tretman BBN-om bio je akutni i trajao je 2 tjedna, nakon čega su miševi žrtvovani. Miševi korišteni u istraživanju uzgajani su, anestezirani i žrtvovani prema europskim i hrvatskim smjernicama za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja, a sa životinjama su radili kvalificirani istraživači. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Ministarstva poljoprivrede te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu.

3.2. Postupak izolacije RNA iz tkiva

Izolacija RNA iz zdravog i tumorskog tkiva prvi je korak u istraživanju. Uzorak iz tekućeg dušika homogeniziran je snažnim udaranjem metalnim čekićem, a nakon toga uzorak smrvljenog tkiva prebačen u 1,5 ml tubice bez DNAze i RNAze u koju se dodaje 1mL Qiazol Lysis reagensa i ostavlja da odstoji 5 minuta na 15-25^{o}C. Korišteno je ~100 mg uzorka na 1 ml reagensa, a volumen dodanog tkiva ne smije prelaziti 10% volumena Qiazol Lysis Reagent-a. Zatim se smjesi doda 0,2mL kloroforma i vorteksira 15 sekundi, te ostavlja da smjesa odstoji na sobnoj temperaturi 2-3 minute. Nakon toga slijedi centrifugiranje smjese na 12,000 okretaja kroz 15 minuta na temperaturi od 4^{o}C. Rezultat centrifugiranja je taloženje proteina na dnu tubice, DNA u srednjem sloju i RNA na vrhu. Prozirna faza u kojoj se nalazi molekula mRNA pipetiranjem se prebaci u novu tubicu i doda joj se 0,5mL isopropanola (na 1 ml Qiazol Lysis Reagent-a) te vorteksira i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon ponovnog centrifugiranja na 12,000 okretaja kroz 10 minuta na temperaturi od 4^{o}C u tubici dobije se RNA pelet kao bijeli talog na dnu. Aspirira se supernatant i na RNA dodaje 1mL 75% etanola i ponovno centrifugira na 7,500 okretaja kroz 15 minuta na temperaturi od 4^{o}C. Nakon ponovnog otklanjanja supernatanta ostavlja se RNA pelet da se osuši. U posljednjem koraku RNA talog je pažljivim pipetiranjem otopljen u određenom volumenu *DNase, RNase free* vode (30µl). Istim postupkom izolirana je RNA iz svih 16 uzoraka (8 uzoraka zdravog i 8

uzoraka tumorskog tkiva istog ispitanika). Nakon toga moguće koncentracija RNA je izmjerena spektrofotometrom (NanoDrop Spectometar). Uzorci su zatim pohranjeni na -80°C do postupka sinteze cDNA.

3.3. Sinteza cDNA i priprema Q-PCR

Izolirana mRNA prevodi se u cDNA enzimom reverznom transkriptazom. Za sintezu cDNA je korišten kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD*).

Za vrijeme cijelog postupka sve komponente kita drže se na ledu. U tubici se miješaju sljedeće komponente: 10x *RT Buffer* (2,0 µl), 25x *dNTP Mix*(100mM) (0,8 µl), 10xRT *Random Primers* (2,0 µl), *MultiScribe™Reverse Transcriptase* (1,0 µl), *RNase Inhibitor* (1,0 µl), voda bez nukleaza (3,2 µl), RNA (izračuna se, do 1µg) i doda se voda bez RNaza do 20µL. Budući da je navedena smjesa je dostatna za jedan uzorak, smjesa je načinjena za sva 24 uzorka istovremeno i podijeljena na 24 tubice u koje je naknadno dodana RNA (1µg) u potrebnom volumenu s vodom bez RNaza do 20µL. Nakon nježnog miješanja sadržaja tubice, slijede 3 koraka inkubacije: 10 minuta na 25^{o}C, 30 minuta na 50^{o}C te 5 minuta na 85^{o}C. Zatim se doda 1µL *E. coli RNaseH* i inkubira 20 minuta na 37^{o}C. Dobivena cDNA može se koristiti za kvantitativni PCR ili pak pohraniti na -20^{o}C.

Svaka jažica na ploči koja ide u RT-PCR aparat (*7500 Real Time PCR System-Applied Biosystems, Foster City, California, SAD*) sadrži uzorak od ukupno 20µL, od kojih je 16µL MIX-a i 4µL uzorka cDNA. MIX se sastoji od 4µL *RNaza/DNaza free* vode, 10µL *SYBR Green* boje, te po 1µL *Forward* i 1µL *Reverse* početnice za svaki pojedinačni uzorak cDNA.

Zbog kontrole uspješnosti PCR-a, na svaku ploču ispipetirani su i kontrolni uzorci koji su uz MIX s početnicama, sadržavali i aktin. Aktin je uvijek podjednako izražen u svakom humanom tkivu te služi kao kontrola izražaja gena u tim tkivima.

Preko gotove ploče lijepi se naljepnica kako se uzorci ne bi pomiješali te se centrifugira na 4,600 okretaja kroz 13 minuta na 4^{o}C.

3.4. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (Q-PCR)

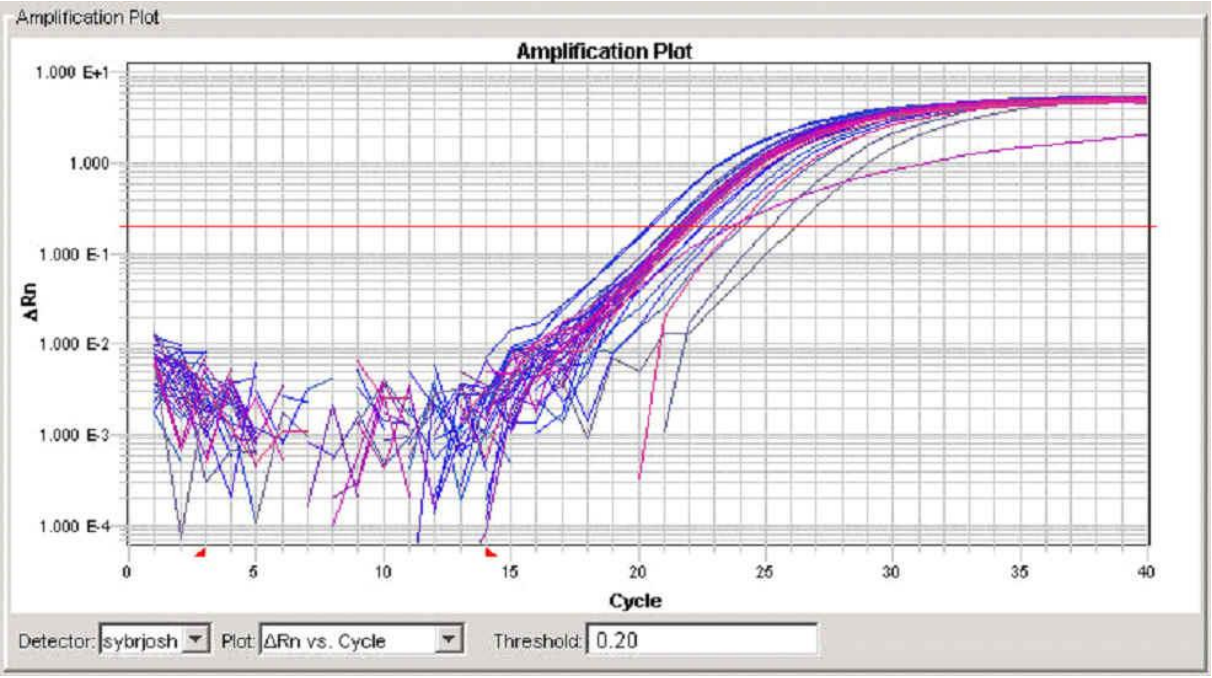
Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*) laboratorijska je metoda koja omogućava višestruko umnažanje određenog DNA fragmenta iz jako male

količine početnog materijala, stvarajući eksponencijalno rastući broj kopija. Sastoji se od tri osnovna koraka. Prvi korak je denaturacija dvolančane DNA u jednolančanu uz pomoć topline, najčešće na temperaturi od 95 ^{o}C. Drugi korak je hibridizacija komplementarnih oligonukleotidnih lanaca tj. primera s jednolančanom DNA. Treći korak je produljenje početnica uz pomoć enzima Taq polimeraze, na visoku temperaturu otporne DNA polimeraze, stvarajući novi lanac po modelu jednolančane DNA. Otpornost na visoku temperaturu je veoma važna, jer se na kraju svakog ciklusa kopiranja DNA dvolančana DNA mora ponovno denaturirati. Tri navedena koraka čine jedan ciklus PCR-a na kraju kojega se broj DNA kopija udvostruči, a koji se tokom reakcije ponavlja 25-45 puta pri čemu se željeni fragment DNA umnoži milijun do milijardu puta.

U tradicionalnom PCR-u, rezultat se analizira samo na kraju reakcije. Najčešće korištena metoda detekcije je elektroforeza na agaroznom gelu koja razdvaja DNA fragmente na osnovu njihove molekularne mase. Na kraju razdvajanja, gel se boja etidij bromidom koji veže DNA i može se vizualizirati pod UV svjetlom. Prisustvo gena u izuzetno velikom broju od milijun do milijardu kopija olakšava njegovu detekciju, a zatim i analizu eventualnih izmjena njegove nukleotidne strukture. Međutim često je važno ne samo otkriti neki gen u uzorku, već i odrediti broj kopija u kojima je prisutan. Problem koji nastaje u korištenju tradicionalnog PCR-a je postojanje platoa detekcije na agaroznom gelu, što znači da ako postoje veoma niske koncentracije originalne DNA nećemo biti u mogućnosti na taj način detektirati i kvantificirati željene fragmente. Klasična metoda RT-PCR (engl. *reverse transcriptase PCR*) je semikvantitativna, stoga je potreba za preciznijom kvantifikacijom mRNA dovela do razvoja nove tehnike nazvane kvantitativna PCR u stvarnom vremenu (Q-PCR). Q-PCR je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNA. Za reakciju su potrebne vrlo male količine mRNA, što omogućava upotrebu ove metode u slučajevima kada na raspolaganju imamo vrlo male količine tkiva (mikrodetekcija). Produkti PCR-a obilježeni fluorescencijskom bojom kontinuirano se analiziraju. Fluorescencijska boja (najčešće se koristi *SYBR Green I*) vezana je uz prigušivač (Q- *quencher*), a emitira fluorescenciju tek nakon razdvajanja od njega, tj. vezanjem za dvolančanu (novonastalu) DNA. Dakle, mjerenjem fluorescencije mjerimo nastalu DNA jer količina fluorescencije razmjerna je količini PCR proizvoda.

Ovo omogućava detekciju originalne mRNA/cDNA u femtogramima. Rezultati Q-PCR-a se očitavaju na krivulji umnažanja. Ta krivulja pokazuje porast intenziteta fluorescencije (laserski detektirano) u odnosu na broj PCR ciklusa. U tu krivulju se postavlja detekcijski prag, koji nakon što ga intenzitet fluoresciranja prijeđe, ukazuje na sigurnu pojavu

umnažanja kopija DNA (Slika 3). Ciklus u kojem je taj prag prijeđen se naziva CT tj. pragovni ciklus (engl. *cycle threshold*). Što je ciklus u kojemu se prijeđe prag niži, veća je količina DNA u određenom uzorku (i obrnuto).



Slika 3. Amplifikacijske krivulje Q-PCR reakcije. Slika prikazuje dinamiku promjene flourescencije (RN) testiranih uzoraka u odnosu na broj ciklusa (Cycles) umnažanja testirane mRNA. Količina početnog materijala diktira vrijednost u kojoj fluorescencija pojedinog uzorka prijeđe predviđeni intenzitet – prag ciklusa (Ct). Niže Ct vrijednosti ukazuju na veću količinu startnih mRNA/cDNA molekula, a to odgovara njegovom većem izražaju.
Preuzeto sa: http://www.joshuapgray.com/RealtimePCR/dataanalysisguide.html

3.5. Obrada podataka

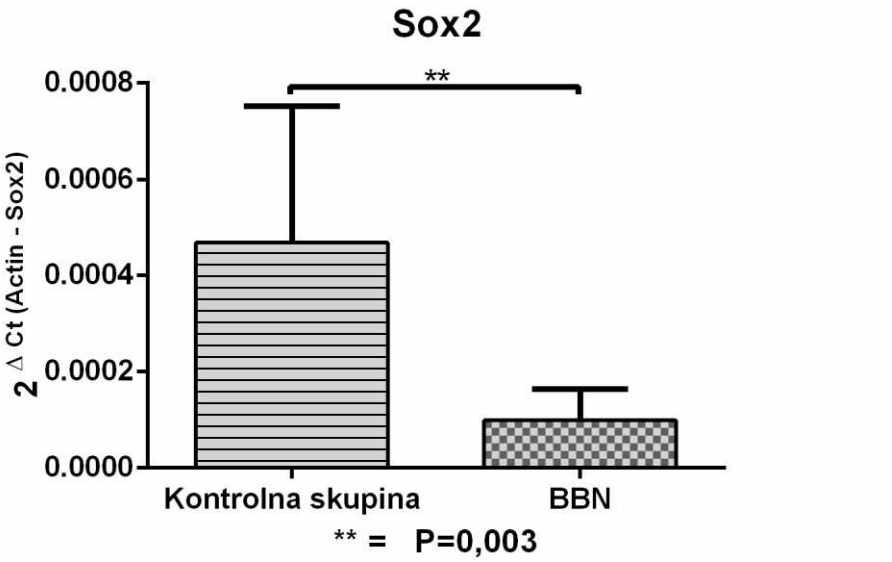
Mjerile su se relativne promjene izražaja ciljanih gena (*Pou5f1, Sox2, Nanog* i *Klf4*) u miševa koji su prošli BBN tretman i WT miševa, a kao endogena kontrola za kvantifikaciju korišten je gen za aktin.

Relativne vrijednosti promjena ciljnog gena u odnosu na kontrolni, za tumorsko i zdravo tkivo dobivene su po formuli $2^{(C_T \text{ kontrole} - C_T \text{ ciljanog gena})}$. Zatim je izračunat omjer relativnih vrijednosti za tumorsko tkivo i relativne vrijednosti za zdravo tkivo i time je

dobivena razina promjene (porast ili pad) izražaja ciljnog gena u tumorskom tkivu. Omjer > 2 smatran je porastom izražaja promatranih gena. Napravljeni su nespareni t testovi kako bi se utvrdila promjena izražaja istraživanih gena u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo netretiranih miševa. Vrijednost od $P<0,05$ smatrana je statistički značajnom. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Izračun relativnih promjena ciljnih gena napravljen je u programima *Microsoft Office Excel 2007(Microsoft, Redmond, Washington, SAD)* i *GraphPad Prism 6(GraphPad Software inc., La Jolla, California, SAD).*

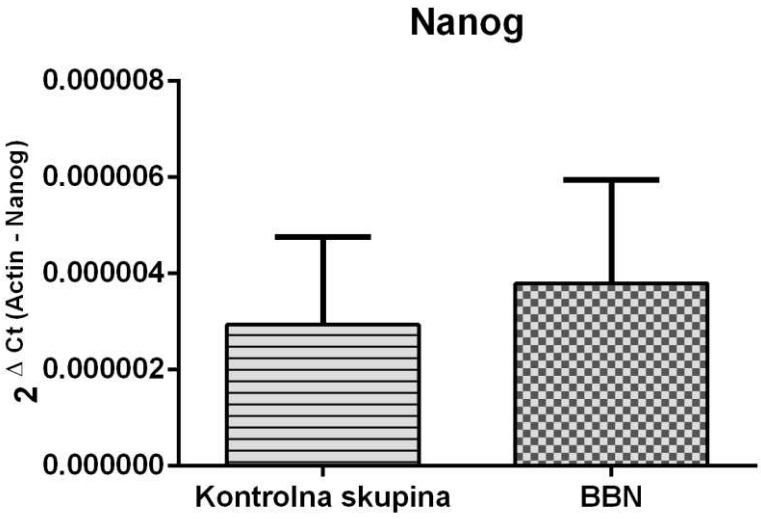
4. REZULTATI

Gen *Sox2* pokazuje statistički značajno manji izražaj u tumorskom tkivu, i to za 4,73 puta (P= 0,003) (Slika 4).



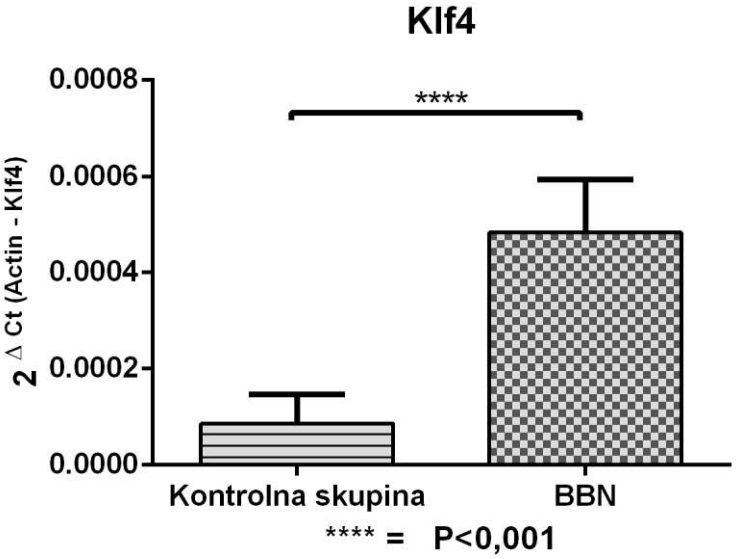
Slika 4. Prikaz izražaja gena *Sox2* u ranim fazama razvoja tumora. Izražaj gena *Sox2* značajno je manji u odnosu na njegov izražaj u zdravom tkivu (P=0,003).

Nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju *Nanog* gena između tumorski promjenjenog tkiva mjehura i kontrolne skupine (P=0,423) (Slika 5).



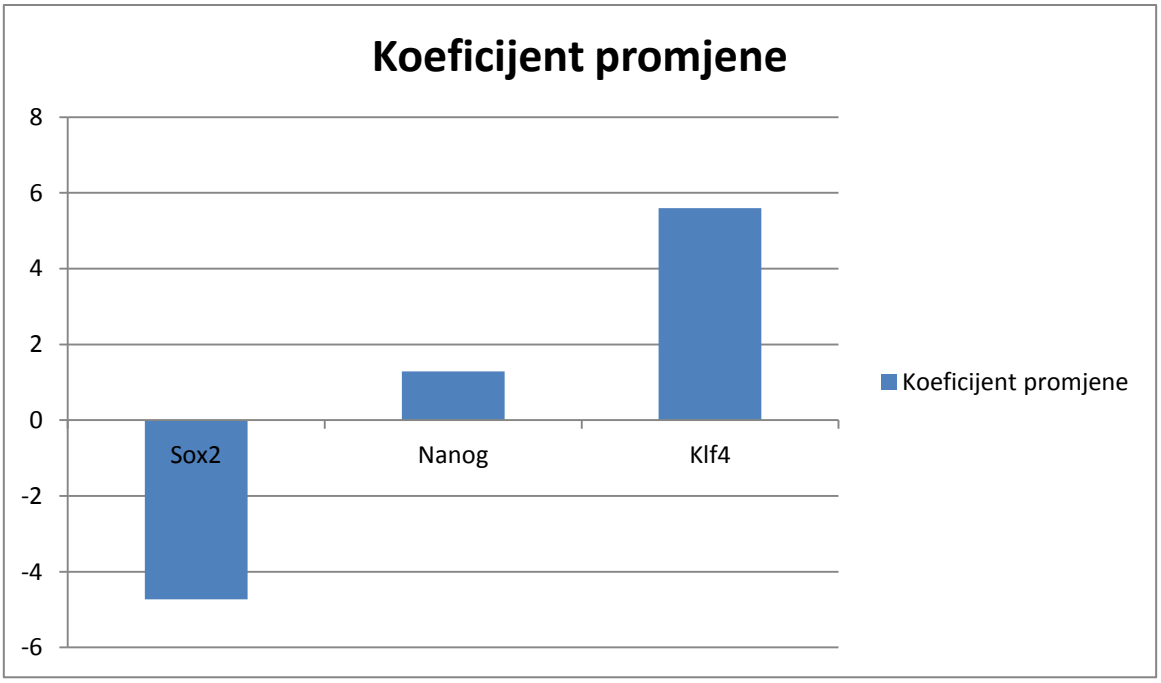
Slika 5. Prikaz izražaja gena *Nanog* u ranim fazama razvoja tumora. Izražaj gena *Nanog* nije značajno promjenjen u odnosu na izražaj u zdravom tkivu (P=0.423).

Gen *Klf4* pokazuje statistički značajno veći izražaja u tumorskom tkivu za 5,6 puta (P< 0,001)(Slika 6).



Slika 6. Prikaz izražaja gena *Klf4* u ranim fazama razvoja tumora. Izražaj gena *Klf4* značajno je veći u od njegovoj izražaja u zdravim tkivima (P< 0,001).

Zbog nevažećih podataka, gen *Pou5f1* izbačen je iz daljnjih analiza.



Slika 7. Sumarni prikaz promjena testiranih gena kao omjer izražaja istih u bolesnom i zdravom tkivu. Uočen je značajno manji izražaj *Sox2* gena u tumorskom tkivu, izostanak promjene u izražaju *Nanog* gena i značajno veći izražaj *Klf4* gena u tumorskom tkivu.

5. RASPRAVA

5.1. Sox2

Sox2, gen koji često dolazi kao partner *Oct4* genu (19), povećano je izražen u raznim karcinomima, primjerice u karcinomu pankreasa, dojke, hepatocelularnom karcinomu, adenokarcinomu pluća, prostate, kolona te karcinomu mokraćnog mjehura (20,21). Neki od načina korištenja tog saznanja očitovali su se već u radu kineskih znanstvenika Jia i suradnika kada su ustvrdili da se razina izražaja *Sox2* gena može potencijalno koristiti kao marker u raspoznavanju tumora i netumorskih tvorbi u tkivima prostate, kao prognostički biljeg carcinoma prostate, čak možda i u liječenju (22). Yamaguchi i suradnici utvrdili su da dvostruki porast u ekspresiji *Sox2* gena uzrokuje pad u ekspresiji *Oct4* gena, time potvrđujući određeni oblik interakcije između ta 2 gena (23). Smanjenje u ekspresiji *Sox2* gena dobiveno kroz provedene eksperimente može biti uzrokovano brojnim razlozima te je potrebno daljnje istraživanje koje bi uključivalo neke druge metode (w*estern blot* i imunohistokemija) kako bi i na proteinskoj razini potvrdili dobivene rezultate.

5.2. Klf4

Klf4 ima potencijalno dvojnu ulogu u razvoju karcinoma, nekad se vjerovalo da je tumor supresor, dok novija istraživanja nisu ukazala na njegovu povećanu ekspresiju u planocelularnom karcinomu, karcinomu dojke, mozga, prostate, leukemijama i multiplom mijelomu (21,24). Otkriveno je da je *Klf4* u karcinomu dojke (u kojem je pojačano izražen u preko 70% slučajeva) potreban za održavanje populacije karcinomskih matičnih stanica te za migraciju i invaziju karcinomskih stanica. *Knockout* tehnikom sva navedena svojstva karcinoma su se smanjila te je logično da *Klf4* bude potencijalna meta u liječenju karcinoma dojke (25). Rasprave o učinku *Klf4* gena kao onkogenu ili tumor supresoru sumirao je rad Wanga i suradnika iz 2015. godine ustvrdivši da funkcionira i kao jedno i drugo ovisno o vrsti tkiva i reguliranju ekspresiji raznih gena. Zatim su demonstrirali da u karcinomu dojke prekomjeran izražaj *Klf4* potiče apoptozu i smanjuje tumorigenost (26). Za pojasniti peterostruki porat *Klf4* gena u ovim pokusima potrebno je provesti dodatna istraživanja. Uočeni porast izražaja gena *Klf4* ukazuje na postojanje procesa dediferencijacije urotelnih stanica tijekom zloćudne preobrazbe ili na razvoj matične karcinomske stanice u tim tumorima.

5.3. Nanog

Nanog, gen za kojeg Yamanaka i suradnici nisu ustvrdili da je nužan za proizvodnju iPS stanica, kasnije je proglašen esencijalnim u dediferencijaciji stanica (12). Kada se u 4 različite stanične loze prisilno aktiviraju pojedinačni Yamanakijevi faktori *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc*, u svim se lozama razina izražaja *Nanoga* poveća (27). Nanog je transkripcijski faktor kritično uključen u samoobnovu nediferenciranih embrionalnih matičnih stanica i smatra se ključnim faktorom za održavanja pluripotencije (19). Zajedno s ostala 4 Yamanakijeva faktora, ekspresija mu je povećana u nekoliko vrsta karcinoma, poput karcinoma cerviksa (28) i tumora gonada (29). Njegova ekspresija može biti prognostički element u kolorektalnom karcinomu (30). Ponovo, eliminiranjem Nanog gena kroz RNA interferenciju postižemo inhibiciju napretka tumora (31). U našem istraživanju izražaj *Nanoga* nije se značajno promijenio u tumoru mokraćnog mjehura.

5.4. Pogled u budućnost

Postoje prilično čvrsti dokazi da manipulacija te mjerenje ekspresije *Oct4*, *Nanog* i *Sox2* gena može doprinositi liječenju različitih zloćudnih tumora, pa tako vjerojatno i liječenju zloćudnog tumora mokraćnog mjehura. Daljnja istraživanja trebala bi se fokusirati na definiranje uloga tih faktora u funkcioniranju karcinomskih matičnih stanica otkrivajući precizne mehanizme koji mogu biti značajni za tumorsku transformaciju i širenje tumorske bolesti u pacijentu. Tumori mogu biti kontrolirani blokiranjem ekspresije *Oct4*, *Nanog* i *Sox2*, ili ometajući signalne putove koji su promjenjeni u karcinomskim matičnim stanicama (32).

Neočekivani nalaz nižeg izražaja *Sox2* gena u tumorskom tkvi u našem istržaivanju još su jedan pokazatelj kako naše razumijevanje mehanizama djelovanja čimbenika pluripotencije još je uvijek nedovoljno. Buduća proučavanja Yamanakijevih faktora potrebna su za analizu mehanizama tumorigeneze i dizajniranje individualizirane terapije za oboljele od različitih zloćudnih tumora.

6. ZAKLJUČCI

- Smanjenje izražaja *Sox2* gena ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjem međudjelovanja Yamanakijevih faktora u tumorima mokraćnog mjehura
- Porast izražaja *Klf4* gena sugerira postojanje karcinomskih matičnih stanica u tumorima mokraćnog mjehura

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Mayo Clinic. Bladder cancer [Internet]. 2016 [citirano 10. lip 2016.]. Preuzeto od: http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/bladder-cancer/basics/definition/CON-20027606

2. American Cancer Society. What is bladder cancer? [Internet]. 2016 [citirano 10. lip 2016.]. Preuzeto od: http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-what-is-bladder-cancer

3. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, i sur. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. Urology. 2005;66(6):4-34.

4. National Cancer Institute. Bladder cancer treatment [Internet]. 2016 [citirano 10. lip 2016.]. Preuzeto od: http://www.cancer.gov/types/bladder/patient/bladder-treatment-pdq

5. Torpy JM, Lynm C, Glass RM. JAMA patient page. Bladder cancer. JAMA. 2005;293(7):890.

6. Šitum M. Novotvorine mokraćnog mjehura. U: Šitum M, Gotovac J, urednici. Urologija. Medicinska naklada, Zagreb; 2012. str. 124–30.

7. Ružić, B. Tumori mokraćnog sustava. U: Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petrković M, Gugić D, Krajina Z, urednici. Klinička onkologija. Medicinska naklada Zagreb; 2013. str. 146–9.

8. American Cancer Society. Survival rates for bladder cancer [Internet]. Preuzeto od: http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-survival-rates

9. Bethesda MD, National Institutes of Health U.S., Department of Healt and Human Services. What are induced pluripotent stem cells? [Internet]. Stem Cell Information. 2015 [citirano 10. lip 2016.]. Preuzeto od: http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics10.aspx

10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 2006;126(4):663–76.

11. Sommer CA, Mostoslavsky G. The evolving field of induced pluripotency: Recent progress and future challenges. J Cell Physiol. 2013;228(2):267–75.

12. Silva, J. *et al*. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722–737 (2009).

13. Liu X, Huang J, Chen T, Wang Y, Xin S, Li J, i sur.. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. Cell Res. 2008.;18(12):1177–89.

14. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. Cell Stem Cell. 2012;10(6):717–28.

15. Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. EMBO Rep. 2014.;15(3):244–53.

16. Yang M, Liu P, Huang P. Cancer stem cells, metabolism, and therapeutic significance. Tumor Biol. 2016.;1–8.

17. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, i sur. Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. Cell Stem Cell. 12. lip 2009.;5(1):31–42.

18. Ho PL, Lay EJ, Jian W, Parra D, Chan KS. Stat3 Activation in Urothelial Stem Cells Leads to Direct Progression to Invasive Bladder Cancer. Cancer Res. 2012;72(13):3135–42.

19. Sun C, Liu YK. Induced pluripotent cancer cells: Progress and application. J Cancer Res Clin Oncol. 2011;137(1):1–8.

20. Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, Tsutani Y. Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intr. Pancreas. 2006;32(2):164–70.

21. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. Biochem Biophys Res Commun. 2009;383(2):157–62.

22. Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y, i sur. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. J Mol Cell Biol. 2011;3(4):230–8.

23. Yamaguchi S, Hirano K, Nagata S, Tada T. Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. Stem Cell Res. 2011;6(2):177–86.

24. Foster KW, Liu Z, Nail CD, Li X, Fitzgerald TJ, Bailey SK, i sur. Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia. Oncogene. 2005;24(9):1491–500.

25. Yu F, Li J, Chen H, Fu J, Ray S, Huang S, i sur. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. Oncogene. 2011.30(18):2161–72.

26. Wang B, Zhao M, Cui N, Lin D, Zhang A, Qin Y, i sur. Krüppel-like factor 4 induces apoptosis and inhibits tumorigenic progression in SK-BR-3 breast cancer cells. FEBS Open Bio. 2015;5:147–54.

27. Miyoshi N, Ishii H, Nagai K, Hoshino H, Mimori K, Tanaka F, i sur. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(1):40–5.

28. Ye F, Zhou C, Cheng Q, Shen J, Chen H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. BMC Cancer. 2008;8(1):1–5.

29. Hoei-Hansen CE, Carlsen E, Jorgensen N, Leffers H, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E. Towards a non-invasive method for early detection of testicular neoplasia in semen samples by identification of fetal germ cell-specific markers. Hum Reprod. 2007;22(1):167–73.

30. Meng H-M, Zheng P, Wang X-Y, Liu C, Sui H-M, Wu S-J, i sur. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. Cancer Biol Ther. 2010.;9(4):295–302.

31. Jeter CR, Badeaux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C, i sur. Functional

evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. Stem Cells. 2009.;27(5):993–1005.

32. Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. Chin J Cancer. 2013;32(9):483–7.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Utvrditi postojanje dediferencijacije urotelnih stanica kroz aktivaciju Yamanakijevih faktora (čimbenika indukcije matičnih stanica) tijekom nastanka tumora mokraćnog mjehura u miša.

MATERIJALI I METODE: Eksperimentalno istraživanje provedeno je na Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Splitu. Napravljene su dvije skupa od 8 miševa, kontrolna i eksperimentalna, a eksperimentalna skupina podvrgnuta je akutnom tretmanu, u trajanju od 2 tjedna, korištenjem kemikalije N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN) u vodi za piće u koncentraciji od 0,05% sa svrhom indukcije tumora mokraćnog mjehura. Nakon tretmana miševi su žrtvovani. Iz izolirane RNA zdravog i bolesnog tkiva napravljena je cDNA koja je zatim analizirana Q-PCR (kvantitativna lančana reakcije polimeraze) metodom.

REZULTATI: Gen *Sox2* pokazuje statistički značajno manji izražaj za 4,7 puta (P= 0,003). Gen *Nanog* nije pokazao značajnu promjenu u izražaju u tumorski promjenjenom tkivu mjehura. Gen *Klf4* pokazuje statistički značajan veći izražaj u tumorskom tkivu za 5,6 puta (P< 0,001).

ZAKLJUČAK: Smanjenje izražaja *Sox2* gena ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjem međudjelovanja Yamanakijevih faktora, dok porast izražaja *Klf4* gena sugerira dediferencijaciju urotelnih stanica i nastajanje karcinomskih matičnih stanica u tumorima mokraćnog mjehura.

9. SUMMARY

DIPLOMA THESIS TITLE : Yamanaka factors expression in bladder tumors in mice.

AIM: To determine process of dedifferentiation of urothelial cells through activation of Yamanaka factors (factors of stem cell induction) during the occurence of bladder cancers in mice.

MATHERIALS AND METHODS: Experimental research was conducted at Department of Immunology and Medical Genetics, University of Split School of Medicine. Two study groups were created, the control group and the experimental group which consisted of 8 mice each. The experimental group had undergone an acute treatment, 2 weeks in duration, using the chemical compound N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) in drinking water at a concentration of 0,05% in order to induce bladder cancer development. After the treatment the mice were sacrificed. Out of the isolated RNA of both, healthy and diseased mice tissue, cDNA was synthesised and analyzed with a Q-PCR (quantitative Polimerase Chain Reaction).

RESULTS: A 4,7 fold statistically significant decrease was observed in *Sox2* gene expression (P= 0,003). No significant change in expression of *Nanog* gene was observed. A 5,6 fold statistically significant increase was observed in *Klf4* gene (P< 0,001).

CONCLUSION: The decrease of *Sox2* expression unveils the need for further studying of Yamanaka factors interaction during bladder cancer development. The increase of *Klf4* expression suggests presence of the process of dedifferentiation and possible egzistence of cancer stem cells in bladder cancer.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Boran Katunarić
Datum i mjesto rođenja: 22.05.1992., Split, Republika Hrvatska
Državljanstvo: Hrvat
Adresa stanovanja: Ulica fra Bonina 3, Split
E-mail: boran.katunaric@gmail.com

Obrazovanje i druge aktivnosti:

2016. Predsjednik Studentske sekcije za hitnu medicinu
2015., 2016. Lokalni dužnosnik za medicinsku edukacije udruge CroMSIC
2015. Dobitnik rektorove nagrade za izvrsnost
2015. Član reakreditacijskog tima za Medicinski fakultet u Osijeku
Demonstrator na katedrama za Anatomiju i Medicinsku kemiju i biokemiju

2010. – 2016. Medicinski fakultet u Splitu
2006. – 2010. Gimnazijski kolegij Kraljica Jelena
1998. – 2006. Osnovna škola Spinut

Engleski jezik – C2
Španjolski jezik – A2