Polimorfizam gena B4GALNT1 i ST3GAL5 u karcinomu vrata maternice

Selak, Nikica

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:719115

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikica Selak

POLIMORFIZAM GENA *B4GALNT1* I *ST3GAL5* U KARCINOMU VRATA MATERNICE

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod vodstvom doc. dr. sc. Jasenke Wagner. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

POLIMORFIZAM GENA *B4GALNT1* I *ST3GAL5* U KARCINOMU VRATA MATERNICE

Nikica Selak
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovome radu istražen je mogući utjecaj polimorfizama gena *B4GALNT1* (rs715930) i *ST3GAL5* (rs1138484) na pojavu i razvoj karcinoma vrata maternice. Prema podatcima Svjetske zdravstvene organizacije, karcinom vrata maternice, koji je uzrokovan ljudskim papilloma virusom (HPV), drugi je po učestalosti karcinom u žena u svijetu. Enzimi B4GALNT1 i ST3GAL5 sudjeluju u biosintezi složenih gangliozida, koji su bitni za biološku funkciju lipidnih splavi. Lipidne splavi imaju bitnu ulogu u aktivaciji T-limfocita koji sudjeluju u imunološkom odgovoru na infekciju HPV-om. Polimorfizmi navedenih gena analizirani su kod 80 ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice i 82 žene bez te dijagnoze i bez dokazane infekcije HPV-om. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih alela i genotipova između kontrolne skupine i skupine ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice za oba polimorfizma.

(40 stranica, 6 slika, 6 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: karcinom, HPV, gangliozidi, lipidne splavi, glikoziltransferaza, sijaliltransferaza, polimorfizam
Voditelj: doc. dr. sc. Jasenka Wagner
Suvoditelj: doc. dr. sc. Petra Korać
Ocjenitelji: doc. dr. sc. Petra Korać, izv. prof. dr. sc. Ana Galov, izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
Rad prihvaćen: 6.7.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

B4GALNT1 AND *ST3GAL5* GENE POLYMORPHISMS IN CERVICAL CANCER

Nikica Selak
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

This thesis examines the possible effects of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *B4GALNT1* gene (rs715930) and *ST3GAL5* gene (rs1138484) in cervical cancer oncogenesis. According to data provided by the World Health Organization, cervical cancer, caused by the human papillomavirus (HPV), is the second most common cancer in women worldwide. B4GALNT1 and ST3GAL5 enzymes are involved in the biosynthesis of complex gangliosides that play an important role in the biological function of lipid rafts. Lipid rafts have a key role in the activation of T-lymphocytes during the immune response to HPV infection. Analysis of *B4GALNT1* and *ST3GAL5* polymorphisms was done in samples from 80 patients diagnosed with cervical carcinoma and 82 women in the control group (patients without cervical carcinoma diagnosis and HPV infection). There was no significant difference in the distribution of alleles and genotypes between the case and control groups for both SNPs.

(40 pages, 6 figures, 6 tables, 85 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: carcinoma, HPV, gangliosides, lipid rafts, glycosyltransferase, sialyltransferase, polymorphism
Supervisor: Dr. Jasenka Wagner, Asst. Prof.
Assistant supervisor: Dr. Petra Korać, Asst. Prof.
Reviewers: Dr. Petra Korać, Asst. Prof., Dr. Ana Galov, Assoc. Prof., Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.
Thesis accepted: July 6th, 2017

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici, docentici Jasenki Wagner na ukazanom povjerenju i pružanju mogućnosti za izradu ovoga diplomskog rada u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Također se zahvaljujem docentici Petri Korać s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, koja je bila suvoditeljica ovoga rada, te profesoricama Jasni Lajtner i Ani Galov na savjetima i prijedlozima tijekom pisanja ovoga rada.

Ivani Škrlec i Saneli Štibi iz Laboratorija za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, zahvaljujem na svoj pomoći i susretljivosti koju su mi iskazale prilikom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se mojim roditeljima, Aneli i Krešimiru, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su mi pružili tijekom cjelokupnog studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1
1.1. Karcinom vrata maternice.....1
1.2. Gangliozidi i struktura staničnih membrana.....4
1.3. Lipidne splavi i aktivacija TCR.....6
1.4. Gen *B4GALNT1*.....9
1.5. Gen *ST3GAL5*.....10
1.6. Ciljevi istraživanja.....11

2. MATERIJAL I METODE.....12
2.1. Materijal.....12
2.1.1. Ispitanice.....12
2.2. Metode.....13
2.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi.....12
2.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....15
2.2.3. Statistička obrada dobivenih podataka.....18

3. REZULTATI.....19

4. RASPRAVA.....27

5. ZAKLJUČAK.....31

6. LITERATURA.....32

7. PRILOZI.....40

8. ŽIVOTOPIS.....43

POPIS KRATICA

APC - predočne stanice, stanice koje predočuju antigen (eng. *antigen presenting cells*)

bFGF - faktor rasta fibroblasta (eng. *basic fibroblast growth factor*)

CD3 - koreceptorska molekula T-limfocita

CTL - citotoksične T-stanice (eng. *cytotoxic T lymphocytes*)

DIGs - glikolipidima obogaćeni kompleksi netopljivi u detergentima (eng. *detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes*)

EGF - epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor*)

Fyn - tirozinska kinaza *Fyn*

GalNAc - N-acetilgalaktozamin

GD2 - gangliozid GD2

GD3 - gangliozid GD3

GM1 - gangliozid GM1

GM2 - gangliozid GM2

GM3 - gangliozid GM3

GM2S - GM2 sintaza

GM3S - GM3 sintaza

GPI - glikozilfosfatidilinozitol

GSL - glikosfingolipidi

HLA - glavni sustav tkivne podudarnosti u ljudi (eng. *human leukocyte antigens*)

IL-2/4/10/12 - interleukin-2, interleukin-4, interleukin-10, interleukin-12

INF - interferon

ITAMs - imunoreceptorski aktivacijski motiv koji se temelji na tirozinu (eng. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

LacCer - laktozilceramid

LAT - protein za aktivaciju T-limfocita (eng. *adaptor protein linker for activation of T cells)*

Lck - tirozinska kinaza *Lck* (eng. *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*)

MAPK - mitogenima aktivirana proteinska kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinase*)

MHC - glavni sustav tkivne podudarnosti (eng. *major histocompatibility complex*)

NFAT - jezgrin faktor aktiviranih T-limfocita (eng. *nuclear factor of activated T cells*)

NK-stanice - prirodnoubilačke stanice (eng. *natural killer cells*)

NKT-stanice - prirodnoubilačke T-stanice (eng. *natural killer T cells*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

PDGF - trombocitni faktor rasta (eng. *platelet-derived growth factor*)

PI3K/AKT - fofatidilinozitol-3-kinaza/protein kinaza B (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*)

PTKs - protein-tirozinske kinaze (eng. *protein tyrosine kinases*)

PTEN - fosfataza i tenzin homolog (eng. *phosphatase and tensin homolog*)

Src - tirozinska kinaza *Src*

Syk - tirozinska kinaza *Syk*

TCR - antigenski receptor T-limfocita (eng. *T-cell receptor*)

TNFα - faktor nekroze tumora alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*)

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

Zap-70 - tirozinska kinaza Zap-70 (eng. *zeta-chain-associated protein kinase 70*)

1. UVOD

1.1. Karcinom vrata maternice

Prema podatcima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, od eng. *World Health Organization*) karcinom vrata maternice drugi je po učestalosti karcinom u žena u svijetu. Više od 85 % smrti od ovoga karcinoma događa se u zemljama u razvoju. Nastanak ovog karcinoma povezan je s infekcijom ljudskim papilloma virusom (HPV, od eng. *human papillomavirus*). Infekcija HPV-om najčešća je vrsta virusne infekcije reproduktivnog sustava. U Republici Hrvatskoj svake godine od karcinoma vrata maternice oboli nešto više od 300, a umre oko 100 žena (prema podatcima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo). U dobi do 45. godine karcinom vrata maternice treći je po učestalosti kod žena u Hrvatskoj, a učestaliji su samo rak dojke i štitnjače. Prema Hrvatskom zdravstveno-statističkom ljetopisu za 2015. godinu (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2016) u istoj je godini uzeto 381 238 uzoraka za PAPA-testove što je za 11,5 % manje u odnosu na 2014. godinu. Od ukupnog broja PAPA-testova 12,2 % bilo je patoloških (13,5 % 2014. godine). Prema posljednjim dostupnim podatcima, standardizirana stopa smrtnosti od ovoga karcinoma za dob 0 - 64 godine na 100 000 stanovnika za Republiku Hrvatsku u 2013. godini iznosila je 2,99, dok je za sve uzraste iznosila 3,98. Podatci o stopi smrtnosti u Republici Hrvatskoj i Europskoj uniji prikazani su u tablici 1., a podatci o ukupnom broju dijagnosticiranih slučajeva karcinoma vrata maternice za Republiku Hrvatsku u 2015. godini dani su u tablici 2. U ordinacijama koje imaju ugovor s Hrvatskim zavodom za zdravstveno osiguranje ukupno je dijagnosticirano 1258 slučajeva zloćudnih tumora vrata maternice u 2015. godini.

Infekcija ljudskim papilloma virusom uzrokuje pojavu displazija vrata maternice (CIN, od eng. *cervical intraepithelial neoplasia*). To su potencijalno premaligne promjene stanica, a dugotrajna infekcija HPV-om može u konačnici rezultirati i pojavom karcinoma vrata maternice. Do danas je otkriveno više od 180 tipova ovoga virusa, a samo neki predstavljaju visokorizične tipove koji mogu uzrokovati nastanak karcinoma vrata maternice (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 i 69) (Song i sur., 2014). Karcinom vrata maternice najčešće je uzrokovan tipovima HPV16 i HPV18. Virusna DNA je dvolančana i sastoji se od 7900 parova baza. Genom sadrži 6 ranih gena (E1, E2, E3, E4, E5 i E6) koji kodiraju rane proteine te 2 kasna gena (L1 i L2) koji kodiraju kasne proteine (sastavnice

virusne kapside). Regija LCR (LCR, od eng. *long control region*) je nekodirajuća regija koja sudjeluje u virusnoj replikaciji i transkripciji.

Inkubacijski period kod infekcije HPV-om može trajati i do 10 godina. Za moguću onkogenezu karcinoma vrata maternice nakon zaraze visokorizičnim tipovima virusa HPV-a važan je imunološki odgovor zaražene osobe. Prikladan imunološki odgovor organizma može dovesti do spontane regresije infekcije, dok kod nekih pojedinaca dolazi do progresije infekcije. Nakon ulaska virusa u organizam, dolazi do migracije imunosnih stanica (makrofagi, Langerhansove stanice, keratinociti, T-limfociti, dendritičke stanice, NK-stanice, NKT-stanice, B-limfociti) (Song i sur., 2014). Pokreću se mehanizmi urođene imunosti, uz sudjelovanje Langerhansovih stanica, receptora TLR i makrofaga M2. Tijekom progresije infekcije povećava se brojnost makrofaga pridruženih tumoru M2, koji mogu poticati proliferaciju malignih stanica i tumorsku angiogenezu. Virus HPV-a također utječe i na aktivaciju NK-stanica. Poremećaji aktivacije NK-stanica su značajni zbog njihove sposobnosti da direktno uništavaju stanice zaražene virusom ili maligno transformirane stanice. Njihova aktivnost regulirana je kroz ravnotežu aktivacijskih i inhibitornih receptora. Kod infekcije HPV-om dolazi do deregulacije ovih receptora (Molina i sur., 2013). Jedna od značajki virusa HPV-a jest njegova sposobnost izbjegavanja imunosnog odgovora domaćina što dovodi do perzistentne infekcije. Infekcija HPV-om ima nekoliko faza (Song i sur., 2014):

1. virus određeno vrijeme nije aktivan i ne uzrokuje citolizu stanica domaćina (Stanley i Sterling, 2014);
2. slijedi inhibicija sinteze interferona (INF) - E6 i E7 onkogeni ometaju signalizacijske puteve INF-a (Crosbie i sur., 2013);
3. induciraju se regulatorne T-stanice (T_{reg}), luči se IL-10 ili TGF-β;
4. inficirane stanice slabije eksprimiraju molekule MHC klase I, oslabljena je funkcija CTL (Piersma, 2011);
5. moguće je nakupljanje neučinkovitih CD4 i CD8 T-limfocita tijekom kasnijih faza infekcije (Alves i sur., 2010).

Također, dolazi i do odgovora domaćina putem mehanizama stečene imunosti. Infekcija HPV-om uzrokuje poremećaje u aktivaciji T-limfocita. Mijenja se i ravnoteža u omjeru pomoćničkih stanica Th1 i Th2. Dolazi do povećanog lučenja Th2 citokina (IL-10), a smanjuje se lučenje Th1 citokina (IFN-γ, IL-12, IL-2, TNFα). Smanjen je broj dendritičkih

stanica čija je uloga prepoznavanje patogena pomoću receptora TLR i predočavanje antigena pomoću MHC molekula. Stanice T_{reg} ($CD4^+/CD25^+/Foxp3^+$ T-limfociti) induciraju imunosnu toleranciju te je njihov utjecaj na progresiju infekcije povezan s povećanim stupnjem infiltracije ovih stanica i lučenjem citokina.

Za aktivaciju T-limfocita važan je membranski sustav lipidnih splavi (Simons i Ikonen, 1997). Početak aktivacije T-limfocita označen je premještanjem njihovih receptora TCR unutar područja lipidnih splavi u membrani stanice (He i sur., 2005). Važnu ulogu za biološku aktivnost lipidnih splavi imaju gangliozidi (Sonnino i sur., 2007).

Tablica 1. Usporedba standardizirane stope smrtnosti od raka vrata maternice na 100 000 stanovnika u Republici Hrvatskoj i Europskoj uniji.

	Republika Hrvatska		**Europska unija**	
Dob	**0-64 godine**	**svi uzrasti**	**0-64 godine**	**svi uzrasti**
Godina				
1985.	2,61	4,05	3,86	5,36
1990.	3,12	4,55	3,55	4,87
1995.	3,03	4,01	3,25	4,38
2000.	2,43	3,57	3,1	4,01
2005.	2,48	3,51	2,73	3,51
2010.	3,14	4,1	2,7	3,29
2013.	2,99	3,98	2,44	3,14

Prema podatcima iz Hrvatskog zdravstveno-statističkog ljetopisa za 2015. (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2016)

Tablica 2. Broj utvrđenih slučajeva zloćudnih tumora vrata maternice u Republici Hrvatskoj u 2015. godini.

Naziv bolesti *Zloćudni tumor vrata maternice*	**0 - 6 godina**	**7 - 19 godina**	**20 - 64 godine**	**65+ godina**	**Ukupno**
Djelatnost					
Opća medicina	0	0	622	289	911
	≤21 godine	**22 - 45 godina**	**46+ godina**	**-**	**Ukupno**
Medicina rada	1	23	50	-	74
Ordinacije s ugovorom HZZO	-	-	-	-	**1258**

Prema podatcima iz Hrvatskog zdravstveno-statističkog ljetopisa za 2015. (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2016)

1.2. Gangliozidi i struktura staničnih membrana

Unutar staničnih membrana postoje različite specijalizirane membranske mikrodomene, čije su karakteristike prisustvo mnoštva glicerofosfolipida, sfingolipida i kolesterola, uz nizak udio proteina (Simons i Toomre, 2000; Sonnino i sur., 2006).

Glikolipidi su molekule građene od jednog ili više ugljikohidratnih ostataka povezanih glikozidnom vezom s hidrofobnom lipidnom komponentom. Glikolipidi koji sadrže sfingoid ili ceramid kao lipidnu komponentu poznati su pod imenom glikosfingolipidi. Gangliozidi su složene molekule koje se sastoje od glikosfingolipida i jedne ili više molekula sijalinske kiseline, odnosno, oni su sijalizirani glikani koji su pridruženi ceramidnoj lipidnoj jezgri (Schnaar, 2016). Sijalinska kiselina je šećer koji razlikuje gangliozide od glikosfingolipida i sulfatida (Sonnino i sur., 2006). Sijaloglikani se obično sastoje od 3-8 saharida, od kojih su 1-4 sijalinska kiselina. Ceramidna komponenta se sastoji od sfingozina, dugolančanog 2-amino alkohola, u kojemu je dušik amidnom vezom povezan s masnom kiselinom. Najviše su prisutni u živčanim stanicama. U kralježnjaka je dosad opisano 188 gangliozida (Yu i sur., 2011).

Gangliozidi na površini stanice sudjeluju u staničnom prepoznavanju, adheziji te transdukciji signala unutar posebnih mikrodomena (kaveole, lipidne splavi, glikosfingolipidima obogaćene mikrodomene), zajedno s kolesterolom i sfingomijelinom. Gangliozidi su također jedna od glavnih komponenti lipidnih splavi.

Simons i Ikonen (1997) su predložili model koji opisuje organizaciju lipidnih mikrodomena te selektivnu ugradnju proteina u te domene. Zaključili su da mikrodomene u membrani djeluju kao splavi u membranskom transportu te da sudjeluju u unutarstaničnom signaliziranju. U epitelnim stanicama, membrane su podijeljene u apikalnu i bazolateralnu domenu (Rodriguez-Boulan i Nelson, 1989). Apikalna domena bogata je sfingolipidima, dok je bazolateralna bogata glicerolipidom fosfatidilkolinom (Simons i van Meer, 1988; van Meer, 1989). Po predloženom modelu organizacije sfingolipidno-kolesterolskih splavi, sfingolipidi se lateralno udružuju slabim interakcijama između ugljikohidratnih glava glikosfingolipida. Praznine između njih popunjavajuju molekule kolesterola. Ove splavi su netopljive u detergentu Triton X-100 na temperaturi od 4 °C te tvore glikolipidima-obogaćene komplekse (Brown i Rose, 1992; Parton i Simons, 1995). Zbog visokog udjela lipida, ovi DIG kompleksi (DIG, od eng. *detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes*) prilikom centrifugiranja u gradijentu pokazuju malu gustoću. Glikosfingolipidi su sami netopljivi, a sfingomijelin je otporan na ekstrakciju detergentom u prisutnosti kolesterola (Schroeder i Brown, 1994). Problem kod ekstrakcije kompleksa pomoću Tritona X-100 predstavlja to što originalni unutarstanični smještaj i podrijetlo DIG kompleksa i dalje ostaju nepoznati. Poznato je da lipidne splavi mogu vezati proteine (npr. GPI-usidrene proteine, transmembranske proteine, neke tirozin-kinaze). GPI-usidreni proteini ugrađuju se u DIG komplekse tek nakon transporta iz endoplazmatske mrežice (ER) u Golgijev kompleks, najvjerojatnije zbog nepostojanja splavi u ER-u (Brown i Rose, 1992). Iako se kolesterol sintetizira već u ER-u, DIG kompleksi nastaju tek u Golgijevom kompleksu jer se tamo sintetiziraju i sfingolipidi (van Meer, 1989). Sfingolipidno-kolesterolske splavi sudjeluju u endocitoznom transportu proteina. Simons i Ikonen (1997) predložili su postojanje alternativnog puta kojim se vrši transport proteina od Golgijevog kompleksa do površine stanice, a to je upravo putem sfingolipidno-kolesterolskih splavi.

1.3. Lipidne splavi i aktivacija antigenskog receptora T-limfocita (TCR)

Nositelji stanične imunosti su T-limfociti. Stanična se imunost razvija prilikom ulaska unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica transplantata ili tumorskih stanica (Andreis i sur, 2010).

TCR posjeduje heterodimernu građu. Postoje 2 vrste receptora: TCR-αβ (95 % T-limfocita u perifernoj krvi) i TCR-γδ (5 %). T-stanični receptorski kompleks, koji je sposoban prenijeti aktivacijski signal u stanicu nakon vezanja antigena, osim samog receptora tvore i neke druge molekule. To su molekule CD3-kompleksa (specifične za T-limfocite) i molekula ξ. Koreceptorske molekule T-limfocita su CD4 i CD8 molekule koje se vežu za konstantne dijelove molekula MHC/HLA i učvršćuju vezu receptora s kompleksom MHC/HLA i antigena (Andreis i sur., 2010). Postoje i različite kostimulacijske i inhibicijske molekule T-limfocita te također i akcesorne signalne molekule T-limfocita. Jedna od akcesornih molekula jest molekula CD45 koja je eksprimirana na svim leukocitima, a ima aktivnosti tirozinske fosfataze. Ona cijepa inhibicijski fosfat s tirozina proteinskih kinaza *Lck* i *Fyn* što omogućuje njihovu aktivaciju (Andreis i sur., 2010).

Za aktivaciju T-limfocita važan je membranski sustav lipidnih splavi. Lipidne splavi su mikrodomene unutar plazma membrana stanica, koje su bogate glikosfingolipidima, kolesterolom i sfingomijelinom. Točan molekularni mehanizam aktivacije signalne kaskade TCR-a još nije u potpunosti razjašnjen.

Početak aktivacije T-limfocita označen je premještanjem njihovih receptora TCR unutar područja lipidnih splavi u membrani stanice. Jedan model aktivacije sugerira postojanje kompleksa TCR/CD3 izvan lipidnih splavi te njegovo premještanje unutar mikrodomena splavi nakon ligacije. Tu se također odvija fosforilacija *Lck* (He i sur., 2005). He i suradnici predložili su 2005. godine model aktivacije TCR koji uključuje postojanje takozvanog "TCR-signalosoma" ili "TCR-splavi". Taj sustav obuhvaća specifičan podset splavi unutar plazma membrana stanica, a prisutan je i prije stimulacije TCR-a. Sadrži sve komponente potrebne za inicijaciju TCR-signalne kaskade. Bogat je kolesterolom i sfingolipidima, ali ne nužno i GPI-usidrenim proteinima ili GM1-gangliozidom te predstavlja vrlo dinamičnu i plastičnu strukturu. Ona omogućuje brzo nastajanje kompleksa proteina i lipida (He i sur., 2005).

Jedan od ključnih koraka u aktivaciji T-limfocita je aktivacija tirozinskih kinaza (PTK), kao što su *Lck*, *Fyn* i Zap-70 (Weiss i Littman, 1994; Wange i Samelson, 1996; Kosugi i sur., 2001). *Lck* i *Fyn* pripadaju enzimskoj porodici Src kinaza, dok Zap-70 pripada Syk enzimskoj porodici. Osim enzima PTK u taj proces uključene su i tirozinske fosfataze (PTPaze), kao što je CD45. Aktivacija T-limfocita uzrokuje promjene u dinamičnoj ravnoteži PTK i PTPaze (Chan i sur., 1994).

Lck fosforilira ITAMs (ITAMs, od eng. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) u TCR-u te fosforilira i aktivira Zap-70. Za smještanje u membrane i aktivaciju T-limfocita potrebna je miristoilacija *Lck* (Caron i sur, 1992). Za smještanje G proteina, enzima PTK iz Src porodice i NOS (NO-sintaze) u mikrodomene obogaćene glikolipidima ključne su palmitoilacija i miristoilacija (Resh, 1994). Smatra se da dodavanje zasićenih acilnih lanaca omogućuje smještanje ovih proteina u mikrodomene. Dokazano je i da mutacije Cys3 inhibiraju nizvodnu signalizaciju te događaje kao što su ekspresija CD69 i aktivacija NFAT (Kabouridis i sur., 1997), što pokazuje važnu ulogu Cys3 u funkciji T-limfocita. Važnost uloge Cys3 u aktivaciji T-limfocita dokazali su i Kosugi i suradnici (2001).

U inaktivnom stanju T-limfocita, TCR-CD3 kompleks je slabo vezan s lipidnim splavima, no to se mijenja nakon aktivacije T-limfocita (Montixi i sur., 1998). Ovo se vjerojatno događa kako bi TCR-CD3 kompleks bio bliži tirozinskim kinazama Src porodice koje se nalaze unutar lipidnih splavi, kao što je *Lck* (Yasuda i sur., 2000; Kosugi i sur., 2001; Tavano i sur., 2004). To pospješuje fosforilaciju molekula ključnih za TCR signalizaciju, kao što su Zap-70 i LAT. Nakupljanje signalnih molekula u lipidnim splavima moglo bi ih štititi od inhibitornih fosfataza, primjerice CD45, tijekom aktivacije T-limfocita (Janes i sur., 1999; He i sur., 2002). Nakupljanje TCR-CD3 kompleksa u blizini *Lck* unutar lipidnih splavi predstavlja ključan korak u inicijaciji TCR-signalizacije (Zhu i sur., 2011). U svom su istraživanju na Jurkat T-limfocitima Zhu i suradnici (2011) dokazali da smanjenje razine GSL ne utječe značajno na sastav signalnih molekula na staničnoj površini. Za smanjenje razine GSL korišten je Genz-123346, inhibitor glukozilceramid sintaze, enzima koji katalizira prvu reakciju u biosintezi GSL i gangliozida (Lee i sur., 1999; Kolter i sur., 2002; Zhao i sur., 2007). Nije bilo utjecaja na razinu ceramida unutar stanice i staničnu vijabilnost. Došlo je do smanjenja fosforilacije *Lck*, Zap-70 i LAT i smanjenog protoka kalcijevih iona, što je sve bitno za ranu aktivaciju TCR-signalizacije. Snižene su i razine IL-2. Nije uočeno da je došlo do promjena u integritetu samih lipidnih splavi ili u sastavu i razmještaju signalnih proteina

unutar njih. Zabilježeno je specifično smanjenje diferencijacije Th17 limfocita tijekom aktivacije T-limfocita, dok nije bilo promjena u diferencijaciji ostalih stanica Th, kao što su Th1, Th2 i regulatornih T-limfocita. Zaključak ovog istraživanja bio je da strukturalni proteni i GSL u lipidnim splavima imaju ulogu u modulaciji signaliziranja i diferencijaciji Th17 limfocita, iako točan mehanizam nije razjašnjen. Zbog uloge Th17 u autoimunim bolestima, utjecanje na razine GSL u lipidnim splavima moglo bi otvoriti nove mogućnosti za liječenje tih bolesti.

U istraživanju kojeg su objavili Nagafuku i suradnici (2012), potvrđeno je da $CD4^+$ i $CD8^+$ stanice zahtijevaju različite gangliozide za aktivaciju. U tom istraživanju korištene su 2 skupine miševa. Prva skupina nije imala funkcionalnu GM3 sintazu (GM3S), stoga su tim miševima nedostajali gangliozidi koji nastaju od GM3 (*a*- i *b*-serija gangliozida). Druga skupina miševa imala je nefunkcionalnu GM2/GD2 sintazu (GM2/GD2S) te su oni imali samo gangliozide *o*-serije. Utvrđena je razlika u sastavu gangliozida između primarnih timocita i T-limfocita ($CD4^+$ i $CD8^+$). Stanice $CD4^+$ eksprimiraju gangliozide *a*-serije, dok $CD8^+$ eksprimiraju gangliozide *o*-serije. Također, aktivacija T-limfocita ovisna o TCR-u kod stanica $CD4^+$ zahtijeva prisutnost gangliozida *a*-serije, a kod stanica $CD8^+$ prisutnost gangliozida *o*-serije. Najjednostavniji gangliozid *a*-serije jest GM3. Njega sintetizira enzim GM3S, prijenosom sijalinske kiseline na nereducirajući kraj galaktoze (Gal) u molekuli laktozilceramida (LacCer). Enzim GM2/GD2S iz GM3 stvara gangliozid GM2, također gangliozid *a*-serije, dok enzim GD3S stvara GD3, najjednostavniji gangliozid *b*-serije. GM2/GD2S također produljuje LacCer i stvara GA2, najjednostavniji gangliozid *o*-serije. Miševi bez funkcionalne GM3S uopće nemaju gangliozide *a*- i *b*-serije te kod njih dolazi do nakupljanja LacCer i povećanja koncentracije gangliozida *o*-serije. Miševi bez funkcionalne GM2/GD2S nemaju gangliozide *o*-serije i produljene gangliozide *a*- i *b*-serije te kod njih dolazi do nakupljanja LacCer, a pronalaze se samo gangliozidi GM3 i GD3. Nagafuku i suradnici protočnom citometrijom nisu pronašli značajne razlike u raspodjeli CD4 i CD8 kod populacija timocita u miševa divljeg tipa (WT, od eng. *wild-type*) i miševa kojima nedostaje GM3S ili GM2/GD2S. Istraživanjem je utvrđeno da različite subpopulacije T-stanica za svoju aktivaciju zahtijevaju različite tipove gangliozida. Sazrijevanje T-stanica također prati selektivna ekspresija različitih glikosfingolipida. U odnosu na ekspresiju unutar timocita, kod stanica $CD4^+$ je za 180 % povećana ekspresija *GM3S*, a smanjena na 30 % kod stanica $CD8^+$. Ekspresija *GM2/GD2S* je povećana kod stanica $CD4^+$ i $CD8^+$ u odnosu na timocite. Uzorak ekspresije pojedine serije gangliozda također se mijenja tijekom sazrijevanja T-stanica. Kod

stanica $CD4^+$ dominantno su eksprimirani gangliozidi *a*-serije, dok su kod stanica $CD8^+$ dominantno ekprimirani gangliozidi *o*-serije. Pretpostavljeno je da je za pravilnu raspodjelu CD4 i CD8 unutar stanične membrane bitna interakcija s lipidnim splavima koji nose specifične gangliozide. Sastav gangliozida unutar splavi bi se trebao razlikovati, ovisno radi li se o stanicama $CD4^+$ ili stanicama $CD8^+$.

Miguel i suradnici (2011) istražili su povezanost stupnja organizacije lipida u membrani stanica (eng. *membrane lipid order*) i funkcije $CD4^+$ T-limfocita. Nakon stimulacije TCR-a, T-limfociti s visokim stupnjem organizacije membranskih lipida tvore stabilne imunološke sinapse (nastaju između T-limfocita i APC stanica) i brzo proliferiraju, stanice sa srednjim stupnjem organizacije imaju smanjenu stabilost sinapsi i proliferaciju, dok su stanice s niskim stupnjem organizacije nereaktivne. Stabilnost imunoloških sinapsi korelira s brzinom nastajanja konjugata T-limfocita/APC. Stanice s visokim stupnjem organizacije sporije stvaraju konjugate, ali oni su stabilniji, i to su uglavnom dotad mirujući (naivni, djevičanski) T-limfociti, koji proizvode IL-2 i IL-4. Stanice sa srednjim stupnjem organizacije imaju memorijski (efektorski) fenotip, slabo proliferiraju te luče IFN-γ. Stanice s niskim stupnjem organizacije ne reagiraju na stimulaciju TCR i sklonije su apoptozi. Točna povezanost stupnja organizacije lipida unutar membrane stanica i nastajanja lipidnih mikrodomena zasad nije razjašnjena.

1.4. Gen *B4GALNT1*

Gen *B4GALNT1* je gen na 12. kromosomu (12q13.3), a kodira enzim B4GALNT1 (β-1,4-N-acetilgalaktozaminiltransferaza 1, GalNAcT, B4GN1, GM2/GD2 sintaza, EC 2.4.1.92). Postoje 3 izoforme ovoga gena (produkti alternativnog prekrajanja). Posttranslacijske modifikacije uključuju glikozilaciju na Asn 79, Asn 179 i Asn 274 (UniProtKB - Q00973 (B4GN1_HUMAN)).

Enzim B4GALNT1 sudjeluje u biosintezi složenih gangliozida, tj. glikosfingolipida koji sadrže 1, 2 ili 3 molekule sijalinske kiseline (OMIM Entry - * 601873 - BETA-1,4-N-ACETYLGALACTOSAMINYLTRANSFERASE 1; B4GALNT1). Svrstava se u gensku porodicu β 4-glikoziltransferaza. Sastoji se od 533 aminokiseline, molekularne je mase 58882 Da (B4GALNT1 Gene - GeneCards | B4GN1 Protein | B4GN1 Antibody).

Enzim B4GALNT1 sudjeluje u sintezi gangliozida GM2 i GD2 (glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu) te GA2 (asijalo-GM2, koji ne sadrži sijalinsku kiselinu) iz GM3, GD3 i laktozilceramida. Ovo je ključan korak za kasniju biosintezu složenih gangliozida, kao što su GM1, GD1a, GD1b, GT1b i GQ1b (Taniguchi i sur., 2002). Ovaj enzim koristi glikolipidne akceptore (ali ne i glikoproteinske i oligosaharidne) te katalizira prijenos N-acetilgalaktozamina (GalNAc) na GM3, GD3 te globotriaozilceramid β-1,4 vezom, što dovodi do nastajanja GM2 i GD2 gangliozida (Boukhris i sur., 2013). Reverznu reakciju obavlja enzim β-heksoaminidaza i njegov kofaktor (GM2 aktivator). Istraživanja na miševima dokazala su da na regulaciju sinteze i ekspresije GM2 i GD2 utječe razina transkripcije gena *B4GALNT1*. Enzim je sastavni dio stanične membrane te membrane Golgijeva aparata. Kvaternarnu strukturu enzima čine homodimeri povezani disulfidnim mostovima u kasnom Golgijevom kompleksu.

1.5. Gen *ST3GAL5*

Gen *ST3GAL5* smješten je na 2. kromosomu (2p11.2), a kodira enzim sijaliltransferazu ST3GAL5 (ST3 β-galaktozid α-2,3-sijaliltransferaza 5, SIAT9,
CMP-N-acetilneuramin:laktozilceramid α-2,3-sijaliltransferaza, GM3 sintaza, EC 2.4.99.9).
Postoje 3 izoforme ovoga gena (produkti alternativnog prekrajanja). Gen se sastoji od 7 egzona (62 kb), a kodirajuće regije nalaze se u egzonima 4-9. Posttranslacijske modifikacije uključuju N-glikozilaciju, glikozilaciju na Asn 86, Asn 236 i Asn 390.

Enzim ST3GAL5 sastavni je dio stanične membrane i membrane Golgijeva aparata (UniProtKB - Q9UNP4 (SIAT9_HUMAN)). Svrstava se u gensku porodicu sijaliltransferaza. Pretpostavljen je njegov smještaj na luminalnoj strani membrane Golgijeva aparata. Ima značajnu ekspresiju u mozgu, mišićima, placenti i testisima (OMIM Entry - * 604402 - ST3 BETA-GALACTOSIDE ALPHA-2,3-SIALYLTRANSFERASE 5; ST3GAL5).

Enzim ST3GAL5 kojeg kodira ovaj gen sudjeluje u sintezi gangliozda GM3 (kao GM3 sintaza, GM3S) (Ishii i sur., 1998) dodavanjem sijalinske kiseline na laktozilceramid. Prvi put je otkriven u embrionalnom mozgu pilića. Sastoji se od 418 aminokiselina, molekularne je mase 47990 Da (ST3GAL5 Gene - GeneCards | SIAT9 Protein | SIAT9 Antibody).
Kvaternarnu strukturu enzima čine homodimeri povezani disulfidnim mostovima.

Reakcija koju katalizira jest:

LacCer + CMP-NEUAC → gangliozid GM3 + CMP.

Gangliozid GM3 u kralježnjaka služi kao prekursor za biosintezu drugih, složenijih gangliozida. Zbog toga je enzim odgovoran za njegovu sintezu značajan i za sintezu ostalih gangliozida, što je kontrolirano prvenstveno kroz regulaciju nastajanja samoga gangliozida GM3. Kompeticija za zajednički supstrat (LacCer) između enzima β1,3-N-acetilglukozaminiltransferaze, α1,3(4)-galaktoziltransferaze, β1,4-N-acetilgalaktozaminiltransferaze i GM3S rezultira prostorno i razvojno reguliranom ekspresijom glikosfingolipida (Taniguchi i sur., 2002). Ganglioid GM3 kao membranski glikosfingolipid ima ulogu u indukciji diferencijacije stanica, kontroli proliferacije, signalizaciji i staničnoj adheziji.

1.6. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovoga istraživanja jesu:

1. analiza polimorfizama gena koji sudjeluju u biosintezi gangliozida - rs715930 gena *B4GALNT1* i rs1138484 gena *ST3GAL5* u zdravih žena i u pacijentica koje boluju od invazivnog karcinoma vrata maternice;

2. utvrditi postoji li povezanost navedenih polimorfizama i nastanka i razvoja karcinoma vrata maternice.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Materijal

2.1.1. Ispitanice

U ovom istraživanju korišteni su uzorci periferne krvi ukupno 162 žene, koji su prikupljeni na Odjelu za ginekološko-onkološku kirurgiju Zavoda za kiruršku onkologiju Klinike za tumore pri Kliničkom bolničkom centru "Sestre milosrdnice" u Zagrebu u razdoblju od ožujka do kolovoza 2015. godine. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice" u Zagrebu.

Kontrolnu skupinu činila je skupina od 82 zdrave žene s uredna zadnja tri citološka nalaza, bez dokazanih abnormalnosti epitela. Ispitivanu skupinu činila je skupina od 80 žena s dokazanim invazivnim karcinomom vrata maternice koje su liječene u Klinici za tumore. Kriterij za isključivanje iz istraživanja bili su: bolovanje od akutne ili kronične upalne bolesti, primanje imunosupresivne terapije ili prethodno liječenje zbog maligne bolesti.

Prosječna dob ispitanica u kontrolnoj skupini iznosila je 54±10 (SD) godina, a ispitanica u skupini s dijagnozom karcinoma vrata maternice 54±15 (SD) godina. Dob ispitanica iskazana je kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD).

2.2. Metode

2.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi

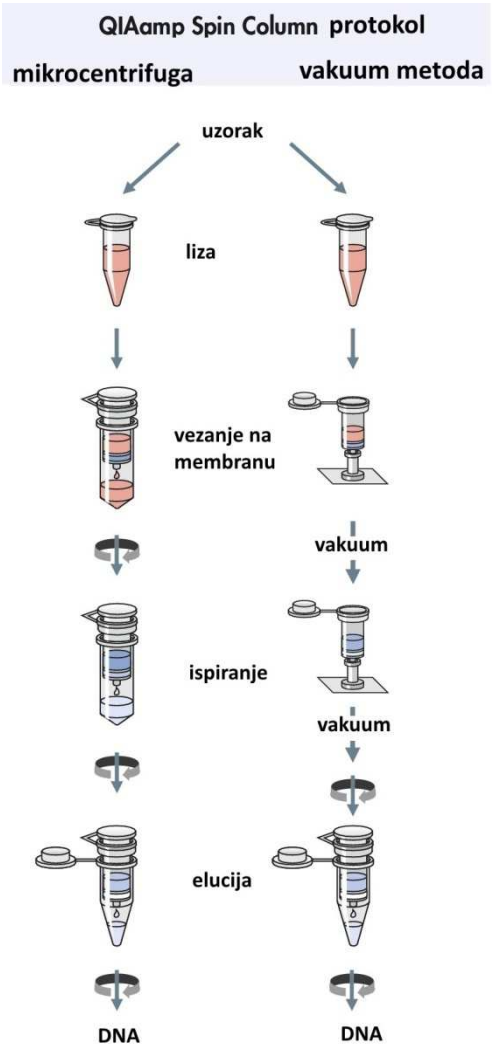
Izolacija DNA učinjena je pomoću komercijalnog kompleta za izolaciju DNA QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Nizozemska) u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Komplet je korišten prema protokolu proizvođača za izolaciju DNA iz pune krvi, uz prilagodbe volumena kako bi DNA bila izolirana iz ukupnog volumena krvi od 1 mL.

Pri izolaciji su korištene QIAGEN proteaza i Applichem proteinaza K (Applichem, Darmstadt, Njemačka). QIAGEN proteaza je serinska proteaza izolirana iz rekombinantnog soja Bacillusa, dok je AppliChem serinska proteaza izolirana iz gljivice *Tritirachium album*.

Kod ove metode izolacije DNA se veže za silika-gel membranu unutar QIAamp kolone, dok se nečistoće ispiru pomoću pufera za ispiranje. Također se ispiru i mogući inhibitori PCR reakcija, kao što su dvovaletni kationi i proteini. Za izolaciju je moguće koristiti svježu ili zamrznutu krv s antikoagulansima (heparin, EDTA, citrat). Shematski prikaz ove metode dan je na slici 1.

Uzorci krvi za izolaciju DNA bili su pohranjeni u epruvete koje sadrže antikoagulans K2EDTA. Izolacija je obavljena prema protokolu proizvođača (QIAGEN). Korišteni su pufer za lizu (AL pufer), proteaze (QIAGEN proteaza, uz inkubaciju na 70 °C i Applichem proteinaza K, uz inkubaciju na 60 °C), dva pufera za ispiranje (AW1 i AW2 pufer) te pufer za eluiranje (AE pufer). Nakon izolacije, DNA je pohranjena u AE puferu u hladnjaku na temperaturi od -20 °C. Sastav AE pufera jest: 10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0 (prema specifikaciji proizvođača na internetskoj stranici Qiagena).

Ukupni volumen izolirane DNA u AE puferu bio je 100 μL.



Slika 1. Shematski prikaz izolacije DNA prema protokolu proizvođača.
(Prilagođeno prema slici preuzetoj s internetske stranice proizvođača: https://www.qiagen.com/hr/shop/sample-technologies/dna/dna-preparation/qiaamp-dna-blood-mini-kit/#productdetails).

2.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Nakon izolacije DNA, učinjena je genotipizacija polimorfizama, odnosno umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, od eng. *real-time polymerase chain reaction*). Za provođenje reakcija umnažanja korišten je uređaj AB 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Za genotipizaciju su korištene TaqMan sonde (TaqMan SNP Genotyping Assay). Shematski prikaz TaqMan protokola dan je na slici 2.

Korišteni TaqMan komplet za genotipizaciju (TaqMan SNP Genotyping Assay) sastoji se od para neobilježenih početnica te:

- dvaju TaqMan sondi (jedna je sonda obilježena fluorescencijskom bojom FAM, a druga fluorescencijskom bojom VIC) - na 5' kraju;
- nefluorescencijskog prigušivača (NFQ, od eng. *nonfluorescent quencher*) i molekule MGB (od eng. *minor groove binder*) koja se veže na mali utor DNA - na 3' kraju.

Analizirani polimorfizmi (SNP, od eng. *single-nucleotide polymorphism*) bili su sljedeći:

- za gen *B4GALNT1*: rs715930;
- za gen *ST3GAL5*: rs1138484.

Za gen *B4GALNT1* i polimorfizam rs715930, ciljani slijed DNA koji se umnažao PCR reakcijom jest:

GGTAGCTTCGGCTGCTGTAAGTGAC[**A/C**]AGTTGTAGTTGCCTGTTGAGTTGGT.

Za gen *ST3GAL5* i polimorfizam rs1138484, ciljani slijed DNA koji se umnažao PCR reakcijom jest:

ACCAATGGGATATCTAACCTTTACA[**C/T**]GGTCAGGGTCCACATAATGCATTT.

Lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*) eksponencijalno umnožava broj molekula DNA. U svakom amplifikacijskom ciklusu broj molekula DNA se udvostručava. Kod lančanih reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*) količina DNA mjeri se automatski nakon svakog ciklusa umnažanja. Za detekciju molekula DNA koriste se fluorescencijske boje. Uređaj mjeri promjene u fluorescenciji tijekom reakcije

u stvarnom vremenu, odnosno kontinuirano se mjeri povećanje fluorescencijskog signala koji je izravno povezan s povećanjem broja molekula DNA. Ovom metodom specifično se umnažaju i detektiraju određeni aleli genomske DNA. U reakcijskoj smjesi nalaze se genomska DNA, uzvodna i nizvodna početnica, dvije oligonukleotidne TaqMan sonde i TaqMan Genotyping MasterMix. Svaka od sondi specifično se veže za komplementarni slijed DNA, ukoliko je takav slijed prisutan. Dok je TaqMan sonda u cijelosti vezana na DNA, prigušivač (NFQ) osigurava da ne dolazi do fluoresciranja reporterske boje (VIC ili FAM) zbog rezonantnog prijenosa energije fluorescencije (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) (Real-time PCR Handbook, Life Technologies, 2012).

Egzonukleaznom aktivnošću DNA polimeraze razgrađuje se TaqMan sonda vezana na DNA. Tada dolazi do odvajanja reporterske boje od prigušivača pa tako reporterska boja (VIC ili FAM) počinje fluorescirati. To se događa ukoliko je umnoženi ciljani slijed DNA komplementaran TaqMan sondi. Ovisno o fluorescencijskom signalu prisutnom nakon umnožavanja DNA, raspoznajemo koji su aleli prisutni.

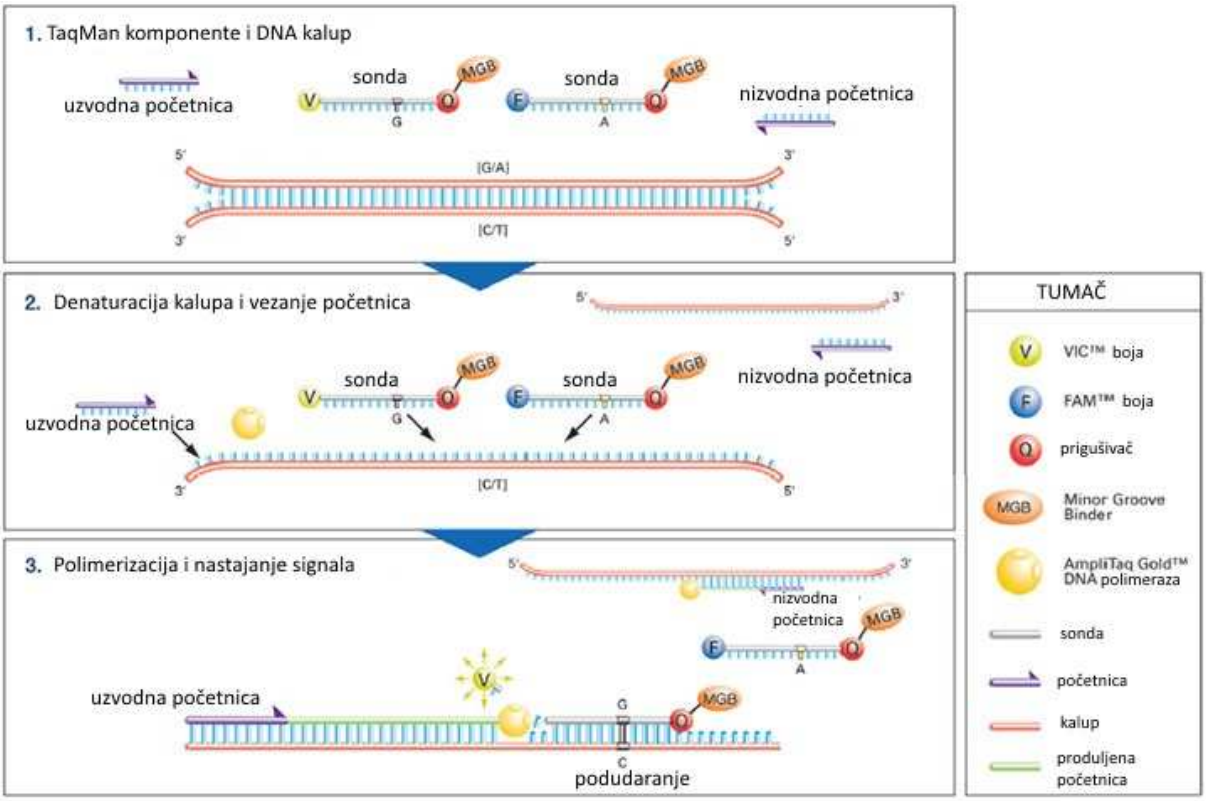
Za PCR reakcije korišten je uređaj Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, podešen na program za genotipizaciju uz korištenje TaqMan reagensa. Rezultati reakcija prate se na kompjuteru koristeći softverski program 7500 Software v2.3.

Za svaku pojedinu PCR reakciju (u jednoj jažici) korišteni su sljedeći reagensi: MasterMix (2x), AssayMix (40x), uzorak (10x), voda. Za izvođenje PCR-a korišten je TaqMan Genotyping Master Mix koji se sastoji od AmpliTaq Gold DNA polimeraze - Ultra Pure (UP), deoksiribonukleotidnih trifosfata (dNTPs), ROX boje (pasivna referentna boja) i puferskih komponenti.

Koraci PCR reakcije u svakom ciklusu:

1. 10 minuta na 95 °C
2. 15 sekundi na 92 °C
3. 1 minuta na 60 °C.

} 40 ponavljanja



Slika 2. Shematski prikaz tijeka PCR reakcije uz korištenje TaqMan sondi za genotipizaciju. (Prilagođeno prema slici preuzetoj s internetske stranice proizvođača: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/images/0816/TaqMan-Gene-Expression-Assay-720.jpg)

2.2.3. Statistička obrada dobivenih podataka

Statistička obrada dobivenih rezultata napravljena je koristeći Hi-kvadrat test i omjer vjerojatnosti (OR, od eng. *odds ratio*) s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (CI, od eng. *confidence intervals*) koristeći softverske pakete dostupne online na internetskim stranicama:

- ***SHEsis Online Version*** (http://analysis.bio-x.cn/SHEsisMain.htm) i
- ***SNPStats*** (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats).

3. REZULTATI

Za gen *B4GALNT1* uspješno su određeni genotipovi za sva 162 uzorka (82 uzorka kontrolne skupine i 80 uzoraka skupine ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice).

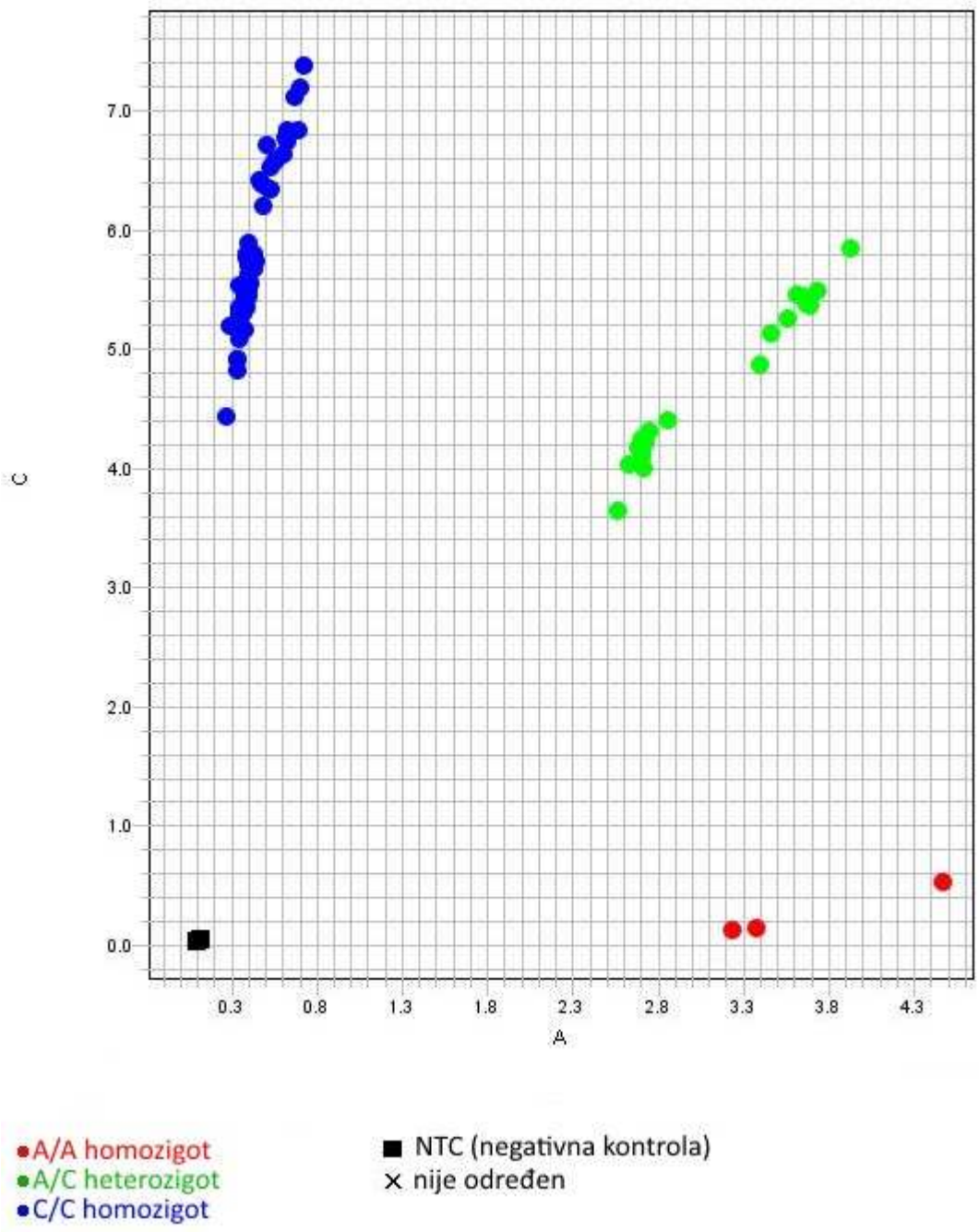
Za gen *ST3GAL5* uspješno su određeni genotipovi za 99,38 % uzoraka, odnosno 161 od ukupno 162 uzorka (82 uzorka kontrolne skupine i 79 uzoraka skupine ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice).

Na slikama 3 do 6 grafički je prikazana raspodjela genotipova za proučavane polimorfizme za obje skupine ispitanica.

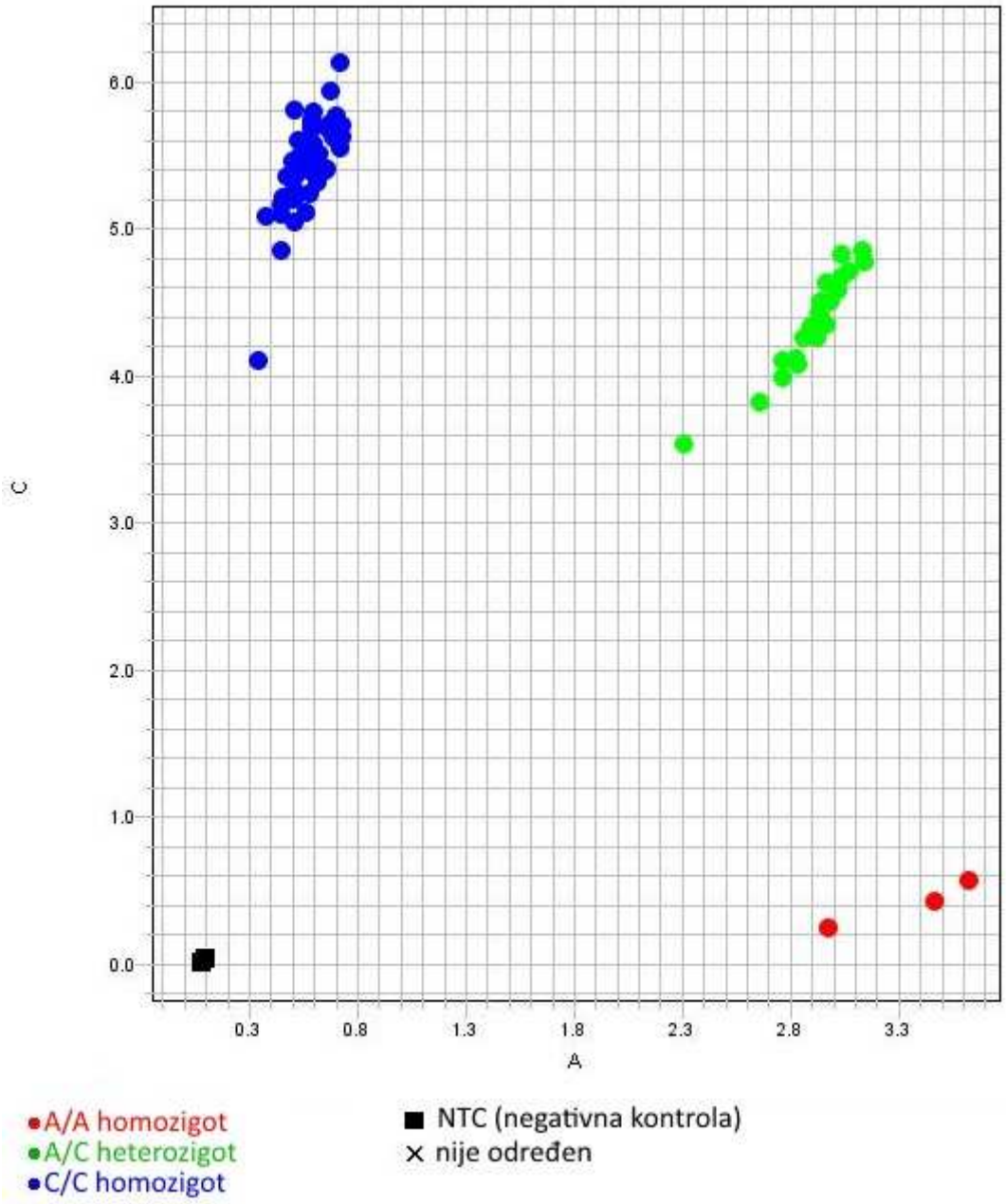
U tablicama 3 i 4 dan je prikaz učestalosti alela za oba proučavana polimorfizma.

Kod polimorfizma rs715930 (gen *B4GALNT1*) rjeđe prisutan bio je alel A, dok je kod polimorfizma rs1138484 (gen *ST3GAL5*) rjeđe prisutan bio alel C. Prikaz učestalosti rjeđih alela (MAF, od eng. *minor alelle frequency*) dan je u tablici 5. Prikaz raspodjele genotipova za oba gena (dominantni i recesivni model) dan je u tablici 6.

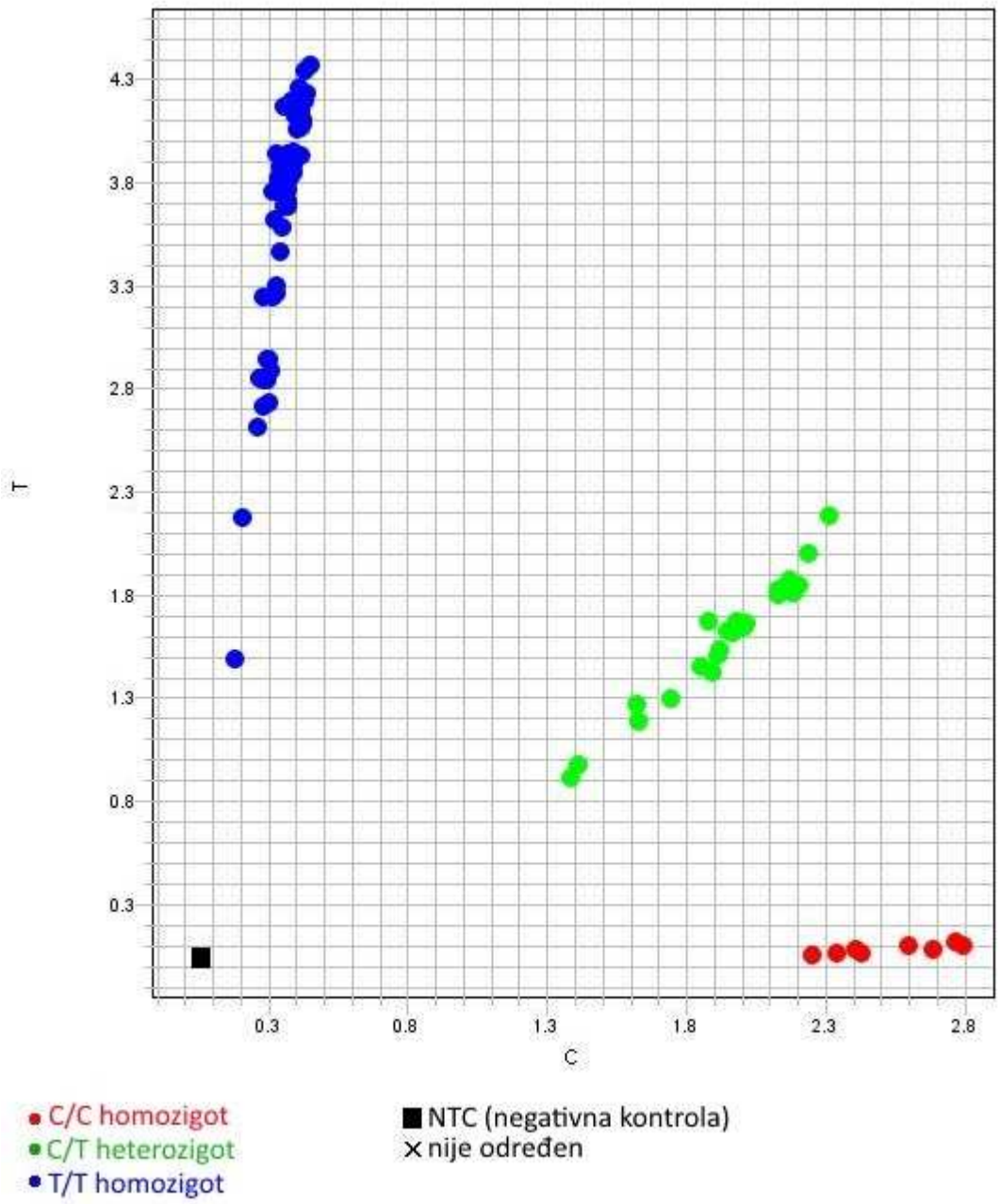
Obrada dobivenih podataka o raspodjeli genotipova i učestalosti alela unutar kontrolnih skupina i skupina ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice za oba analizirana polimorfizma nije otkrila statistički značajne razlike između tih skupina.



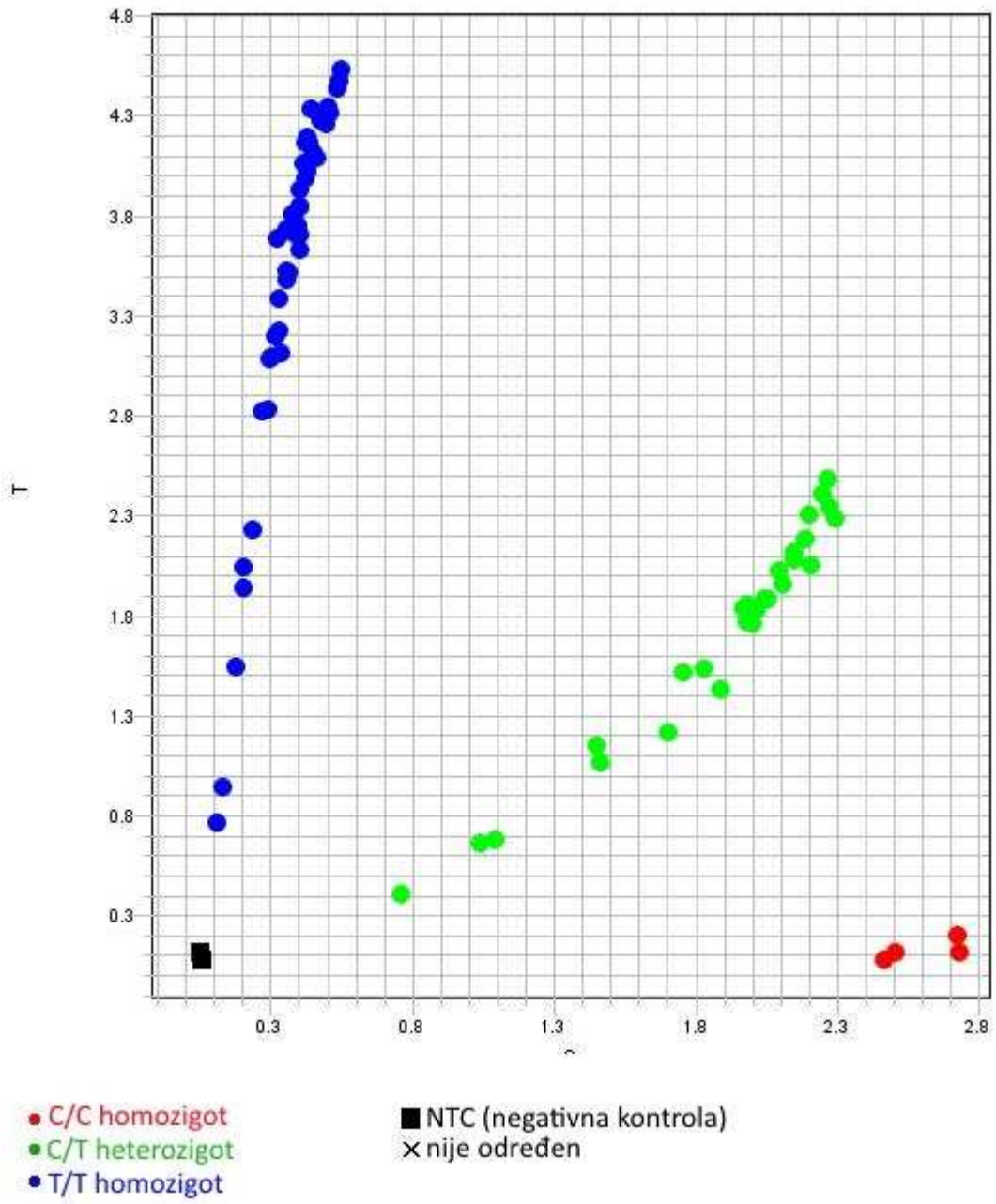
Slika 3. Raspodjela genotipova za polimorfizam rs715930 gena *B4GALNT1* (kontrolna skupina).



Slika 4. Raspodjela genotipova za polimorfizam rs715930 gena *B4GALNT1* (skupina ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice).



Slika 5. Raspodjela genotipova za polimorfizam rs1138484 gena *ST3GAL5* (kontrolna skupina).



Slika 6. Raspodjela genotipova za polimorfizam rs1138484 gena *ST3GAL5* (skupina ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice).

Tablica 3. Učestalost alela za polimorfizam rs715930 (gen *B4GALNT1*).

Gen *B4GALNT1* Polimorfizam rs715930	**Alel A / (učestalost)**	**Alel C / (učestalost)**
Skupina ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice	30 (0,188)	130 (0,812)
Kontrolna skupina	25 (0,152)	139 (0,848)
OR	1,283077	
95 % CI	[0,716846 - 2,296571]	
X^2	0,706386	
P-vrijednost	0,400686	

Tablica 4. Učestalost alela za polimorfizam rs113848 (gen *ST3GAL5*).

Gen *ST3GAL5* Polimorfizam rs1138484	**Alel C / (učestalost)**	**Alel T / (učestalost)**
Skupina ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice	35 (0,222)	123 (0,778)
Kontrolna skupina	38 (0,232)	126 (0,768)
OR	0,943517	
95 % CI	[0,559770 - 1,590340]	
X^2	0,047648	
P-vrijednost	0,827217	

Tablica 5. Učestalost rjeđe prisutnih alela za polimorfizme rs715930 (gen *B4GALNT1*) i rs1138484 (gen *ST3GAL5*).

Gen	**Polimorfizam (SNP)**	**Rjeđe prisutan alel**	**MAF kontrolna skupina**	**MAF skupina s dijagnozom karcinoma**	**OR**	**95 % CI**	**X^2**	**P-vrijednost**
B4GALNT1	rs715930	A	25 (0,152)	30 (0,188)	1,283077	0,716846-2,296571	0,706386	0,400686
ST3GAL5	rs1138484	C	38 (0,232)	35 (0,222)	0,943517	0,559770-1,590340	0,047648	0,827217

[MAF - učestalost rjeđeg prisutnog alela (eng. *minor allele frequency*), OR - omjer vjerojatnosti (eng. *odds radio*), CI - interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*)]

Tablica 6. Raspodjela genotipova za polimorfizme rs715930 (gen *B4GALNT1*) i rs1138484 (gen *ST3GAL5*) - dominantni i recesivni model.

Gen	Model	Genotip	Kontrolna skupina	Skupina ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice	OR (95 % CI)	P-vrijednost
B4GALNT1	DOMINANTNI	C/C A/C-A/A	60 (73,2 %) 22 (26,8 %)	53 (66,2 %) 27 (33,8 %)	1,00 0,72 (0,37-1,41)	0,34
B4GALNT1	RECESIVNI	C/C-A/C A/A	79 (96,3 %) 3 (3,7 %)	77 (96,2 %) 3 (3,8 %)	1,00 0,97 (0,19-4,98)	0,98
ST3GAL5	DOMINANTNI	T/T C/T-C/C	52 (63,4 %) 30 (36,6 %)	48 (60,8 %) 31 (39,2 %)	1,00 0,89 (0,47-1,69)	0,73
ST3GAL5	RECESIVNI	T/T-C/T C/C	74 (90,2 %) 8 (9,8 %)	75 (94,9 %) 4 (5,1 %)	1,00 2,03 (0,59-7,02)	0,25

4. RASPRAVA

U ovom istraživanju nije dokazano postojanje povezanosti polimorfizma rs715930 gena *B4GALNT1* i rs1138484 gena *ST3GAL5* s nastankom i razvojem karcinoma vrata maternice, budući da raspodjela alela i genotipova između ispitanica u kontrolnoj skupini i ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice nije pokazala postojanje statistički značajne razlike između tih skupina.

Do sada nisu objavljena istraživanja koja bi proučila polimorfizme u genima *B4GALNT1* i *ST3GAL5,* koji imaju utjecaj na sintezu i funkciju gangliozida te sudjeluju u imunološkom odgovoru organizma, u povezanosti s nastankom i razvojem karcinoma vrata maternice.

Za aktivaciju T-limfocita, nositelja stanične imunosti koji se aktiviraju prilikom ulaska virusa u stanicu, važne su mikrodomene lipidnih splavi unutar stanične membrane. Dokazano je da $CD4^+$ i $CD8^+$ T-limfociti zahtijevaju različite gangliozide za aktivaciju (Nagafuku i sur, 2012).

Postoje istraživanja koja su pokazala da onkoprotein ljudskog papilloma virusa E5, prisutan u visokorizičnom HPV-u tipa 16, povećava ekspresiju i udruživanje gangliozida GM1 i kaveolina-1, koji su komponente membranskih lipidnih splavi, na površini stanica (Suprynowicz i sur., 2008; Takahashi i Suzuki, 2011). Time virus HPV-a izbjegava imunološku reakciju domaćina. Dolazi do supresije citotoksičnih T-limfocita i povećanja signalizacije za proliferaciju putem receptora za EGF (Suprynowicz i sur., 2008; Takahashi i Suzuki, 2011). Slična istraživanja koja bi proučila moguće slično djelovanje drugih onkoproteina HPV-a na ostale gangliozide, kao što su GM2 i GM2, zasad nisu obavljena.

Trenutno ne postoje konkretna saznanja o tome koje sve utjecaje poremećaji u biosintezi glikosfingolipida mogu imati na ukupne glikome različitih stanica i tkiva (Boccuto i sur., 2014). Modifikacije glikolipida i glikoproteina u organizmu podložne su značajnoj epigenetičkoj i okolišnoj regulaciji (Moremen i sur., 2012; Bouccuto i sur., 2014). Dakle, ekspresija glikospfingolipida može biti regulirana na razini gena epigenetičkim mehanizmima, poput metilacije DNA i acetilacije histona gena glikoziltransferaza. Posttranslacijske modifikacije također reguliraju ativnost glikoziltransferaza, primjerice

fosforilacija stimulira aktivnost enzima B4GALNT1, a inhibira sijaliltransferazu SIAT4 (Johannes i sur., 2016).

Istražuje se i moguće djelovanje gangliozida GM3, u čijoj sintezi sudjeluje enzim GM3S (kodiran genom *ST3GAL5*) kao modulatora signalnih puteva koji uključuju različite molekule, primjerice EGF, bFGF, TNFα, PDGF, VEGF, inzulin te MAPK, PI3K/AKT, PTEN i ZAP-70 (Bouccuto i sur., 2014).

Glikozilacija proteina i lipida odvija se u Golgijevom aparatu i/ili endoplazmatskoj mrežici. Složene molekule glikokonjugata rezultat su reakcija u kojima sudjeluju različite glikoziltransferaze, glikozidaze, specifični transporterski i drugi proteini koje kodira preko 250 gena. Mutacije tih gena mogu uzrokovati poremećaje u funkciji proteina koji sudjeluju u glikozilaciji. Postoji cijela skupina urođenih metaboličkih poremećaja uzrokovana promjenama u glikozilaciji - urođeni poremećaji glikozilacije (CDGs, od eng. *congenital disorders of glycosylation*) (Supraha Goreta i sur., 2011). Dosad je opisano više od 45 ovih poremećaja, ali pretpostavlja se da je postavljanje dijagnoza otežano zbog sličnost s nekim drugim poremećajima ili zbog nedovoljne edukacije liječnika. Ovi poremećaji razvrstani su u nekoliko skupina, a to su: poremećaji N-glikozilacije proteina, poremećaji O-glikozilacije proteina, poremećaji glikozilacije glikosfingolipida i GPI sidra te poremećaji višestrukih glikozilacijskih i ostalih metaboličkih puteva (National Organization for Rare Disorders, NORD). Unutar skupine poremećaja glikozilacije glikosfingolipida i GPI sidra opisani su i poremećaji ST3GAL5-CDG i B4GALNT1-CDG, povezani s genima *ST3GAL5* i *B4GALNT1*.

Postoje istraživanja koja opisuju promjene u razini gangliozida u serumu pacijenata koji boluju od raka, primjerice neuroblastoma, limfoma, melanoma i glioblastoma. Kod nekih vrsta tumora prisutne su povećane razine gangliozida, što se povezuje i s nižom stopom preživljavanja pacijenata. Tumorske stanice mogu pojačano lučiti gangliozide koji tada ulaze u susjedne stanice i u njima izazivaju promjene u rastu i diferencijaciji. Gangliozidi mogu modificirati imunološke interakcije zdravog i tumorskog tkiva (Santin, 2004). Pokazano je i da gangliozidi mogu imati imunosupresivno djelovanje protiv različitih imunosnih stanica - B- i T-limfocita, pomagačkih T-limfocita, NK-stanica i različitih predočnih stanica.

Takamiya i sur. (1996) pokazali su da miševima koji imaju mutiran *B4GALNT1* gen nedostaju svi složeni gangliozidi, a dolazi do nakupljanja jednostavnih gangliozida u mozgu (GM3,

GD3) što ima utjecaj na neuronsku funkciju. *B4GALNT1 knock-out* miševi pokazuju simptome blažih neuroloških abnormalnosti, a mužjaci su i sterilni.

Kod takvih je miševa povećana ekspresija GM3 i GD3 u mozgu. Kod ljudi je zasad dokazana povezanost mutacija *B4GALNT1* gena u nastanku neurološke bolesti spastične paraplegije 26 (SPG26). Bolest se autosomno recesivno nasljeđuje (OMIM Entry - * 601873 - B4GALNT1).

Miševi s mutirana oba gena *B4GALNT1* i *ST3GAL5*, koji imaju poremećenu funkciju enzima GM3S i GM2S, pokazuju teži oblik neurodegenerativnog poremećaja koji završava ranom smrću (Sabourdy i sur., 2008).

Istraživanja na *ST35GAL knock-out* miševima pokazala su da takve životinje pokazuju povećanu osjetljivost na inzulin, gubitak sluha uslijed degeneracije Cortijevog organa, neuropsihološke poteškoće, a poremećena je i aktivacija $CD4^+$ T-limfocita (Sheikh i sur., 1999; Yamashita i sur., 2003; Yoshikawa i sur., 2009; Niimi i sur., 2011; Boccuto i sur., 2014). Takvi *ST3GAL5* KO miševi, kojima nedostaju GM3 i svi nizvodni gangliozidi, imali su povećanu osjetljivost na inzulin koja se manifestira kao povećana inzulinom izazvana fosforilacija inzulinskog receptora (IR) u skeletnim mišićima (Yamashita i sur., 2003; Lopez i Schnaar, 2009), što je dovelo do zaključka da su gangliozidi fiziološki regulatori osjetljivosti inzulinskog receptora.

U američkih Amiša opisan je epileptički sindrom koji se javlja u novorođenčadi, povezan sa razvojnim zaostajanjem i sljepoćom. Nasljeđivanje je bolesti autosomno recesivnog tipa. Pronađena je mutacija gubitka smisla gena *ST3GAL5* koja za posljedicu ima izostanak aktivnosti enzima GM3 sintaze, potpuni nedostatak gangliozida GM3 i njegovih derivata te porast koncentracije LacCer (OMIM Entry - * 604402 - ST3GAL5). To je prvi zabilježeni slučaj da poremećaji u biosintezi gangliozida uzrokuju bolesti u ljudi. Kasnije je opisana i mutacija *ST3GAL5* gena u jedne obitelji afroameričkog podrijetla koja uzrokuje tzv. "salt and pepper" sindrom. Bolest se manifestira kroz promjene u pigmentaciji te mentalno zaostajanje.
Neka istraživanja sijaliltransferaza u povezanosti s tumorima, posebice *ST3GAL5* (GM3S) i *ST8SIA1* (GD3S), pokazala su pozitivnu asocijaciju malignosti s ekspresijom GD3 (Ko i sur., 2006; Furukawa i sur., 2008; Cazet i sur., 2010; Dall'Olio i sur., 2014) te negativnu asocijaciju s ekspresijom GM3 (Miura i sur., 2004; Wang i sur., 2006, Mukherjee sur., 2008; Prinetti i sur., 2009; Dall'Olio i sur., 2014). Visoke razine GD3 karakteriziraju melanom, dok

visok omjer GD2/GD3, uslijed visokih razina *B4GALNT1*, karakterizira neuroblastom (Dall'Olio i sur., 2014). Postoje i oprečna istraživanja o *ST3GAL5* i GM3. Obično su povezani sa smanjenom malignošću, ali neka istraživanja pokazuju suprotno (Wang i sur., 2006; Gu i sur., 2008; Mondal i sur., 2010; Dall'Olio i sur., 2014).

S obzirom na složenost procesa biosinteze gangliozida uz sudjelovanje mnogih gena i njihovih produkata, moguća buduća istraživanja povezanosti tih gena s nastankom karcinoma vrata maternice trebala bi uključivati proučavanje većeg broja genetičkih varijanti, odnosno trebalo bi biti izvršeno opsežno cjelogenomsko istraživanje povezanosti (GWAS, od eng. *genome-wide association study*). Ovakva istraživanja bave se proučavanjem povezanosti raznih genskih polimorfizama jednog nukleotida (SNP, od eng. *single-nucleotide polymorphism*) s bolestima. Istraživanja bi također trebala uključivati veći broj ispitanica u kontrolnoj skupini i skupini ispitanica s dijagnozom karcinoma vrata maternice.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata koji su dobiveni u ovom istraživanju polimorfizama gena *B4GALNT1* i *ST3GAL5* koji sudjeluju u biosintezi gangliozida o mogućoj ulozi tih gena u nastanku i razvoju karcinoma vrata maternice, u konačnici se može zaključiti sljedeće:

1. između ispitanica koje boluju od karcinoma vrata maternice i zdravih ispitanica u kontrolnoj skupini *ne postoji* statistički značajna razlika u raspodjeli alela i genotipova za proučavani polimorfizam rs715930 gena *B4GALNT1*;

2. između ispitanica koje boluju od karcinoma vrata maternice i zdravih ispitanica u kontrolnoj skupini *ne postoji* statistički značajna razlika u raspodjeli alela i genotipova za proučavani polimorfizam rs1138484 gena *ST3GAL5*;

3. *nije dokazana* povezanost između polimorfizma rs715930 gena *B4GALNT1* i nastanka karcinoma vrata maternice;

4. *nije dokazana* povezanost između polimorfizma rs1138484 gena *ST3GAL5* i nastanka karcinoma vrata maternice;

5. ovim istraživanjem *nije dokazano* da geni *B4GALNT1* i *ST3GAL5* imaju ulogu u nastanku karcinoma vrata maternice.

6. LITERATURA

1. Amador-Molina, A., Hernández-Valencia, J., Lamoyi, E., Contreras-Paredes, A. & Lizano, M. (2013). Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. *Viruses*, 5(11), str.2624-2642.
2. Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F., Grčević, D., Lukinović-Škudar, V., Marušić, M., Taradi, M. & Višnjić, D. (2010). Imunologija. 7th ed. Zagreb: *Medicinska naklada*, str.15, 28-32.
3. Boccuto, L., Aoki, K., Flanagan-Steet, H., Chen, C., Fan, X., Bartel, F., Petukh, M., Pittman, A., Saul, R., Chaubey, A., Alexov, E., Tiemeyer, M., Steet, R. & Schwartz, C. (2013). A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation. *Human Molecular Genetics*, 23(2), str.418-433.
4. Borges Alves, D., Aparecida Tozetti, I., Almeida Gatto, F., Cassandri, F., Teixeira Ferreira, A., dos Santos Fernandes, C., Ribeiro Falcao, G., Doraci Lins Scapulatempo, I., Tezelli Junqueira Padovani, C. & Gomes Sandim Abdo, M. (2010). CD4 and CD8 T lymphocytes and NK cells in the stroma of the uterine cervix of women infected with human papillomavirus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(4), str.425-429.
5. Boukhris, A., Schule, R., Loureiro, J., Lourenço, C., Mundwiller, E., Gonzalez, M., Charles, P., Gauthier, J., Rekik, I., Acosta Lebrigio, R., Gaussen, M., Speziani, F., Ferbert, A., Feki, I., Caballero-Oteyza, A., Dionne-Laporte, A., Amri, M., Noreau, A., Forlani, S., Cruz, V., Mochel, F., Coutinho, P., Dion, P., Mhiri, C., Schols, L., Pouget, J., Darios, F., Rouleau, G., Marques, W., Brice, A., Durr, A., Zuchner, S. & Stevanin, G. (2013). Alteration of Ganglioside Biosynthesis Responsible for Complex Hereditary Spastic Paraplegia. *The American Journal of Human Genetics*, 93(1), str.118-123.
6. Brown, D. & Rose, J. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), str.533-544.
7. Caron, L., Abraham, N., Pawson, T. & Veillette, A. (1992). Structural requirements for enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Molecular and Cellular Biology*, 12(6), str.2720-2729.
8. Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S. & Delannoy, P. (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate Research*, 345(10), str.1377-1383.

9. Chan, A., Desai, D. & Weiss, A. (1994). The Role of Protein Tyrosine Kinases and Protein Tyrosine Phosphatases in T Cell Antigen Receptor Signal Transduction. *Annual Review of Immunology*, 12(1), str.555-592.
10. Crosbie, E., Einstein, M., Franceschi, S. & Kitchener, H. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 382(9895), str.889-899.
11. Dall'Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M., Chiricolo, M., 2014. Sialosignaling: Sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subject,s* 1840, str.2752-2764.
12. Daniotti, J., Lardone, R. & Vilcaes, A. (2016). Dysregulated Expression of Glycolipids in Tumor Cells: From Negative Modulator of Anti-tumor Immunity to Promising Targets for Developing Therapeutic Agents. *Frontiers in Oncology*, 5, str.1-11.
13. Furukawa, K., Hamamura, K., Nakashima, H. & Furukawa, K. (2008). Molecules in the signaling pathway activated by gangliosides can be targets of therapeutics for malignant melanomas. *Proteomics*, 8(16), str.3312-3316.
14. He, H., Lellouch, A. & Marguet, D. (2005). Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Seminars in Immunology*, 17(1), str.23-33.
15. He, X., Woodford-Thomas, T., Johnson, K., Shah, D. & Thomas, M. (2002). Targeting of CD45 protein tyrosine phosphatase activity to lipid microdomains on the T cell surface inhibits TCR signaling. *European Journal of Immunology*, 32(9), str.2578-2587.
16. Janes, P., Ley, S. & Magee, A. (1999). Aggregation of Lipid Rafts Accompanies Signaling via the T Cell Antigen Receptor. *The Journal of Cell Biology*, 147(2), str.447-461.
17. Johannes, L., Wunder, C. & Shafaq-Zadah, M. (2016). Glycolipids and Lectins in Endocytic Uptake Processes. *Journal of Molecular Biology*, 428(24), str.4792-4818.
18. Kabouridis, P. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *The EMBO Journal*, 16(16), str.4983-4998.
19. Ko, K., Furukawa, K., Takahashi, T., Urano, T., Sanai, Y., Nagino, M., Nimura, Y. & Furukawa, K. (2006). Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene*, 25(52), str.6924-6935.
20. Kolter, T., Proia, R. & Sandhoff, K. (2002). Combinatorial Ganglioside Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), str.25859-25862.
21. Kosugi, A., Hayashi, F., Liddicoat, D., Yasuda, K., Saitoh, S. & Hamaoka, T. (2001). A pivotal role of cysteine 3 of Lck tyrosine kinase for localization to glycolipid-enriched microdomains and T cell activation. *Immunology Letters*, 76(2), str.133-138.

22. Lee, L., Abe, A. & Shayman, J. (1999). Improved Inhibitors of Glucosylceramide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), str.14662-14669.
23. Lopez, P. & Schnaar, R. (2009). Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(5), str.549-557.
24. Miguel, L., Owen, D., Lim, C., Liebig, C., Evans, J., Magee, A. & Jury, E. (2011). Primary Human $CD4^+$ T Cells Have Diverse Levels of Membrane Lipid Order That Correlate with Their Function. *The Journal of Immunology*, 186(6), str.3505-3516.
25. Miura, Y., Kainuma, M., Jiang, H., Velasco, H., Vogt, P. & Hakomori, S. (2004). Reversion of the Jun-induced oncogenic phenotype by enhanced synthesis of sialosyllactosylceramide (GM3 ganglioside). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(46), str.16204-16209.
26. Mondal, S., Chandra, S. & Mandal, C. (2010). Elevated mRNA level of hST6Gal I and hST3Gal V positively correlates with the high risk of pediatric acute leukemia. *Leukemia Research*, 34(4), str.463-470.
27. Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M., Chauvin, J., Pierres, M. & He, H. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *The EMBO Journal*, 17(18), str.5334-5348.
28. Moremen, K., Tiemeyer, M. & Nairn, A. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), str.448-462.
29. Mukherjee, P., Faber, A., Shelton, L., Baek, R., Chiles, T. & Seyfried, T. (2008). Thematic Review Series: Sphingolipids. Ganglioside GM3 suppresses the proangiogenic effects of vascular endothelial growth factor and ganglioside GD1a. *The Journal of Lipid Research*, 49(5), str.929-938.
30. Nagafuku, M., Okuyama, K., Onimaru, Y., Suzuki, A., Odagiri, Y., Yamashita, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Takayanagi, M., Ohno, I. & Inokuchi, J. (2012). CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), str.E336-E342.
31. Niimi, K., Nishioka, C., Miyamoto, T., Takahashi, E., Miyoshi, I., Itakura, C. & Yamashita, T. (2011). Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(4), str.524-528.

32. Parton, R. & Simons, K. (1995). Digging into caveolae. *Science*, 269(5229), str.1398-1399.
33. Piersma, S. (2011). Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Cervical Cancer Patients. *Cancer Microenvironment*, 4(3), str.361-375.
34. Prinetti, A., Aureli, M., Illuzzi, G., Prioni, S., Nocco, V., Scandroglio, F., Gagliano, N., Tredici, G., Rodriguez-Menendez, V., Chigorno, V. & Sonnino, S. (2009). GM3 synthase overexpression results in reduced cell motility and in caveolin-1 upregulation in human ovarian carcinoma cells. *Glycobiology*, 20(1), str.62-77.
35. Rodriguez-Boulan, E. & Nelson, W. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*, 245(4919), str.718-725.
36. Sabourdy, F., Kedjouar, B., Sorli, S., Colié, S., Milhas, D., Salma, Y. & Levade, T. (2008). Functions of sphingolipid metabolism in mammals — Lessons from genetic defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(4), str.145-183.
37. Santin, A., Ravindranath, M., Bellone, S., Muthugounder, S., Palmieri, M., O'Brien, T., Roman, J., Cannon, M. & Pecorelli, S. (2004). Increased levels of gangliosides in the plasma and ascitic fluid of patients with advanced ovarian cancer. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 111(6), str.613-618.
38. Schnaar, R. (2016). Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), str.3325-3336.
39. Schroeder, R., London, E. & Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), str.12130-12134.
40. Sheikh, K., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T., Proia, R., Griffin, J. & Schnaar, R. (1999). Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), str.7532-7537.
41. Shi, Y. & He, L. (2006). SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Research*, 16(10), str.851-851.
42. Simons, K. & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), str.569-572.

43. Simons, K. & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), str.31-39.
44. Simons, K. & Van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), str.6197-6202.
45. Sole, X., Guino, E., Valls, J., Iniesta, R. & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 22(15), str.1928-1929.
46. Song, D., Li, H., Li, H. & Dai, J. (2015). Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). *Oncology Letters*, 10(2), str.600–606.
47. Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V. & Prinetti, A. (2006). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17(1), str.1R-13R.
48. Stanley, M. & Sterling, J. (2014). Host Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Human Papillomavirus*, 45, str.58-74.
49. Supraha Goreta, S., Dabelic, S. & Dumic, J. (2012). Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochemia Medica*, 22(2), str.156-170.
50. Suprynowicz, F.A., Disbrow, G.L., Krawczyk, E., Simic, V., Lantzky, K., Schlegel, R. (2008). HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene,* 27(8), str.1071–1078.
51. Takahashi, T. & Suzuki, T. (2011). Function of Membrane Rafts in Viral Lifecycles and Host Cellular Response. *Biochemistry Research International*, 2011, str.1-23.
52. Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K. & Aizawa, S. (1996). Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), str.10662-10667.
53. Taniguchi, N., Honke, K. & Fukuda, M. (2002). Handbook of glycosyltransferases and related genes. 1st ed. Tokyo: *Springer*, str.174-179, 289-294.
54. Tavano, R., Gri, G., Molon, B., Marinari, B., Rudd, C., Tuosto, L. & Viola, A. (2004). CD28 and Lipid Rafts Coordinate Recruitment of Lck to the Immunological Synapse of Human T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 173(9), str.5392-5397.
55. van Meer, G. (1989). Lipid Traffic in Animal Cells. *Annual Review of Cell Biology*, 5(1), str.247-275.

56. Wang, X., Sun, P., Go, L., Koti, V., Fliman, M. & Paller, A. (2006). Ganglioside GM3 Promotes Carcinoma Cell Proliferation via Urokinase Plasminogen Activator-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase-Independent p70S6 Kinase Signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), str.2687-2696.
57. Wang, Z., Sun, Z., Li, A. & Yarema, K. (2006). Roles for UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc 6-Kinase outside of Sialic Acid Biosynthesis: Modulation of sialyltransferase and BIP expression, GM3 and GD3 biosynthesis, proliferation, and apoptosis, and Erk1/2 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), str.27016-27028.
58. Wange, R. & Samelson, L. (1996). Complex Complexes: Signaling at the TCR. *Immunity*, 5(3), str.197-205.
59. Weiss, A. & Littman, D. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, 76(2), str.263-274.
60. Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K. & Proia, R. (2003). Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), str.3445-3449.
61. Yasuda, K., Kosugi, A., Hayashi, F., Saitoh, S., Nagafuku, M., Mori, Y., Ogata, M. & Hamaoka, T. (2000). Serine 6 of Lck Tyrosine Kinase: A Critical Site for Lck Myristoylation, Membrane Localization, and Function in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 165(6), str.3226-3231.
62. Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K. & Inokuchi, J. (2009). Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23), str.9483-9488.
63. Yu, R., Tsai, Y., Ariga, T. & Yanagisawa, M. (2011). Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *Journal of Oleo Science*, 60(10), str.537-544.
64. Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I., Zhang, J., Siegel, C., Komarnitsky, S., Yew, N. & Cheng, S. (2007). Inhibiting Glycosphingolipid Synthesis Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity in Animal Models of Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 56(5), str.1210-1218.
65. Zhu, Y., Gumlaw, N., Karman, J., Zhao, H., Zhang, J., Jiang, J., Maniatis, P., Edling, A., Chuang, W., Siegel, C., Shayman, J., Kaplan, J., Jiang, C. & Cheng, S. (2011). Lowering

Glycosphingolipid Levels in CD4^{+}T Cells Attenuates T Cell Receptor Signaling, Cytokine Production, and Differentiation to the Th17Lineage. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), str.14787-14794.

Internetski izvori

66. Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050329.pdf (pristupljeno 18.3.2016.)
67. ENZYME entry: EC 2.4.1.92 http://enzyme.expasy.org/EC/2.4.1.92 (pristupljeno 6.2.2017.)
68. ENZYME entry: EC 2.4.99.9 http://enzyme.expasy.org/EC/2.4.99.9 (pristupljeno 6.2.2017.)
69. Real-time PCR handbook (pristupljeno 6.2.2017.) http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf
70. B4GALNT1 Gene - GeneCards | B4GN1 Protein | B4GN1 Antibody http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=B4GALNT1 (pristupljeno 6.2.2017.)
71. ST3GAL5 Gene - GeneCards | SIAT9 Protein | SIAT9 Antibody http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ST3GAL5 (pristupljeno 6.2.2017.)
72. Hrvatski zavod za javno zdravstvo http://www.hzjz.hr/ (pristupljeno 6.2.2017.)
73. Hrvatski zavod za javno zdravstvo nabavio 14.000 doza cjepiva protiv HPV-a http://www.hzjz.hr/novosti/hrvatski-zavod-za-javno-zdravstvo-nabavio-14-000-doza-cjepiva-protiv-hpv-a/ (pristupljeno 6.2.2017.)
74. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2015. http://www.hzjz.hr/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2015/ (pristupljeno 6.2.2017.)
75. OMIM Entry - * 601873 - BETA-1,4-N-ACETYLGALACTOSAMINYLTRANSFERASE 1; B4GALNT1 http://www.omim.org/entry/601873 (pristupljeno 6.2.2017.)
76. OMIM Entry - * 604402 - ST3 BETA-GALACTOSIDE ALPHA-2,3-SIALYLTRANSFERASE 5; ST3GAL5 http://www.omim.org/entry/604402 (pristupljeno 6.2.2017.)

77. How TaqMan Assays Work
http://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html (pristupljeno 6.2.2017.)
78. TaqMan Genotyping Master Mix Protocol
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_039282.pdf (pristupljeno 6.2.2017.)
79. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook
http://www.qiagen.com/hr/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en (pristupljeno 6.2.2017.)
80. QIAGEN Protease
http://www.qiagen.com/hr/shop/lab-basics/enzymes/qiagen-protease/#productdetails (pristupljeno 6.2.2017.)
81. National Organization for Rare Disorders - Congenital Disorders of Glycosylation
https://rarediseases.org/rare-diseases/congenital-disorders-of-glycosylation/ (pristupljeno 24.2.2016.)
82. B4GALNT1 - Beta-1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase 1 - Homo sapiens (Human) - B4GALNT1 gene & protein - UniProtKB - Q00973 (B4GN1_HUMAN)
http://www.uniprot.org/uniprot/Q00973 (pristupljeno 6.2.2017.)
83. ST3GAL5 - Lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase - Homo sapiens (Human) - ST3GAL5 gene & protein - UniProtKB - Q9UNP4 (SIAT9_HUMAN)
http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UNP4 (pristupljeno 6.2.2017.)
84. Human papillomavirus (HPV)
http://www.who.int/immunization/topics/hpv/en/ (pristupljeno 6.2.2017.)
85. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer
http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/(pristupljeno 6.2.2017.)

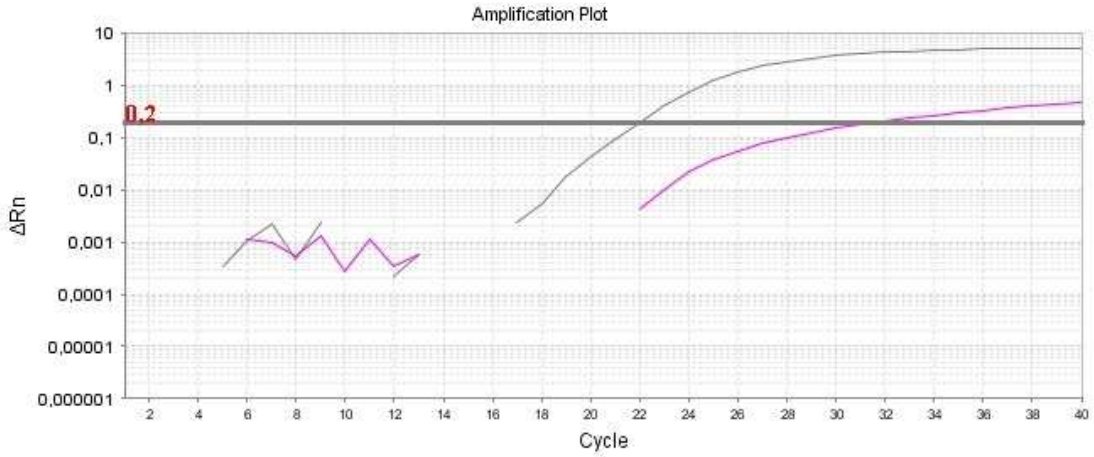
7. PRILOZI

Prilog 1. Izgled amplifikacijskih krivulja za polimorfizam rs715930 gena *B4GALNT1*.

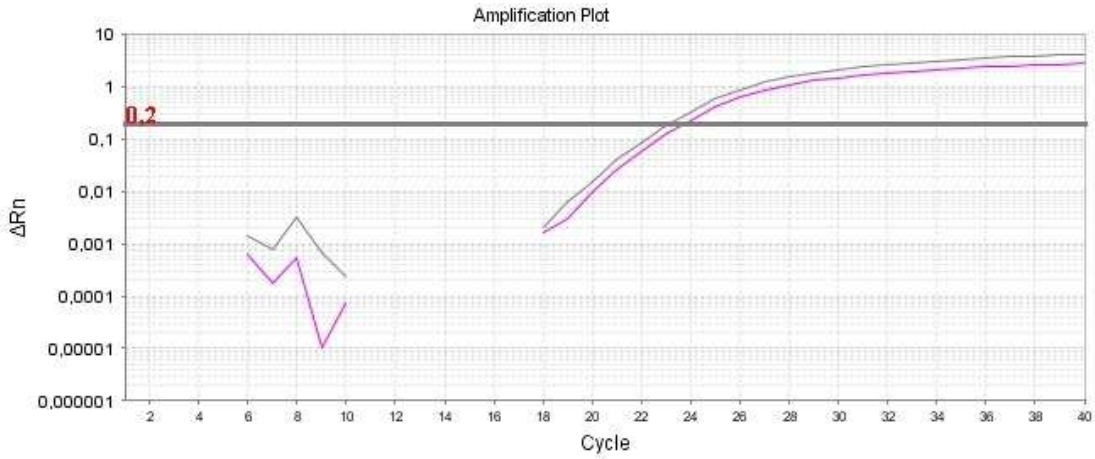
Prilog 2. Shema biosinteze gangliozida.

Prilog 1. Izgled amplifikacijskih krivulja za polimorfizam rs715930 gena *B4GALNT1*.

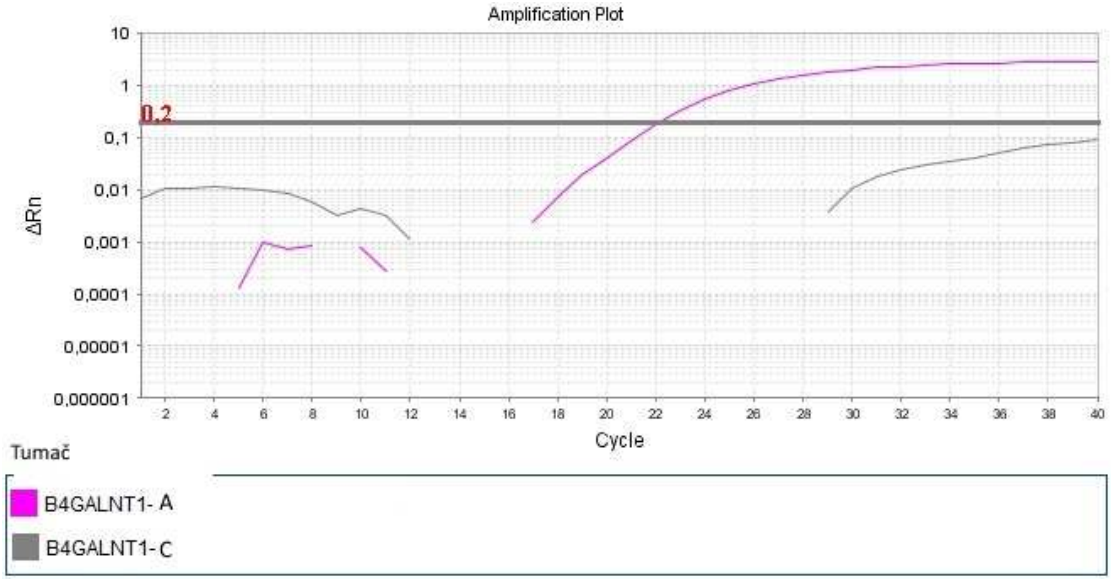
a) homozigot za alel C



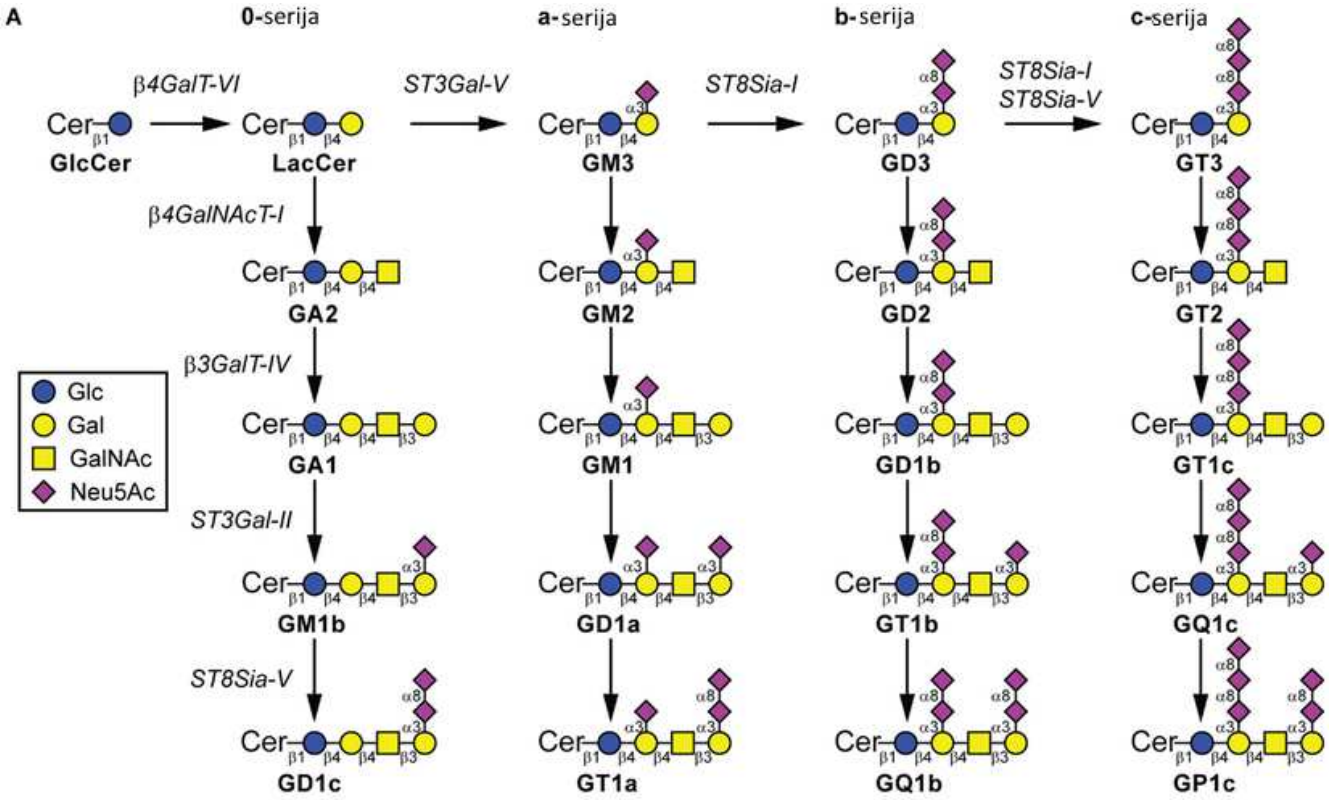
b) heterozigot (aleli A i C)



c) homozigot za alel A



Prilog 2. Shema sinteze gangliozida.



Prilagođeno iz rada: Daniotti, J., Lardone, R. and Vilcaes, A. (2016). Dysregulated Expression of Glycolipids in Tumor Cells: From Negative Modulator of Anti-tumor Immunity to Promising Targets for Developing Therapeutic Agents. Frontiers in Oncology, 5, str.1-11.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Osijeku gdje sam završila Osnovnu školu Ljudevita Gaja te I. gimnaziju.

Godine 2014. završila sam preddiplomski studij biologije i stekla zvanje sveučilišne prvostupnice biologije na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Iste sam godine upisala diplomski studij eksperimentalne biologije (modul: Fiziologija i imunobiologija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

U svibnju 2017. godine završila sam pedagoško-psihološku i didaktičko-metodičku izobrazbu na Fakultetu za odgojne i obrazovne znanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.