Uloga polimorfizama gena BIRC5 (survivin) u različitim tipovima tumora jajnika

Majić, Tajana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:217:223654

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Tajana Majić

Uloga polimorfizama gena *BIRC5* (survivin) u različitim tipovima tumora jajnika

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković, pod voditeljstvom dr.sc. Vesne Musani i suvoditeljstvom doc.dr.sc. Inge Marijanović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimenatalne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Vesni Musani na beskrajnom strpljenju, razumijevanju i pomoći sa svime vezanim uz ovaj rad.

Zahvaljujem dr.sc. Petru Ozretiću na savjetima i pomoći sa statistikom.

Zahvaljujem voditeljici laboratorija dr.sc. Sonji Levanat što mi je omogućila izradu diplomskog rada u njihovom laboratoriju.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Ingi Marijanović na stručnom savjetovanju.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i Mihaelu na njihovoj potpori, strpljenju i svemu što su učinili za mene.

Zahvaljujem također svima koji su na bilo koji način pripomogli nastajanju ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga polimorfizama gena *BIRC5* (survivin) u različitim tipovima tumora jajnika

Tajana Majić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb
Hrvatska

Gen *BIRC5* i njegov proteinski produkt survivin imaju važnu ulogu u procesu apoptoze. U zdravim tkivima survivin je eksprimiran samo tijekom embrionalnog razvoja dok u diferenciranim tkivima odraslih organizama nije eksprimiran. Eksprimiran je u mnogim tumorima i njegova ekspresija je povezana s nastankom tumora, njihovim povratkom i lošijim preživljenjem. Istraživala sam polimorfizme u promotorskoj regiji, eksonu 4 te 3' UTR regiji gena *BIRC5* kod različitih tipova tumora jajnika metodom analize heterodupleksa i sekvenciranjem DNA. Pronašla sam 15 polimorfizama od kojih c.9809T>C ima statističku značajnost u karcinomima u usporedbi s kontrolama, a c.-683C>T je novootkriven. Učestalosti ostalih polimorfizama odgovaraju referentnim vrijednostima. Čini se da polimorfizmi *BIRC5* nemaju značajnu ulogu u nastanku tumora jajnika osim možda u slučaju c.9809T>C, no moguće je da bi veći uzorak pokazao drugačije rezultate.

Ključne riječi: polimorfizmi, promotor, tumori, survivin
54 stranica, 15 slika, 32 tablice, 41 literaturnih navoda, hrvatski jezik
Voditelj: Vesna Musani, dr.sc.
Suvoditelj: Inga Marijanović, doc.dr.sc.
Ocjenjivači: Inga Marijanović, doc.dr.sc.
Damjan Franjević doc.dr.sc.
Željka Vidaković-Cifrek, izv.prof.dr.sc.

Rad prihvaćen: 18. veljače 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of science
Department of Biology

Master thesis

The role of polymorphisms of gene *BIRC5* (survivin) in different types of ovarian tumors

Tajana Majić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb
Croatia

BIRC5 gene and its protein product survivin has an important role in the process of apoptosis. In healthy tissues survivin is expressed only during embryonal development but it is not expressed in differentiated tissues of adult organisms. It is expressed in many tumors and its expression is linked to development of tumors, their recurrence and lower survival. I studied polymorphisms in promoter region, exon 4 and 3'UTR region of *BIRC5* gene in different types of ovarian tumors using heteroduplex analysis method and DNA sequencing. I found 15 polymorphisms out of which c.9809T>C has statistical significance in cancer samples compared to controls, and c.-683C>T is newly discovered. Frequency of other polymorphisms match reference values. It appears that *BIRC5* polyphormisms do not have a significant role in developing ovarian tumors apart from c.9809T>C, but it is possible that a larger sample would show different results.

Keywords: polymorphisms, promoter, tumors, survivin
54 pages, 15 pictures, 32 tables, 41 references, Croatian
Supervisor: Vesna Musani, PhD Research Associate
Cosupervisor: Inga Marijanović, PhD Assistant Professor
Reviewers: Inga Marijanović, PhD Assistant Professor
Damjan Franjević, PhD Assistant Professor
Željka Vidaković-Cifrek, PhD Associate Professor

Thesis accepted: February 18th 2015

SADRŽAJ

1. Uvod 1

1.1.Tumori jajnika 1

1.1.1. Fibromi jajnika 1

1.1.2. Dermoidi jajnika 2

1.1.3. Karcinomi jajnika 2

1.2. Apoptoza 3

1.3. Survivin 5

1.3.1. Građa survivina 5

1.3.2. Ekspresija survivina 5

1.3.3. Funkcija survivina 6

1.3.4. Regulacija aktivnosti survivina 6

1.3.4.1. Regulacija na razini transkripcije 6

1.3.4.2. Regulacija ovisna o staničnom ciklusu 7

1.3.4.3. Stabilnost survivina posredovana HSP90 7

1.3.4.4. Posttranslacijske modifikacije survivina 8

1.3.5. Prekrajanje survivina 8

1.3.6. Polimorfizmi survivina 10

1.3.7. Ciljevi istraživanja 10

2. Materijali i metode 11

2.1. Izolacija genomske DNK iz uzorka pune krvi metodom isoljavanja 11

2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije DNA 12

2.3. Lančana reakcija polimerazom 12

2.3.1. Dizajn početnica 12

2.3.2. Postupak PCR 13

2.4. Elektroforeza 14

2.4.1. Elektroforeza u gelu agaroze 14

2.4.2. Postupak elektroforeza 15

2.5. Analiza heterodupleksa 15

2.5.1. Postupak analize heterodupleksa 15

2.6. Sekvenciranje 16

2.7. Statistička analiza 16

3. Rezultati 17

3.1. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-1547 18

3.1.1. Polimorfizam c.-1547C>T 19

3.1.2. Polimorfizam c.-1458C>T 20

3.2. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-625 21

3.2.1 Polimorfizam c.-644T>C 23

3.2.2. Polimorfizam c.-625G>C 24

3.2.3. Polimorfizam c.-683G>T 25

3.3. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-241 25

3.3.1. Polimorfizam c.-267G>A 27

3.3.2. Polimorfizam c.-241C>T 28

3.3.3. Polimorfizam c.-235G>A 29

3.4. Područje PCR fragmenta eksona 4 30

3.4.1. Polimorfizam c.9194G>A 31

3.4.2. Polimorfizam c.9288G>C 32

3.4.3. Polimorfizam c.9342G>A 33

3.4.4. Polimorfizam c.9386T>C 34

3.4.5. Polimorfizam c.9387_9388insAA 35

3.5. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.9809 36

3.5.1. Polimorfizam c.9809T>C 36

3.6. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.10611 39

3.6.1. Polimorfizam c.10611C>A 41

4. Rasprava 42

4.1 Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-1547 43

4.2. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-625 43

4.3. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-241 44

4.4. Područje PCR fragmenta eksona 4 44

4.5. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.9809 45

4.6. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.10611 46

4.7. Ostali polimorfizmi 46

5. Zaključak 46

6. Literatura 49

7. Životopis 54

POPIS KRATICA

AK- aminokiselina

APC- eng. adenomatosis polyposis coli

BAD- eng. BCL2-associated agonist of cell death, BCL2 pridružen agonist stanične smrti

BAK- eng. BCL2-antagonist/killer, BCL2 antagonist/ubojica

BAX- eng. BCL2-associated X protein, BCL2 pridružen X protein

BCL2- eng. B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2, B-stanica kronična limfocitna leukemija/limfoma 2

BCL-xL- eng. B-cell lymphoma-extra large, B- stanica limfom-ekstra veliki

BH- eng. Bcl-2 homology domains, domene homologije Bcl-2

BID- eng. BH3 interacting domain death agonist, BH3 interagirajuća domena agonist smrti

BIR- eng. baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat, proteinsko ponavljanje bakuloviralnog inhibitora apoptoze

BIRC2- eng. baculoviral IAP repeat containing 2, bakulovirusno IAP ponavljanje 2

BIRC3- eng. baculoviral IAP repeat containing 3, bakulovirusno IAP ponavljanje 3

BIRC5- eng. baculoviral IAP repeat containing 5, gen bakulovirusno IAP ponavljanje 5

BRAF- eng. B-Raf proto-oncogene, B-Raf protoonkogen

BRCA1- eng. breast cancer 1, gen raka dojke 1

BRCA2- eng. breast cancer 2, gen raka dojke 2

CARD- eng. caspase activation and recruitment domains, domene aktivacije i regrutiranja kaspaza

CARD- eng. caspase activation recruitment

CDE- eng. cell-cycle dependant element, element ovisan o staničnom ciklusu

CHR- eng. cell cycle homology region, regija homologije staničnog ciklusa

CI- eng. confidence interval interval pouzdanosti

CTNNB1- eng. catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (katenin (kadherinu pridružen protein) beta 1

dATP- eng. deoxyadenosine triphosphate, deoksiadenozin trifosfat

dCTP- eng. deoxycytidine triphosphate, deoksicitozin trifosfat

dGTP- eng. deoxyguanosine triphosphate, deoksigvanozin trifosfat

DIABLO- eng. IAP-binding mitochondrial protein, IAP-vezujući mitohondrijski protein

DNA- eng. deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleinska kiselina

dNTP- eng. deoxynucleoside triphosphate deoksunukleotid trifosfat

dTTP- eng. deoxythymidine triphosphate, deoksitimidin trifosfat

E2F- eng. E2F transcription factor 1, e2f transkripcijski faktor 1

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina

FAS- eng. Fas cell surface death receptor, Fas površinski receptor smrti

Hi-Di formamid- jako deioniziran formamid

Hsp- eng. heat shock protein, protein toplotnog šoka

HTRA2- eng. HtrA serine peptidase 2, HtrA serinska peptidaza 2

HWE - Hardy Weinbergova ravnoteža

IAP- eng. inhibitors of apoptosis proteins, proteini inhibitori apoptoze

IGF-1- eng. insulin-like growth factor-1, inzulinu sličan faktor rasta 1

K-ras - eng. kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MgCl2- magnezijev klorid

OR- eng. odds ratio, omjer izgleda

ORF- eng. open reading frame otvoreni okvir čitanja

P53- eng. tumor protein p53, tumorski protein 53

pb- parovi baza

PCR- eng. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom

PTEN- eng. phosphatase and tensin homolog, fosfataza i tenzinov homolog

P-vrijednost- statistička značajnost

Ras- eng. superfamily Ras, Ras superobitelj

RB- eng. retinoblastoma, retinoblastom,

RCBL pufer- eng. red blood cell lysis buffer, pufer za lizu eritrocita

RING- eng. really interesting new gene, stvarno zanimljiv novi gen

RNAi- eng. RNA interference, RNA intereferenca

SDS- natrijev dodecil sulfat

SNP- eng. single nucleotid polimorphysm, polimorfizam

Sp1- eng. specificity protein 1 protein specifičnosti 1

STAT3- eng. signal transducer and activator of transcription 3

Tm- eng. melting temperature, temperatura mekšanja

TNF-α- eng. tumor necrosis factor α, faktora nekroze tumora-α

UTR- eng. untraslated region, netranslatirana regija

UV- eng. ultraviolet light, ultraljubičasta svjetlost

WHO - eng. World health organisation, svjetska zdravstvena organizacija

XIAP- eng. X-linked inhibitor of apoptosis, X-vezan inhibitor apoptoze

1. UVOD

Mnogi geni koji imaju važnu ulogu u funkcioniranju organizma, počevši od proliferacije stanica do njihovog ugibanja i apoptoze, sudjeluju i u nastanku tumora. Poznato je da gen *BIRC5* i njegov proteinski produkt survivin imaju važnu ulogu u procesu apoptoze. U zdravim tkivima survivin je eksprimiran samo tijekom embrionalnog razvoja dok u diferenciranim tkivima odraslih organizama nije eksprimiran. Eksprimiran je u mnogim tumorima i njegova ekspresija je povezana s nastankom tumora, njihovim povratkom i lošijim preživljenjem. Povećana razina survivina u karcinomima jajnika povezana je s lošijom kliničkom slikom (Chen i sur. 2013.), a prisutnost nekih polimorfizama s dobi oboljenja kod pacijentica s karcinomima jajnika (Han i sur. 2009.). Ovim radom nastoji se utvrditi uloga tog gena i njegovih polimorfizama ne samo u karcinomima, nego i u drugim tumorima jajnika, za koje u literaturi nema podataka.

1.1. Tumori jajnika

Jajnici su građeni od triju različitih vrsta stanica: multipotentnog površinskog pokrovnog epitela, totipotentnih zametnih stanica i multipotentnih stromalnih stanica spolnog tračka. S obzirom na histološku raznolikost u građi normalnih janika histogenetski su vrlo raznoliki i dijele se na epitelne tumore, tumore strome i tumore zametnih stanica. Unutar ovih skupina postoje brojne podskupine od kojih svaka uključuje zloćudne i dobroćudne oblike tumora (Musani, 2008.). Epitelni tumori jajnika su klasificirani prema WHO (eng. World health organisation, Svjetska zdravstvena organizacija,) na benigne, granične i maligne. Epitelni tumori čine dvije trećine svih tumora jajnika. Većina stromalnih tumora jajnika spadaju u fibrome. Ti tumori se većinom nalaze samo s jedne strane, nastaju iz mezenhima. Tumori germinativnih stanica nastaju iz stanica nezrelih germinativnih stanica. Najveći dio tumora germinativnih stanica čine dermoidne ciste (zreli cistični teratomi) (Musani i sur. 2013.).

1.1.1. Fibromi jajnika

Fibromi jajnika su dobroćudni, nefunkcionalni tumori stromalnog porijekla. Razvijaju se iz spolno indiferentnog vezivnog tkiva. Stromalni tumori spolnog tračka sastavljeni su od različitih kombinacija spolnog tračka i derivata strome koji se diferenciraju (u ovarijskom ili testikularnom smjeru) ili ostaju fibromatozni. Tumori jajnika iz ove skupine pogađaju žene svih dobnih skupina i čine 5-19% svih tumora jajnika. Fibromi čine 4% svih tipova

stromalnih tumora. Histološki su sastavljeni od dobro diferenciranih fibroblasta s kolagenskim vezivnim tkivom između stanica. Morfološki izgrađuju solidnu, oblu začahurenu i čvrstu sivkastobijelu masu pokrivenu serozom jajnika. (Musani, 2008.)

1.1.2. Dermoidi jajnika

Dermoidi ili dermoidne ciste jajnika su dobroćudni tumori. Definirani su kao zreli teratomi obavijeni ovojnicom koja sliči epidermi. U mnogim slučajevima su prisutni i mezodermni, ektodermni i endodermni derivati. Često sadrže kosu, mliječne zube, komade organa, kosti, hrskavice i slično. Obično su manji od 10 cm. Većinom su jednostrani, vrlo često na desnoj strani, ali 10% je obostrano. Nastaju uslijed poremećaja u razvoju jajnih stanica iz prekursorskih stanica koje bi trebale postati jajne stanice. Do poremećaja najčešće dolazi prije prve mejotske diobe, ali i nakon mejoze I. Mnogo toga o samom mehanizmu nastanka još je nepoznato. Dermoidi čine 20% svih tumora jajnika, odnosno 30% benignih tumora. Moguće su i dermoidne ciste s malignom transformacijom. Zabilježene su u 2% slučajeva i tada poprimaju izgled planocelularnog karcinoma. Preko 80% dermoida javlja se u reproduktivnoj fazi života žene, ali mogu se javiti i kod djece i žena u postmenopauzi. (Musani, 2008.)

1.1.3. Karcinomi jajnika

Većinu malignih tumora jajnika kod odraslih žena čine epitelni tumori jajnika. Te neoplazme su klasificirane u različite morfološke kategorije prema izgledu epitela u serozne, mucinozne, endometrioidne, karcinome svijetlih stanica, miješane, skvamozne, prijelazne i nediferencirane tumore (Bell i sur. 2015.). Serozni adenokarcinomi su najčešći i čine 75% svih karcinoma jajnika, mucinozni čine 20%, endometrioidni 2%, karcinomi svijetlih stanica i nediferencirani karcinomi zajedno čine manje od 1% svi epitelnih lezija. Svaki histološki tip tumora jajnika i stupanj diferenciranosti stanica je povezan s određenim molekularno-genetičkim promjenama. Serozni tip tumora nastaje zbog mutacije *p53* (eng. tumor protein p53, tumorski protein 53), disfunkcije *BRCA1* (eng. breast cancer 1, gen raka dojke 1) i *BRCA2* (gen raka dojke 2, eng. breast cancer 2) te postupno zbog mutacija *K-ras* (eng. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) i *BRAF* (eng. B-Raf proto-oncogene, B-Raf protoonkogen). Endometrioidni tip tumora nastaje također zbog mutacija *p53* i disfunkcije *BRCA1* i *BRCA2*, ali i mutacijama u *CTNNB1* (eng. catenin (cadherin-associated protein) beta 1, katenin (kadherinu pridružen protein) beta 1) i *PTEN* (eng. phosphatase and tensin

homolog, fosfataza i tenzinov homolog), a mucinozni uslijed mutacija u *K-ras* (Maurac, 2011.).

1.2. Apoptoza

Do razvoja raka dolazi kada dođe do pogreške u kontroli osnovnih mehanizama koji upravljaju rastom i smrću stanice. Procesi koji reguliraju proliferaciju stanice i uništenje potencijalno štetnih stanica su tako blisko povezani da neprimjerena aktivacija onkogena koji promoviraju rast često pokrene staničnu smrt. U zdravom organizmu stanice obično umiru putem apoptoze. Sposobnost stanica raka da neograničeno proliferiraju zahtjeva potiskivanje apoptoze (Hunter i sur. 2007). Apoptoza je fenotip stanične smrti s jedinstvenim morfološkim karakteristikama. Ona je genetski program staničnog samoubojstva koji uključuje kaskade obitelji gena, signalnih puteva i specijalizirane unutarstanične mikrookoliše. Apoptoza je nužna za oblikovanje organizma u razvoju tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja, uklanjanje nepotrebnih ili zastarjelih struktura i omogućuje plastičnost specijaliziranim tkivima kao što je središnji živčani sustav. U odraslom organizmu apoptoza održava homeostazu diferenciranih tkiva reguliranjem ravnoteže između stanične proliferacije i stanične smrti. Apoptozu posreduju kaspaze, obitelj unutarstaničnih cisteinskih proteaza koje cijepaju stanične supstrate koji su uključeni u popravak DNA, organizaciju citoskeleta, integritet jezgre i preživljenje stanice (Altieri, 2003.).

Stanice sisavaca koriste dva glavna puta apoptotoze:

a) Ekstrinzični put je ključan za imunološki sustav i upalu, započinje ligacijom trimernih receptora smrti na površini stanice, uključujući receptor TNF-α (eng. tumor necrosis factor α, faktor nekroze tumora-α) i FAS (eng. Fas cell surface death receptor, Fas površinski receptor smrti).

b) Intrinzični put pokreću izvanstanični i okolišni signali te djeluje preko poremećaja funkcije mitohondrija. Taj put dovodi do povećanja permeabilnosti mitohondrijske membrane i otpuštanja proteina koji omogućavaju aktivaciju kaspaza (citokrom c i DIABLO (eng. diablo, IAP-binding mitochondrial protein, diablo, IAP-vezujući mitohondrijski protein)) u citoplazmu. Oba puta provode apoptotski signal formiranjem multimernih kompleksa koji promiču proteolitičku aktivaciju inicijatorskih kaspaza (Altieri, 2003.).

Identificirane su dvije obitelji regulatora apoptoze:

Obitelj BCL2 (eng. B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2, B-stanica kronična limfocitna leukemija/limfoma 2) čine molekule s pro- ili anti-apoptotskom funkcijom koje imaju 1 - 4 kopije domene BH (eng. Bcl-2 homology domains, domene homologije Bcl-2) i karboksi-terminalnu hidrofobnu regiju. Proteini BLC2 smanjuju (antiapoptotski: BCL2 i BCL-xL (eng. B-cell lymphoma-extra large, B- stanica limfom-ekstra veliki)) ili pojačavaju (proapoptotski: BAX (eng. BCL2-associated X protein, BCL2 pridružen X protein), BAD (eng. BCL2-associated agonist of cell death, BCL2 pridružen agonist stanične smrti), BAK (eng. BCL2-antagonist/killer, BCL2 antagonist/ubojica) i BID (eng. BH3 interacting domain death agonist, BH3 interagirajuća domena agonist smrti)) permeabilnost mitohondrija i određuju otpuštanje citokroma c. Ključna odlika molekula BCL2 je njihova sposobnost da stvaraju homo- ili hetero-dimere na mitohondrijskoj membrani. Smatra se da razlika između vezanja pro- ili anti-apoptotskih članova obitelji određuje ravnotežu između stanične smrti i preživljenja stanice. Među proapoptotskim članovima obitelji BCL2 samo su BAX i BAK potrebni za inicijaciju gotovo svih slučajeva apoptoze povezane s mitohondrijima (Altieri, 2003.).

Druga obitelj koja regulira staničnu smrt su proteini IAP (eng. inhibitors of apoptosis proteins, proteini inhibitori apoptoze). Proteini IAP sadrže 1-3 kopije domene cinkovog prsta s nazivom BIR (eng. Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat, proteinsko ponavljanje bakuloviralnog inhibitora apoptoze), domenu za vezanje kaspaze CARD (eng. caspase activation and recruitment domains, domene aktivacije i regrutiranja kaspaza) i karboksi-terminalnu domenu „RING“ (eng. really interesting new gene, stvarno zanimljiv novi gen). Kod ljudi je identificirano osam članova obitelji IAP, a najproučavaniji su XIAP (eng. X-linked inhibitor of apoptosis, X-vezan inhibitor apoptoze), BIRC2 (eng. baculoviral IAP repeat containing 2, Bakulovirusno IAP ponavljanje 2), BIRC3 (eng. baculoviral IAP repeat containing 3, Bakulovirusno IAP ponavljanje 3) i survivin. Proteini IAP sprečavaju apoptozu kao endogeni inhibitori kaspaza te ciljaju korak nizvodno od BCL2. Inhibiraju inicijatorsku kaspazu 9 i efektorske kaspaze 3 i 7 (Jang i sur. 2008.). Proteini koji se otpuštaju iz mitohondrija tijekom promjene permeabilnosti (uključujući DIABLO i HTRA2 (eng. HtrA serine peptidase 2, HtrA serinska peptidaza 2) vežu se na proteine IAP i uklanjaju njihovu inhibiciju kaspaza (Altieri, 2003.)

1.3. SURVIVIN

1.3.1. Građa survivina

Survivin je najmanji član obitelji IAP kod sisavaca, velik je samo 16,5 kDa. Sastoji se od jedne domene BIR i produljene karboksi-terminalne α-uzvojnice (Altieri i sur. 2003). Gen za survivin *BIRC5* (eng. baculoviral IAP repeat containing 5, gen bakulovirusno IAP ponavljanje 5) smješten je na ljudskom kromosomu 17q25. Njegov promotor ima ponavljajući CpG slijed, 3 elementa CDE (eng. cell-cycle dependant element, element ovisan o staničnom ciklusu), regiju CHR (eng. cell cycle homology region, regija homologije staničnog ciklusa) i brojna Sp1 mjesta na 5' kraju. Ne posjeduje domenu „RING finger“ ili druge domene koje je moguće identificirati (Han i sur. 2009.). Kod čovjeka survivin ima tri introna i četiri eksona. U otopini je organiziran kao homodimer (Altieri i sur. 2003.). Budući da njegove izoforme pokazuju različita svojstva vezana uz apoptozu, smatra se da bi formiranje heterodimera survivina i njegovih izoformi moglo biti bitno za regulaciju funkcije survivina (Antonacopoulou i sur. 2010.).

1.3.2. Ekspresija survivina

Survivin tijekom mitoze pokazuje ekspresiju ovisnu o staničnom ciklusu koja je većinom kontrolirana na razini transkripcije i uključuje kanonske CDE/CHR kutije koje se nalaze u promotoru survivina. Na njegovo nakupljanje tijekom mitoze utječu i posttranslacijske modifikacije koje utječu na njegovu stabilnost. Kada je eksprimiran tijekom mitoze smješta se u razne odjeljke mitotskog aparata kao što su centrosomi, mikrotubuli i anafazno vreteno, te ostatke mitotskog aparata (Altieri, 2003.). Delecija CDE i CHR elemenata u promotorskoj regiji gena *BIRC5* dovodi do gubitka ekspresije ovisne o staničnom ciklusu koja je potrebna za bazalnu razinu transkripcije survivina. Homologna delecija survivina rezultira ranom smrti embrija što pokazuje njegovu ključnu ulogu u staničnom razvoju, diferencijaciji i homeostazi. Selektivno je eksprimiran u stanicama raka, ali ne u normalnim tkivima. Kod mnogih tumora pokazano je da niz čimbenika, uključujući i genetičku varijabilnost, može utjecati na poremećenu ekspresiju survivina ometajući aktivnost tih domena i time dovesti do karcinogeneze. Pretjerana ekspresija survivina je povezana s razvojem bolesti, povratkom bolesti i prognozom u različitim karcinomima, uključujući karcinom mjehura, grlića maternice, glave i vrata, prostate, kože i jajnika (Han i sur. 2009). Zbog pretjerane ekspresije kod karcinoma dolazi do globalnog poremećaja gena za survivin posredovane od strane onkogena (uključujući STAT3 (eng. signal transducer and activator of

transcription 3), E2F i mutirani Ras) ili gubitka tumor supresora kao što su proteini p53 i APC (eng. adenomatosis polyposis coli) (Altieri, 2007.). Pretjerana ekspresija gena za survivin je povezana s podložnosti obolijevanju od tumora pluća (Jang i sur. 2008.), želuca (Cheng i sur. 2008.), mjehura (Kawata i sur. 2010.) i jetre (Hsieh i sur. 2012.), te preživljenjem kod kolorektalnog karcinoma (Antonacopoulou i sur. 2010.) i karcinoma dojke (Shi i sur. 2011.) kao i dobi obolijevanja od raka jajnika (Han i sur. 2009.).

1.3.3. Funkcija survivina

Dvije karakteristike čine survivin jedinstvenim: povezanost s različitim signalnim putovima i diferencijalna ekspresija u karcinomima u usporedbi s normalnim tkivima. Zbog te karakteristike survivin se može koristiti kao prognostički i prediktivni marker i povezan je s napredovanjem bolesti, kraćim preživljenjem, otpornosti na terapiju i ubrzanim vraćanjem bolesti. Survivin je neophodan za ispravno odvijanje različitih stadija dijeljenja stanice, od funkcije centrosoma do ispravnog vezanja kinetohora na diobeno vreteno. Survivin je inhibitor apoptoze putem ometanja procesiranja kaspaze-9 uzvodnom inicijacijom intrinzičnih putova apoptoze. Tijekom staničnog odgovora na stres survivin se veže na molekularnog pratitelja Hsp90 (eng. heat shock protein 90, protein toplotnog šoka 90) i omogućuje preživljenje stanice u nepovoljnom okolišu očuvanjem sposobnosti proliferacije (Altieri i sur. 2007.). *In vitro* je pokazana direktna veza između survivina i polimeriziranog tubulina koja se vjerojatno ostvaruje preko karboksi-kraja survivina.

1.3.4. Regulacija aktivnosti survivina

1.3.4.1. Regulacija na razini transkripcije

Regulacija gena za survivin (*BIRC5*) odvija se na razini transkripcije. Sp1 (eng. specificity protein 1, protein specifičnosti 1) je ljudski transkripcijski faktor uključen u ekspresiju gena različitih procesa uključenih u razvoj stanice. Veže se direktno na DNA na promotorsku regiju gena i pojačava njihovu transkripciju. Promotor survivina nema kutije TATA ili CCAAT, a Sp1 je ključan u regulaciji gena koji nemaju funkcionalnu kutiju TATA te se zbog toga smatra da gen *BIRC5* sadrži nekoliko veznih mjesta za transkripcijske faktore Sp1/Sp3. Xu i sur. 2004. su otkrili dva ključna vezna mjesta za vezanje Sp1 na promotorskoj regiji gena *BIRC5* (-148 do -153 i -127 do -140) u stanicama cervikalnog adenokarcinoma HeLa što navodi na zaključak da je Sp1 ključan u kontroli bazalne ekspresije survivina (Altieri i sur. 2003.). Pretjerana ekspresija Sp1 u staničnoj liniji ljudskog adenokarcinoma

pluća povećava ekspresiju survivina na razini mRNA (eng. messenger ribonucleic acid, glasnička ribonukleinska kiselina) i razini proteina (Chen i sur. 2000.). Utišavanje Sp1 pomoću mitramicina ili RNAi (eng. RNA interference, RNA intereferenca) smanjuje također i ekspresiju survivina. Pokazano je da promotorska regija gena *BIRC5* nosi vezna mjesta za veliki broj regulatornih proteina. Sp1, p53 i put RB/E2F (eng. retinoblastoma/E2F transcription factor 1, retinoblastom/E2F transkripcijski faktor 1) uključeni su u regulaciju survivina (Chun i sur. 2013). Prisutnost mutacija u p53 povećava ekspresiju survivina i njegovih varijanti survivin-DEx3 and survivin-3B (Vegran i sur. 2007).

U tumorskim stanicama su nađeni i netranskripcijski mehanizmi kontroliranja razine survivina. IGF-1 (eng. insulin-like growth factor-1, inzulinu sličan faktor rasta 1) pojačava ekspresiju survivina poticanjem translacije survivina u staničnoj liniji raka prostate DU145 (Vaira i sur. 2007).

1.3.4.2. Regulacija ovisna o staničnom ciklusu

Osim regulacije survivina na razini transkripcije i translacije, ekspresija se može regulirati i kroz mijenjanje stabilnosti proteina. Ekspresija survivina je regulirana staničnim ciklusom i najveća je tijekom G2/M faze. Pretpostavlja se da je da je ciklus degradacije i ekspresije survivina povezan s ubikvitinsko proteosomskim putem.

1.3.4.3. Stabilnost survivina posredovana s Hsp90

Stanice eksprimiraju nekoliko molekularnih pratitelja da bi osigurali ispravno smatanje proteina nakon sinteze proteina te nakon stresa koji uzrokuje njihovu denaturaciju. Hsp70 i Hsp90 su najvažniji molekularni pratitelji u stanicama sisavaca. Za razliku od Hsp70, Hsp90 ne smata novonastale proteine nego se veže na proteine koji su u gotovo nativnom stanju tj. u kasnom stadiju smatanja. Survivin se veže s Hsp90 *in vitro* pomoću interakcije koja uključuje ATP-aznu domenu Hsp90. Ekspresija survivina i Hsp90 u stanicama HeLa se povećava s vremenom nakon toplotnog šoka stanica (Altieri, 2007.).

1.3.4.4. Posttanslacijske modifikacije survivina

Istraživanja su pokazala da posttranslacijske modifikacije, uključujući fosforilaciju i acetilaciju, imaju važnu ulogu u reguliranju stanične funkcije survivina.

a) Fosforilacija

Survivin može biti fosforiliran na više mjesta (treonin 34, 53, i 117; serin 20) i te modifikacije mogu dovesti do drugačijih funkcija proteina. Survivin fosforiliran na Thr34 se veže na kaspazu-9 u HeLa stanicama, a survivin kojem je onemogućena fosforilacija na tom mjestu nije u stanju vezati kaspazu-9. Smatra se da to dovodi do reguliranja intrinzične apoptoze. Fosforilacija survivina na Ser20 smanjuje antiapoptotsku aktivnost.

b) Acetilacija

Survivin je prisutan u mitohondriju i citosolu te se može premještati iz jezgre u citoplazmu pomoću Crm1 (eng. Chromosome region maintanance 1, jezgrin receptor za izvoz). Survivin sadrži signal za jezgrin izvoz između BIR domene i COOH-terminalne α-helikalne zavojnice. Ukidanje premještanja survivina u citoplazmu promovira apoptozu ovisnu o kaspazama u stanicama raka. Citoplazmatski survivin inhibira apoptozu, a jezgreni survivin inhibira preživljenje stanice (Chun i sur. 2013.).

1.3.5. Prekrajanje

Gen *BIRC5* ima četiri dominantna eksona (1, 2, 3 i 4) i dva skrivena eksona (2B i 3B) (Li i sur. 2005.). Alternativno prekrajanje njegove pre-mRNA proizvodi pet različitih mRNA koje kodiraju pet različitih proteina s različitom unutarstaničnom distribucijom i anti-apoptotskim svojstvima: survivin, survivin-2α, survivin-2B, survivin- ΔEx3 i survivin-3B (Slika 1).

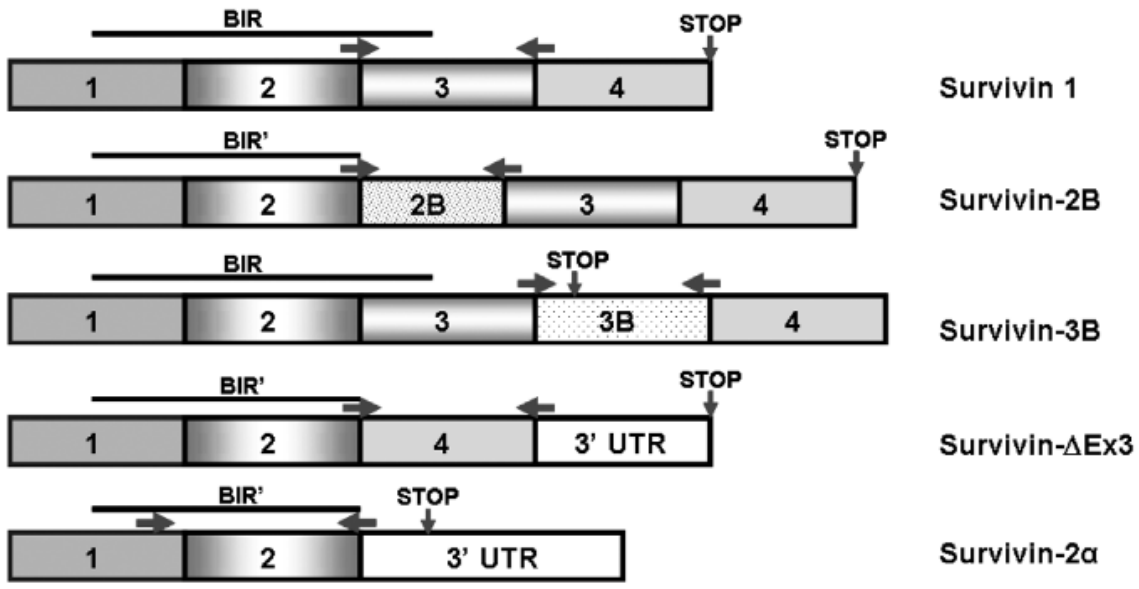
Survivin (142 ak) je deriviran iz eksona 1-4.

Survivin-2α (74 ak) se sastoji od 2 eksona: eksona 1 i eksona 2 te 3' regije introna 2 od 197 pb. Dodatak novog stop kodona unutar okvira čitanja introna 2 dovodi do otvorenog okvira čitanja od 225 nukleotida i skraćenog proteina od 74 aminokiseline. Skraćeni protein ima masu od 8,5 kDa i sadrži skraćenu BIR domenu. Potpuno nedostaje domena karboksi-terminalno smotane zavojnice. Survivin-2α je eksprimiran u visokim razinama u nekoliko malignih staničnih linija i primarnih tumora. Survivin-2α smanjuje antiapoptotsko djelovanje survivina (Caldas i sur. 2005.).

Survivin-2B (167 ak) ima dodatne 23 aminokiseline derivirane iz 69 pb kriptičnog eksona 2B unutar introna 2, koji je izrezan u mRNA u okviru između eksona 2 i 3 (Li, 2005.). Survivin-2B pokazuje proapoptotsko djelovanje (Zheng i sur. 2011.).

Survivin- ΔEx3 (137 ak) je deriviran od eksona 1, 2 i 4 i nastaje preskakanjem eksona 3 zbog pomaka okvira čitanja (Li i sur. 2005.) što rezultira gubitkom 102 pb (Vegran i sur. 2011.). Survivin- ΔEx3 zadržava sličan anti-apoptotski potencijal kao survivin (Atlasi i sur. 2009.).

Survivin-3B (120 ak) se sastoji od 5 eksona što uključuje novi ekson 3B deriviran iz 165 pb dugog dijela introna 3. Survivin-3B sadrži novi stop kodon TGA unutar okvira čitanja što dovodi do otvorenog okvira čitanja (ORF) od 363 pb prije skraćenog proteina od 120 ak. Protein sadrži jednu BIR domenu, ali mu nedostaje karboksi-terminalna zavojnica (Badran i sur. 2004.). Kodiran je eksonima 1, 2 i 3 uz dodatnih novih 7 ak na C-terminalnom kraju kodiranim iz introna 3 (Li, 2005.). Survivin-3B pokazuje citoprotektivnu funkciju (Antonacopoulou i sur. 2010.).



Slika 1. Alternativno prekrojene varijante survivina (Antonacopoulou i sur. 2010.)

Alternativno prekrojene varijante survivina čak i kada su prisutne u visokim razinama ne doprinose značajno preživljenju stanica, promoviranju mitoze ili inhibiciji apoptoze (Jacob i sur. 2012.).

1.3.6. Polimorfizmi survivina

Otkriveno je nekoliko polimorfizama (SNP, eng. single nucleotid polimorphysm) gena *BIRC5* koji su povezani s ekspresijom survivina i rakom. Najviše proučavani polimorfizam nalazi se u promotoru gena *BIRC5*. Nalazi se na poziciji -31 unutar CDE i CHR regija (Aynaci i sur. 2013.). Mijenjanje tog mjesta vezanja dovodi do promijenjene transkripcije ovisne o staničnom ciklusu koja karakterizira ekspresiju survivina. Prisutstvo polimorfizma c.-31G>C može dovesti do viših razina ekspresije survivina i korelirano je s povećanim rizikom razvoja raka pluća (Antonacopoulou i sur. 2010.).

Polimorfizmi c.-241C>T (rs17878467) i c.-235G>A (rs17887126) također se nalaze unutar promotorske regije i mogu utjecati na ekspresiju survivina. Unutar eksona 4 se nalazi c.9194G>A (rs2071214), a unutar 3'-UTR regije c. 9809C>T (rs1042489) i za njih se smatra da utječu na stabilnost survivinove mRNA (Weng i sur. 2012.).

Genotipirano je svih 5 uobičajenih polimorfizama survivina u promotoru s pretpostavkom da utječu na klinički ishod raka jajnika. Polimorfizmi su: c.-1547A>G [rs3764383], c.-644C>T [rs8073903], c.-625C>G [rs8073069], c.-241C>T [rs17878467] i c.-31G>C [rs9904341]). Njihovi rezultati su pokazali da su c.-1547A>G i c.-31G>C značajno povezani s dobi pojavljivanja raka (Han i sur. 2009).

1.3.7. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

- određivanje polimorfizama koji se pojavljuju u regulatornim regijama gena *BIRC5* na uzorku hrvatske populacije
- određivanje udjela do sada poznatih i nepoznatih polimorfizama u regulatornim regijama gena *BIRC5* u uzorcima različitih tipova tumora jajnika
- genotipizacija i utvrđivanje učestalosti polimorfizama gena *BIRC5* kod pacijenata s tumorima jajnika te u zdravim kontrolama s ciljem njegove primjene kao potencijalnog novog prediktivnog biomarkera tumora jajnika.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Izolacija genomska DNA iz uzorka pune krvi metodom isoljavanja

Metoda isoljavanja je korištena za izdvajanje DNA uzoraka iz pune krvi. Osmotskom lizom smo uklonili eritrocite, a nakon toga razgradili leukocite te se iz njih oslobodila DNA. Proteine smo uklonili isoljavanjem pomoću natrijevog klorida.

I Faza

Odmrznutu krv smo prelili u sterilnu epruvetu od 50 mL i dodali RCBL pufer (eng. Red Blood Cell Lysis Buffer, pufer za lizu eritrocita) do 40 mL volumena. Promiješali smo izvrtanjem epruvete i držali na ledu 15 min. Centrifugirali (Universal 320r, Hettich, Njemačka) smo 10 min pri 5000 rpm i 4 °C. Nakon toga smo uklonili supernatant i na talog dodali 5 mL pufera za lizu. Uzorci su se miješali na vibracijskoj miješalici dok se talog nije razbio. Nakon toga smo dodali pufer za lizu do 25 mL volumena i centrifugirali 10 min pri 5000 rpm i 4 °C. Ponavljali smo postupak ispiranja dok talog leukocita nije postao blijedožute boje. Nakon toga smo uklonili supernatant i na talog dodali 2,5 mL SE pufera (natrij klorid i natrij EDTA). Miješali smo na vibracijskoj miješalici dok se talog nije razbio te dodali 200 µL 10% SDS pufera i 15 µL proteinaze K. Epruvete smo ostavili u vodenoj kupelji preko noći pri 37 °C.

II Faza

Epruvete smo izvadili iz kupelji te prelili sadržaj u plastične epruvete od 13 mL te dodali 750 µL 5 M NaCl i miješali na vibracijskoj mješalici do mliječno bijele boje. Centrifugirali smo 15 min pri 5000 rpm i sobnoj temperaturi. Supernatant smo prelili u novu sterilnu epruvetu od 15 mL, dodali 3,5 mL izopropanola te miješali ručno okretanjem mikroepruvete dok DNA nije postala vidljiva. DNA smo zahvatili sterilnom staklenom Pasteurovom pipetom te isprali u apsolutnom etanolu. Pasteureovom pipetom smo prenijeli DNA u mikroepruvetu od 1,5 mL s 1 mL pufera TE (tris acetat i EDTA) te ju ostavili da se otapa preko noći pri 4 °C na rotacijskom stalku.

2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije DNA

Za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina koriste se različite metode. Najčešće se koristi spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije UV svjetla (eng. ultraviolet light, ultraljubičasta svjetlost) pri 260 nm u purinskim i pirimidinskim bazama DNA. Uređaj koji smo koristili za mjerenje je BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Koncentraciju smo mjerili na način da smo na mjerno mjesto na uređaju pipetom nanjeli 1 µl uzorka. Računalo spojeno s uređajem automatski izračunava koncentraciju DNA iz apsorbancije UV svjetla pri 260 nm, također mjeri apsorbanciju pri 280 nm koja omogućuje određivanje kvalitete uzorka.

2.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (eng. polymerase chain reaction, PCR) je *in vitro* metoda kojom se eksponencijalno umnažaju željeni odsječci dvolančane DNA pomoću termostabilnog enzima DNA polimeraze i dvije oligonukleotidne početnice. U reakcijsku smjesu se dodaje pufer, ioni magnezija, te smjesa deoksiribonukleozida (dATP (eng. deoxyadenosine triphosphate, deoksiadenozin trifosfat), dGTP (eng. deoxyguanosine triphosphate, deoksigvanozin trifosfat), dTTP (eng. deoxythymidine triphosphate, deoksitimidin trifosfat) i dCTP (eng deoxycytidine triphosphate, deoksicitozin trifosfat)). Oligonukleotidne početnice se konstruiraju tako da su komplementarne rubnim 5'- i 3'-slijedovima DNA odsječka kojeg želimo umnožiti i duge su 18-28 parova baza.

2.3.1. Dizajn početnica

Prema dosadašnjim rezultatima istraživanja polimorfizama gena *BIRC5*, nekoliko polimorfizama u regulatornim regijama su se pokazali zanimljivima za istraživanje njihove uloge u nastanku tumora. Pet se nalazi u promotoru, jedan u 5' UTR regiji, jedan u eksonu 4, i tri u 3' UTR regiji. Prema lokalizaciji tih polimorfizama, dizajnirano je sedam parova početnica za 7 PCR produkata. Početnice za odabrane fragmente dizajnirane su prema sekvenci gena *BIRC5* (GeneID: 332) iz baze GenBank pod brojem NG_029069.1 uz pomoć programa Primer3 Input 0.4.0 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/, (Untergrasser i sur. 2007.) (Tablica 1).

Tablica 1. Naziv fragmenta, duljina odsječka, temperatura sparivanja i sekvence početnica fragmenata koje smo istraživali.

Fragment	Duljina odsječka	Temperatura sparivanja	Sekvenca
BIRC5 c.-1547	228 pb	66°C	F 5'-GGAGGAGAGAAAGGGAGGAA3' R 3'- GGCTGGTCTCAAACTCCTGA'
BIRC5 c.-625	175 pb	60°C	F 5'-CCCCTGACTCCAGAAGGTG-3' R 5'- TCAGACAGGAGAGCTTTACAGG-3'
BIRC5 c.-241	159 pb	62°C	F 5'- GATTACAGGCGTGAGCCACT-3' R 5'- GTGTGCCGGGAGTTGTAGTC-3'
BIRC5 c.-31	251 pb	--	F 5'- GACTACAACTCCCGGCACAC -3' R 5'-CCTCCAAGAAGGGCCAGT-3'
Ekson 4	310 pb	62°C	F 5'- CTGGGAAGCTCTGGTTTCAG-3' R 5'- CTGGTGCCACTTTCAAGACA-3'
BIRC5 c.9809	161 pb	60°C	F 5'- TGCATGACTTGTGTGTGATGA-3' R 5'- CCGTTTCCCCAATGACTTAG-3'
BIRC5 c.10611	159 pb	60°C	F 5'- TGTATCATCCGGGCTCCTT-3' R 5'- ACAGAGGCTGGAGTGCATTT-3'

2.3.2. Postupak PCR

Umnoženi su fragmenti gena *BIRC5* c.1547, c.-625, c.-241, ekson 4, c.9809 i c.10611, dok se za fragment *BIRC5* c.-31 nije moglo dobiti specifični produkt.

U reakcijsku smjesu se dodaje prvo voda, potom ostali reagensi i enzim. Prije stavljanja u PCR aparat (Applied Biosystems 7270 Thermal Cycler) se sve vorteksira i centrifugira na short spin.

Pripremljena reakcijska smjesa od 10 µl sadrži 1 µl 10× boje LCGreen Plus+ (Idaho Technology), 1 µl komercijalno dostupnog 10× PCR pufera s 20 mM MgCl2 koji sadrži goveđi albumin iz seruma (Idaho Technology), 0,2 µl smjese nukleotida (dATP, dTTP, dCTP,

dGTP, 50 mM svaki, Roche), 0,5 µl svake početnice (500 nM svaki), 1 µl DNA, 0,8 µl FastStart Taq DNA polimeraze (Roche), te H_2O do ukupnog volumena od 10 µl. Kod dva fragmenta s visokim udjelom GC baza (polimorfizmi c.-625 i c.-241), za uspješnije umnažanje bilo je potrebno dodati 2 µl (-625), odnosno 3 (-241) µl GC pufera koji dolazi u kitu s FastStart Taq DNA polimerazom, te odgovarajuće manje H_2O. Nakon početne denaturacije od 4 minute na 95 °C, slijedi 45 ciklusa, svaki od 30 sekundi na 95 °C, 45 sekundi na temperaturi sparivanja (60-62 °C, ovisno o fragmentu), i 30 sekundi na 95 °C. Nakon završne elongacije od 7 minuta na 72 °C, slijedi stvaranje heterodupleksa od 1 minute na 98 °C i 5 minuta na 40 °C. Nakon toga se održava temperatura od 4 °C dok se ne ugasi PCR aparat.

2.4. Elektroforeza

Elektroforetske metode služe za razdvajanje sličnih tipova molekula (proteina, nukleinskih kiselina) na osnovi njihove različite pokretljivosti u gelu koji se nalazi u polju istosmjerne električne struje. Budući da je molekula DNA negativno nabijena u polju istosmjerne električne struje se kreće prema pozitivnom polu (anodi). Brzina kretanja ovisi o veličini (manje molekule putuju brže pa u zadanom vremenu prevale dulji put) i obliku molekule (linearna DNA putuje najsporijem kružna bržem a DNA smotana u superzavojnicu najbrže migrira kroz gel), naboju molekule DNA, naponu i koncentraciji gela.

2.4.1. Elektroforeza u gelu agaroze

Agaroza je smjesa kompleksnih polisaharida izoliranih iz određenih vrsta morskih crvenih algi. Elektroforeza u agaroznom gelu se koristi za razdvajanje odsječaka velikog opsega duljina.

Produkte PCR reakcije smo analizirali u 1% gelu agaroze pripremljenom pomoću TAE pufera (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) (Sigma, SAD) i EtBr 1ug/mL (Sigma, SAD).

Za elektroforezu je korišten 1xTAE pufer (50xTAE: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH=8,0) koji se koristio i za izradu gela. Za vizualizaciju produkata PCR reakcije u gelove se dodaje etidij bromid (1 µg/ml) (3,8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridijbromid). Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 V, 30 min. Za detekciju i fotografiranje gelova pri 254 nm korišten je Image Alliance 4.7 (UVItec Limited, Ujedinjeno kraljevstvo).

Etidij bromid je mutageni spoj koji interkalira između lanaca dvolančane DNA te fluorescira pri izlaganju UV svjetlu (254 ili 300 nm). Elektorforeza u agaroznom gelu koristi se u svrhu provjere uspješnosti i specifičnosti reakcije PCR-a.

2.4.2. Postupak elektroforeza

1%-tni (w/V) gel smo pripremili otapanjem 0,5 g agaroze (Sigma) u 50 ml pufera 1× TAE. Nakon zagrijavanja gela i potpunog otapanja agaroze, dodali smo 5 µl etidij bromida (1 µg/ml). Blago ohlađenu agarozu smo izlili u plastičnu kadicu i ostavili polimerizirati. Polimerizirani gel smo postavili u uređaj za elektroforezu i nanijeli uzorke u jažice. Nanijeli smo 2,5 µl PCR-produkta pomiješanog s 1 µl pufera za nanošenje uzoraka (0,05% bromfenol plavo, 0,05% ksilen cijanol, 50% glicerol). U prvu jažicu smo nanijeli standard (Fermentas) (3,5 µl (110 ng/µl) 1 kb + DNA) koji služi za usporedbu i procjenu veličine PCR – produkta. Elektroforeza se odvijala u puferu 1× TAE, 30 min pri naponu od 100 V.

2.5. Analiza heterodupleksa

Za analizu polimorfizama gena *BIRC5* smo koristili metodu fluorescentne detekcije heterodupleksa (Levačić i sur. 2008). Heterodupleks analiza je indirektna metoda otkrivanja mutacija i polimorfizama koja se temelji na analizi produkata reakcije PCR. Heterodupleks je dvostruka uzvojnica nukleinske kiseline u kojoj lanci potiču iz različitih molekula DNA. Kada se dvije različite molekule DNA zajedno denaturiraju na visokoj temperaturi i zatim ohlade, dio molekula se međusobno „krivo“ spari i pritom nastaje heterodupleks.

Krivulja mekšanja ili disocijacije je grafički prikaz ovisnosti fluorescencije produkta o temperaturi. Pri temperaturi koja odgovara temperaturi mekšanja (Tm) PCR produkta dolazi do naglog pada fluorescencije. Pri toj temperaturi dolazi do razdvajanja komplementarnih lanaca i oslobađanja interkalirajuće boje koja prestaje fluorescirati. Osim krivulje mekšanja, postoje još dva grafička prikaza detekcije heterodupleksa, a to su derivacijska krivulja (ovisnost negativne prve derivacije intenziteta fluorescencije o temperaturi (-dI/dT)) i krivulja razlike (razlika između intenziteta fluorescencije uzorka i referentnog „normalnog“ uzorka za svaku točku mjerenja).

2.5.1. Postupak analize heterodupleksa

Nakon što je reakcija PCR-a gotova uzorci se analiziraju na aparatu za praćenje denaturacije HR-1 (High resolution melter) koji ih zagrijava i prati pad fluorescencije. Uzorci čije se krivulje disocijacije razlikuju od normalne sekvenciraju se.

2.6. Sekvenciranje

Sekvenciranje je postupak kojim se određuje slijed baza u fragmentu DNA sekvence od interesa. Prije reakcije sekvenciranja potrebno je pročistiti PCR produkte od genomske DNA i početnica. To se radi s kitom ExoSAP-IT (usb) tako da se 10 µl PCR produkta pipetom prenese u čistu mikroepruvetu, te se u svaku doda 0,4 µl ExoSAP-IT enzima. Uzorci se zatim inkubiraju 30 minuta na 37 °C, a potom zagrijavaju 15 minuta na 85 °C. Reakcija sekvenciranja se radi u volumenu od 10 µl, od čega je 1 µl kita za sekvenciranje (BigDye Terminator v1.1 Applied Biosystems), 1 µl početnica, 3 µl PCR produkta te 5 µl QH2O. Uvjeti reakcije sekvenciranja su sljedeći: 1 minuta na 96 °C, zatim 25 ciklusa od 10 sekundi na 96 °C, 5 sekundi na 50 °C i 4 minute na 60 °C. Po završetku reakcije, uzorci se precipitiraju s 25 µl apsolutnog etanola, s dodatkom 1 µl 0,125 M EDTA i 1 µl 3 M Na-acetata, 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci se centrifugiraju 50 min na 3000 rpm (Universal 320, Hettich Zentrifugen) i supernatant se odlije. Zatim se talog ispere s 125 µl 70% etanola, ponovno centrifugira 50 min na 3000 rpm i osuši. Uzorci se tada otope u 20 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems), denaturiraju 2 - 5 minuta na 95 °C i ohlade u ledenom stalku. Zatim se uzorci nanesu na sekvencer i nakon toga analiziraju programom Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems), te se uspoređuju s referentnom sekvencom programom BioEdit.

2.7. Statistička analiza

Statistički su obrađeni rezultati genotipizacije zdrave kontrolne skupine i skupine oboljelih od karcinoma jajnika. Frekvencija pojedinog alela izračunata je prema formuli: (dvostruki broj uzoraka s homozigotnim genotipom + broj uzoraka s heterozigotnim genotipom) / dvostruki broj uzoraka. Odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže (HWE) je testirano pomoću standardnog Hi-kvadrat testa. Razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata i zdravih kontrola testirana je Fisherovim egzaktnim testom (2x2 tablice) ili Hi-kvadrat testom (2x3 tablice). Za polimorfizme sa značajnom razlikom u distribuciji, omjer izgleda (engl. odds ratio, OR) i 95% interval pouzdanosti (engl. confidence interval, CI) izračunat je pomoću logističke regresije. Dvosmjerne P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Statistička analiza provedena je pomoću MedCalc programa, verzija 13.0.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) i Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, SAD).

3. REZULTATI

Kako je već spomenuto u metodama, dosadašnja istraživanja su ukazala da bi deset polimorfizama potencijalno moglo biti značajno za nastanak tumora (tablica 2.). Pet od njih se nalazi u promotoru, jedan u 5'UTR regiji (kojeg nije bilo moguće analizirati), jedan u kodirajućem dijelu eksona 4 i tri u 3´ UTR regiji (Tablica 2).

U ovom radu analizirano je šest fragmenata gena *BIRC5*: tri u promotorskoj regiji: (c.-1547, c.-644 i c.-625), jedan za ekson 4 (koji obuhvaća i početak 3' UTR regije) i dva u 3' UTR regiji (c.9809 i c.10611).

U istraživanim regulatornim regijama gena *BIRC5*, promotoru, eksonu 4 i 3' UTR-u (3' netranslatiranoj regiji) pronađeno je 15 polimorfizama. Frekvencije genotipova svih pronađenih polimofizama bile su u HWE.

Tablica 2. Polimorfizmi gena BIRC5 izabrani za istraživanje u ovom radu, te njihova pozicija unutar gena.

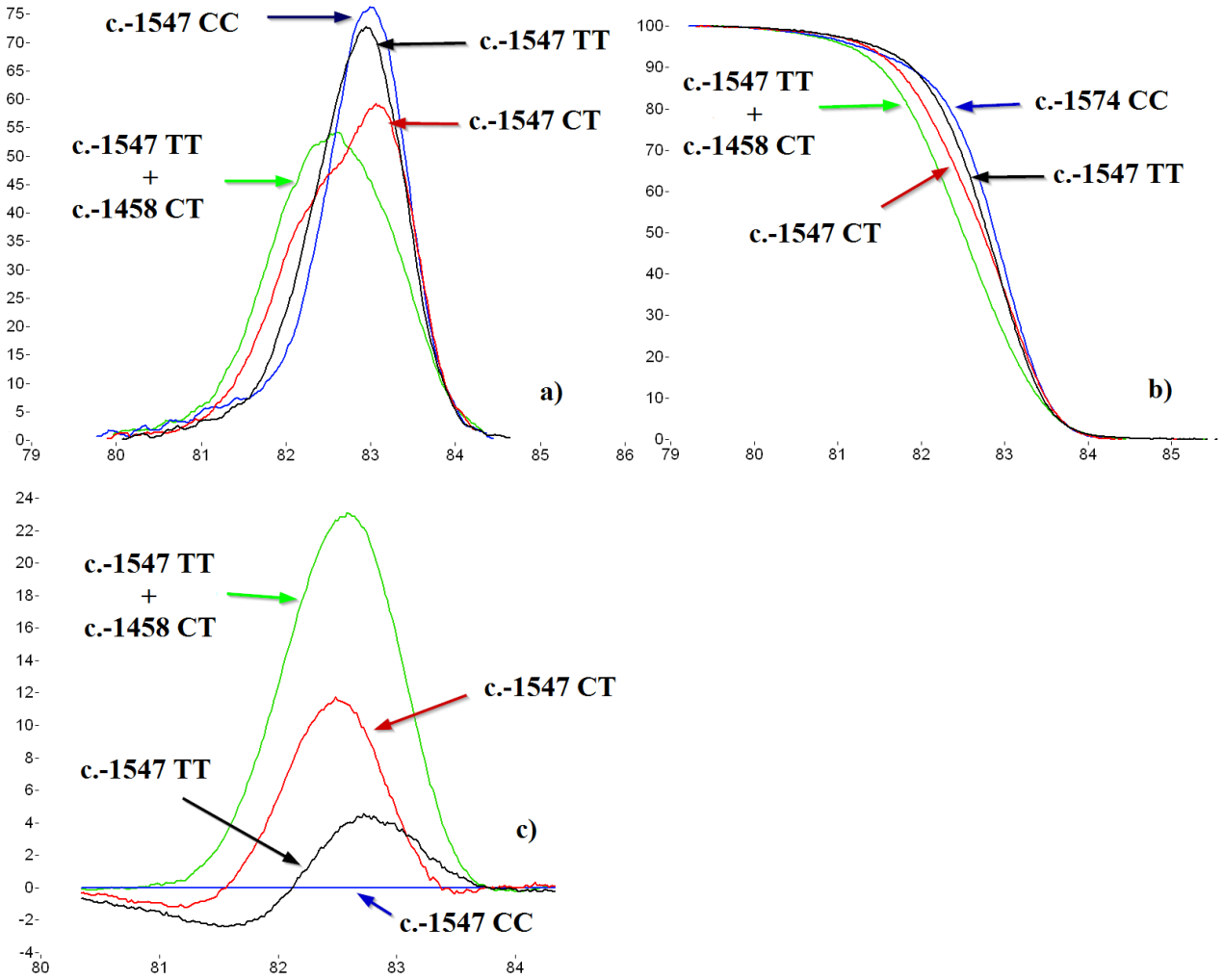
dbSNP ID	nukleotidna promjena	pozicija unutar gena
rs3764383	c.-1547C>T	promotor
rs8073903	c.-644T>C	promotor
rs8073069	c.-625G>C	promotor
rs17878467	c.-241C>T	promotor
rs17887126	c.-235G>A	promotor
rs9904341	c.-31G>C	5' UTR
rs2071214	c.9194G>A	ekson 4
rs2239680	c.9386T>C	3' UTR
rs1042489	c.9809T>C	3' UTR
rs2661694	c.10611C>A	3' UTR

3.1. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-1547

U fragmentu DNA veličine 228 pb umnoženom PCR reakcijom c.-1547 analizirana je regija od 188 pb koja se nalazi od -1574 do -1406 baze uzvodno od početka translacije. U regiji su pronađena dva polimorfizma, c.-1547C>T, koji je bio cilj istraživanja ove regije, te rijetki polimorfizam c.-1458C>T (Slika 2). Polimorfizmi c.-1547C>T i c.-1458C>T analizirani su pomoću krivulja mekšanja (Slika 3).

ggaggagagaaagggaggaagaagcagagagtgaatgttaaaggaaacaggcaaaacataaacagaaaatctgggtgaagggtat
atgagtattctttgtactattcttgcaattatcttttatttaaattgacatcgggccgggcgcagtggctcacatctgtaatcccagcactttgg
gaggccgaggcaggcagatcacttgaggtcaggagtttgagaccagcc

Slika 2. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.-1547 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto), polimorfizmi gena *BIRC5*: c.-1547C>T (rs3764383) i c.-1458C>T (rs143396310) (ljubičasto). Plavo su označeni ostali dosad poznati polimorfizmi u toj regiji koji nisu pronađeni u ovom istraživanju.



Slika 3. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-1547: a) Derivacijska krivulja, b) Disocijacijska krivulja, c) Krivulja razlike

3.1.1 Polimorfizam c.-1547C>T

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-1547C>T (rs3764383) (Slika 3.) homozigotna nukleotidna promjena C>T pronađena je u 52,70% kontrolnih uzoraka, 44,83% karcinoma, 58,33% dermoida i 47,62% fibroma. Heterozigotna promjena je pronađena u 44,60% kontrola, 55,17% karcinoma, 41,67% dermoida i 52,38% fibroma. Divlji tip gena je nađen samo u 2,70% kontrolnih uzoraka (Tablica 3.).

Tablica 3. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-1547C>T u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	CC	2	2,70	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	CT	33	44,60	16	55,17	10	41,67	11	52,38
	TT	39	52,70	13	44,83	14	58,33	10	47,62
aleli	C	37	25,00	16	27,59	10	20,83	11	26,19
	T	111	75,00	42	72,41	38	79,17	31	73,81

Tablica 4.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,465	0,674	0,649	0,768
aleli	0,725	0,698	0,843	0,877

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 4.).

3.1.2. Polimorfizam c.-1458C>T

Rijetki polimorfizam c.-1458C>T (Slika 3.) nađen je u heterozigotnom obliku u dva uzorka kontrola (2,70%), te jednom uzorku karcinoma jajnika (3,45%), dok kod uzoraka dermoida i fibroma jajnika nije nađen. U homozigotnom obliku promjena nije nađena niti u jednom uzorku (Tablica 5.).

Tablica 5. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-1458C>T u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	CC	72	97,30	28	96,55	24	100,00	21	100,00
	CT	2	2,70	1	3,45	0	0,00	0	0,00
	TT	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	C	146	98,65	57	98,28	48	100,00	42	100,00
	T	2	1,35	1	1,72	0	0,00	0	0,00

Tablica 6.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,653	1,000	0,987	0,706
aleli	1,000	1,000	1,000	0,710

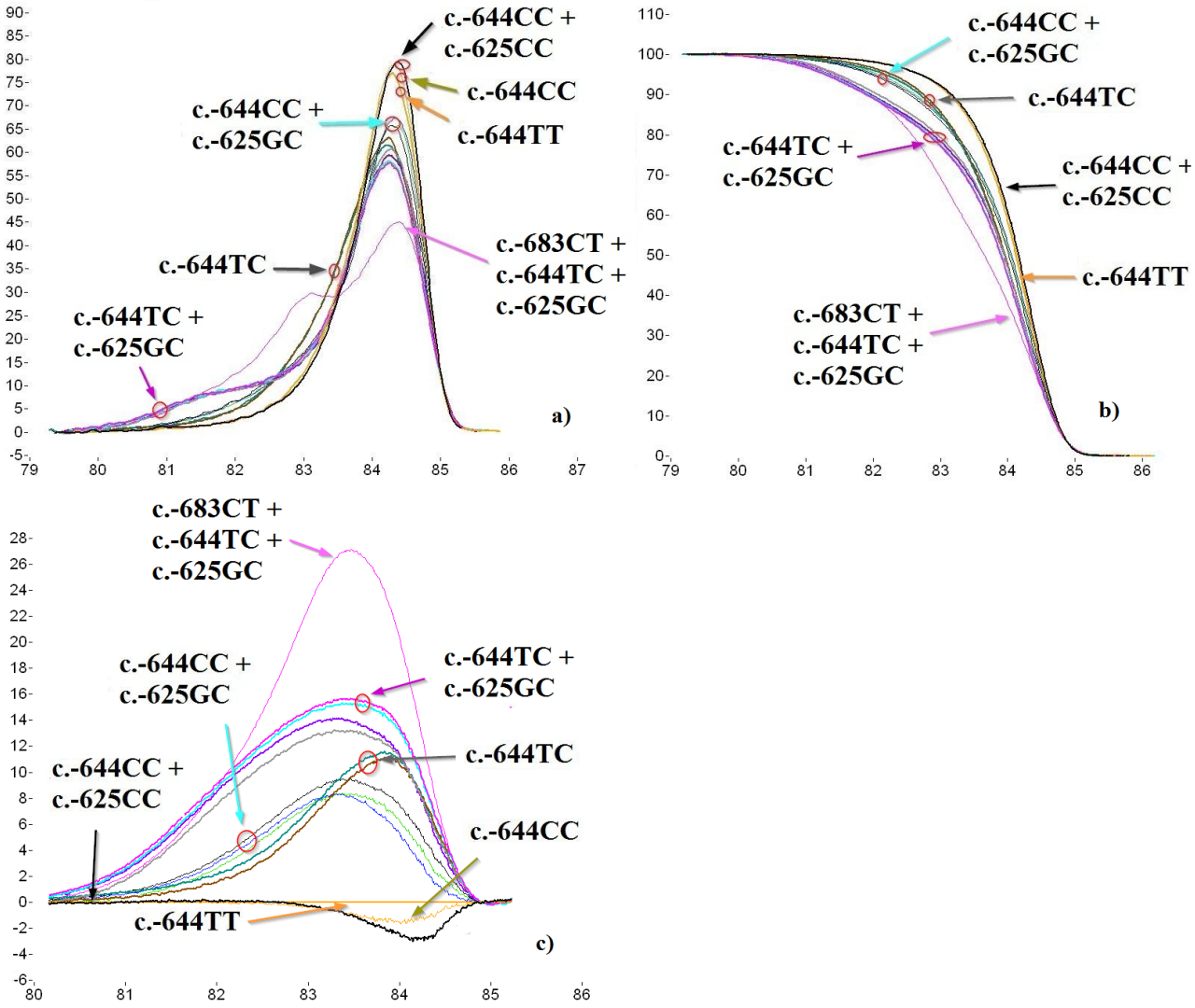
Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 6.).

3.2. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-625

U fragmentu DNA veličine 175 pb umnoženom PCR reakcijom c.-625 analizirana je regija od 134 pb koja se nalazi od -726 do -592 baze uzvodno od početka translacije. U regiji su pronađena tri polimorfizma, c.-644T>C i c.-625G>C, koji su bili ciljevi istraživanja ove regije, te novootkriveni polimorfizam c.-683C>T (Slika 4.). Polimorfizmi su analizirani pomoću krivulja mekšanja (Slika 5.).

cccctgactccagaaggtggccctcctggaaacccaggtcgtgcagtcaacgatgtactcgccgggacagcgatgtctgctgcactcc
atccctccccctgttcatttgtccttcatgcccgtctggagtagatgctttttgcagaggtggcaccctgtaaagctctcctgtctga

Slika 4. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.-625 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto), polimorfizmi gena *BIRC5*: c.-644T>C (rs8073903) i c.-625G>C (rs8073069) (ljubičasto) te novootkriveni polimorfizam c.-683C>T (zeleno). Plavo su označeni ostali dosad poznati polimorfizmi u toj regiji koji nisu pronađeni u ovom istraživanju.



Slika 5. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-625: a) Derivacijska krivulja, b) Disocijacijska krivulja, c) Krivulja razlike

3.2.1 Polimorfizam c.-644T>C

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-644T>C (rs8073903) (Slika 5.) homozigotna nukleotidna promjena T>C je pronađena u 6,76% kontrolnih uzoraka, 3,45% karcinoma, 20,83% dermoida i 9,52% fibroma. Heterozigotna promjena je pronađena u 52,70% kontrola, 34,48% karcinoma, 41,67% dermoida i 52,38% fibroma. Divlji tip gena je pronađen u 40,54% kontrola, 62,07% karcinoma, 37,50% dermoida i 38,10% fibroma (Tablica 7.).

Tablica 7. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-644T>C u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	TT	30	40,54	18	62,07	9	37,50	8	38,10
	TC	39	52,70	10	34,48	10	41,67	11	52,38
	CC	5	6,76	1	3,45	5	20,83	2	9,52
aleli	T	99	66,89	46	79,31	28	58,300	27	64,29
	C	49	33,11	12	20,69	20	41,67	15	35,71

Tablica 8.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,653	1,000	0,987	0,706
aleli	1,000	1,000	1,000	0,710

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 8.).

3.2.2 Polimorfizam c.-625 G>C

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-625G>C (rs8073069) (Slika 5.) homozigotna nukleotidna promjena G>C je pronađena 2,70% kontrolnih uzoraka, 0% karcinoma, 12,50% dermoida i 4,76% fibroma. Heterozigotna promjena je pronađena u 39,19% kontrola, 31,03% karcinoma, 33,33% dermoida i 33,33% fibroma. Divlji tip gena je pronađen u 40,54% kontrola, 62,07% karcinoma, 37,50% dermoida i 38,10% fibroma (Tablica 9.).

Tablica 9. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-625G>C u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	GG	43	58,11	20	68,97	13	54,17	13	61,90
	GC	29	39,19	9	31,03	8	33,33	7	33,33
	GG	2	2,70	0	0,00	3	12,50	1	4,76
aleli	G	115	77,70	49	84,48	34	70,83	33	78,57
	C	33	22,30	9	15,52	14	29,17	9	21,43

Tablica 10.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,458	0,163	0,816	0,336
aleli	0,339	0,337	1,000	0,411

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 10.).

3.2.3 Polimorfizam c.-683C>T

Pronađen je novi, dosad nepoznati, polimorfizam c.-683C>T (Slika 5.). Homozigotna nukleotidna promjena C>T nije pronađena niti u jednom uzorku. Heterozigotna promjena je pronađena samo u jednom uzorku dermoida, odnosno 4,17% dermoida. Divlji tip gena je pronađen u 100% kontrola, karcinoma i fibroma (Tablica 11.).

Tablica 11. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-683C>T u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	CC	74	100,00	29	100,00	23	95,83	21	100,00
	CT	0	0,00	0	0,00	1	4,17	0	0,00
	TT	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	C	148	100,00	58	100,00	47	97,92	42	100,00
	T	0	0,00	0	0,00	1	2,08	0	0,00

Tablica 12. Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	/	0,245	/	0,158
aleli	/	0,245	/	0,159

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 12.).

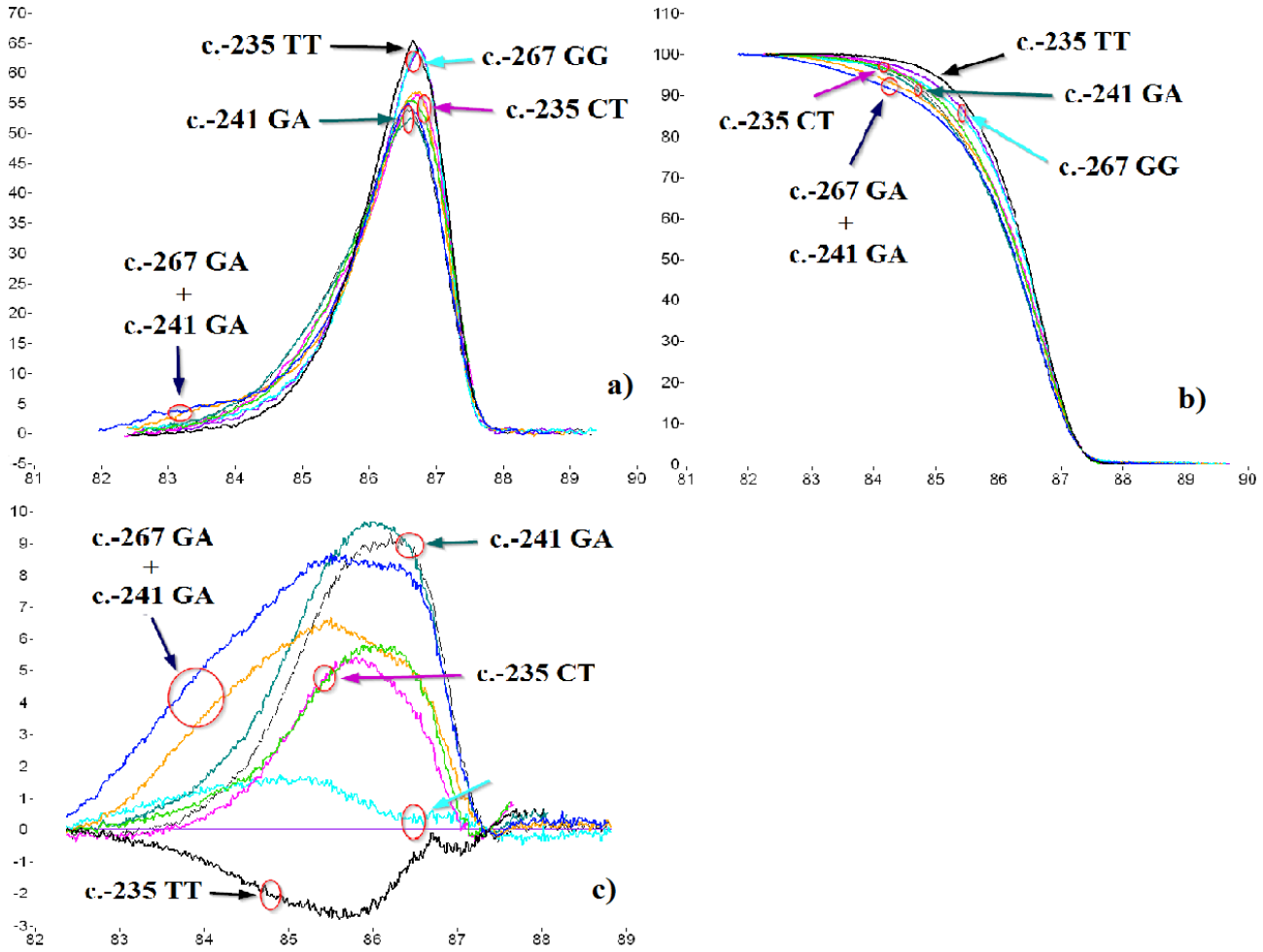
3.3. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-241

U fragmentu DNA veličine 159 pb umnoženom PCR reakcijom c.-241 analizirana je regija od 119 pb koja se nalazi od -282 do -163 baze uzvodno od početka translacije. U regiji su pronađena tri polimorfizma, c.-241C>T i c.-235G>A, koji su bili ciljevi istraživanja ove

regije, te rijetki polimorfizam c.-267G>A, (Slika 6.). Polimorfizmi su analizirani pomoću krivulja mekšanja (Slika 7.).

gattacaggcgtgagccactgcacccggcctgcacgcgttctttgaaagcagtcgaggggggcgctaggtgtgggcagggacgagct
ggcgcggcgtcgctgggtgcaccgcgaccacgggcagagccacgcggcgggaggactacaactcccggcacac

Slika 6. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.-241 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto), polimorfizmi gena *BIRC5*: c.-267G>A (rs17878731), c.-241C>T (rs17887126) i c.-235G>A (rs17878467) (ljubičasto). Plavo su označeni ostali dosad poznati polimorfizmi u toj regiji koji nisu pronađeni u ovom istraživanju.



Slika 7. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-241: a) Derivacijska krivulja, b) Disocijacijska krivulja, c) Krivulja razlike

3.3.1 Polimorfizam c.-267G>A

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-267G>A (rs17878731) (Slika 7.) homozigotna nukleotidna promjena G>A nije pronađena u niti jednom uzorku. Heterozigotna promjena je pronađena u 1,35% kontrola i 3,45% karcinoma, no nije pronađena u dermoidima i fibromima. Divlji tip gena je pronađen u 98,65% kontrola, 96,55% karcinoma, 100% dermoida i 100% fibroma (Tablica 13.).

Tablica 13. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-267G>A u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	GG	73	98,65	28	96,55	24	100,00	21	100,00
	GA	1	1,35	1	3,45	0	0,00	0	0,00
	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	G	147	99,32	57	98,28	48	100,00	42	100,00
	A	1	0,68	1	1,72	0	0,00	0	0,00

Tablica 14.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,486	1,000	1,000	0,666
aleli	0,485	1,000	1,000	0,668

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 14.).

3.3.2. Polimorfizam c.-241C>T

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-241G>A (rs17878467) (Slika 7.) homozigotna nukleotidna promjena C>T nije pronađena niti u jednom uzorku. Heterozigotna promjena je pronađena u 21,62% kontrola, 10,34% karcinoma, 16,67% dermoida i 28,57% fibroma. Divlji tip gena pronađen je u 78,38% kontrolnih uzoraka, 89,66% karcinoma, 83,33% dermoida i 71,43% fibroma (Tablica 15.).

Tablica 15. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-241C>T u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	CC	58	78,38	26	89,66	20	83,33	15	71,43
	CT	16	21,62	3	10,34	4	16,67	6	28,57
	TT	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	C	132	89,19	55	94,83	44	91,67	36	85,71
	T	16	10,81	3	5,17	4	8,33	6	14,29

Tablica 16.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,261	0,773	0,561	0,396
aleli	0,287	0,787	0,586	0,449

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 16.).

3.3.3. Polimorfizam c.-235G>A

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-235G>A (rs17887126) (Slika 7.) homozigotna nukleotidna promjena G>A je pronađena samo u 4,76% fibroma. Heterozigotna promjena je pronađena u 2,70% kontrola, 3,45% karcinoma, a u dermoidima i fibromima nije nađena. Divlji tip gena pronađen je u 97,30% kontrolnih uzoraka, 96,55% karcinoma, 100% dermoida i 95,24% fibroma (Tablica 17.).

Tablica 17. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.-235G>A u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	GG	72	97,30	28	96,55	24	100,00	20	95,24
	GA	2	2,70	1	3,45	0	0,00	0	0,00
	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	4,76
aleli	G	146	98,65	57	98,28	48	100,00	40	95,24
	A	2	1,35	1	1,72	0	0,00	2	4,76

Tablica 18.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	1,000	1,000	0,129	0,282
aleli	1,000	1,000	0,212	0,346

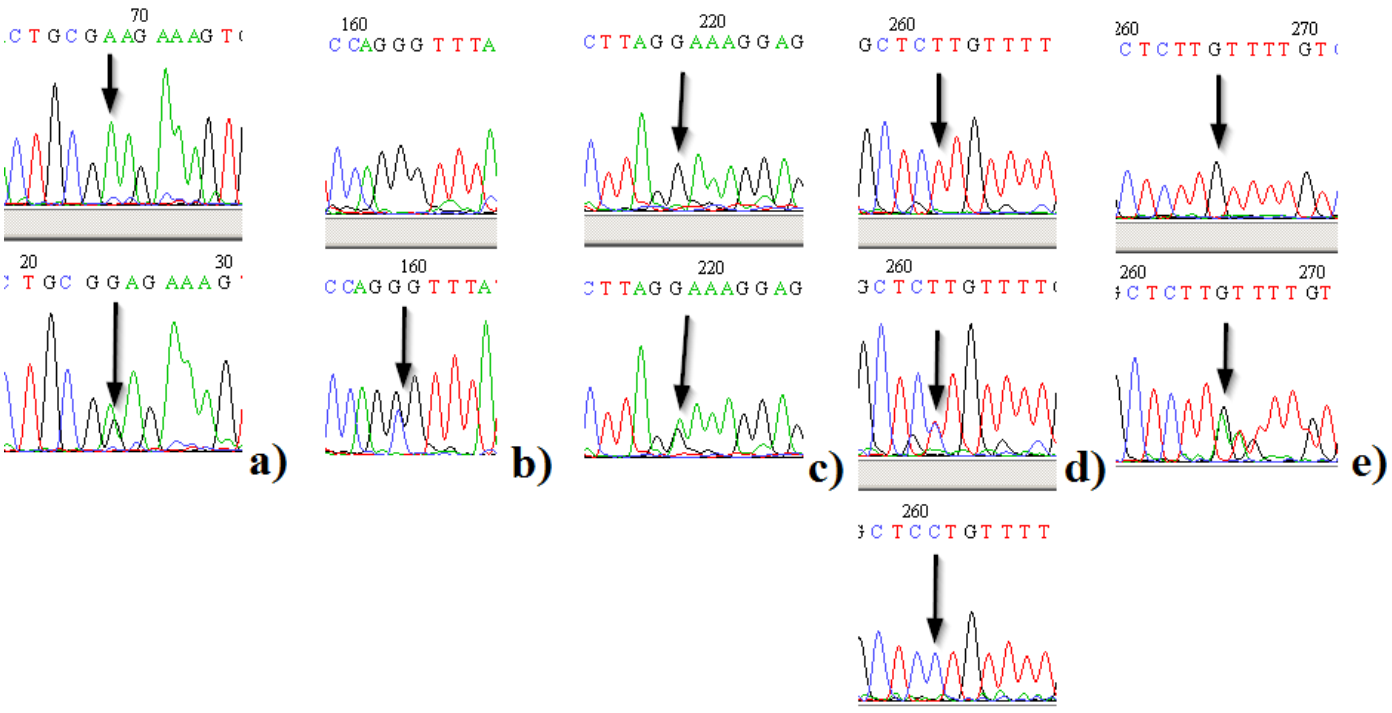
Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 18.).

3.4. područje PCR fragmenta eksona 4

U fragmentu DNA veličine 310 pb umnoženom PCR reakcijom analizirano je 24 baze introna 3, 90 kodirajućih baza eksona 4, te prve 153 baze nekodirajuće 3' UTR regije. U regiji je pronađeno pet polimorfizma, c.9194G>A i c.9386T>C, koji su bili ciljevi istraživanja ove regije, te rijetki polimorfizmi c.9288G>C, c.9342G>A, i c.9387_9388insAA (Slika 8.). Polimorfizmi su analizirani pomoću krivulja mekšanja (Slika 9.).

ctgggaagctctggtttcagtgtcatgtgtctattctttatttccag**GCAAAGGAAACCAACAATAAGAAGAA**
AGAATTTGAGGAAACTGCGGAGAAAGTGCGCCGTGCCATCGAGCAGCTGGC
TGCCATGGAT*TGA*ggcctctggccggagctgcctggtcccagagtggctgcaccacttccagggtttattccctggt
gccaccagccttcctgtgggcccccttagcaatgtcttaggaaaggagatcaacattttcaaattagatgtttcaactgtgctcttg
ttttgtcttgaaagtggcaccag

Slika 8. Slijed nukleotida eksona 4 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto), polimorfizmi gena *BIRC5*: c.9288G>C (rs17885521), c.9342G>A (rs17882627), c.9386T>C (rs2239680) (ljubičasto) te c.9387_9388insAA (rs17882139) (zeleno). Plavo su označeni ostali dosad poznati polimorfizmi u toj regiji koji nisu pronađeni u ovom istraživanju. Velika tiskana plava slova označavaju sekvencu koja se translatira u protein, a mala tiskana plava slova sekvencu koja se prepisuje u mRNA, ali se ne translatira u protein.



Slika 9. Polimorfizmi eksona 4: a) c.9194G>A, b) c.9288 G>C, c) c.9342G>A, d) c.9386T>C, e) c.9387_9388insAA

3.4.1. Polimorfizam c.9194G>A

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.9194G>A (rs2071214) (Slika 9.) homozigotna nukleotidna promjena G>A je pronađena u 93,24% kontrola, 96,55% karcinoma, 100% dermoida i 95,24% fibroma. Heterozigotna promjena je pronađena u 6,76% kontrola, 3,45% karcinoma, 0% dermoida i 4,76% fibroma. Divlji tip gena nije pronađen niti u jednom uzorku (Tablica 19.).

Tablica 19. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.9194G>A u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	GG	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	GA	5	6,76	1	3,45	0	0,00	1	4,76
	AA	69	93,24	28	96,55	24	100,00	20	95,24
aleli	G	5	3,38	1	1,72	0	0,00	1	2,38
	A	143	96,62	57	98,28	48	100,00	41	97,62

Tablica 20.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,673	0,330	1,000	0,578
aleli	1,000	1,000	1,000	0,588

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 20.).

3.4.2. Polimorfizam c.9288G>C

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.9288G>C (rs17885521) (Slika 9.) homozigotna nukleotidna promjena G>C nije pronađena niti u jednom uzorku. Heterozigotna promjena je pronađena u 4,05% kontrola, 3,45% karcinoma, 4,17% dermoida i 4,76% fibroma. Divlji tip gena je pronađen u 95,95% kontrola, 96,55% karcinoma, 95,83% dermoida i 95,24% fibroma. (Tablica 21.).

Tablica 21. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.9288G>C u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	GG	71	95,95	28	96,55	23	95,83	20	95,24
	GC	3	4,05	1	3,45	1	4,17	1	4,76
	CC	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	G	145	97,97	57	98,28	47	97,92	41	97,62
	C	3	2,03	1	1,72	1	2,08	1	2,38

Tablica 22.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	1,000	1,000	1,000	0,997
aleli	1,000	1,000	1,000	0,997

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 22.).

3.4.3. Polimorfizam c.9342G>A

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.9342G>A (rs17882627) (Slika 9.) homozigotna nukleotidna promjena G>A nije pronađena niti u jednom uzorku. Heterozigotna promjena je pronađena u 2,70% kontrola, 3,45% karcinoma, 0% dermoida i 0% fibroma. Divlji tip gena je pronađen u 97,30% kontrola, 96,55% karcinoma, 100% dermoida i 100% fibroma. (Tablica 23.).

Tablica 23. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.9342G>A u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	GG	72	97,30	28	96,55	24	100,00	21	100,00
	GA	2	2,70	1	3,45	0	0,00	0	0,00
	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	G	146	98,65	57	98,28	48	100,00	42	100,00
	A	2	1,35	1	1,72	0	0,00	0	0,00

Tablica 24.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	1,000	1,000	1,000	0,706
aleli	1,000	1,000	1,000	0,710

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 24.).

3.4.4. Polimorfizam c.9386T>C

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.9386T>C (rs2239680) (Slika 9.) homozigotna nukleotidna promjena T>C je pronađena u 4,05% kontrola, u karcinomima, dermoidima i fibromima nije pronađena. Heterozigotna promjena je pronađena u 37,84% kontrola, 55,17% karcinoma, 41,67% dermoida i 47,62% fibroma. Divlji tip gena je pronađen u 58,11% kontrola, 44,83% karcinoma, 58,33% dermoida i 52,38% fibroma. (Tablica 25.).

Tablica 25. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.9386T>C u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	TT	43	58,11	13	44,83	14	58,33	11	52,38
	TC	28	37,84	16	55,17	10	41,67	10	47,62
	CC	3	4,05	0	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	T	114	77,03	42	72,41	38	79,17	32	76,19
	C	34	22,97	16	27,59	10	20,83	10	23,81

Tablica 26.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,190	0,594	0,513	0,504
aleli	0,477	0,844	1,000	0,862

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 26.).

3.4.5. Polimorfizam c.9387_9388insAA

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.9387_9388insAA (rs17882139) (Slika 9.) homozigotna insercija AA nije pronađena u niti jednom uzorku. Heterozigotna insercija je pronađena u 4,05% kontrola i 12,50% dermoida, u uzorcima karcinoma i fibroma nije pronađena. Divlji tip gena je pronađen u 95,95% kontrola, 100% karcinoma, 87,50% dermoida i 100% fibroma. (Tablica 27.).

Tablica 27. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.9387_9388insAA u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	-/-	71	95,95	29	100,00	21	87,50	21	100,00
	AA/-	3	4,05	0	0,00	3	12,50	0	0,00
	AA/AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
aleli	-	145	97,97	58	100,00	45	93,75	42	100,00
	A	3	2,03	0	0,00	3	6,25	0	0,00

Tablica 28.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,557	0,155	1,000	0,089
aleli	0,561	0,158	1,000	0,095

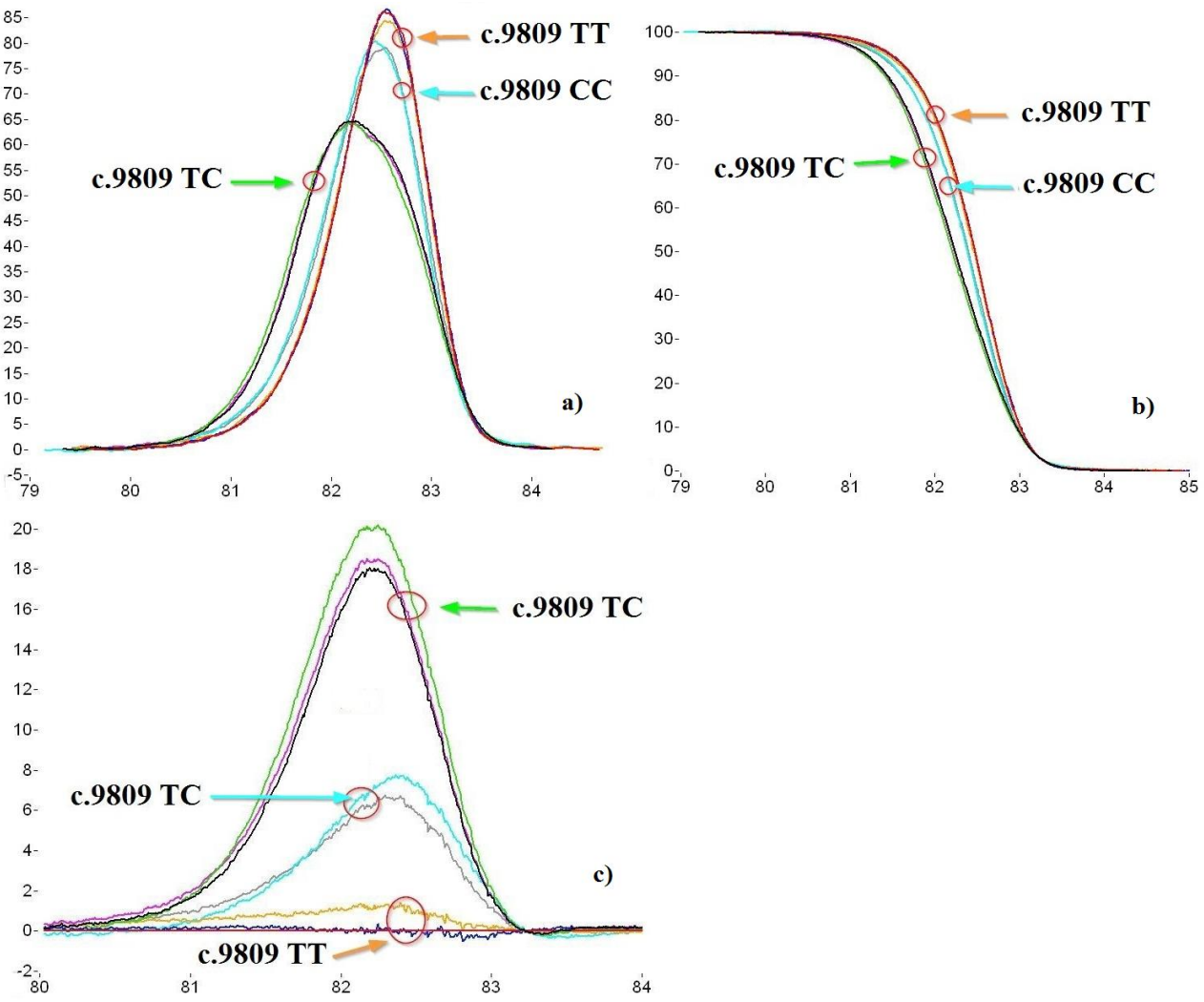
Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 28.).

3.5. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.9809

U fragmentu DNA veličine 161 pb umnoženom PCR reakcijom c.9809 analizirana je regija od 120 pb koja se nalazi od c.9789 do c.9909. U regiji je pronađen jedan polimorfizam c.9809T>C, koji je bio cilj istraživanja ove regije (Slika 10.). Polimorfizam je analiziran pomoću krivulja mekšanja (Slika 11.).

tgcatgacttgtgtgtgatgagagaatggagacagagtccctggctcctctactgtttaacaacatggctttcttattttgtttgaattgttaatt
cacagaatagcacaaactacaattaaaactaagcacaaagccattctaagtcattggggaaacgg

Slika 10. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.9809 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto), polimorfizam gena *BIRC5* c.9809T>C (rs1042489) (ljubičasto). Plavo je označen drugi dosad poznat polimorfizam u toj regiji koji nije pronađen u ovom istraživanju.



Slika 11. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.9809 a) Derivacijska krivulja, b) Disocijacijska krivulja, c) Krivulja razlike

3.5.1. Polimorfizam c.9809T>C

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.9809T>C (rs1042489) (Slika 11.) homozigotna nukleotidna promjena T>C nađena je u 10,81% kontrola, 3,45% karcinoma, 16,67% dermoida i 9,52% fibroma. Heterozigotna promjena je pronađena u 50,00% kontrola, 34,48% karcinoma, 41,67% dermoida i 52,38% fibroma. Divlji tip gena je pronađen u 39,19% kontrola, 62,07% karcinoma, 41,67% dermoida i 38,10% fibroma (Tablica 29.).

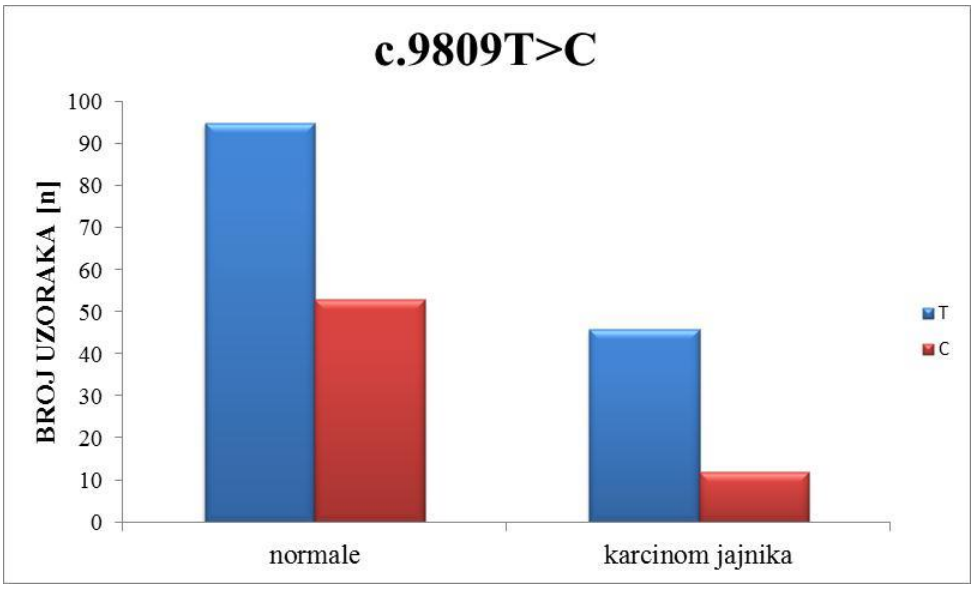
Tablica 29. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.9809T>C u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	TT	29	39,19	18	62,07	10	41,67	8	38,10
	TC	37	50,00	10	34,48	10	41,67	11	52,38
	CC	8	10,81	1	3,45	4	16,67	2	9,52
aleli	T	95	64,19	46	79,31	30	62,50	27	64,29
	C	53	35,81	12	20,69	18	37,50	15	35,71

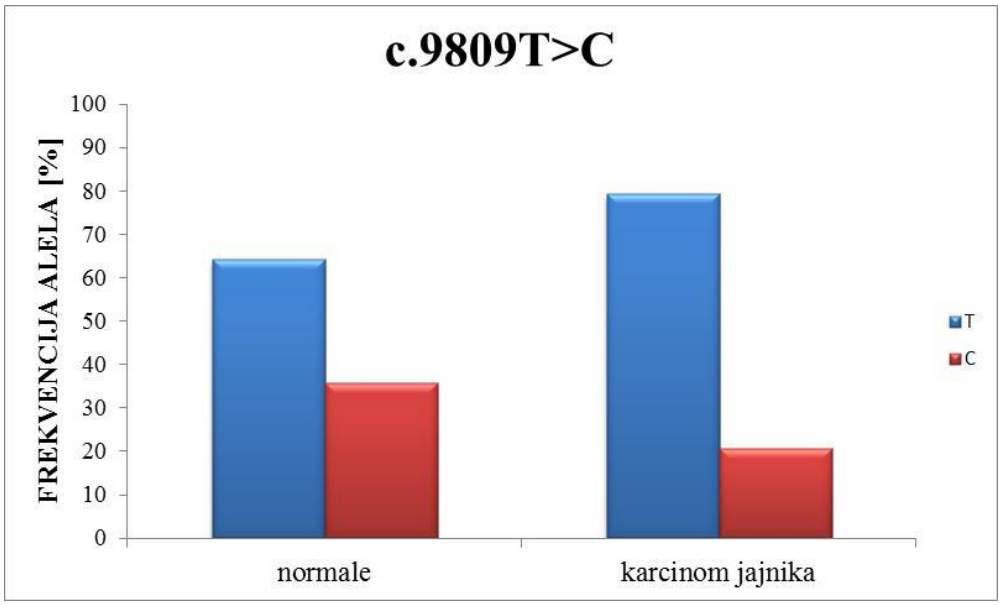
Tablica 30.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,092	0,671	0,976	0,375
aleli	**0,045**	0,864	1,000	0,167

Ovaj polimorfizam je statistički značajan u uzorcima karcinoma sa statističkom značajnosti od 0,045 (Tablica 30.) (Slika 13.).



Slika 12. Broj uzoraka u kojima je prisutan polimorfizam c.9809T>C u normalama i karcinomima jajnika



Slika 13. Frekvencija alela polimorfizma c.9809T>C u normalama i karcinomima jajnika

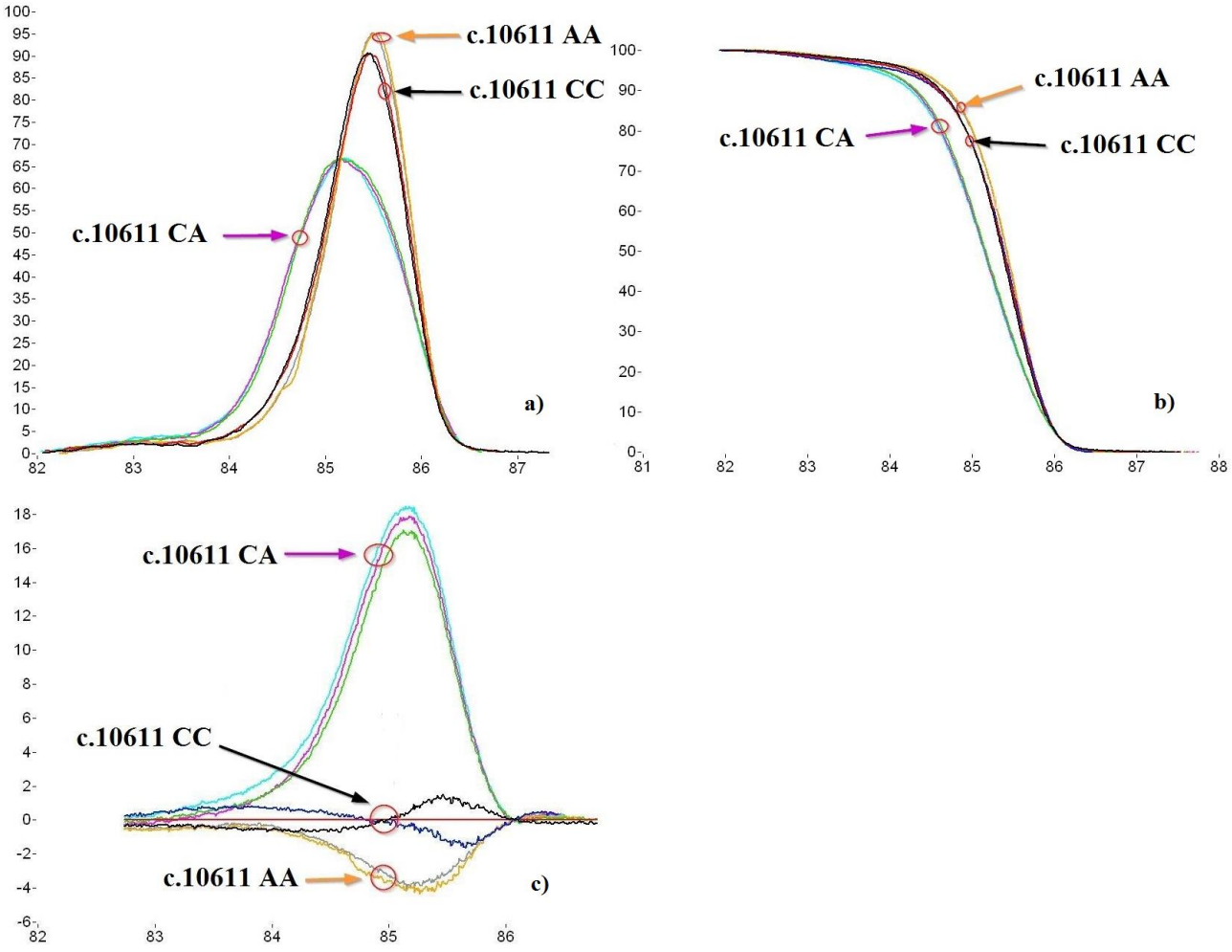
3.6. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.10611

U fragmentu DNA veličine 159 pb umnoženom PCR reakcijom c.10611 analizirana je regija od 120 pb koja se nalazi od c.10568 do c.10688. U regiji je pronađen jedan

polimorfizam c.10611C>A, koji je bio cilj istraživanja ove regije (Slika 14.). Polimorfizam je analiziran pomoću krivulja mekšanja (Slika 15.).

tgtatcatccgggctccttccgggcagaaacaactgaaaatgcacttcagacccacttatttctgccacatctgagtcggcctgagatag
actttttccctctaaactgggagaatatcacagtggtttttgttagcagaaaatgcactccagcctctgt

Slika 14. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.10611 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto), polimorfizam gena *BIRC5* c.10611C>A (rs2661694) (ljubičasto). Plavo je označen drugi dosad poznat polimorfizam u toj regiji koji nije pronađen u ovom istraživanju.



Slika 15. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.10611 a) Derivacijska krivulja, b) Disocijacijska krivulja, c) Krivulja razlike

3.6.1. Polimorfizam c.10611C>A

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.10611C>A (rs2661694) (Slika 15.) homozigotna nukleotidna promjena C>A nađena je u 5,41% kontrola, 3,45% karcinoma, 16,67% dermoida i 4,76% fibroma. Heterozigotna promjena je pronađena u 40,54% kontrola, 55,17% karcinoma, 41,67% dermoida i 47,62% fibroma. Divlji tip gena je pronađen u 54,05% kontrola, 41,38% karcinoma, 41,67% dermoida i 47,62% fibroma (Tablica 31.).

Tablica 31. Učestalost pojedinih genotipova te frekvencija alela polimorfizma c.10611C>A u kontrolama, te uzorcima karcinoma, dermoida i fibroma jajnika.

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=29)		DERMOIDI (n=24)		FIBROMI (n=21)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
genotipovi	CC	40	54,05	12	41,38	10	41,67	10	47,62
	CA	30	40,54	16	55,17	10	41,67	10	47,62
	AA	4	5,41	1	3,45	4	16,67	1	4,76
aleli	C	110	74,32	40	68,97	30	62,50	30	71,43
	A	38	25,68	18	31,03	18	37,50	12	28,57

Tablica 32.Statistička značajnost polimorfizma

	karcinomi	dermoidi	fibromi	ukupno
genotipovi	0,401	0,186	0,845	0,382
aleli	0,487	0,141	0,696	0,458

Ovaj polimorfizam nije statistički značajan (Tablica 32.).

4. RASPRAVA

U ovom radu istraživana je povezanost polimorfizama gena BIRC5 s rizikom od nastanka različitih tipova tumora jajnika.

Genu *BIRC5* u zadnje vrijeme pridaje se sve veća pažnja, osobito njegovom proteinskom produktu survivinu, koji ima važnu ulogu u procesu programirane stanične smrti - apoptoze. Survivin pripada obitelji proteina inhibitora apoptoze. U zdravim tkivima survivin je eksprimiran samo tijekom embrionalnog razvoja dok u diferenciranim tkivima odraslih organizmima nije eksprimiran. Survivin je zanimljiv kod mnogih tumorska oboljenja jer se njegova prekomjerna aktivnost može povezati s nastankom bolesti, njenim povratkom i lošijim preživljenjem.

Polimorfizmi gena *BIRC5* do sada su najviše proučavani u promotorskoj regiji gena, eksonu 4 te 3' netranslatiranoj regiji (3' UTR). Neki pronađeni polimorfizmi povezuju se s promjenama u ekspresiji, stabilnosti te lokalizaciji survivina, što sve može utjecati na pojavu tumora. Ovim radom istražena je uloga polimorfizama gena *BIRC5* u različitim tipovima tumora jajnika. Primarno je odabrano 10 polimorfizama koji su bili pokriveni sa sedam PCR produkata, ali jedan fragment nije bilo moguće proučavati zbog nemogućnosti dobivanja specifičnog PCR produkta. Analizirano je 6 PCR fragmenata koji su pokrivali područje odabranih 9 polimorfizama. Sveukupno je pronađeno 15 različitih polimorfizama, od kojih je 7 imalo učestalost veću od 5%. Dva od devet odabranih polimorfizama (c.-231G>A i c.9194G>A) imali su učestalost nižu od 5%.

Pronađeno je i 6 rijetkih polimorfizama koji nisu bili izabrani za istraživanje, ali se nalaze u blizini odabranih polimorfizama: tri u promotoru: c.-1458C>T, c.-683C>T i C.-267G>A; te četiri u 3' UTR regiji: c.9288G>C, c.9342G>A i c.9387_9388insAA. Polimorfizam c.-683C>T do sada nije objavljen u literaturi.

Rezultati ovog rada pokazali su značajnu razliku u zastupljenosti samo kod jednog polimorfizma. Polimorfizam c.9809T>C pokazuje veću zastupljenost kod pacijenata s karcinomom jajnika u odnosu na kontrolne uzorke, dok je kod pacijenata s dermoidima i fibromima jajnika zastupljenost jednaka kao kod kontrolnih uzoraka. To se djelomično poklapa s rezultatima Hana i sur. iz 2009. koji su kod karcinoma jajnika pronašli povezanost samo s dobi obolijevanja. Kako u ovom istraživanju dob ispitanika nije bila dostupna, nije se moglo ustanoviti je li i ovdje tako.

U zadnjih nekoliko godina sve više se istražuje genetska podloga veze između survivina i nastanka tumora. Prvi polimorfizam gena *BIRC5* koji se povezao s nastankom tumora je c.-31G>C (rs9904341). Prvi put je opisan u Xu i sur. 2004 i do sada je najistraživaniji polimorfizam gena *BIRC5*. Kako je ta promjena nađena samo u staničnim linijama tumora, ali ne i u normalnim staničnim linijama, smatrano je da se radi o mutaciji. Taj polimorfizam nalazi se u regiji vezanja represora te je povezan s razinom ekspresije i sklonosti razvoja različitih tumora. Međutim, u zadnje vrijeme nekoliko meta-analiza (Srivastva i sur. 2012. i Weng i sur. 2012.) pokazalo je značajan utjecaj samo kod azijskih populacija, dok kod europskih pokazuje proturječne rezultate (Boidot i sur. 2008., Antonacopoulou i sur. 2010., De Maria i sur. 2011.).

4.1. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-1547

Han i sur. su 2009. otkrili da je polimorfizam c.-1547C>T povezan s pojavom raka jajnika, točnije da je T alel povezan sa znatno nižom dobi pojavljivanja bolesti. Lee i sur. 2009. nisu našli povezanost tog polimorfizma sa izliječenjem od hepatitisa B, kao ni nastankom hepatocelularnog karcinoma. Shi i sur. 2011, nisu našli da je povezan s nastankom raka dojke. Kod Lee (Koreja) i Shi (Švedska) zabilježena frekvencija T oko 75%. Za polimorfizam c.-1547C>T frekvencija alela T u ovom istraživanju je oko 75,09%, a u NCBI dbSNP bazi 78,85%. Zanimljivo je da kod ovog polimorfizma referentna sekvenca navodi C, dok je u većini populacija, pa tako i hrvatskoj, T alel zastupljeniji.

4.2. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-625

Prvo istraživanje polimorfizama c.-644T>C i c.-625G>C objavljeno je u Jang i sur. 2008. Međutim, promjena c.-644T>C nije detaljno analizirana jer je pronađena u potpunoj neravnoteži udruživanja (engl. linkage disequilibrium, LD) s polimorfizmom c.-625G>C. Kod korejskih pacijenata s rakom pluća nije nađena povezanost polimorfizma c.-625G>C s bolesti. Opisana frekvencija rjeđeg alela oba polimorfizma kod pacijenata iznosi 20,4%, dok globalne frekvencije iz NCBI dbSNP baze iznose 44,4% za alel c.-644C te 33,5% za alel c.-625C. Frekvencije alela za hrvatsku populaciju nađene u ovom istraživanju iznose 24,8%. U slovenskoj populaciji frekvencija rjeđeg c.−625C alela iznosi oko 29% (Hmeljak i sur. 2011.). Za polimorfizam c.-625G>C u literaturi se iznose podaci da se rjeđi alel povezuje sa sklonošću nastanka tumora (Yang i sur. 2009.) te lošijim preživljenjem (Han i sur. 2009., Dai i sur. 2010., Shi i sur. 2012.). Za polimorfizam c.-644T>C, Aynaci i sur. 2013., ustanovili su

1,32 puta manji rizik od raka pluća kod nositelja rjeđeg homozigotnog genotipa c.−644C>C, što se ne slaže s drugim dosad objavljenim podacima. U istom radu alel C se smatra češćim, s frekvencijom od 35,27% u pacijentima i 24,48% u kontrolama. Yang i sur. 2009., nisu našli povezanost polimorfizma c.-644T>C sa sklonošću nastanku raka jednjaka te je frekvencija alela C iznosila oko 26% u pacijentima i 24% u kontrolama. Kod Han i sur. 2009. polimorfizam c.-644T>C nije pokazao značajnost kod pacijentica oboljelih od raka jajnika, kod kojih je frekvencija alela C bila oko 18%. U tom istraživanju zanimljivo je da je, za razliku od istraživanju Jang i sur. 2008., gdje su se polimorfizmi c.-644T>C i c.−625G>C nalazili u LD, alel c.−625C bio učestaliji s frekvencijom od oko 37%, što ukazuje da ti polimorfizmi nisu uvijek u LD.

4.3. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.-241

U radu Xu i sur. 2004. prvi put se spominju dva promotorska polimorfizma, c.-241C>T i c.-235G>A. Kako su nađeni u malom broju staničnih linija, nisu smatrani značajnima. U radovima Hsieh i sur. 2012. i Weng i sur. 2012. navedeni polimorfizmi nisu nađeni, dok je u radu Yang i sur. 2009. ispitivan samo polimorfizam c.-241C>T te je nađen u samo 3% kontrolnih uzoraka. Navedeno ukazuje na mogućnost da ti polimorfizmi nisu česti u azijskim populacijama. Wagner i sur. 2008. su na uzorku od 59 pacijenata oboljelih od mijeloidne leukemije kod dva pacijenta nađen polimorfizam c.-241C>T te u jednom pacijentu polimorfizam c.-235G>A. Stoga se čini da ni u Europi ta dva promotorska polimorfizma nisu česta. S druge strane, isti autori su za polimorfizam c.-241C>T ustanovili pozitivan utjecaj na ekspresiju survivina *in vitro*. Boidot i sur. 2008. polimorfizme c.-241C>T i c.-235G>A nisu detaljno analizirali, već je samo uspoređena njihova frekvencija pronađena kod pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s frekvencijama objavljenima u NCBI dbSNP bazi. Za polimorfizam c.-241C>T frekvencija alela T bila je oko 9,65%, a u NCBI dbSNP bazi oko 6%. Frekvencija rjeđeg alela A polimorfizma c.-235G>A bila je oko 1,96%, dok je u NCBI dnSNP bazi bila oko 1%.

4.4. Područje PCR fragmenta eksona 4

U eksonu 4 našli smo pet polimorfizama: c.9194G>A, c.9288G>C, c.9342G>A, c.9386T>C i c.9387_9388insAA.

Za polimorfizam c.9194G>A prema referentnoj sekvenci NM_001168.2 na poziciji rjeđeg alela nalazi se G, dok je prema bazama podataka i literaturi izvorni alel A. Ta promjena

dovodi do promjene aminokiseline na mjestu 129 iz lizina (alel A) u glutamat (alel G). Smatra se da je acetilacija te aminokiseline važna za lokalizaciju survivina u jezgri te da protein kodiran G alelom ima do 50% manju lokalizaciju u jezgri (Wang i sur. 2008.), što daje dobru prognozu. Jang i sur. 2008. ustanovili su značajan utjecaj GG genotipa na povećani rizik nastanka raka pluća, ali samo u kombinaciji s polimorfizmom c.-31G>C. Frekvencija alela G u tom istraživanju bila je oko 22%, dok je navedena globalna frekvencija iznosila 2,1%. Weng i sur. 2012. povezuju homozigotni genotip GG s rizikom od raka usta, posebno u kombinaciji s homozigotnim genotipovima c.-31GG i c.9809TT. Za polimorfizam c-9194G>A frekvencija alela G u ovom istraživanju je oko 98,13%, a u NCBI dbSNP bazi 92,91%.

Polimorfizam c.9386T>C prvi put se spominje u Jang i sur. 2008. Navedena je samo njegova frekvencija od oko 30% u korejskoj populaciji, oko 29% u europskoj populaciji te oko 24% na globalnoj razini. Antonacopoulou i sur. 2010. ustanovili su da taj polimorfizam ima ulogu u alternativnom izrezivanju gena *BIRC5*, posebno u kombinaciji s polimorfizmom c.-31G>C. Zu i sur. 2013. ustanovili su povezanost alela C s rizikom nastanka raka pluća, te s tumorima višeg patološkog stadija. U zdravom tkivu, homozigotni genotip TT bio je povezan s značajno nižom ekspresijom survivina u odnosu na CC genotip, dok kod tumora ta razlika u ekspresiji nije bila značajna. Nadalje, autori su ustanovili da promjena c.9386T>C dovodi do promjene u regulaciji ekspresije survivina. Za polimorfizam c.9386T>C frekvencija alela C u ovom istraživanju je oko 23,8%, a u NCBI dbSNP bazi 21,77%.

4.5. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.9809

Jang i sur. 2008. prvi su analizirali polimorfizam c.9809T>C te nisu pronašli povezanost s rakom pluća. Nađene frekvencije alela c.9809C u korejskoj populaciji bile su 37% u pacijentima te 42% u zdravim kontrolama. Weng i sur. 2012. povezuju homozigotni genotip TT s rizikom od raka usta, posebno u kombinaciji s homozigotnim genotipovima c.-31GG i c. 9194GG. Hsieh i sur. 2012. pronašli su značajno smanjen rizik od karcinoma jetre kod nositelja homozigotnog genotipa CC, te pretpostavljaju da taj alel dovodi do slabije ekspresije ili aktivnosti survivina. Dai i sur. 2010. povezali su genotip c.9809CC s lošijim preživljenjem kod oboljelih od karcinoma pluća, pogotovo u kombinaciji s c.-625GG genotipom. Vrlo slični rezultati dobiveni su u radu Shi i sur. 2012. kod oboljelih od karcinoma dojke, pogotovo kod pacijentica s agresivnom bolešću. Za polimorfizam c.9809T>C frekvencija alela C u ovom istraživanju je oko 32,43%, a u NCBI dbSNP bazi 41,39%. Polimorfizam c.9809T>C je jedini

kod kojeg je pokazana statistička značajnost frekvencije alela C u karcinomima u odnosu na kontrole.

4.6. Područje PCR fragmenta oko polimorfizma c.10611

Polimorfizam c.10611C>A dosad je objavljen samo u jednom radu (Shi i sur. 2012.) i nije se pokazao značajnim prognostičkim markerom za karcinom dojke. Za polimorfizam c.10611C>A frekvencija alela A u ovom istraživanju je oko 30,7%, a u NCBI dbSNP bazi 20,37%.

4.7. Ostali polimorfizmi

U ovom istraživanju nađeno je i dodatnih 6 polimorfizama. Pet od njih navedeno je u NCBI dbSNP bazi podataka, jedan je novootkriveni, a jedini koji je do sada objavljen u literaturi je c.-267G>A (Boidot i sur. 2008.). Pet polimorfizma, c.-1458C>T, c.-267G>A, c.9288G>C, c.9342G>A i c.9387_9388insAA, nađeni su i u kontrolama i pacijentima. Novo opisani polimorfizam c.-683C>T nađen je samo u jednoj pacijentici s dermoidom jajnika.

Za polimorfizam c.-1458>T frekvencija rijetkog alela T u ovom istraživanju je oko 0,77%, a u NCBI dbSNP bazi 0,22%.

Novootkriveni polimorfizam c.-683C>T u našem istraživanju ima frekvenciju 0,52%.

Frekvencija rijetkog alela A polimorfizma c.-267G>A u našem istraživanju je oko 0,6%, dok je u NCBI dbSNP bazi frekvencija 0,04%.

Za polimorfizam c.9288G>C frekvencija rijetkog alela C u bazi je 0,54%. U ovom istraživanju frekvencija mu je oko 2,05%.

Za polimorfizam c.9342G>A frekvencija rijetkog alela A u NCBI dbSNP bazi je 1,28%. U ovom istraživanju frekvencija mu je oko 0,77%.

Za polimorfizam c.9387_9388insAA frekvencija u bazi je 1,36. U ovom istraživanju frekvencija je oko 2,07%.

Ovim radom željelo se doprinijeti novim spoznajama o važnosti polimorfizama u promotorskoj regiji gena za survivin. Ovo je prva takva studija provedena u Hrvatskoj, te naravno ima svoja ograničenja. Broj uzoraka trebao bi biti znatno veći i trebao bi se podrobnije ispitati polimorfizam c.9809T>C pošto je jedino kod njega dobivena statistička značajnost broja alela C u karcinomima u odnosu na kontrole. Rezultati ovog rada otvorili su

naravno i nova pitanja na koja bi trebalo dodatnim istraživanjima odgovoriti. Posebno bi bilo zanimljivo istražiti potencijalnu primjenu polimorfiama c.9809T>C personaliziranoj medicini, kao mogući prediktivni i prognostički biomarkera u karcinomu jajnika.

5. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem utvrđeno je koji se polimorfizami u regulatornim regijama gena *BIRC5* pojavljuju na uzorku hrvatske populacije te koji se mogu naći kod pacijentica s različitim tipovima tumora jajnika. Ukupno je pronađeno 15 polimorfizama, od kojih je 14 pronađeno u zdravim kontrolama, a jedan, dosad nepoznati c.-683C>T samo u uzorku dermoida jajnika.

Genotipizacijom je pronađen jedan značajan polimorfizam, c.9809T>C, koji ima statistički značajnu frekvenciju u karcinomima jajnika u usporedbi s kontrolama. Čini se da polimorfizmi gena *BIRC5* nemaju značajniju ulogu u nastanku tumora jajnika, te se vjerojatno ne bi mogli koristiti kao prediktivni marker za tumore jajnika. Moguće je da bi veći uzorak pokazao drugačije rezultate. Budući da je *BIRC5* povezan s nastankom velikog broja različitih tumora potrebno je više istraživanja kako na tumorima jajnika tako i na ostalim vrstama tumora.

6. LITERATURA

1. Altieri D.C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. Nat. Rev. Cancer 3, 46-54.
2. Altieri D.C. 2007. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. Mol Cancer Ther 2006 5, 478-482.
3. Altieri D.C. 2008. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. Nat Rev Cancer 8, 61–70.
4. Antonacopoulou A.G., Floratou K., Bravou V., Kottorou A., Dimitrakopoulos F.I., Marousi S., Stavropoulos M., Koutras A.K., Scopa C.D., Kalofonos H.P. 2010. The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. Anal Cell Pathol 33 (5), 177–189.
5. Atlasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A. 2009. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer. Cancer Detect Prev 32(4), 308–313.
6. Aynaci E., Coskunpinar E., Eren A., Kum O., Oltulu Y.M., Akkaya N. 2013. Association between survivin gene promoter −31G/C and −644C/T polymorphisms and non-small cell lung cancer. Genet Mol Res 10, 4238-4246.
7. Badran A., Yoshida A., Ishikawa K., Goi T., Yamaguchi A., Ueda T. and Inuzuka M. 2004. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptopsis gene survivin. Biochem Biophys Res Commun 314, 902-907.
8. Bell D.A. 2005. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. Moderm Pathol, 18 Suppl 2, 19-32.
9. Boidot R., Vegran F., Jacob D., Chevrier S., Cadouot M., Feron O., Solary E., Lizard-Nacol S. 2010. The transcription factor GATA-1 is overexpressed in breast carcinomas and contributes to survivin upregulation via a promoter polymorphism Oncogene, 1–8.
10. Caldas H., Honsey L.E. and Altura R.A. 2005. Survivin 2α: a novel survivin splice variant expressed in human malignancies. Mol Cancer, 4-11.
11. Chen J., Wu W., Tahir S.K., Kroeger P.E., Rosenberg S.H., Cowsert L.M., Bennett F., Krajewski S., Krajewska M., Welsh K., Reed J.C., Ng S.C. 2000. Down-regulation of

survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. Neoplasia 2, 235–241.

12. Chen L., Liang L., Yan X., Liu N., Gong L., Pan S., Lin F., Zhang Q., Zhao H., Zheng F. 2013. Survivin status affects prognosis and chemosensitivity in epithelial ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer 23(2), 256-263.
13. Cheng Z.J., Hu L.H., Huang S.J. 2008. Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma. Ai Zheng 27, 258–263.
14. Chun H. Cheung A., Huang C.C., Tsai F.Y., Lee J. Y.C., Cheng S. M., Chang Y.C., Huang Y.C., Chen S.H,. Chang J.Y. 2013 Survivin – biology and potential as a therapeutic target in oncology. OncoTargets and Therapy 6, 1453–1462.
15. Dai J., Jin G., Dong J., Chen Y., 2010. Prognostic significance of survivin polymorphisms on non-small cell lung cancer survival. J. Thorac. Oncol. 5, 1748-1754.
16. De Maria S., Lo Muzio L., Braca A., Rega P., Cassano A., Vinella A., Fumarulo R., Serpico R., Farina E., Metafora V., Pannone G., Ravagnan G.P., Metafora S., Rubini C., Carteni M., Mariggio M.A. 2011.Survivin promoter -31G/C polymorphism in oral cancer cell lines ONCOLOGY LETTERS 2, 935-939.
17. Han C.H., Wei Q., Lu K.K., Liu Z., Mills G.B., Wang L.E. 2009. Polymorphisms in the survivin promoter are associated with age of onset of ovarian cancer. Int J Clin Exp Med 2(4), 289–299.
18. Hmeljak J., Erbulj N., Dolqan V., Kern I., Cör A. 2011. BIRC5 promoter SNPs do not affect nuclear survivin expression and survival of malignant pleural mesothelioma patients. J Cancer Res Clin Oncol 137, 1641–165.
19. Hsieh Y.S., Tsai C.M., Yeh C.B., Yang S.F., Weng C.J., 2012. Survivin T9809C, an SNP Located in 30-UTR, Displays a Correlation with the Risk and Clinicopathological Development of Hepatocellular Carcinoma Ann Surg Oncol 19 Suppl 3, 625–633.
20. Hunter D.J., Kraft P., Jacobs K.B., Cox D.G., Yeager M., Hankinson S.E., 2007. A genomewide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. Nat Genet 39, 870-874.

21. Jacob N. K., Cooley J. V., Shirai K., Chakravarti A. 2012. Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation OncoTargets and Therapy 5, 7–20.

22. Jang J.S., Kim K.M., Kang K.H., Choi J.E., Lee W.K., Kim C.H., Kang Y.M., Kam S., Kim I.S., Jun J.E., Jung T.H., Park J.Y. 2008. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. Lung Cancer 60 (1), 31-39.

23. Kawata N., Tsuchiya N., Horikawa Y., Inoue T., Tsuruta H., Maita S., Satoh S., Mitobe Y., Narita S., Habuchi T. 2011. Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. Int J Cancer 129(8), 1872-1880.

24. Lee J.S., Kim J.H., Park B.L., Cheong H.S., Kim J.Y., Park T.J., Chun J.Y., Bae J.S., Lee H.S., Kim Y.J., Shin H.D. 2009. Lack of Association of BIRC5 Polymorphisms with Clearance of HBV Infection and HCC Occurrence in a Korean Population. Genomics Inform 7 (4), 195-202.

25. Levačić Cvok M., Cretnik M., Musani V., Ozretic P., Levanat S. 2008. New sequence variants in BRCA1 and BRCA2 genes detected by high-resolution melting analysis in an elderly healthy female population in Croatia. Clin Chem Lab Med 46(10), 1376-1383.

26. Li F. 2005. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. Br J Cancer 92 (2), 212–216.

27. Maurac I., 2011. Signalni put HH-GLI i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika, Središnja medicinska knjižnica, Sveučilište u Zagrebu, 1-93.

28. Musani V. 2008. Mechanisms of Hedgehog/Patched/Gli signling pathway regulation in tumors and hereditary diseases. University of Zagreb, Faculty of Science, Department of Biology, 1-172.

29. Musani V., Sabol M., Car D., Ozretić P., Kalafatić D., Maurac I., Orešković S., Levanat S. 2013, PTCH1 gene polymorphisms in ovarian tumors: Potential protective role of c.3944T allele. Gene 517, 55–59.

30. Musani V., Levačić Cvok M., Ozretić P., Čonda M., Leović D., Gregorić M., Majić T., Levanat S. 2014. The role of *BIRC5* polymorphisms in squamous cell carcinoma of head and neck. Period Biol 116, Suppl 1, 53.

31. Shi H., Bevier M., Johansson R., Grzybowska E., Chen B. 2011. Single nucleotide polymorphisms in the 20q13 amplicon genes in relation to breast cancer risk and clinical outcome. Breast Cancer Res Treat 3, 1039-1047.

32. Srivastava K., Srivastava A., Mittal B. 2012. Survivin promoter 231G/C (rs9904341) polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis Mol Biol Rep 39, 1509–1516.

33. Untergrasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 Bioinformatics 23 (10), 1289-1291.

34. Vaira V., Lee C.W., Goel H.L., Bosari S., Languino L.R., Altieri D.C. 2007. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. Oncogene 26, 2678–2684.

35. Vegran F., Boidot R., Oudin C., Defrain C., Rebucci M., Lizard-Nacol S. 2007. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. Oncogene 26, 290-297.

36. Vegran F., Boidot R., Bonnetain F.,Cadouot M., Chevrier S. and Lizard-Nacol S. 2011. Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma Endocrine-Related Cancer 18, 783–792.

37. Wang Y.H., Chiou H.Y., Lin C.T., Hsieh H.Y., Wu C.C., Hsu C.D. and Shen C.H. 2008. Association Between Survivin Gene Promoter -31 C/G Polymorphism and Urothelial Carcinoma Risk in Taiwanese Population. Molecular Cell 32, 11–20.

38. Weng C.J., Hsieh Y.H., Chen M.K., Tsai C.M., Lin C.W,. Yang S.F. 2012. Survivin SNP-carcinogen Interactions in Oral Cancer J Dent Res 91(4), 358-363.

39. Xu Y., Fang F., Ludewig G., Jones G., 2004. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. DNA Cell Biol 23, 419-429.

40. Yang L., Zhu H., Zhou B., Gu H., Yan H., Tang N., Dong H., Sun Q., Cong R., Chen G., Wang B. 2008. The Association Between the Survivin C-31G Polymorphism and Gastric Cancer Risk in a Chinese Population. Dig Dis Sci 54, 1021-1028.

41. Yang X., Xiong G., Chen X., Xu X., 2009. Polymorphisms of survivin promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma. J. Cancer Res Clin Oncol 135, 1341-1349.

7. **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 21.02.1988. godine u Našicama. Osnovnu školu sam pohađala u OŠ Ivane Brlić Mažuranić u Koški, a srednju školu u SŠ Isidora Kršnjavog u Našicama.

Preddiplomski studij molekularne biologije na biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu sam završila 2012.god. Završni rad „Molekularne metode u klasifikaciji bakterija“ sam izradila pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Jasne Hrenović.

Bila sam demonstrator na praktikumu iz Bakteriologije i virologije pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Jasne Hrenović.

Sudjelovala sam na kongresu HDIR3 Hrvatskog društva za istraživanje raka „From bench to clinic“ te sudjelovala kao koautor plakata The role of BIRC5 polymorphisms in squamous cell carcinoma of head and neck (Musani i sur. 2014.)