

# Uloga proteina Smoothened u razvoju seroznih karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti

---

Mioč, Pavao

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:452204>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-31**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Pavao Mioč**

**Uloga proteina Smoothened u razvoju seroznih  
karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja  
malignosti**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Pavao Mioč**

**Uloga proteina Smoothened u razvoju seroznih  
karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja  
malignosti**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

*Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za ginekologiju i opstetriciju u sklopu Klinike za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice Merkur pod vodstvom prof. dr. sc. Ratka Matijevića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.*

## KRATICE KORIŠTENE U RADU

ACS	Američko društvo za rak, prema engl. <i>American Cancer Society</i>
EOC	epitelni karcinom jajnika, prema engl. <i>epithelial ovarian cancer</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, prema engl. <i>World Health Organization</i>
LGSC	serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti, prema engl. <i>low grade serous carcinoma</i>
HGSC	serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti, prema engl. <i>high grade serous carcinoma</i>
KRAS	gen <i>KRAS</i> , prema engl. <i>Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog; K- Ras</i>
BRAF	gen <i>BRAF</i> , prema engl. <i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase; B-Raf</i>
ERBB2	gen <i>ERBB2</i> , prema engl. <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
TP53	gen za tumor supresor protein 53, prema engl. <i>tumor protein 53</i>
STIC	serozni tubarni intraepitelni karcinom, prema engl. <i>serous tubal intraepithelial carcinoma</i>
HH	Hedgehog signalni put
HH	gen <i>Hedgehog</i>
PTCH	PTCH protein, prema engl. <i>Patched</i>
GLI	GLI protein, GLI transkripcijski čimbenik, prema engl. <i>Glioma- Associated Oncogene</i>
SHH	SHH protein, SHH ligand, prema engl. <i>Sonic Hedgehog</i>
IHH	IHH protein, IHH ligand, prema engl. <i>Indian Hedgehog</i>
DHH	DHH protein, DHH ligand, prema engl. <i>Desert Hedgehog</i>

NBCCS	sindrom bazocelularnog nevusa, prema engl. <i>nevroid basal-cell carcinoma syndrome</i>
SMO	Smoothened protein, prema engl. <i>Smoothened</i>
SMO	gen za Smoothened protein
Fz	obitelji receptora Frizzled, prema engl. <i>Frizzled</i>
CRD	regija bogata cisteinom, prema engl. <i>cysteine-rich domain</i>
Wnt	Wnt signalni put, prema engl. <i>Wingless-related intergration site</i>
PKA	protein kinaza A, prema engl. engl. <i>ptotein kinase A</i>
CK1	kazein kinaza 1, prema engl. <i>casein kinase 1</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom, prema engl. <i>polymerase chain reaction</i>
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina, prema engl. micro ribonucleic acid
ctDNA	izvanstanična tumorska DNA, prema engl. <i>cell-free tumor DNA</i>
CA-125	karcinomski antigen 125, prema engl. <i>carcinoma antigen 125</i>
TBS	Tris pufer, prema engl. <i>Tris-buffered saline</i>
DAB	kromogen 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid, prema engl. 3,3'- <i>Diaminobenzidine</i>
rpm	okretaj po minuti, prema engl. <i>round per minute</i>
MSP	PCR ovisan o metilaciji, prema engl. <i>methylation-specific PCR</i>
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat, prema engl. <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
MWU	Mann-Whitney U test

## SADRŽAJ

### 1. SAŽETAK

### 2. SUMMARY

<b>3. UVOD.....</b>	<b>1</b>
3.1. Karcinom jajnika .....	1
3.1.1. Serozni karcinom jajnika .....	1
3.2. Hedgehog signalni put.....	2
3.2.1. Protein Smoothened .....	3
3.2.2. Hedgehog signalni put u seroznim karcinomima jajnika .....	5
3.3. Epigenetske promjene i njihova uloga u ranoj detekciji seroznih karcinoma jajnika .....	6
<b>4. HIPOTEZA.....</b>	<b>8</b>
<b>5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>9</b>
5.1. Opći cilj istraživanja .....	9
5.2. Specifični ciljevi istraživanja .....	9
<b>6. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>10</b>
6.1. Materijali .....	10
6.1.1. Preparati tumorskog tkiva jajnika .....	10
6.1.2. Protutijela za imunohistokemijsko bojanje .....	10
6.2. Metode .....	11
6.2.1. Imunohistokemijsko bojanje .....	11
6.2.2. Izolacija DNA iz tkiva uklopljenog u parafin.....	12
6.2.3. PCR ovisan o metilaciji .....	12
6.2.4. Analiza imunohistokemijskog bojanja SMO proteina .....	13
6.2.5. Statistička analiza .....	14

<b>7. REZULTATI</b> .....	15
7.1. Ekspresija SMO proteina.....	15
7.1.1. Usporedba ekspresije SMO proteina u HGSC i zdravom tkivu jajovoda	17
7.1.2. Usporedba ekspresije SMO proteina u LGSC i zdravom tkivu jajovoda	18
7.1.3. Usporedba ekspresije SMO proteina u LGSC i zdravom tkivu jajnika...	19
7.1.4. Usporedba ekspresije SMO proteina u HGSC i LGSC .....	19
7.2. Rezultati analize metilacije promotora <i>SMO</i> gena.....	20
<b>8. RASPRAVA</b> .....	21
<b>9. ZAKLJUČCI</b> .....	24
<b>10. ZAHVALE</b> .....	25
<b>11. LITERATURA</b> .....	26
<b>12. ŽIVOTOPIS</b> .....	32



## 1. SAŽETAK

### Uloga proteina Smoothened u razvoju seroznih karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti

Pavao Mioč

Signalni put Hedgehog (Hh) evolucijski je konzerviran i važan u embrionalnom razvoju. Smatra se da je njegova aberantna aktivacija povezana s patogeneom nekih ljudskih karcinoma, a postoje dokazi kako ima određenu ulogu i u razvoju seroznih karcinoma jajnika. Jedan od važnih aktera ovog signalnog puta je protein Smoothened (SMO), transmembranski koreceptor, koji je nakon završenog embrionalnog razvoja uglavnom inhibiran, pa bi njegova ponovna aktivacija mogla dovesti do nekontroliranog rasta i proliferacije stanica. Budući da su istraživanja u čijem je fokusu uloga SMO proteina u seroznim karcinomima jajnika rijetka, cilj ovog istraživanja bio je odrediti ekspresiju proteina SMO i ispitati DNA metilaciju gena *SMO* u kohorti seroznih karcinoma jajnika. Imunohistokemijski je analizirano 40 seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC), 12 seroznih karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC), 9 uzoraka zdravog tkiva jajovoda i 20 uzoraka zdravog tkiva jajnika koji su korišteni kao kontrole. Metilacija *SMO* gena analizirana je u 10 HGSC, 10 LGSC, 10 uzoraka zdravog tkiva jajnika i 9 zdravog tkiva jajovoda koji su bili nasumično odabrani. Nuklearna ekspresija SMO bila je statistički značajno veća u HGSC i LGSC u odnosu na zdravo tkivo jajovoda ( $p=0.010$ ,  $p=0.003$ ). Membranska i citoplazmatska te ukupna ekspresija bila je statistički značajno veća u LGSC u odnosu na zdravo tkivo jajnika ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p<0.001$ ). Uspoređujući HGSC i LGSC nađena je statistički značajno veća ukupna te membranska i citoplazmatska ekspresija SMO u HGSC ( $p=0.026$ ,  $p=0.030$ ). Promotor gena *SMO* bio je nemetiliran kako u karcinomima tako i u kontrolama. Povećana ekspresija proteina SMO, posebno nuklearna, razlikuje tumorsko tkivo seroznih karcinoma jajnika od zdravih kontrola. Budući da promotor gena *SMO* nije bio metiliran, smatramo da je ekspresija ovoga gena u tkivu jajnika regulirana drugim epigenetskim mehanizmima poput histonske acetilacije za što su potrebna daljnja istraživanja koja će rasvijetliti klinički značaj ovih otkrića.

**Ključne riječi:** serozni karcinom jajnika, Hedgehog signalni put, Smoothened protein, imunohistokemija, DNA metilacija

## 2. SUMMARY

### The role of Smoothed protein in development of high and low grade serous ovarian carcinoma

Pavao Mioč

Aberrant Hedgehog (HH) pathway signaling has been implicated in pathogenesis of several human cancers. Furthermore, recent studies have indicated its active role in serous ovarian carcinomas. Smoothed protein (SMO), a transmembrane co-receptor in HH pathway signal transduction, is normally inhibited in non-dividing cells, thus its disinhibition might be a trigger for uncontrolled cell proliferation and growth. However, very few studies have explored the role of SMO in serous ovarian cancers. The aim of this study was to assess the expression of SMO protein and to explore the *Smoothed* gene promoter methylation in a cohort of serous ovarian carcinomas. SMO protein expression was immunohistochemically quantified in 40 high-grade serous carcinomas (HGSC), 12 low-grade serous carcinomas (LGSC), 20 normal ovarian and 9 normal fallopian tube samples (controls). *SMO* gene promoter methylation status was analyzed using methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) in randomly selected HGSCs (n=10), LGSCs (n=10), normal fallopian tube (n=9) and normal ovarian (n=10) samples. SMO nuclear expression was significantly higher in HGSCs and LGSCs compared with the fallopian tube samples ( $p=0.010$  and  $p=0.003$ , respectively). LGSCs, compared with normal ovarian tissue, exhibited higher total, cytoplasmic/membrane and nuclear expression ( $p<0.001$ ,  $p=0.001$  and  $p<0.001$ , respectively). Comparing HGSCs and LGSCs, significantly higher total and cytoplasmic/membrane expression was found in HGSC ( $p=0.026$  and  $p=0.030$ , respectively). *SMO* gene promoter was unmethylated in both LGSCs and HGSCs as well as in fallopian tube. Our data indicate the lack of *SMO* gene promoter methylation in LGSC, HGSC as well as in controls whereas a significant overexpression (particularly nuclear) of SMO protein characterized a substantial proportion of serous ovarian carcinomas. Further functional studies should elucidate the clinical relevance of these findings

**Key words:** serous ovarian carcinoma, Hedgehog signaling pathway, Smoothed protein, immunohistochemistry, DNA methylation

### 3. UVOD

#### 3.1. Karcinom jajnika

Karcinomi jajnika čine 4% svih karcinoma u žena u Republici Hrvatskoj te time zauzimaju sedmo mjesto na ljestvici najčešćih sijela raka (1). Prema Američkom društvu za rak (engl. *American Cancer Society, ACS*) karcinomi jajnika su peti uzrok smrti od karcinoma. U 2019. godini procjenjuje se da će 13 980 žena u Sjedinjenim Američkim Državama umrijeti od ove bolesti što karcinome jajnika čini najsmrtonosnijim ginekološkim tumorima (2). Nespecifični simptomi, agresivan rast, koji rezultira metastatskim oblikom bolesti u trenutku dijagnoze, i nedostatak adekvatnih probirnih metoda, uzrok su crnih brojki vezanih za karcinome jajnika koje su neprestani izvor frustracije za sve ginekologe i ostale eksperte koji se bave ovom problematikom (3).

Epitelni karcinomi jajnika (engl. *epithelial ovarian cancer, EOC*) čine više od 90% svih karcinoma jajnika. Rizikni faktori uključuju stariju dob, pozitivnu obiteljsku anamnezu karcinoma jajnika i/ili dojke, dok rađanje, odnosno veći broj trudnoća, i primjena oralnih kontraceptiva smanjuju rizik za nastanak karcinoma jajnika (4). Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization, WHO*) klasificira EOC u dvije skupine: tip I te tip II. Tip I uključuje serozni karcinom niskog stupnja malignosti (engl. *low grade serous carcinoma, LGSC*), mucinozni, endometrioidni, adenokarcinom svijetlih stanica (engl. *clear cell*) i maligni Brennerov tumor, a tip II serozni karcinom visokog stupnja malignosti (engl. *high grade serous carcinoma, HGSC*), karcinosarkom te nediferencirani karcinom. Razlika između ove dvije skupine nije samo morfološka, budući da se tumori razlikuju kako na temelju molekularnih tako i kliničkih značajki (5,6).

##### 3.1.1. Serozni karcinom jajnika

Serozni karcinomi najčešći su maligni tumori jajnika, čine oko 40% svih EOC i dijele se u dva podtipa: LGSC i HGSC (7). LGSC i HGSC su heterogene skupine tumora, različite patogeneze te različitih molekularnih i kliničko-patoloških karakteristika (5). LGSC rastu sporo, nastaju stupnjevito, iz atipično proliferirajućih tumora i nose mutacije gena *KRAS*, *BRAF* i *ERBB2* (8). Međutim, još uvijek nije sasvim jasno nastaju

li ovi tumori iz pokrovnog epitela jajnika ili epitela jajovoda (9). Iz toga razloga, kao kontrola LGSC u ovom istraživanju koristit će se zdravo tkivo i jajnika i jajovoda. Serozni karcinomi niskog stupnja malignosti obično imaju bolju prognozu od seroznih karcinoma visokog stupnja malignosti. HGSC su češći, agresivnog i brzog rasta, u trenutku dijagnoze su obično već u uznapređovalom stadiju, a osnovna genska promjena u preko 90% ovih tumora je mutacija gena *TP53*. Danas se smatra kako nastaju iz epitela fimbrija jajnika, odnosno iz prekursorske lezije koju nazivamo serozni tubarni intraepitelni karcinom (engl. *serous tubal intraepithelial carcinoma*, STIC) ili u samom jajniku, ali malignom alteracijom inkluzijske ciste tubarnog, a ne kortikalnog podrijetla, kako se do nedavno vjerovalo (10,11).

### **3.2. Hedgehog signalni put**

Hedgehog (HH) signalni put evolucijski je konzerviran put prijenosa signala od membrane do jezgre, što znači da je, u relativno nepromijenjenom obliku, aktivan u različitim organizmima, od insekata pa sve do sisavaca. U literaturi se može naći i pod drugim nazivima poput Hedgehog-Patched (HH-PTCH), Hedgehog-GLI (HH-GLI) ili Hedgehog-Patched-GLI (HH-PTCH-GLI) implicirajući tako najvažnije proteine koji sudjeluju u prijenosu signala (12). Prvi put je opisan u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) (13). Mutacija gena *Hedgehog* (HH) u ovoj vrsti dovodi do promjene izgleda ličinke, koja, u tom slučaju, zbog brojnih bodljikavih izraslina, nalikuje ježu (engl. *hedgehog*) odakle dolazi i sam naziv ovog signalnog puta (14). HH signalni put važan je u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica mnogih tkiva, stoga je njegova uloga ključna u embrionalnom razvoju i tkivnoj homeostazi kako beskralježnjaka, tako i kralježnjaka (15,16).

Klasična aktivacija HH signalnog puta započinje vezanjem HH liganda za transmembranski receptor Patched (PTCH) nakon čega dolazi do njegove internalizacije koja dovodi do dislokacije proteina Smoothened iz endocitičkih vezikula na plazmatsku membranu. Tako aktivan protein Smoothened inicira unutarstanični prijenos signala koji konačno rezultira aktivacijom transkripcijskih faktora, pripadnika obitelji proteina GLI (prema engl. *Glioma-Associated Oncogene*) (17,18).

U sisavaca postoje tri vrste HH liganda: Sonic HH (SHH), Indian HH (IHH) i Desert HH (DHH). Svi se mogu vezati na protein Patched, a aktivnost svakog od njih razlikuje se ovisno o vrsti tkiva (12).

Isto tako postoje i dva PTCH homologa, izolirana u kralježnjaka, PTCH1 i PTCH2. HH proteini se vežu na njih sličnim afinitetom. Različito su izraženi ovisno o vrsti tkiva pa je tako PTCH1 primarno eksprimiran u tkivu mezenhimalnog podrijetla, a PTCH2 u stanicama kože i testisa. Različita ekspresija tijekom razvoja epidermisa potvrđuje hipotezu o njihovoj različitoj funkciji u embrionalno doba (17,19).

Obitelj proteina GLI u kralježnjaka čine tri izoforme ovog enzima GLI1, GLI2 i GLI3. Strukturno, to su proteini s motivom cinkovih prstiju. Funkcionalno su to transkripcijski faktori koji utječu na ekspresiju ciljnih gena HH signalnog puta. GLI1, najvažniji od spomenutih, ima isključivo ulogu aktivatora signalnog puta, dok GLI2 i GLI3 mogu biti i aktivatori i inhibitori transkripcije gena, no generalno možemo reći kako je GLI2 uglavnom transkripcijski aktivator, a GLI3 represor transkripcije (20,21)

Poremećaj u funkcioniranju HH signalnog ima ulogu u karcinogenezi, nastajanju metastaza i kemoterapijskoj rezistenciji mnogih solidnih i hematoloških malignoma (22). Postoje i neke kongenitalne malformacije, poput holoprozencefalije, kod kojih su pronađene mutacije gena bitnih za normalno funkcioniranje HH signalnog puta (17). Povezanost između aberantnog HH signalnog puta i karcinoma u ljudi prvi put je uočena nakon otkrića mutacije *PTCH1* gena koja je uzrok Gorlinovog sindroma nazvanog još i Gorlin-Goltzov sindrom, odnosno sindrom bazocelularnog nevusa (engl. *nevroid basal-cell carcinoma syndrome*, NBCCS) (17,23) To je autosomno dominantni poremećaj koji se očituje multiplim bazocelularnim karcinoma kojima prethodi nevoidna faza, a podrazumijeva mnogobrojne pigmentirane tvorbe koje prethode karcinomima. Kod ovog sindroma prisutne su i druge anomalije poput keratodontogenih cista čeljusti, skeletnih malformacija, kalcifikacije *falx cerebri*, fibroma jajnika, meduloblastoma. (24). Treba naglasiti kako je spoznaja o ulozi HH signalnog puta u karcinomima rezultirala već i konkretnim terapijskim opcijama čiji se mehanizmi djelovanja temelje upravo na inhibiciji ovog signalnog puta. Prvi iz ove skupine lijek je vismodegib koji je odobren za liječenje metastatskog ili inoperabilnog lokalno uznapredovalog bazocelularnog karcinoma. To je molekula koja se veže na protein Smoothened inhibirajući tako aberantnu aktivaciju HH signalnog puta (25).

### **3.2.1. Protein Smoothened**

Protein Smoothened (SMO) je koreceptor u HH signalnom putu. U ljudi je kodiran genom *SMO*. Strukturno je sličan receptorima spregnutima s G-proteinom budući da

polipeptidni lanac prolazi ravninu citoplazmatske membrane sedam puta (26). Na ekstracelularnom N-terminalnom kraju polipeptidnog lanca nalazi se regija bogata cisteinom (engl. *cysteine-rich domain*, CRD), baš kao i u obitelji receptora Frizzled (Fz) koji sudjeluju u Wnt (prema engl. *Wingless-related intergration site*) signalnom putu. Ta regija bitna je za normalno funkcioniranje proteina SMO (27). Zanimljivo je kako su SMO i Fz više sličniji međusobno, nego s ostalim receptorima spregnutima s G-proteinom, što je samo jedna od brojnih sličnosti koje dijele HH i Wnt signalni put (17,28). To ide u prilog hipotezi o evolucijskoj povezanosti ovih dvaju signalnih putova (17). Inače, Wnt signalni put sudjeluje u sličnim procesima kao i HH signalni put, a njegova aktivacija česta je u mnogim karcinomima, uključujući i karcinome jajnika (29)

SMO je konstitutivno aktivan u odsutnosti PTCH1 (30). Za razliku od većine membranskih receptora koji se aktiviraju nakon vezanja liganda inicirajući tako kaskadni prijenosa signala, protein Patched1, receptor Hedgehog proteina, nakon vezanja liganda biva internaliziran, dakle inhibiran. To rezultira, dezinhibicijom, odnosno aktivacijom SMO (31). Točan mehanizam inhibicije nije u potpunosti razjašnjen. Neki smatraju da je PTCH1 fizički povezan sa SMO, inhibirajući ga na taj način (32). S druge strane, Taipale i sur. primjerice tvrde kako nema čvrstih dokaza da su PTCH1 i SMO nedvojbeno u kontaktu (33). Štoviše, naglašavaju kako do inhibicije SMO dolazi i u substehiometrijskim koncentracijama PTCH u odnosu na SMO (33). To znači da će do inhibicije SMO doći čak i kada je omjer koncentracija PTCH1/SMO puno manji od 1. Na primjer, u slučaju PTCH/SMO omjera od samo 1/45 dolazi do supresije skoro 80 postotne aktivnosti proteina SMO Sve to navodi na zaključak da PTCH1 svoju inhibiciju ostvaruje putem nekih malih molekula, a ne direktnim kontaktom dvaju proteina (18,33). Bijlsma i sur. eksperimentalno su utvrdili kako vitamin D3 direktno inhibira SMO i pretpostavili kako PTCH1 inducira sekreciju vitamina D3 te na taj način ostvaruje svoje inhibitorno djelovanje na SMO (34). Međutim, dokazi su zasada ograničeni na *in vitro* modele (34).

Nakon vezanja HH liganda i degradacije PTCH1; enzimi obitelji protein kinaza A (engl. *protein kinase A*, PKA) i kazein kinaza 1 (engl. *casein kinase 1*, CK1) fosforiliraju C-terminalni kraj SMO blokirajući tako njegovu degradaciju i endocitozu. Signal se dalje prenosi fosforilacijskom kaskadom kojoj su ciljna meta proteini GLI, transkripcijski faktori nužni u regulaciji ekspresije ciljnih gena (35).

U današnje vrijeme opravdano postoji stalna težnja za otkrivanjem molekula koje bi mogle suprimirati proliferaciju tumorskih stanica. U tom kontekstu treba spomenuti i neke do sada poznate inhibitore proteina Smoothed, koji će potencijalno u budućnosti imati određenu ulogu u liječenju nekih karcinoma. Prvi otkriveni iz ove skupine inhibitora je ciklopamin. To je molekula koja se može izolirati iz biljke *Veratrum californicum*. Pripada obitelji steroidnih alkaloida, a u fokus znanstvene zajednice je došla nakon otkrića njezinog teratogenog svojstva. Otkriveno je da su ovce, koje su se hranile ovom biljkom, mahom rađale janjad s kongenitalnim anomalijama, a jedan od tri glavnih teratogena bio je ciklopamin. U najtežim slučajevima radilo se o ciklopiji po kojoj je i sama tvar kasnije nazvana. Svoje teratogeno djelovanje ima zahvaljujući direktnoj inhibiciji SMO (36,37). Sonidegib, ima mehanizam djelovanja sličan vsimodegibu, o kojem je već bilo govora, no zbog nedostatka objektivnih randomiziranih studija koje direktno uspoređuju ova dva lijeka, teško je sa sigurnošću govoriti o eventualnoj superiornosti jednog lijeka u odnosu na drugi (38). Zanimljivo je kako itrakonazol, široko primjenjivani antimikotik, pokazuje također inhibitorno djelovanje na SMO (39).

### **3.2.2. Hedgehog signalni put u seroznim karcinomima jajnika**

Aberantna aktivacija HH signalnog puta prisutna je u gotovo 30% karcinoma u ljudi, uključujući i karcinome jajnika (40). Međutim, dosadašnja istraživanja o ulozi i ekspresiji proteina HH signalnog puta u tumorima jajnika rezultirala su kontradiktornim rezultatima. Bhattacharya i sur. analizirali su ekspresiju nekoliko komponenata HH signalnog puta iz 19 primarnih ovarijskih tumora koristeći metodu PCR-a u realnom vremenu, koja mjeri relativne razine glasničke ribonukleinske kiseline (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA), različite za svaki protein, te tako indirektno govori o ekspresiji pojedinog proteina u stanici (41). Njihovi rezultati upućuju na povećanu ekspresiju SHH, SMO i GLI1, dok PTCH1, inače često korišten marker za kanonsku aktivaciju HH signalnog puta, nije bio statistički značajno pojačano izražen u odnosu na kontrole (netumorsko tkivo jajnika) (41). Yang i sur. u istraživanju iz 2009. godine, zaključuju pak kako aktivacija HH signalnog puta u karcinomima jajnika ipak nije tako česta i da ne korelira s histološkim tipom tumora. Naglašavaju potrebu za identifikacijom točne skupine karcinoma jajnika, koja bi imala zajednički karakteristiku- aberantnu aktivaciju HH signalnog puta te smatraju kako aktivacija HH signalnog puta nije značajka svih karcinoma jajnika, stoga na kraju razvijaju hipotezu da morfološka

klasifikacija karcinoma jajnika možda ne korelira s molekularnom patogenezom ovih tumora (42). Spomenuta istraživanja fokusirala su se na maligne oblike tumora jajnika, pa su mnoga pitanja vezana za ulogu HH signalnih molekula u benignim i *borderline* tumorima, ostala neodgovorenima (43). Chen i sur. su imunohistokemijski kvantificirali ekspresiju SHH, IHH, PTCH; SMO i GLI1, a rezultati su pokazali značajno veću ekspresiju tih proteina u karcinomima, nego u benignim tumorima jajnika (44). Recentno istraživanje Songa i sur. objavljenog 2018. godine uključilo je analizu ekspresije SHH, PTCH; SMO i GLI1 u benignim, *borderline* i malignim karcinomima jajnika. Visoka ekspresija proteina Smoothened je bila prisutna u *borderline* i malignim tumorima nasuprot niskoj ekspresiji u benignim tumorima. Ekspresija GLI1 korelirala je s ekspresijom SMO, stoga ovo istraživanje govori u prilog teoriji o bitnoj ulozi HH signalnog puta u malignoj transformaciji tumora jajnika (43). Razlike u rezultatima različitih istraživača produkt su vjerojatno malog broja uzoraka, kvalitete samih uzoraka, različitih metoda detekcije, ali i različitih standarda korištenih u definiranju aktivacije HH signalnog puta (42,43).

Osim u nekontroliranoj proliferaciji stanica, moguće je da aktivacija HH signalnog puta ima ulogu i u rezistenciji na cisplatinu, kemoterapeutika koji se koristi u liječenju karcinoma jajnika, budući da je dokazana uska povezanost između visoke ekspresije SMO i GLI1 te kemorezistencije na spomenuti lijek (43).

### **3.3. Epigenetske promjene i njihova uloga u ranoj detekciji seroznih karcinoma jajnika**

Promjene kromosoma, koje ne uključuju promjene u sekvenci deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), već su produkt metilacije DNA, modifikacije histona ili su posljedica djelovanja mikro ribonukleinske kiseline (engl. *micro ribonucleic acid*, miRNA), nazivaju se epigenetskim promjenama (45). Epigenetske promjene, prisutne u neoplastičnim stanicama, potencijalno su korisni biomarkeri za detekciju, ali i terapiju karcinoma (46). Aberantna metilacija DNA često je prisutna u mnogim karcinomima i smatra se jednom od najranijih molekularnih promjena u karcinogenezi (47–49). U EOC također postoje geni s karakterističnim obrascem metilacije koji bi mogli imati ulogu u klasifikaciji (50), progresiji (51) i odgovoru na terapiju (52). Štoviše, postoje istraživanja koja ukazuju na prisutnost karakterističnih obrazaca metilacije tumor-specifičnih gena koji se mogu dokazati u



DNA prisutnoj u krvi pacijentica s EOC (53–56). Ta tumorska DNA, koja je u ekstracelularnom obliku prisutna u krvi bolesnika s tumorom, naziva se izvanstanična tumorska DNA (engl. *cell-free tumor DNA*, ctDNA) (57). Analiza metilacijskih obrazaca ctDNA, karakterističnih za karcinome jajnika, potencijalno je moćan neinvazivan biomarker u detekciji EOC (58) koji bi mogao zamijeniti dosada jedini dostupni serumski marker – karcinomski antigen 125 (engl. *carcinoma antigen 125*, CA -125). Naime, velika mana CA-125 je nedostatak specifičnosti zbog njegove povišene koncentracije i kod dijela zdravih žena i kod onih s drugom tumorskom ili netumorskom patologijom, ali i osjetljivost, budući da se kod samo 80% pacijentica s EOC pronade povišen CA-125 (59). Promjene u metilaciji DNA događaju se rano i stabilne su za vrijeme trajanja karcinogeneze. To je bitna značajka ovog procesa, budući da bi se, upravo zahvaljujući tome, mogla nadvladati visoka stopa lažno pozitivnih nalaza pri korištenju CA-125 (58). Jasno je, međutim, da analiza metilacije samo jednog gena neće biti dovoljna za adekvatan dijagnostički test, čija bi specifičnost trebala biti >99.6%. Zbog toga potrebno će biti analizirati metilaciju u panelima biomarkera kako bi se postigla spomenuta specifičnost (59).

#### **4. HIPOTEZA**

Naša hipoteza je da će ekspresija proteina Smoothened, kao pozitivnog regulatora HH signalnog puta, biti izraženija u tumorima jajnika nego u netumorskom tkivu jajnika, odnosno jajovoda (kontrolama). S obzirom na to da su HGSC i LGSC dva posve različita kliničko-patološka entiteta, pretpostavili smo i da će ekspresija proteina Smoothened biti izraženija u tumorima jajnika visokog stupnja malignosti u usporedbi s tumorima niskog stupnja malignosti. Postoje naznake kako je promjena u metilaciji DNA genska osnova koja dovodi do poremećaja u funkciji HH signalnog puta, stoga očekujemo da će promotor gena za sintezu proteina Smoothened biti hipometiliran u stanicama karcinoma jajnika u odnosu na kontrolno tkivo jajnika, odnosno jajovoda.

## **5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **5.1. Opći cilj istraživanja:**

Cilj ovog istraživanja je ispitati ekspresiju proteina Smoothened u definiranoj kohorti seroznih tumora jajnika visokog i niskog stupnja malignosti te ispitati razinu metilacije DNA promotora gena *SMO* u tim tumorima.

### **5.2. Specifični ciljevi istraživanja:**

1. Ispitati ekspresiju proteina Smoothened u netumorskom tkivu jajnika i jajovoda (kontrolno tkivo).
2. Ispitati ekspresiju proteina Smoothened u seroznim karcinomima jajnika niskog i visokog stupnja malignosti.
3. Ispitati DNA metilaciju promotora gena *SMO* u tumorskom tkivu jajnika i netumorskom tkivu jajnika i jajovoda.

## **6. MATERIJALI I METODE**

### **6.1. Materijali**

#### **6.1.1. Preparati tumorskog tkiva jajnika**

U istraživanju su se koristila formalin-fiksirana, parafin-uklopljena tumorska tkiva jajnika koja su dio zbirke tumorskih uzoraka u vlasništvu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su prikupljeni tijekom operativnih zahvata na Klinici za ženske bolesti i porode KB Merkur u periodu od 2000. do 2012. godine u suradnji s doc. dr. sc. Anitom Škrtić, dr. med. U sklopu Projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (CERRM), jedinice za Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja, dobivena je etička dopusnica za istraživanje.

Za imunohistokemijsku analizu korišteno je ukupno 52 uzorka seroznih karcinoma, od kojih su 40 bili uzorci seroznih karcinoma visokog stupnja malignosti, a 12 uzorci seroznih karcinoma niskog stupnja malignosti. Kao kontrola HGSC koristilo se 9 uzoraka zdravog tkiva jajovoda. Budući da podrijetlo LGSC još uvijek nije do kraja razjašnjeno (9), kontrola LGSC u ovom istraživanju bilo je 9 uzoraka zdravog tkiva jajovoda, zajedno s 20 uzoraka zdravog tkiva jajnika, odstranjenih zbog drugih ne-ginekoloških indikacija.

Za analizu metilacije promotora *SMO* gena, korišteno je 10 HGSC, 10 LGSC, 10 uzoraka zdravog tkiva jajnika i 9 uzoraka zdravog tkiva jajovoda koji su bili nasumično odabrani.

#### **6.1.2. Protutijela za imunohistokemijsko bojanje**

Primarno protutijelo, korišteno za imunohistokemijsko bojanje, bilo je poliklonsko *SMO* protutijelo (engl. *rabbit polyclonal anti-human*; Clone: ab113438, Abcam, Cambridge, MA, razrjeđenje 1:200).

## 6.2. Metode

### 6.2.1. Imunohistokemijsko bojanje

Parafinski uklopljeni rezovi uzoraka debljine 4  $\mu\text{m}$  postavili su se na silanizirana predmetna stakla (DakoCytomation, Denmark). Potom su se stakla s uzorcima preko noći deparafinirala u termostatu na temperaturi od 58 do 60°C. Nakon vađenja iz termostata stakla su bila 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se ohladila. Prije imunohistokemijskog bojanja potrebno je bilo deparafinirati i rehidrirati tkivo što se postiglo provođenjem uzoraka kroz niz ksilola u trajanju od 4 puta po 10 minuta. Uzorci su se nakon toga rehidrirali kroz silazni red etilnog alkohola: 5 minuta u apsolutnom, 5 minuta u 96%-tnom i 2 minute u 70%-tnom alkoholu, nakon čega su dvaput bili isprani destiliranom vodom. Deparafinizirani i rehidrirani rezovi uzoraka potom su bili stavljeni u posude s citratnim puferom (pH 6, razrjeđenje 1:10) te su se tako kuhali u vodenoj kupelji 20 minuta radi demaskiranja epitopa. Nakon hlađenja, u trajanju od 30 minuta, uzorci su bili isprani Tris puferom (engl. *Tris-buffered saline*, TBS) dvaput u trajanju od 3 minute. Kako bi se blokirala aktivnost endogene peroksidaze, uzorci su bili tretirani 3%-tnom otopinom vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), nakon čega je ponovno uslijedilo ispiranje TBS puferom, dvaput po 3 minute. Nakon toga se na uzorke, isključujući negativnu kontrolu, nanijelo primarno SMO protutijelo, razrijeđeno s TBS-om u omjeru 1:200, te su uzorci ostavljeni preko noći u vlažnoj komori na temperaturi od 4°C.

Nakon inkubacije, uzorci su se dvaput po 3 minute isprali u puferu PBS iza čega je uslijedila inkubacija u tamnoj komori sekundarnim protutijelom Dako REAL Envision detection system (DakoCytomation, Carpinteria, USA; K500711) u trajanju od 30 minuta. Uzorci su se potom ponovno isprali u TBS puferu dvaput po 3 minute, nakon čega je uslijedila 10 minutna inkubacija 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid kromogenom (engl. *3,3'-Diaminobenzidine*, DAB). Primjena ovog supstrat-kromogen kompleksa rezultirala je nastajanjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu. Navedena otopina isprana je zatim običnom, pa destiliranom vodom. Uzorci su se kontrastirali hemalaunom u trajanju od 30 sekundi koji se onda isprao običnom vodom unutar 5 minuta. Nakon ispiranja destiliranom vodom uslijedilo je dehidriranje uzoraka provođenjem kroz uzlazni niz etilnog alkohola: nekoliko urona u 70%-tnom, nekoliko urona u 96%-tnom, a zatim minutu i dvije minute u apsolutnom alkoholu. Preparati su se naposljetku izbistrili u ksilolu dvaput po 5 minuta. Obrada je završila

poklapanjem pokrovnim stakalcem i medijem za pokrivanje koji se koristi u rutinskoj histološkoj dijagnostici. Negativna kontrola tijekom eksperimenta bio je uzorak koji nismo inkubirali s primarnim protutijelom tijekom imunohistokemije, a kao pozitivna kontrola za SMO koristio se uzorak HGSC koji je bio korišten tijekom optimiziranja protokola.

### **6.2.2. Izolacija DNA iz tkiva uklopljenog u parafin**

DNA je izolirana iz HGSC (n = 10) i LGSC (n = 10) karcinoma, te iz normalnog tkiva jajnika (n = 10) i jajovoda (n = 9). Za izolaciju DNA korištena su dva reza svakog uzorka uklopljenog u parafin debljine 10 µm. Rezovi su prebačeni u mikrotubice od 1.5 mL te je na njih dodano 1 mL supstitucije za ksilen. Uslijedila je 30 minutna inkubacija na sobnoj temperaturi uz miješanje uzoraka okretanjem mikrotubica. Mikrotubice su potom centrifugirane 5 minuta pri 13 000 okretaja po minuti (engl. round per minute, rpm) te je odstranjen supernatant. Postupak se još jednom ponovio nakon čega je u svaku mikrotubicu dodano 500 µL apsolutnog etilnog alkohola. Uzorci su potom miješani okretanjem mikrotubica 2 minute, centrifugirani 5 min pri 13 000 rpm, nakon čega je odstranjen supernatant. Nakon što se korak s alkoholom još jednom ponovio, odstranjen je supernatant te su mikrotubice ostavljene otvorene kako bi etanol ispario. Na talog je dodano 100 µL pufera za lizu stanica (50 mM Tris – pH 8.5, 1mM etilendiamintetraoctena kiselina, 0,5% Tween 20) i 4 µL proteinaze K (20 mg/mL). Uzorci su se inkubirali preko noći u termobloku na 37°C uz miješanje pri 300 rpm. Sljedeći dan talog je spušten kratkim centrifugiranjem mikrotubica (30 s, 13 000 rpm), nakon čega je uslijedila 8 minutna inkubacija na 95°C, radi inaktivacije proteinaze K. Mikrotubice su ponovno centrifugirane (30 s, 13 000 rpm), te inkubirane 10 minuta na 4°C. DNA iz supernatanta pročišćena je pomoću kita NucleoSpin® gDNA Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany) prema uputama proizvođača. Koncentracije izolirane DNA izmjerene su pomoću NanoDrop-a 2000 (Thermo Fisher Scientific, SAD).

### **6.2.3. PCR ovisan o metilaciji**

Nakon izolacije iz tkiva uklopljenog u parafin, DNA je bisulfitno konvertirana koristeći kit MethylEdge Bisulfite Conversion System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) prema uputama proizvođača. Bisulfitno konvertirana DNA korištena je u reakcijama PCR-a ovisnog o metilaciji (engl. *methylation-specific PCR*, MSP). Sekvence

početnica za promotorsku regiju gena *SMO* dizajnirane su pomoću MethPrimer programa: početnice za metiliranu reakciju,

F: 5'-TTAGATTAAGTAAGGTGTTTCGTCGA-3',

R: 5'-GAACTAAAAAATCTAATAACCCCG-3';

početnice za nemetiliranu reakciju,

F: 5'- TTAGATTAAGTAAGGTGTTTGTGA-3',

R: 5'-AAACTAAAAAATCTAATAACCCACC-3'.

MSP reakcija provedena je koristeći kit TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA) (TaKaRa Bio, USA). Reakcijska smjesa za PCR sastojala se od 0.125 µL TaKaRa EpiTaq HS DNA polimeraze (0.75 U), 2.5 µL 1XEpiTaq PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) pufera, 2.5 µL magnezijevog klorida (2.5 mM), 3 µL dNTP (0.3 mM), po 1 µL F (engl. *forward*) i R (engl. *reverse*) početnica (10 pmol svakih), 25 ng DNA kalupa i vode bez nukleaza (engl. *nuclease-free water*) do ukupnog volumena reakcijske smjese od 25 µL. PCR reakcija započeta je denaturacijom pri 95°C tijekom 30 sekundi iza koje su slijedila 40 ciklusa koji su se sastojali od 3 koraka: denaturacije na 95°C tijekom 30 sekundi, sparivanja početnica s kalupom na 60°C tijekom 30 sekundi i produljivanja lanaca DNA na 72°C tijekom 30 sekundi. Završno produljivanje DNA trajalo je 7 minuta na 95°C. Umnoženi DNA fragmenti razdvojeni su na 2%-tnom agaroznom gelu obojani bojom GelStar nucleic acid stain (Lonza Rockland, Inc. Rockland, USA). Elektroforeza se odvijala u 1x TAE (prema engl. *tris base, acetic acid and EDTA*) puferu tijekom 30 minuta pri 120 V nakon čega je slijedila vizualizacija umnoženih fragmenata pod UV svjetlom na transiluminatoru. Methylated Human Control (Promega, Madison, Wisconsin, USA) služila je kao pozitivna kontrola za metiliranu reakciju, dok je nemetilirana DNA EpiTect Control DNA (Qiagen, Hilden, Germany) služila kao pozitivna kontrola za nemetiliranu reakciju. Kao negativna kontrola korištena je voda bez nukleaza.

#### **6.2.4. Analiza imunohistokemijskog bojanja *SMO* proteina**

Analiza signala imunohistokemijskog bojanja vršila se semikvantitativnom metodom po uzoru na Rizzardija (60). Jačina signala označavala se brojevima od 0 do 3 (0 – nema signala; 1 – signal je prisutan u <10% stanica; 2 – signal je prisutan u 10-50% stanica; 3 – signal je prisutan u >50% stanica). Ekspresija *SMO* proteina je evaluirana u citoplazmi/membrani i jezgri tumorskih stanica jajnika i kontrolnog tkiva.

### **6.2.5. Statistička analiza**

Obrada svih prikupljenih parametara imunohistokemijske analize temeljila se na deskriptivnoj statistici. Koristile su se mjere centralne tendencije i mjere disperzije. Distribucija podataka testirala se Kolmogorov-Smirnovljevim testom, Lillieforsovim testom i Shapiro-Wilkovim W-testom te se nakon toga primijenio neparametrijski Mann–Whitney U test. Prag prihvaćanja odnosno odbacivanja hipoteze bio je na razini vjerojatnosti od 5% ( $p < 0.05$  – razlika je značajna). U obradi podataka koristio se program GraphPrism6 (GPW6-278912-RLMU-966F4).



## 7. REZULTATI

### 7.1. Ekspresija SMO proteina

U Tablici 1, 2 i 3 prikazani su rezultati semikvantitativne analize imunohistokemijske ekspresije SMO proteina u HGSC, LGSC te tkivu zdravih jajovoda i jajnika. Rezultati su prikazani uzimajući u obzir zasebno nuklearnu, membransku i citoplazmatsku te ukupnu ekspresiju SMO proteina i to ovisno o postotku stanica u kojima je vidljiv signal imunohistokemijskog bojenja.

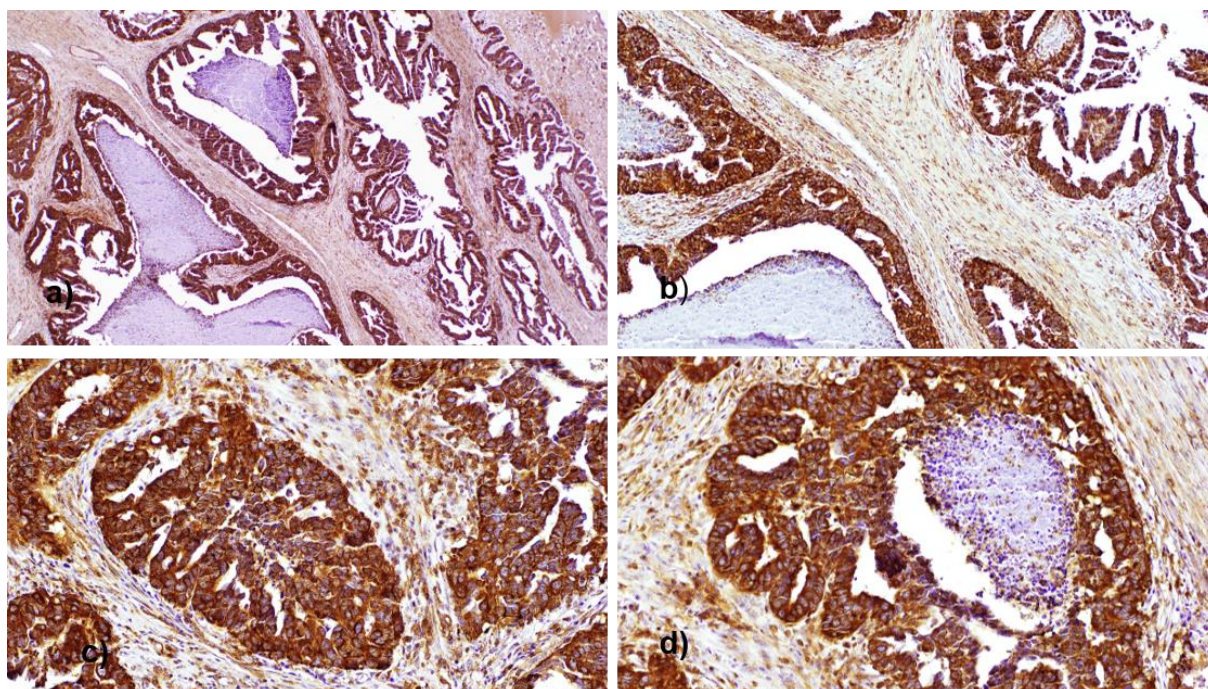
*Tablica 1 Ukupna ekspresija SMO proteina*

	Ukupna ekspresija			
	> 50%	10-50%	< 10%	0%
Zdravo tkivo jajnika (n = 20)	-	2 (10%)	1 (5%)	17 (85%)
LGSC (n = 12)	7 (58.5%)	5 (41.5%)	-	-
Zdravo tkivo jajovoda (n = 9)	6 (67%)	1 (11%)	1 (11%)	1 (11%)
HGSC (n = 40)	35 (87.5%)	5 (12.5%)	-	-

*Tablica 2 Citoplazmatska i membranska ekspresija SMO proteina*

	Citoplazmatska / membranska ekspresija			
	> 50%	10-50%	< 10%	0%
Zdravo tkivo jajnika (n = 20)	-	2 (10%)	1 (5%)	17 (85%)
LGSC (n = 12)	5 (41.5%)	2 (16.5%)	1 (8.5%)	4 (33.5%)
Zdravo tkivo jajovoda (n = 9)	6 (67%)	1 (11%)	1 (11%)	1 (11%)
HGSC (n = 40)	27 (67.5%)	11 (27.5%)	-	2 (5%)

Na *Slici 1* prikazan je rezultat imunohistokemijskog bojanja seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) gdje se vidi izražena citoplazmatska i membranska ekspresija.



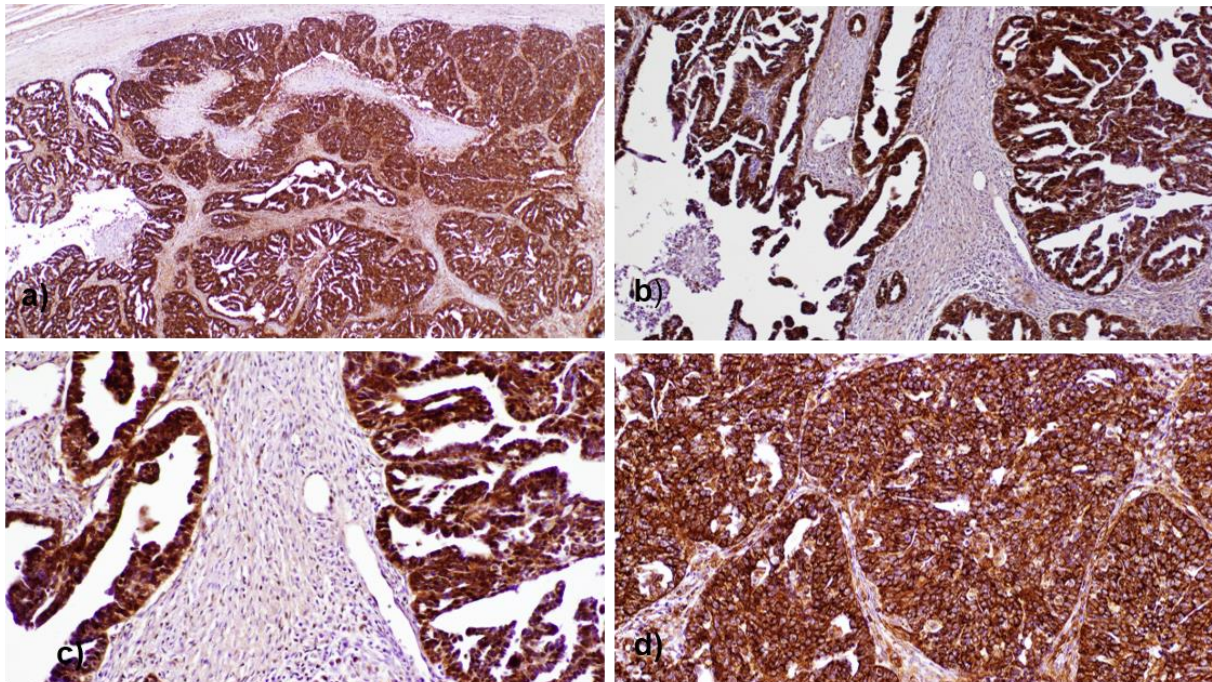
*Slika 1* HGSC sa 100 %-tnom citoplazmatskom i membranskom ekspresijom SMO  
a) povećanje 4x b) povećanje 10x c) i d) povećanje 20x

*Tablica 3* Nuklearna ekspresija SMO proteina

	Nuklearna ekspresija			
	> 50%	10-50%	< 10%	0%
Zdravo tkivo jajnika (n = 20)	-	-	-	-
LGSC (n = 12)	1 (8.5%)	7 (58.5%)	-	4 (33%)
Zdravo tkivo jajovoda (n = 9)	-	-	-	-
HGSC (n = 40)	2 (5%)	15 (37.5%)	2 (5%)	21 (52.5%)



Na *Slici 2* prikazan je primjer HGSC u kojem je vidljiv jak imunohistokemijski signal u jezgri malignih stanica.



*Slika 2* Imunohistokemijska ekspresija SMO u HGSC  
a) povećanje 4x b) vidljiva nuklearna ekspresija, povećanje 10x c) vidljiva nuklearna ekspresija, povećanje 20x d) vidljiva citoplazmatska i membranska ekspresija, povećanje 20x

### 7.1.1. Usporedba ekspresije SMO proteina u HGSC i zdravom tkivu jajovoda

*Tablica 4* Rezultati Mann-Whitney U (MWU) testa korištenog za usporedbu ekspresije SMO proteina u HGSC i zdravom tkivu jajovoda

	Usporedba HGSC u odnosu na zdravo tkivo jajovoda		
	Ukupna ekspresija	Citoplazmatska/membranska ekspresija	Nuklearna ekspresija
Vrijednost MWU testa	137.500	169.500	94.500
p vrijednost	0.088	0.742	0.010

Nuklearna ekspresija SMO proteina je bila statistički značajno veća u HGSC u odnosu na zdravo tkivo jajovoda ( $p=0.010$ ). Uspoređujući membransku/citoplazmatsku i

ukupnu ekspresiju SMO proteina ovih dviju skupina uzoraka nije pronađena statistički značajna razlika ( $p=0.742$ ,  $p=0.088$ ).

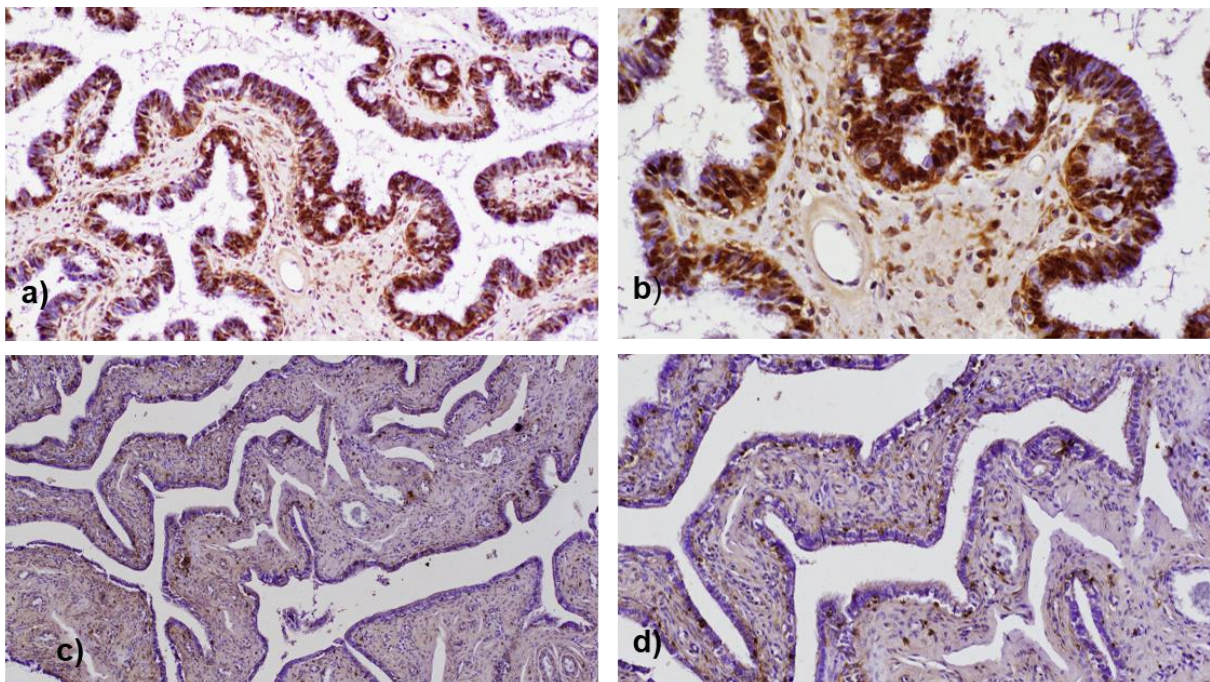
### 7.1.2. Usporedba ekspresije SMO proteina u LGSC i zdravom tkivu jajovoda

Tablica 5 Rezultati Mann-Whitney U (MWU) testa korištenog za usporedbu ekspresije SMO proteina u LGSC i zdravom tkivu jajovoda

	Usporedba LGSC u odnosu na zdravo tkivo jajovoda		
	Ukupna ekspresija	Citoplazmatska/membranska ekspresija	Nuklearna ekspresija
Vrijednost MWU testa	53.500	38.500	18.000
p vrijednost	0.967	0.230	0.003

Nuklearna ekspresija SMO proteina bila je statistički značajno veća u LGSC u odnosu na zdravo tkivo jajovoda ( $p=0.003$ ), za razliku od membranske/citoplazmatske i ukupne ekspresije ( $p=0.230$ ,  $p=0.967$ ).

Na *Slici 3* prikazan je primjer seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) s pozitivnim imunohistokemijskim nalazom koji se vidi isključivo jezgri, za



Slika 3 a) LGSC s isključivo nuklearnom ekspresijom SMO, povećanje 20x b) povećanje 40x c) kontrolno tkivo jajovoda, povećanje 10x d) kontrolno tkivo jajovoda, povećanje 20x

razliku od kontrolnog tkiva zdravih jajovoda koji pokazuju slabo imunohistokemijsko bojenje.

### 7.1.3. Usporedba ekspresije SMO proteina u LGSC i zdravom tkivu jajnika

Tablica 6 Rezultati Mann-Whitney U (MWU) testa korištenog za usporedbu ekspresije SMO proteina u LGSC i zdravom tkivu jajnika

	Usporedba LGSC u odnosu na zdravo tkivo jajnika		
	Ukupna ekspresija	Citoplazmatska/membranska ekspresija	Nuklearna ekspresija
Vrijednost MWU testa	5.000	50.500	40.000
p vrijednost	0.000	0.001	0.000

Ekspresija SMO proteina bila je statistički značajno veća u jezgri, membrani/citoplazmi i ukupno u LGSC u odnosu na zdravo tkivo jajnika ( $p=0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ).

### 7.1.4. Usporedba ekspresije SMO proteina u HGSC i LGSC

Tablica 7 Rezultati Mann-Whitney U (MWU) testa korištenog za usporedbu ekspresije SMO proteina u HGSC i LGSC

	Usporedba HGSC u odnosu na LGSC		
	Ukupna ekspresija	Citoplazmatska/membranska ekspresija	Nuklearna ekspresija
Vrijednost MWU testa	170.000	153.500	185.500
p vrijednost	0.026	0.030	0.189

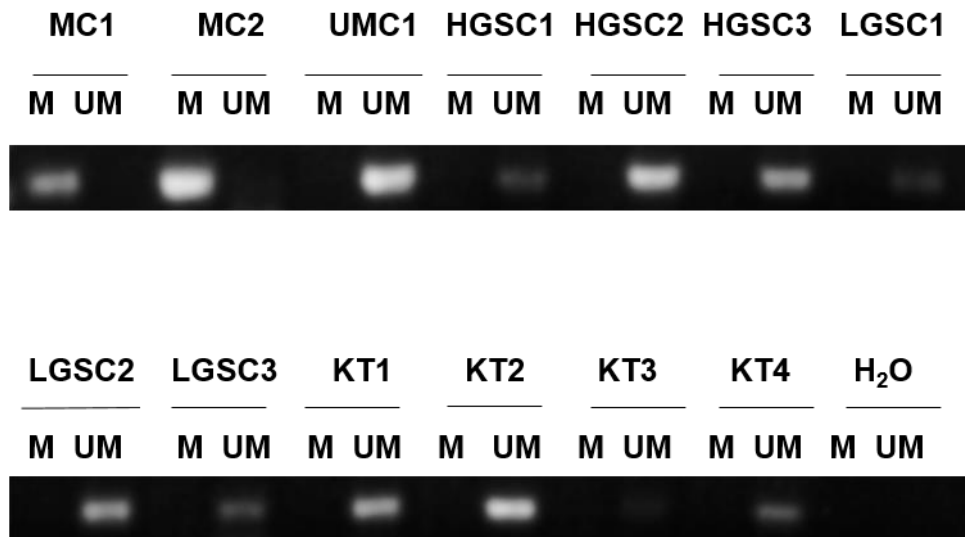
Uzorci HGSC pokazali su statistički značajno veću ukupnu i membransku/citoplazmatsku ekspresiju SMO proteina u odnosu na LGSC ( $p=0.026$ ,  $p=0.030$ ). Analizom nuklearne ekspresije nismo dobili statistički značajnu razliku između ove dvije skupine tumora ( $p=0.189$ ).



## 7.2. Rezultati analize metilacije promotora *SMO* gena

Promotor gena *SMO* bio je nemetiliran u svim analiziranim uzorcima: HGSC (n = 10), LGSC (n = 10), zdravo tkivo jajovoda (n = 9) i zdravo tkivo jajnika (n =20).

Na *Slici 4* prikazani su umnoženi fragmenti DNA na transluminatoru koji su dobiveni MSP-om. Vidljivo je kako su svi fragmenti DNA, osim metiliranih kontrola, nemetilirani.



*Slika 4* Primjer vizualizacije umnoženih fragmenata DNA dobivenih MSP-om. Vidljivo je da su vi uzorci, osim MC1 i MC2, nemetilirani.

MC- metilirana kontrola, UMC- nemetilirana kontrola, KT- kontrolni uzorak jajovoda

## 8. RASPRAVA

Aberantna aktivnost HH signalnog puta u podlozi je nastanka nekih malignoma u ljudi, a postoje dokazi o poremećaju funkcije ovog signalnog puta i u karcinomima jajnika (12,40). SMO, transmembranski koreceptor, je jedan od glavnih sudionika HH signalnog puta, a regulira ga protein PTCH1 (prema engl. *Patched*). U stanicama koje se ne dijele PTCH1 blokira aktivnost proteina SMO, no ako ga nema SMO postaje konstitutivno aktivan (30), stoga se logičnim nameće pitanje o SMO kao potencijalnom onkogenu. Danas na tržištu postoje antitumorski lijekovi, poput vismodegiba, čija se aktivnost temelji upravo na inhibiciji proteina SMO (12,25). Isto tako genetičke analize, koje se sve češće koriste u dijagnozi različitih bolesti, možda će u budućnosti omogućiti i raniju dijagnozu karcinoma jajnika, pod pretpostavkom da se rasvijetli genska osnova njegove maligne alteracije. Nadalje, dosada su jedino klinički stadij bolesti te veličina tumora bili nezavisni prognostički čimbenici karcinoma jajnika. Detekcija aktivnosti HH signalnog puta mogla bi, u pacijentica s karcinomom jajnika, postati prognostički faktor. Iz svega navedenog proizlazi kako bolje razumijevanje uloge HH signalnog puta u seroznim karcinomima jajnika potencijalno moglo dovesti do napretka u dijagnostici, liječenju i prognozi ovih tumora. Nažalost, rijetka su istraživanja u čijem je fokusu uloga gena i proteina SMO u seroznim karcinomima jajnika visokog i niskog stupnja malignosti (41–44). Štoviše, rezultati malobrojnih postojećih istraživanja su kontradiktorni, a produkt su vjerojatno malog broja uzoraka, kvalitete samih uzoraka, različitih metoda detekcije, ali i različitih standarda korištenih u definiranju aktivacije HH signalnog puta (42,43).

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti postoji li veća ekspresija SMO u stanicama seroznih karcinoma jajnika u usporedbi sa zdravim kontrolama. Naša pretpostavka je bila da će ekspresija proteina Smoothened, kao pozitivnog regulatora HH signalnog puta, biti izraženija u tumorima jajnika nego u zdravim kontrolama. S obzirom na to da su HGSC i LGSC dva posve različita kliničko-patološka entiteta, pretpostavili smo i da će ekspresija proteina Smoothened biti izraženija u tumorima jajnika visokog stupnja malignosti u usporedbi s tumorima niskog stupnja malignosti.

Naša je studija pokazala značajno veću ekspresiju SMO u HGSC i LGSC u odnosu na kontrolno tkivo zdravih jajovoda, no statistički značajna razlika uočena je samo u jezgri.

S druge strane LGSC je pokazao povećanu ekspresiju SMO u svim dijelovima stanice u odnosu na zdravo tkivo jajnika dok je veća ukupna i membranska-citoplazmatska ekspresija diferencirala HGSC od LGSC.

Zasada postoji samo nekoliko istraživanja koja izvještavaju o nuklearnoj ekspresiji membranskog proteina SMO. Rhaman i sur. uočili su prisutnost SMO u jezgri u kulturi mišjih stanica bazocelularnih karcinoma kože te postavili novu hipotezu kako bi upravo ta translokacija proteina SMO mogla biti uzrok rezistencije određenog broja tumora na njegove inhibitore koji se koriste u liječenju metastatskih i lokalno uznapredovalih bazocelularnih karcinoma (61). Oni predlažu i koncept novog nekanonskog puta aktivacije HH signalnog puta u kojem SMO ulazi u jezgru gdje aktivira GLI1 zasada nepoznatim mehanizmom (61). Niyaz i sur. u svom istraživanju objavljenom 2019. godine uočavaju nuklearnu ekspresiju SMO u stanicama karcinoma gušterače i debelog crijeva (62). Čini se kako nuklearna ekspresija proteina SMO u tumorskim stanicama otvara novi pogled na razumijevanje molekularne patologije ljudskih karcinoma u kojem signalni put HH igra određenu ulogu.

Uzorci jajovoda u usporedbi s uzorcima LGSC pokazali su isti obrazac kao i uzorci jajovoda u usporedbi s HGSC, a to je razlika u nuklearnoj ekspresiji SMO. S druge strane zdravo tkivo jajnika razlikovalo se od LGSC u ekspresiji SMO na svim subcelularnim razinama što bi moglo govoriti u prilog teoriji kako ovi karcinomi ipak ne nastaju iz pokrovnog epitela jajnika, već jajovoda (63–65).

Razlika u jačini ekspresije nuklearnog SMO, koja je bila veća u HGSC u odnosu na LGSC, otvara vrata pretpostavci da je ekspresija SMO povezana s agresivnijim oblikom karcinoma, sklonijeg metastaziranju.

Prve epigenetske promjene u ljudskim karcinomima opisane su još 1983. godine i podrazumijevale su globalnu DNA hipometilaciju u genomu različitih karcinoma u usporedbi s netumorskim tkivom (66). Uslijedila su istraživanja koja su potvrdila ovo otkriće, a pokazalo se kako je globalna hipometilacija DNA prisutna u gotovo svakoj vrsti tumora (67–70). Kasnije se uvidjelo kako je u karcinomima prisutna i suprotna epigenetska promjena, DNA hipermetilacija promotora tumor supresor gena (71–76). Na taj način dolazi do smanjene transkripcije i sinteze produkata tumor supresor gena što onda rezultira nekontroliranom proliferacijom stanica. S druge strane hipometilacija protoonkogeni znatno je rjeđa pojava od hipermetilacije



(67,75,77–79), no ipak postoje karcinomi u kojima je ova promjena kritični trenutak u malignoj alteraciji (80). Na primjer, gen za urokinazu je hipometiliran, a njegov produkt pojačano izražen u karcinomima dojke ovisno o stadiju te u karcinomima prostate (81,82). U EOC također postoje geni s karakterističnim obrascem metilacije (83) koji bi mogli imati ulogu u klasifikaciji (50), progresiji (51) i odgovoru na terapiju (52). Postoje naznake kako je promjena u metilaciji DNA genska osnova koja dovodi do poremećaja i u funkciji HH signalnog puta (84). Zbog toga smo htjeli ispitati metilaciju promotora *SMO* gena u kohorti seroznih karcinoma jajnika kao i u zdravim kontrolama. Očekivali smo da bi promotor gena *SMO* mogao biti hipometiliran u stanicama karcinoma jajnika u odnosu na zdravo tkivo jajnika, odnosno jajovoda. Analiza MSP-om provedena u ovom istraživanju pokazala je da je promotor gena *SMO* nemetiliran kako u tkivu karcinoma tako i u tkivu zdravih kontrola što navodi na zaključak da DNA metilacija nije regulatorni mehanizam ekspresije gena *SMO* u seroznim karcinomima jajnika. Budući da je metilacija DNA samo jedan od oblika epigenetske kontrole genske ekspresije, istraživanje bi trebalo nastaviti analizom acetilacije i metilacije histona kao i malih interferirajućih DNA molekula koje mogu utjecati na izražaj gena *SMO*. Stoga je ova studija tek početak istraživanja s ciljem da se ona proširi kako na veći broj analiziranih tumora tako i niz drugih molekularno bioloških metoda kojima ćemo provjeriti zadanu hipotezu.

## 9. ZAKLJUČCI

Nakon provedene imunohistokemijske analize ekspresije SMO proteina i analize promotora gena *SMO* u definiranoj kohorti seroznih karcinoma jajnika i kontrola došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Nuklearna ekspresija proteina SMO u HGSC je statistički značajno veća u odnosu na zdravo tkivo jajovoda.
2. Nuklearna ekspresija proteina SMO u LGSC je statistički značajno veća u odnosu na zdravo tkivo jajovoda.
3. Ukupna, membranska i citoplazmatska te nuklearna ekspresija SMO je statistički značajno veća u LGSC u odnosu na zdravo tkivo jajnika.
4. Ukupna te membranska i citoplazmatska ekspresija SMO je statistički značajno veća u HGSC u odnosu na LGSC.
5. Promotor gena *SMO* je nemetiliran kako u seroznim karcinomima tako i u zdravom tkivu jajovoda i jajnika, stoga smatramo da DNA metilacija nije regulatorni mehanizam ekspresije gena *SMO* u seroznim karcinomima jajnika.

Potrebna su daljnja istraživanja koja će rasvijetliti klinički značaj ovih otkrića.

## 10. ZAHVALE

Hvala mentoru prof. dr. sc. Ratku Matijeviću, dr. med. i prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, dr. med. što su me svojim stručnim savjetima i nesebičnom podrškom uveli u svijet znanosti i pratili na dugom putu stvaranja ovog diplomskog rada.

Neizmjereno sam zahvalan asistentici Valentini Karin Kujundžić, mag. mol. biol. na velikom trudu koji je uložila da me upozna s metodama molekularne biologije kao i na mnogim prijateljskim savjetima i riječima ohrabrenja koji su mi olakšali rad u laboratoriju.

Hvala prof. dr. sc. Semiru Vraniću, dr. med. i doc. dr. sc. Aniti Škrtić, dr. med. na histološkoj analizi preparata, kao i na visokokvalitetno snimljenim fotografijama koje sam, zahvaljujući profesoru Vraniću, imao prilike prezentirati u ovom radu.

Hvala Mariani Dragojević, ing. med. lab. dg. na rezanju i pripremi preparata za histološko bojenje i DNA izolaciju.

Zahvaljujem se asistentici Tihani Marić, mag. mol. biol. i svim ostalim članovima laboratorija koji su mi pomagali u rješavanju svakodnevnih problema s kojima se osoba u laboratoriju susreće.

Na kraju, hvala mojoj obitelji na ljubavi, potpori i strpljenju čime su mi uvelike olakšali i uljepšali cjelokupni studentski život.

## 11. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo Registar za rak Republike Hrvatske Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Šekerija M, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo;2018 [pristupljeno 10.1.2019.]. Dostupno na: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten\\_2015\\_rak\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf)
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019;69(1):7–34. Dostupno na: <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
3. Das PM, Bast Jr RC. Early detection of ovarian cancer. *Biomark Med*. 2008;2(3):291–303.
4. Cannistra SA. Cancer of the Ovary. *N Engl J Med*. 2004;351(24):2519–29.
5. Kurman RJ, Shih I-M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016;186(4):733–47.
6. Carcangiu ML, Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. [Internet]. International Agency for Research on Cancer; 2014 [pristupljeno 19.3.2019.]. str. 309 Dostupno na: <https://shop.iarc.fr/products/classification-of-tumours-of-female-reproductive-organs?variant=7964963438640>
7. Vinay Kumar, Abul K. Abbas JCA. The Female Genital Tract. In: *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2015. str. 992–1042.
8. Ciucci A, Zannoni GF, Buttarelli M, Martinelli E, Mascilini F, Petrillo M, i sur. Ovarian low and high grade serous carcinomas: hidden divergent features in the tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2016;7(42):68033–43.
9. Lawrenson K, Mhaweche-Fauceglia P. Precursors of Low-Grade Serous Adenocarcinoma of the Ovary: Pathology and Molecular Pathways. In: *Precancerous Lesions of the Gynecologic Tract*. Cham: Springer International Publishing; 2016. str. 23–34.
10. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*. 2013;24(Suppl 10):S16–21.
11. Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol*. 2012;23(Suppl 10):S111–7.
12. Ana Marija Skoda, Dora Simovic, Valentina Karin, Vedran Kardum, Semir Vranic LS, Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, i sur. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci* 18(1):8-20.
13. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795–801.

14. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* . 2008;22(18):2454–72.
15. Kar S, Deb M, Sengupta D, Shilpi A, Bhutia SK, Patra SK. Intricacies of hedgehog signaling pathways: A perspective in tumorigenesis. *Exp Cell Res*. 2012;318(16):1959–72.
16. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet*. 2006;7:841.
17. Cohen Jr. MM, Cohen MM. Hedgehog signaling update. *Am J Med Genet Part A*. 2010;152A(8):1875–914.
18. Denef N, Neubüser D, Perez L, Cohen SM. Hedgehog Induces Opposite Changes in Turnover and Subcellular Localization of Patched and Smoothed. *Cell*. 2000;102(4):521–31.
19. Motoyama J, Takabatake T, Takeshima K, Hui C. Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat Genet*. 1998;18(2):104–6.
20. Hui C-C, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL. Expression of Three Mouse Homologs of the Drosophila Segment Polarity Gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in Ectoderm- and Mesoderm-Derived Tissues Suggests Multiple Roles during Postimplantation Development. *Dev Biol*. 1994;162(2):402–13.
21. Yoon JW, Liu CZ, Yang JT, Swart R, Iannaccone P, Walterhouse D. GLI activates transcription through a herpes simplex viral protein 16-like activation domain. *J Biol Chem*. 1998;273(6):3496–501.
22. Xie J, Bartels CM, Barton SW, Gu D. Targeting hedgehog signaling in cancer: research and clinical developments. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1425–35.
23. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, i sur. Mutations of the Human Homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996;85(6):841–51.
24. GORLIN RJ. Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 1987;66(2):98-113.
25. Meiss F, Andrlová H, Zeiser R. Vismodegib. In: *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2018 [pristupljeno 24.3.2019.]. str. 125–39. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30069764>
26. Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M, Hooper JE. The Drosophila smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*. 1996;86(2):221–32.
27. Rana R, Carroll CE, Lee H-J, Bao J, Marada S, Grace CRR, i sur. Structural insights into the role of the Smoothed cysteine-rich domain in Hedgehog signalling. *Nat Commun*. 2013;4:2965.

28. Nusse R, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development*. 2003;130(22):5297–305.
29. Su H-Y, Lai H-C, Lin Y-W, Chou Y-C, Liu C-Y, Yu M-H. An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2009;124(2):387–93.
30. Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Hedgehog Signal Transduction: From Flies to Vertebrates. *Exp Cell Res* 1999;253(1):25–33.
31. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001;15(23):3059–87.
32. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*. 1996;384(6605):129–34.
33. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*. 2002;418(6900):892–6.
34. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP. Repression of smoothed by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol*. 2006;4(8):e232.
35. Jia J, Tong C, Wang B, Luo L, Jiang J. Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature*. 2004;432(7020):1045–50.
36. Keeler RF, Binns W. Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). I. Preparation and characterization of fractions and alkaloids for biologic testing. *Can J Biochem*. 1966;44(6):819–28.
37. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev*. 2002;16(21):2743–8.
38. Odom D, Mladsı D, Purser M, Kaye JA, Palaka E, Charter A, et al. A Matching-Adjusted Indirect Comparison of Sonidegib and Vismodegib in Advanced Basal Cell Carcinoma. *J Skin Cancer*. 2017;2017:6121760.
39. Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons K V, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell*. 2010;17(4):388–99.
40. Xie J. Implications of hedgehog signaling antagonists for cancer therapy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(7):670–80.
41. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, Wang E, Patra S, Shridhar V, et al. Role of Hedgehog Signaling in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7659–66.
42. Yang L, He J, Huang S, Zhang X, Bian Y, He N, et al. Activation of hedgehog signaling is not a frequent event in ovarian cancers. *Mol Cancer*. 2009;8:112.

43. Song X, Yan L, Lu C, Zhang C, Zhu F, Yang J, i sur. Activation of hedgehog signaling and its association with cisplatin resistance in ovarian epithelial tumors. *Oncol Lett.* 2018;15(4):5569–76.
44. Chen Y, Bieber MM, Teng NNH. Hedgehog signaling regulates drug sensitivity by targeting ABC transporters ABCB1 and ABCG2 in epithelial ovarian cancer. *Mol Carcinog.* 2013;53(8).
45. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhataar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009;23(7):781–3.
46. Maradeo ME, Cairns P. Translational application of epigenetic alterations: Ovarian cancer as a model. *FEBS Lett.* 2011;585(13):2112–20.
47. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415–28.
48. Balch C, Fang F, Matei DE, Huang TH-M, Nephew KP. Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer. *Endocrinology.* 2009;150(9):4003–11.
49. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.* 2006;6(2):107–16.
50. Barton CA, Hacker NF, Clark SJ, O'Brien PM. DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol.* 2008;109(1):129–39.
51. Wei SH, Chen C-M, Strathdee G, Harnsomburana J, Shyu C-R, Rahmatpanah F, i sur. Methylation Microarray Analysis of Late-Stage Ovarian Carcinomas Distinguishes Progression-free Survival in Patients and Identifies Candidate Epigenetic Markers. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2246-52.
52. Wei SH, Balch C, Paik HH, Kim Y-S, Baldwin RL, Liyanarachchi S, i sur. Prognostic DNA Methylation Biomarkers in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(9):2788–94.
53. Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. The Acquisition of *hMLH1* Methylation in Plasma DNA after Chemotherapy Predicts Poor Survival for Ovarian Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10(13):4420-26.
54. Collins Y, Dicioccio R, Keitz B, Lele S, Odunsi K. Methylation of death-associated protein kinase in ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(Suppl 1):S195-99.
55. de Caceres II, Battagli C, Esteller M, Herman JG, Dulaimi E, Edelson MI, i sur. Tumor Cell-Specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal Fluid from Ovarian Cancer Patients. *Cancer Res.* 2004;64(18):6476-81.
56. Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Hu W, Rotmensch J, i sur. Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* 2011;120(1):113–20.

57. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426–37.
58. Gloss BS, Samimi G. Epigenetic biomarkers in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2014;342(2):257–63.
59. Clarke-Pearson DL. Screening for Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(2):170–7.
60. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, i sur. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol*. 2012;7:42.
61. Rahman MM, Hazan A, Selway JL, Herath DS, Harwood CA, Pirzado MS, i sur. A Novel Mechanism for Activation of GLI1 by Nuclear SMO That Escapes Anti-SMO Inhibitors. *Cancer Res*. 2018;78(10):2577-88.
62. Niyaz M, Khan MS, Wani RA, Shah OJ, Besina S, Mudassar S. Nuclear localization and Overexpression of Smoothed in Pancreatic and Colorectal Cancers. *J Cell Biochem*. 2019;120(7):11941–8.
63. Laury AR, Ning G, Quick CM, Bijron J, Parast MM, Betensky RA, i sur. Fallopian tube correlates of ovarian serous borderline tumors. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(12):1759–65.
64. Li J, Abushahin N, Pang S, Xiang L, Chambers SK, Fadare O, i sur. Tubal origin of ‘ovarian’ low-grade serous carcinoma. *Mod Pathol*. 2011;24(11):1488-99.
65. Wang Y, Hong S, Mu J, Wang Y, Lea J, Kong B, i sur. Tubal Origin of “Ovarian” Low-Grade Serous Carcinoma: A Gene Expression Profile Study. *J Oncol*. 2019;2019:1-9.
66. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, i sur. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*. 1983;11(19):6883–94.
67. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002;21(35):5400–13.
68. Brothman AR, Swanson G, Maxwell TM, Cui J, Murphy KJ, Herrick J, i sur. Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;156(1):31–6.
69. Seifert H-H, Schmiemann V, Mueller M, Kazimirek M, Onofre F, Neuhausen A, i sur. In situ detection of global DNA hypomethylation in exfoliative urine cytology of patients with suspected bladder cancer. *Exp Mol Pathol*. 2007;82(3):292–7.
70. Cadieux B, Ching T-T, VandenBerg SR, Costello JF. Genome-wide Hypomethylation in Human Glioblastomas Associated with Specific Copy Number Alteration, Methylenetetrahydrofolate Reductase Allele Status, and Increased Proliferation. *Cancer Res*. 2006;66(17):8469-76.



71. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, i sur. E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Hypermethylation in Human Breast and Prostate Carcinomas. *Cancer Res.* 1995;55(22):5195-9.
72. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA Hypermethylation of Multiple Genes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* 1999;59(15):3730-40.
73. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, i sur. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000;24(2):132-8.
74. Issa J-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(12):988-93.
75. Pfeifer GP, Rauch TA. DNA methylation patterns in lung carcinomas. *Semin Cancer Biol.* 2009;(3):181-7.
76. Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lübbert M, i sur. Susceptibility of Nonpromoter CpG Islands to De Novo Methylation in Normal and Neoplastic Cells. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2001;93(19):1465-72.
77. Morey SR, Smiraglia DJ, James SR, Yu J, Moser MT, Foster BA, i sur. DNA Methylation Pathway Alterations in an Autochthonous Murine Model of Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2006;66(24):11659-67. t
78. Hoffmann MJ, Schulz WA. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol.* 2005;83(3):296-321.
79. Rauch TA, Zhong X, Wu X, Wang M, Kernstine KH, Wang Z, i sur. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(1):252-7.
80. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics.* 2009;1(2):239-59.
81. Pakneshan P, Têtu B, Rabbani SA. Demethylation of Urokinase Promoter as a Prognostic Marker in Patients with Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(9):3035-41.
82. Pulukuri SMK, Estes N, Patel J, Rao JS. Demethylation-linked activation of urokinase plasminogen activator is involved in progression of prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67(3):930-9.
83. Bodelon C, Killian JK, Sampson JN, Anderson WF, Matsuno R, Brinton LA, i sur. Molecular classification of epithelial ovarian cancer based on methylation profiling: evidence for survival heterogeneity. *Clin Cancer Res.* 2019 May 29. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3720. [Epub ahead of print]
84. Cretnik M, Musani V, Oreskovic S, Leovic D, Levanat S. The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. *Int J Mol Med.* 2007;19(6):875-83.

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1994. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole i osnovne glazbene škole pohađao sam opću gimnaziju i srednju glazbenu školu u Zagrebu. U Glazbenom učilištu Elly Bašić maturirao sam 2012. godine. 2013. godine maturirao sam u II. gimnaziji te sam iste godine upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnik sam Dekanove nagrade za postignut uspjeh u akademskoj godini 2013./2014. Korisnik sam stipendije grada Zagreba za izvrsnost.