

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Petra Leko

Ekspresija gena *HNF1A*  
u hepatocelularnom karcinomu

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Korać. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Posebno zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Petri Korać na svim stručnim savjetima, trudu i strpljenju koje mi je ukazala prilikom izrade eksperimentalnog i pisanog dijela rada.

Također zahvaljujem mag. biol. mol. Mariji Klasić na svim savjetima i pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada.

Puno hvala teti Romani na velikoj pomoći.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## EKSPRESIJA GENA *HNF1A* U HEPATOCELULARNOM KARCINOMU

Petra Leko

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hepatocelularni karcinom (HCC) je primarni maligni tumor jetre. Unatoč dostupnosti različitih terapija, bolest se ponovno vraća u približno 80% slučajeva, a u uznapredovanom stadiju bolesti izbor terapije je limitiran. Poboljšanje razumijevanja molekularne osnove karcinogeneze HCC-a osnova je za poboljšanje razvoja efikasnijih terapija. HCC-u u velikom broju slučajeva prethodi ciroza. Oba ova stanja nastaju kao posljedica promjene ekspresije brojnih gena od kojih je barem dio reguliran transkripcijskim aktivatorom hepatocita HNF1 $\alpha$ . Gen *HNF1A* ključan je za održavanje funkcije jetre budući da regulira ekspresiju mnogih gena uključenih u procese proliferacije, angiogeneze, epitelno-mezenhimske tranzicije, fukozilacije te glikolize, lipogeneze i glukoneogeneze. Utišana ekspresija gena *HNF1A* povezana je s deregulacijom tih signalnih putova što je dovelo do pretpostavke da bi mogla biti povezana i s nastankom i progresijom HCC-a. Kako bi se utvrdila potencijalna razlika u razini ekspresije gena *HNF1A* iz uzoraka tumorskog tkiva HCC-a i okolnog tkiva jetre koje u najvećem broju slučajeva predstavlja cirozu, izolirana je RNA te reverznom transkripcijom prevedena u cDNA. Razina ekspresije gena određena je lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu, a dobiveni podaci analizirani su u odnosu na podatke o razvoju i progresiji bolesti dostupne za navedenu skupinu ispitanika. Dobiveni rezultati pokazuju da ne postoji značajna razlika u razini ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom tkivu i u okolnom tkivu jetre, sugerirajući da promjena ekspresije gena nije uključena u razvoj HCC-a iz predkarcinomskog stadija.

41 stranica, 2 slike, 2 tablice, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: hepatocelularni karcinom, *HNF1A*, ciroza,  $\alpha$ -fetoprotein

Voditelj: dr.sc. Petra Korać, doc.

Ocjenitelji: dr.sc. Petra Korać, doc., dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, prof., dr.sc. Martina

Šeruga Musić, doc.

Rad prihvaćen: 18.2.2015.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

## EXPRESSION OF THE GENE *HNFI A* IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Petra Leko

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary malignancy of the liver. Despite the multiple treatment options the recurrence of the disease is about 80 % and in advanced stages treatment options are limited. Understanding the underlying molecular mechanisms of carcinogenesis of HCC is the basis for improving the development of more effective therapies. In many cases HCC is preceded by cirrhosis. Both of these conditions result from changes in the expression levels of many genes, part of which are regulated by the hepatocyte transcriptional activator HNF1 $\alpha$ . The gene *HNFI A* is essential for maintaining liver function, since it regulates the expression of many genes involved in the processes of cell proliferation, angiogenesis, epithelial to mesenchymal transition, fucosylation, glycolysis, lipogenesis and gluconeogenesis. Decreased expression of *HNFI A* is associated with deregulation of these signaling pathways which leads to the hypothesis that it could be associated with the development and progression of HCC. In order to evaluate potential differences of *HNFI A* expression levels in tumor tissue and surrounding liver tissue which, in most cases represent cirrhosis, RNA was isolated from tissue samples of patients diagnosed with HCC and converted to cDNA by reverse transcription. The level of gene expression was determined by quantitative real time polymerase chain reaction. The obtained data were analyzed in relation to information about the development and progression of the disease, available for patients included in this study. The results showed that there is no significant difference in the level of *HNFI A* expression in tumor tissue and surrounding tissue of the liver, suggesting that the change in *HNFI A* expression is not one of the key steps involved in development of HCC from precancerous tissue.

41 pages, 2 figures, 2 tables, 70 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: hepatocellular carcinoma, *HNFI A*, cirrhosis,  $\alpha$ -fetoprotein

Supervisor: Dr. Petra Korać, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Petra Korać, Asst. Prof., Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof., Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 18.2.2015.

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Hepatocelularni karcinom.....	1
1.2.	Gen <i>HNF1A</i> .....	5
1.2.1.	Uloga gena <i>HNF1A</i> u regulaciji proliferacije.....	8
1.2.2.	Uloga gena <i>HNF1A</i> u kontroli metabolizma jetre.....	11
1.2.3.	Uloga gena <i>HNF1A</i> u angiogenezi i epitelno-mezenhimskej tranziciji .....	11
1.2.4.	Uloga gena <i>HNF1A</i> u fukozilaciji .....	13
2.	Hipoteza i cilj istraživanja.....	16
2.1.	Hipoteza .....	16
2.2.	Cilj istraživanja .....	16
3.	Materijali i metode .....	17
3.1.	Materijali.....	17
3.1.1.	Uzorci tkiva .....	17
3.2.	Metode .....	18
3.2.1.	Izolacija RNA.....	18
3.2.2.	Reverzna Transkripcija.....	18
3.2.3.	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....	19
3.2.4.	Statistička obrada podataka .....	20
4.	Rezultati .....	22
4.1.	Koncentracija RNA.....	22
4.2.	Kvaliteta cDNA uzoraka.....	24
4.3.	Razina ekspresije gena <i>HNF1A</i> u tumorskom i okolnom tkivu .....	24
4.4.	Povezanost razine ekspresije gena <i>HNF1A</i> u tumorskom i okolnom tkivu s ostalim markerima patobiologije tumora.....	27
5.	Diskusija.....	29
6.	Zaključci.....	33
7.	Literatura .....	34
8.	Prilozi .....	41
9.	Životopis	

## Popis kratica

AFB1 - aflatoksin B1, od engl. *aflatoxin B1*

AFP -  $\alpha$ -fetoprotein, od engl. *alpha-fetoprotein*

BA - žučna kiselina, od engl. *bile acid*

BCLC - kriteriji za određivanje razvojnog stadija tumora jetre iz klinike iz Barcelone, od engl. *Barcelona Clinic Liver Cancer*

BMI - indeks tjelesne mase, od engl. *body mass indeks*

CDK - kinaza ovisna o ciklinu, od engl. *cyclin-dependent kinase*

CYP1B1 - citokrom p450 1B1, od engl. *cytochrome p450 1B1*

eEF1A2 - elongacijski faktor 1 $\alpha$  2, od engl. *elongation factor 1-alpha 2*

EMT - epitelno-mezenhimska tranzicija, od engl. *epithelial to mesenchymal transition*

ERBB2- receptor tirozinskih proteinskih kinaza, od engl. *receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*

FUT - fukoziltransferaza, od engl. *fucosyltransferase*

FXR - receptor X farnezoida, od engl. *farnesoid X receptor*

GlcNAc - N-acetilglukozamin, od engl. *N-acetylglucosamine*

GnT-5 - N-acetilglukozaminil transferaza 5, od engl. *N-acetylglucosaminyltransferase V*

HBV - virus hepatitisa B, od engl. *hepatitis B virus*

HCA - hepatocelularni adenom, od engl. *hepatocellular adenoma*

HCC - hepatocelularni karcinom, od engl. *hepatocellular carcinoma*

HCV - virus hepatitisa C, od engl. *hepatitis C virus*

HHC - hemokromatoza, od engl. *haemochromatosis*

HNF1 $\alpha$  - nuklearni faktor 1 $\alpha$  hepatocita, engl. *hepatocyte nuclear factor 1 –alpha*

HNF1 $\beta$  - nuklearni faktor 1 $\beta$  hepatocita, od engl. *hepatocyte nuclear factor 1-beta*

HSC - hepatoholangiocelularni karcinom, od engl. *hepatocholangiocellular carcinoma*

LOH - gubitak heterozigotnosti, od engl. *loss of heterozygosity*

MMP - enzim iz obitelji metaloproteaza matriksa, od engl. *matrix metalloproteinase*

MODY3 - adultni tip diabetesa kod mladih osoba tipa 3, od engl. *maturity-onset diabetes of the young-3*

mTOR - ciljana molekula rapamicina u sisavaca, od engl. *mammalian target of rapamycin*

NAFLD - nealkoholna bolest masnih kiselina, od engl. *nonalcoholic fatty liver disease*

NASH - nealkoholni steatohepatitis, od engl. *nonalcoholic steatohepatitis*

PDGFA - podjedinica A trombocitnog faktora rasta, od engl. *platelet-derived growth factor subunit A*

PDGFB - podjedinica B trombocitnog faktora rasta, od engl. *platelet-derived growth factor subunit B*

PEI - perkutana injekcija etanola, od engl. *percutaneous ethanol injection*

PKB - proteinska kinaza B, od engl. *protein kinase B*

RFA - ablacija radiofrekvencijom, od engl. *radiofrequency ablation*

SHP - mali partner heterodimera, od engl. *small heterodimer partner*

siRNA - mala interferirajuća RNA, od engl. *small interfering RNA*

SNAI - protein cinkova prsta, od engl. *zinc finger protein SNAI*

TACE - transarterijalna kemoembolizacija, od engl. *trans-arterial chemoembolization*

TGF $\beta$  - transformirajući faktor rasta  $\beta$ , od engl. *transforming growth factor beta*



# 1. Uvod

## 1.1. Hepatocelularni karcinom

Primarni tumori jetre su heterogene, histološki različite hepatičke neoplazme, koje karakterizira abnormalna proliferacija stanica (proces brzog umnažanja i povećanja broja stanica). Hepatocelularni karcinom (HCC, od engl. *hepatocellular carcinoma*) je zloćudni tumor jetre koji se razvija iz epitelnih stanica (hepatocita), a sačinjava 80-90% primarnih tumora jetre. HCC je jedan od najčešćih solidnih tumora u svijetu, peti po učestalosti, a uz to je i treći najčešći uzrok smrti povezanih s tumorima (El-Serag i Rudolph 2007).

HCC ima nekoliko zanimljivih epidemioloških značajki kao što su varijacije učestalosti bolesti ovisno o spolu, dobi, geografskoj regiji, etničkoj skupini i izloženosti faktorima rizika. U skoro svim populacijama muškarci dva do četiri puta češće obolijevaju od žena (El-Serag i Rudolph 2007). Pretpostavlja se da je uzrok tome razlika u indeksu tjelesne mase (BMI, od engl. *body mass indeks*) te razlika u količini androgenih hormona čiji je utjecaj na razvoj HCC-a dokazan na miševima (Rudolph i sur. 2000). Učestalost HCC-a kod muškaraca stoga dosegne vrhunac između 60. i 65. godine života, dok je kod žena učestalost najviša između 65. i 70. godine. Većina slučajeva HCC-a (više od 80%) zabilježena je u subsaharskoj Africi i Istočnoj Aziji. Iako je nakon početka korištenja cjepiva protiv virusa hepatitisa B (HBV, od engl. *hepatitis B virus*), faktor rizika razvoja HCC-a koji je jako raširen u tom području, primijećena smanjena incidencija, HCC ostaje veliki problem. Suprotno tome, u Americi te zemljama Europe i Oceanije koje imaju nisku učestalost bolesti, primijećen je rastući trend incidencije, vrlo vjerojatno povezan s povećanom incidencijom infekcija virusom hepatitisa C (HCV, od engl. *hepatitis C virus*). Distribucija faktora rizika značajno varira ovisno o regiji. Tako su, na primjer, kronična HBV infekcija i izloženost aflatoksinu B1 (AFB1, od engl. *aflatoxin B1*, toksin s mutagenim svojstvima kojega kao sekundarni metabolit proizvodi gljivica *Aspergillus flavus*; često se razvija na hrani koja je izložena toplim i vlažnim uvjetima) dominantni faktori rizika u regijama s visokom incidencijom bolesti (Afrika i Azija), dok je kronična HCV infekcija glavni faktor rizika u Japanu, Sjevernoj Americi i Europi. Sama učestalost bolesti dodatno se razlikuje unutar različitih etničkih skupina koje žive na istom području, što je vrlo vjerojatno posljedica različite predispozicije. HBV je najučestaliji osnovni uzrok HCC-a; povećava rizik za razvoj HCC-a 5-15 puta u odnosu na opću populaciju (El-Serag i Rudolph 2007). HBV je pararetrovirus (parcijalno dvolančani

DNA virus koji se replicira pomoću RNA intermedijera) porodice *Hepadnaviridae*. Hepatokarcinogeneza HBV-a uključuje virusnu integraciju u genom domaćina (povezana je s mikrolecijama DNA domaćina), indukciju oksidativnog stresa vezanjem za endoplazmatski retikulum (oštećuje stanične komponente) te aktivaciju ekspresije gena koji kontroliraju stanični rast, ali i inhibiciju staničnog tumorskog proteina p53 (od engl. *cellular tumor antigen p53*, protein zadužen za regulaciju stanične proliferacije i apoptoze; kodira ga *TP53*, od engl. *tumor protein p53*) putem specifičnih virusnih proteina. Kao rezultat aktivacije imunološkog odgovora HBV izaziva kroničnu aktivnu infekciju - hepatitis (nastaje kao posljedica ponavljajućih ciklusa nekroze hepatocita, povećanja upale i regeneracije hepatocita) (Farazi i DePinho 2006). Rizik razvoja HCC-a povećan je kod pacijenata s većom razinom replikacije HBV-a (visok broj kopija DNA virusa s više od 100 000 kopija/mL krvi) te ukoliko postoji i drugi, dodatni faktor rizika. Drugi najučestaliji faktor rizika je HCV (El-Serag i Rudolph 2007), jednolančani RNA virus porodice *Flaviviridae*. HCV izaziva slične biološke procese kao i HBV, s razlikom da HCV ima sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina čime efikasnije izaziva kroničnu infekciju (u čak 60-80% slučajeva), zbog čega ima i veću mogućnost poticanja razvoja ciroze jetre. Kao i kod HBV-a, ciklusi smrti i regeneracije hepatocita omogućavaju kontekst za stvaranje i akumulaciju mutacija, premda sam mehanizam infekcije HCV-om nije u potpunosti jasan. 20% osoba s HCV infekcijom razvije cirozu, dok približno 2,5% osoba razvije HCC (Farazi i DePinho 2006). Uz HCV je često prisutna i velika potrošnja alkohola (50-70 g/danu u dužem periodu), koja je i zaseban faktor rizika za razvoj HCC-a (El-Serag i Rudolph 2007). Uz kroničnu izloženost etanolu, proupalni citokini, kao i kod virusne infekcije, uzrokuju cikluse nekroze i regeneracije hepatocita te aktivaciju oksidativnog stresa, što u konačnici može rezultirati razvojem ciroze i HCC-a (Farazi i DePinho 2006). Osim kronične infekcije virusima HBV i HCV te velike potrošnje alkohola, neki drugi faktori rizika su i izloženost toksinu AFB1, nealkoholna bolest masnih kiselina (NAFLD, od engl. *nonalcoholic fatty liver disease*) koja uključuje nealkoholni steatohepatitis (NASH, od engl. *nonalcoholic steatohepatitis*), dijabetes, prekomjerna debljina, određene metaboličke bolesti kao što je nasljedna hemokromatoza (HHC od engl. *haemochromatosis*), pušenje, upotreba oralnih kontraceptiva, prehrana i slično (El-Serag i Rudolph 2007).

Većina faktora rizika je uzrok kronične upale jetre koja, nakon dužeg perioda latencije (10-20 godina) popraćene kontinuiranim oštećenjem jetre, najčešće vodi razvoju i progresiji ciroze. Ciroza jetre je patološko stanje koje karakteriziraju fibrozni ožiljci jetre. Fibrozni

ožiljci nastaju zbog prekomjerne akumulacije kolagena kojeg luče okolne, zvjezdaste stanice (od engl. *stellate cells*) u oštećenoj jetri (Farazi i DePinho 2006). Ciroza, bilo kojeg podrijetla, smatra se predkarcinomskim stanjem HCC-a zbog svoje česte povezanosti s pojavljivanjem HCC-a; prisutna je kod 70-90% pacijenata s HCC-om (El-Serag 2011). Postoje tri osnovna mehanizma kojima stanje ciroze može ubrzati tumorigenezu. Prvi mehanizam uključuje smanjen potencijal regeneracije hepatocita. Kako cirozu karakterizira smanjen potencijal proliferacije, samo se abnormalno proliferirajući hepatociti uspijevaju dijeliti u okolišu koji inhibira rast, povećavajući broj takvih abnormalnih hepatocita. Regeneraciju hepatocita limitiraju i kratke telomere u stanicama cirozne jetre (telomere se prilikom kronične upale ubrzano skraćuju). Takve stanice zaustavljaju stanični ciklus i ulaze u proces starenja ili apoptoze, ali disfunkcionalne stanice mogu aktivirati proteine popravka DNA i uzrokovati kromosomske fuzije (El-Serag i Rudolph 2007), što korelira s povećanom aneuploidijom u hepatocitima HCC-a (Plentz i sur. 2005). Također se smatra da HCC nastaje nakon ciroze pod utjecajem okoliša; to je efekt poznat kao „*carcinoma field effect*“. Promjene mikrookoliša (lokalni faktori jetre) i makrookoliša (sistemske faktori) u cirozi aktiviraju zvjezdaste stanice koje luče proteine ekstracelularnog matriksa, citokine koji potiču upalni odgovor, faktore rasta i produkte oksidativnog stresa, odnosno faktore koji su povezani s razvojem HCC-a (El-Serag i Rudolph 2007). Cirozno tkivo povećava svoju količinu, odnosno razvija hiperplastične nodule s normalnim citološkim osobinama, s tim da takve lezije lako prelaze u displastične, abnormalno razvijene nodule. Pod utjecajem genetičkih i epigenetičkih promjena ključnih protoonkogenih i tumor supresorskih gena displastični noduli prelaze u HCC (Farazi i DePinho 2006). Neke od tih genetičkih promjena specifične su za etiologiju HCC-a, naročito HBV infekciju koja često inducira kromosomsku ili insercijsku mutagenozu (Boyault i sur. 2007).

Kao i kod drugih solidnih tumora, u HCC-u se tijekom procesa tumorigeneze nakuplja velik broj genetičkih promjena koje se razlikuju kod pojedinih bolesnika, čineći HCC jako heterogenom grupom tumora. Na temelju kliničkih determinanti kao što su HBV infekcija, kromosomska nestabilnost, pojedine ponavljajuće genetičke, odnosno epigenetičke promjene i slično, HCC se grubo može podijeliti na 6 podgrupa, G1-G6. Polovica njih, podgrupe G1-G3, povezana je s kromosomskom nestabilnošću (stanice u kojima su cijeli kromosomi ili dijelovi kromosoma duplicirani ili deletirani). Podgrupa G1 povezana je s HBV infekcijom (mali broj kopija DNA virusa s približno 10 000 kopija/mL krvi), mutacijom gena koji kodira za protein inhibicije osi 1 (*AXIN1*, od engl. *axis inhibition protein-1*) i prekomjernom ekspresijom gena koji su inače regulirani genskim utiskom (od engl. *genomic imprinting*, utišana ekspresija

gena po uzoru na parijentalnu stanicu). Podgrupu G2 također karakterizira HBV infekcija (velik broj kopija DNA virusa) te mutacije gena *TP53* i gena za fosfatidilinozitol bifosfat kinazu  $\alpha$  (*PIK3CA*, od engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*) koju prati aktivacija Akt signalnog puta (od engl. *V-Akt murine thymoma viral oncogene*, poznat i kao proteinska kinaza B ili PKB, od engl. *protein kinase B*). Podgrupa G3 povezana je s *TP53* mutacijom i prekomjernom ekspresijom ciklina te drugih proteina regulatora staničnog ciklusa i DNA replikacije. Podgrupa G4 jako je heterogena; u nekoliko je tumora, među ostalim, nađena i mutacija gena za transkripcijski faktor 1 (*TCF-1*, od engl. *transcription factor-1*, poznat i kao nuklearni faktor 1 $\alpha$  hepatocita ili *HNF1A* od engl. *hepatocyte nuclear factor-1, homeobox A*). Podgrupe G5 i G6 karakteriziraju mutacije gena za  $\beta$ -katenin (od engl. *beta catenin*) i aktivacija Wnt signalnog puta (od engl. *wingless-type MMTV integration site family*) te hipermetilacijom smanjena ekspresija gena za E-kadherin (od engl. *epithelial cadherin*). Razlika je u tome što je kod podgrupe G6 detektirana jača aktivacija, odnosno jača hipermetilacija uz prisutstvo nodula. Ova klasifikacija tumora jasno demonstrira korelaciju između fenotipa i genotipa HCC-a (Boyault i sur. 2007).

Izbor terapije ovisi o stadiju tumora, koji se procjenjuje po kriterijima za određivanje razvojnog stadija tumora jetre iz klinike iz Barcelone, tj. po BCLC-u (od engl. *Barcelona Clinic Liver Cancer*). BCLC procjenjuje prognozu pacijenta sa HCC-om na temelju broja i veličine lezija, na temelju postojanja simptoma karcinoma te na temelju procjene funkcionalnosti jetre (El-Serag 2011). Terapija za HCC uključuje kiruršku resekciju, transplantaciju jetre, lokalnu ablaciju radiofrekvencijom (RFA, od engl. *radiofrequency ablation*), transarterijalnu kemoembolizaciju (TACE, od engl. *trans-arterial chemoembolization*), radioembolizaciju, terapiju oralnim kemoterapeutičima (na primjer multikinaznim inhibitorom proliferacije i angiogeneze sorafenibom) te perkutanu injekciju etanola (PEI, od engl. *percutaneous ethanol injection*). Trenutno je najbolja terapija za rani oblik HCC-a kirurško uklanjanje tumora, koje značajno povećava stopu preživljenja (Raza i Sood 2014). Jedna od takvih terapija koja se koristi za rane stadije HCC-a je kirurška resekcija, kirurški postupak uklanjanja tumora i okolnog dijela jetre. Kratkoročni rezultati su izvrsni, no unatoč tome unutar 5 godina od resekcije dolazi do ponovne pojave bolesti kod 70% pacijenata. Osim resekcije, druga terapija koja uključuje kirurško uklanjanje tumora je transplantacija. Transplantacija jetre je postupak zamjene oštećene jetre zdravom, najčešće jetrom druge osobe (alograf), što ima i efekt na uklanjanje pozadinske kronične infekcije. Transplantacija je najbolji izbor za pacijente u ranom stadiju HCC-a s cirozom. Budući da

zbog nestašice organa transplantacija nije dostupna svima, radi se selekcija prikladnih pacijenata s najboljom prognozom. Najefikasnijom se pokazala selekcija na temelju Milanskih kriterija. Po tim su kriterijima za transplantaciju jetre prikladni pacijenti s jednom lezijom koja nije veća od 5 cm ili s najviše 3 lezije od kojih je svaka maksimalne veličine 3 cm, uz dodatne uvjete da nemaju žilnu invaziju niti manifestaciju izvan jetre. Neke institucije pacijentima koji po Milanskim kriterijima nemaju pravo na transplantaciju pružaju druge oblike terapije (TACE, RFA ili radioembolizaciju) s ciljem poboljšanja njihova stanja, što bi ih kvalificiralo za transplantaciju (El-Serag 2011). Nakon transplantacije 5-godišnje preživljenje iznosi 75%, a ponovna pojava bolesti 15%, zbog čega se ona smatra najboljim izborom terapije (Raza i Sood 2014). Kada u ranijim stadijima HCC-a, kao i u ostalim stadijima, nisu primjenjive niti resekcija niti transplantacija koriste se druge vrste terapija. Gledajući sve terapije zajedno, bolest se ponovno vraća u skoro 80% slučajeva (Kumar i sur. 2011). Problemu dodatno pridonosi činjenica da je jako rani stadij HCC-a teško dijagnosticirati zato što zahtijeva točnu dijagnozu male lezije (1-2 cm), bez prisutstva simptoma, žilne invazije ili metastaza (El-Serag 2011). Poboljšanje razumijevanja molekularne osnove karcinogeneze HCC-a, kao i identifikacija glavnih sudionika promijenjenih signalnih putova osnova je za poboljšanje razvoja efikasnijih terapija.

## 1.2. Gen *HNFI A*

Usporedba sveukupne ekspresije gena tehnologijom oligonukleotidnim mikročipom (od engl. *microarray*) u normalnim hepatocitima i u staničnoj liniji HepG2 (stanična linija humanih hepatocita s dobro diferenciranim HCC-om koja se često koristi kao model HCC-a) pokazala je promijenjenu ekspresiju u velikom broju gena. U staničnoj liniji HepG2 je, u odnosu na normalne hepatocite, povećana ekspresija 3586 gena, a smanjena ekspresija 2646 gena, među kojima je i nekoliko gena koji kodiraju za transkripcijske faktore. Jedan od gena sa smanjenom ekspresijom u staničnoj liniji HepG2 i potencijalnom ulogom u patobiologiji HCC-a je i gen *HNFI A*\*, poznat i kao *TCF-1* ili *MODY3* (od engl. *maturity onset diabetes of the young type 3*) (Costantini i sur. 2013).

\* Prema smjericama „Guidelines for Human Gene Nomenclature“ (Wain i sur. 2002) simboli kojima se označavaju geni kod čovjeka pišu se svim velikim slovima u kurzivu te je preporučeno da se proteini označavaju istim slovima koja nisu u kurzivu. Kad je riječ o mišu, prema smjericama „Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat“ ([http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#gene\\_sym](http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#gene_sym)) simboli kojima se označavaju geni također se pišu u kurzivu te počinju velikim slovom dok su sva ostala slova mala. Proteini kod miša označavaju se istim, ali svim velikim slovima koja nisu u kurzivu.

Gen *HNF1A* kodira za transkripcijski aktivator HNF1 $\alpha$  (od engl. *hepatocyte nuclear factor 1-alpha*) potreban za pravilnu ekspresiju velikog broja gena, specifičnih za hepatocite i za  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića gušterače. Protein HNF1 $\alpha$  djeluje kao homodimer ili kao heterodimer s proteinom HNF1 $\beta$  (od engl. *hepatocyte nuclear factor 1-beta*) u jezgri, gdje veže specifičnu sekvencu, palindrom 5'-GTTAATNATTAAC-3', čime regulira aktivaciju transkripcije RNA polimerazom II (Chi i sur. 2002). Protein HNF1 $\alpha$  veže približno 800-4000 promotora različitih gena koji su uključeni u regulaciji metabolizma glukoze i lipidnog transporta te proces detoksikacije u diferenciranim stanicama (Willson i sur. 2013), a prisutnost HNF1 $\alpha$  u embrionalnom tkivu sugerira i njegovu ulogu u diferencijaciji tkiva i određivanju stanične sudbine hepatocita (Cereghini 1996). Njegovu značajnu ulogu u održavanju funkcije jetre prikazuju i eksperimenti na posebno odabranim dediferenciranim varijantama stanica hepatoma štakora koje su izgubile funkciju jetre (stanične linije M29, H11, HS2 i M38). Protein HNF1 $\alpha$  (ektopična ekspresija dobivena je lipofekcijom ekspresijskog plazmida koji sadrži gen *Hnf1A*) u takvim je stanicama uspio obnoviti dio funkcije jetre aktivacijom ekspresije 60 gena (Bulla i sur. 2012).

Gen *HNF1A* se kod ljudi nalazi na 12. kromosomu na poziciji q24.2. Njegove su mutacije povezane s mnogim bolestima, kao što su diabetes melitus (tipa 1, tipa 2, ovisan o inzulinu), adultni tip diabetesa kod mladih osoba tipa 3 (MODY3, od engl. *maturity-onset diabetes of the young-3*), nepapilarni karcinom bubrežnih stanica i familijarni adenom jetre (Yamagata i sur. 1996; Barrett i sur. 2009; Rebouissou i sur. 2005; Bluteau i sur. 2002). Budući da *HNF1A* ima važnu ulogu i u pravilnom funkcioniranju gušterače, promijenjena ekspresija gena u  $\beta$ -stanicama Langerhansovih otočića gušterače dovodi do razvoja abnormalnih i disfunkcionalnih  $\beta$ -stanica, a u konačnici do smanjene sinteze i izlučivanja inzulina (Yamagata i sur. 1996). Diabetes melitus kao i MODY3 karakteriziraju abnormalne i disfunkcionalne  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića gušterače, zbog čega se MODY često pogrešno dijagnosticira, unatoč različitim kliničkim značajkama naspram tipa 1 ili tipa 2 diabetesa melitusa (Nyunt i sur. 2009). Različite varijante gena *HNF1A*, koje se u populaciji pojavljuju s niskom učestalosti, povezane su s diabetesom melitusom, no zanimljivija je povezanost mutacije gena s MODY3. MODY3 je autosomalno dominantna nasljedna bolest povezana s heterozigotnom mutacijom u genu *HNF1A*. Inaktivacija jednog alela gena u cijelom organizmu rezultira djelomičnom inaktivacijom HNF1 $\alpha$ , koja je odgovorna za deregulaciju homeostaze glukoze karakteriziranu teškim poremećajem u sekreciji inzulina i zadržanom osjetljivosti na sulfonilureazu (uobičajeni lijek za diabetes). MODY3 bolesnici

imaju povećan rizik od razvoja hepatocelularnih adenoma (Yamagata i sur. 1996). Hepatocelularni adenomi (HCA, od engl. *hepatocellular adenoma*) su benigni tumori koji se razvijaju u normalnoj jetri, najčešće kod žena prije menopauze, a povezani su s bolesti pohrane glikogena i izloženosti hormonima, uključujući oralne kontraceptive. HCA se može pojaviti kao jedan ili, rjeđe, više tumora u jetri. Više od deset adenoma u inače normalnoj jetri definira se kao adenomatoza i relativno je rijetko stanje. HCA se kategorizira u molekularne podtipove od kojih je dio povezan s mutacijom u genu *HNF1A*. U takvim podtipovima HCA-a, kod 30-45% svih HCA, rezultat inaktivacije *HNF1A* je smanjena enzimaska aktivnost citokroma p450 1B1 (CYP1B1, od engl. *cytochrome p450 1B1*), povećana sinteza i nakupljanje lipida te razvoj „masne jetre“ ili steatoze zbog difuznog nakupljanja neutralnih masti u adenomima (Nault i Zucman Rossi 2013). Većina mutacija *HNF1A* je pak u samom HCA prisutna na oba alela gena. Bialelne promjene *HNF1A* u tumoru ljudske jetre zadovoljavaju kriterije Knudsonove hipoteze dva udarca (od engl. *two-hit hypothesis*). U takvom modelu onkogeneze geni koji inhibiraju proliferaciju i induciraju apoptozu moraju biti mutirani u obje kopije kako bi se izgubila njihova funkcija. Mutacije tumor supresorskih gena su stoga recesivno svojstvo. Inaktivacija jednog takvog gena, sporadična (mutacija koja se događa tijekom života u pojedinim stanicama, uzrokovana utjecajem okoliša) ili nasljedna mutacija (u svim stanicama organizma), rani je događaj u razvoju tumora. Mutaciju drugog gena, poznatu i kao gubitak heterozigotnosti (LOH, od engl. *loss of heterozygosity*), uzrokuje gubitak genskog produkta, što predstavlja jedan od osnovnih koraka u razvoju tumora. Knudsonova hipoteza podupire tezu da je *HNF1A* tumor supresorski gen koji je izmijenjen u ranim fazama tumorigeneze, te rezultira formiranjem adenoma (Bluteau i sur. 2002). Zanimljivo je da sve nasljedne mutacije u HCA-u nemaju i somatsku mutaciju na drugom alelu. To bi se moglo objasniti haploinsuficijencijom, nemogućnosti jednog funkcionalnog gena *HNF1A* da nadomjesti genski produkt druge kopije, kao što su Rebouissou i sur. (2005) pokazali u slučaju nepapilarnog karcinoma bubrežnih stanica. Druga, vjerojatnija mogućnost je da navedene mutacije imaju dominantno negativan efekt, odnosno da mutacije rezultiraju nefunkcionalnim proteinom ili proteinom čija je funkcija promijenjena na način da remeti i funkciju normalnog proteina. Sve takve monoalelne mutacije za sada su nađene izvan dimerizacijske domene, što ukazuje na to da takav protein može dimerizirati s normalnim proteinom i remetiti njegovu funkciju (Willson i sur. 2013). Mutacije *HNF1A* su u HCA-u ipak najčešće sporadične (u 90% slučajeva) bialelne mutacije (Bluteau i sur. 2002).

Bilo jedan ili više adenoma, HCA može uzrokovati krvarenje, bol, ali i, rjeđe, izazvati transformaciju u HCC (Nault i Zucman Rossi 2013). HCA ima jako nizak rizik od maligne transformacije, približno 4-5% (Stoot i sur. 2010), međutim opisana su dva slučaja HCC-a u obiteljima s nasljednom mutacijom *HNF1A* u inače normalnoj jetri bez prisutnosti poznatih faktora rizika ili ciroze. Ovi slučajevi ukazuju na mogućnost da je za stjecanje malignog fenotipa tijekom staničnih diobi potrebno nakupljanje više genetskih promjena od kojih bi jedna mogla biti inaktivacijska mutacija ili pak smanjena ekspresija gena *HNF1A* (Willson i sur. 2013). Uloga proteina HNF1 $\alpha$ , čija inaktivacija češće sudjeluje u stvaranju benignih nego malignih tumora, nije u potpunosti jasna budući da su mnogi molekularni putovi koji su deregulirani u benignim HCA sa mutacijom *HNF1A* deregulirani i u malignim tumorima. Učinak bilo koje mutacije i njegova važnost u nastanku tumora vjerojatno varira ovisno o položaju u genu i vremenu u kojem se događa. U *HNF1A* inaktiviranim hepatocitima najvjerojatnije postoji dodatna, funkcionalna regulacija veličine populacije koja neovisno o *HNF1A* uspješno održava stabilnost sistema, čime je onemogućena maligna transformacija (Pelletier i sur. 2010). Kako *HNF1A* ispunjava sve genetičke kriterije tumor supresorskog gena, potrebno je jasnije objasniti mehanizme tumorigeneze i promjene signalnih putova povezane s inaktivacijom *HNF1A* u hepatocitima kako bi se potencijalno dokazao njegov doprinos u patobiologiji HCC-a.

### 1.2.1. Uloga gena *HNF1A* u regulaciji proliferacije

Eksperimenti na mišjim modelima, homozigotima za mutaciju *Hnf1A*, deficijentnima za HNF1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha^{-/-}$ ), pokazali su da takvi miševi ne uspijevaju napredovati i umiru oko vremena odvajanja od majke, zbog progresivnog gubitka težine i mišićnog tkiva. Miševi kojima nedostaje HNF1 $\alpha$  razvijaju fenilketonuriju zbog potpune represije gena koji kodira za fenilalanin hidroksilazu, Fanconijev sindrom zbog disfunkcije proksimalnih tubula bubrega, a imaju i izrazito povećanu jetru kao rezultat povećane proliferacije hepatocita, koja ponekad može biti popraćena i displazijom (Pontoglio i sur. 1996).

Servitja i sur. (2009) pokušali su odrediti ciljane gene, odnosno gene za čiju je ekspresiju neophodan protein HNF1 $\alpha$ . Usporedbom ekspresijskih profila na mišjim hepatocitima s inaktivacijskom mutacijama na oba alela *Hnf1A* (HNF1 $\alpha^{-/-}$ ) i divljim tipom pokazali su smanjenu ekspresiju nekoliko tumor supresorskih gena. Jedan od gena sa smanjenom ekspresijom je i gen *Nr1h4* koji kodira za receptor X farnezoida (FXR od engl. *farnesoid X receptor*), protein s ključnom ulogom u regulaciji homeostaze žučne kiseline



(BA, od engl. *bile acid*). Kao odgovor na BA, FXR inducira povećanje ekspresije proteina transporta BA te smanjenje ekspresije proteina uključenih u njegovu sintezu (Lee i sur. 2006). BA djeluje kao unutarstanična signalna molekula, utječući na promjene stanične funkcije regulacijom procesa proliferacije, diferencijacije, sekrecije, apoptoze i regeneracije jetre te održavanjem metaboličke homeostaze. Uloga *Hnf1A* u aktivaciji FXR je značajna zato što FXR<sup>-/-</sup> mutanti nakupljaju velike količine citotoksične BA, što vodi povećanju ekspresije gena za nuklearni antigen proliferirajuće stanice (*PCNA*, od engl. *proliferating cell nuclear antigen*),  $\beta$ -katenin i njegov ciljani gen, protoonkogen *c-Myc* (od engl. *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*), kao i za proupalni citokin IL-1 $\beta$ . Proliferacija i povećana ekspresija protoonkogeni, kao i upalni proces osnova su tumorigeneze pa ne čudi da su FXR<sup>-/-</sup> miševi spontano razvili različite tumore uključujući HCA, steatozu, HCC i hepatoholangiocelularni karcinom (HSC, od engl. *hepatocholangiocellular carcinoma*) (Kim i sur. 2007).

$\beta$ -katenin je dio Wnt signalnog puta koji ima ključnu ulogu u embriogenezi te regulaciji stanične diferencijacije, proliferacije i apoptoze. U HCC-u je primijećena povećana učestalost Wnt signalizacije, za koju se smatra da je potrebna za održavanje matičnosti u HCC-u (u slučaju tumora označava matičnost koju opisuje održavanje stanične proliferacije i besmrtnosti). 30% slučajeva HCC-a pokazuje deregulaciju funkcije  $\beta$ -katenina (Kumar i sur. 2011), dok je prekomjerna ekspresija gena za *c-Myc* primijećena u 30-60% HCC-a (El-Serag i Rudolph 2007).

Jedan od partnera FXR u regulaciji ekspresije je i jezgrin receptor mali partner heterodimera (SHP, od engl. *small heterodimer partner*), kodiran genom *Nr0b2* čija je ekspresija također smanjena u HNF1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> miševima (Servitja i sur. 2009). *Nr0b2* je također tumor supresorski gen s ulogom u regulaciji staničnog rasta i preživljenja, čija je hipermetilacija, odnosno utišanost, povezana s razvojem HCC-a (He i sur. 2008).

Eksperimenti na istim HNF1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> miševima pokazali su i povećanu ekspresiju gena uključenih u mitozu i regulaciju staničnog ciklusa. U hepatocitima takvih miševa ekspresija gena za protein marker proliferacije Ki-67 (*MKI67*, od engl. *marker of proliferation Ki-67*), prisutan u stanici tijekom svih aktivnih faza staničnog ciklusa (G1, S, G2 i M), pojačana je pet puta u odnosu na divlji tip (Servitja i sur. 2009). Marker proliferacije Ki-67 je često povezan s karcinomima (Scholzen i Gerdes 2000). Povećana je i ekspresija nekoliko ciklina, proteina koji kontroliraju progresiju stanice kroz stanični ciklus aktivacijom kinaza ovisnih o ciklinu

(CDK, od engl. *cyclin-dependent kinase*) te samih CDK. Pojačanom ekspresijom ciklina gubi se kontrola regulacije staničnog ciklusa, što uzrokuje proliferaciju hepatocita (Servitja i sur. 2009). Gen za ciklin D je jedan od gena čija je ekspresija regulirana  $\beta$ -kateninom te je njegova povećana ekspresija zabilježena u HCC-u (Kumar i sur. 2011). U odnosu na kontrolne hepatocite, pojačana ekspresija ciklina D zabilježena je i u staničnim linijama HepG2 te Hep3B (stanična linija humanih hepatocita koja se također često koristi kao model HCC-a; ima različite karakteristike od HepG2) kojima je uz pomoć malih interferirajućih RNA (siRNA od engl. *small interfering RNA*) utišana endogena ekspresija *HNF1A*. U takvim staničnim linijama zabilježena je i aktivacija mTOR signalnog puta (Pelletier i sur. 2010). Ciljana molekula rapamicina u sisavaca (mTOR, od engl. *mammalian target of rapamycin*) je serinska/treoninska proteinska kinaza koja ima ulogu u regulaciji transkripcije i stanične mobilnosti, kao i staničnog rasta, preživljenja i proliferacije stanica, zahvaljujući svojoj sposobnosti selektivne stimulacije translacije ključnih proteina koji promoviraju rast. Aberantna aktivacija mTOR signalnog puta rezultira inaktivacijom mnogih tumor supresorskih gena, te je često prisutna u raznim benignim lezijama koje karakterizira abnormalni stanični rast (Inoki i sur. 2005). Aktivacija mTOR-a je do sada opisana u raznim tumorima, a novije studije identificirale su njegovu aktivaciju u približno 15-50% HCC-a. Aktivacija mTOR signalnog puta mogla bi biti direktno povezana s inaktivacijom *HNF1A*, ali također i indirektno, budući da je dokazana i akumulacija proteina receptora *ERBB2* (od engl. *receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, avian erythroblastosis oncogene*) koji se u signalnom putu nalazi prije mTOR-a (Pelletier i sur. 2010). Prekomjerna ekspresija *ERBB2* gena, koji se često naziva i humani receptor epidermalnog faktora rasta 2 (*HER2*, od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), uz aktivaciju mTOR signalnog puta ima značajnu ulogu u patobiologiji karcinoma dojke (Zhou i sur. 2004).

Osim aktivacije mTOR-a u staničnim linijama HepG2 i Hep3B, u odnosu na kontrolne hepatocite pojačana je ekspresija gena *EEF1A2* (od engl. *elongation factor 1-alpha 2*) koji se u signalnom putu nalazi nakon mTOR-a. *EEF1A2* kodira za elongacijski faktor eEF1A2, podjedinicu elongacijskog kompleksa, koji je opisan kao aktivator Akt signalnog puta (Amiri i sur. 2007). Sam Akt signalni put je konstitutivno aktivan u 40-60% HCC-a i uključen je u regulaciju brojnih bioloških procesa, kao što su inhibicija apoptoze i diferencijacije te aktivacija staničnog rasta. Također je povezan sa staničnom migracijom i povećanjem invazivnosti. Njegova deregulacija povezana je s agresivnijim oblicima HCC-a (Kumar i sur. 2011). Schlaeger i sur. (2008) identificirali su aktivacijsku mutaciju povećanja broja kopija

gena *EEF1A2*, zajedno s aktivacijom Akt signalnog puta u 43% uzoraka tkiva pacijenata sa HCC-om. U nekim uzorcima su pak, u odnosu na zdravo tkivo, pronašli i prekomjernu ekspresiju gena bez prisutnosti te mutacije. Budući da je povećana razina proteina u odnosu na zdravo tkivo pokazana i u okolnom tkivu s cirozom, te kako je utišavanje *EEF1A2* gena u staničnim linijama HepG2 i Hep3B uspješno smanjilo staničnu proliferaciju i povećalo stopu apoptoze, može se pretpostaviti da je aktivacija ovog gena važna u ranoj fazi maligne transformacije hepatocita (Schlaeger i sur. 2008). Takva pojačana ekspresija gena *EEF1A2* stoga održava visoku razinu sinteze proteina potrebnih za rast i preživljavanje stanica, što potvrđuje ulogu mTOR signalnog puta u rastu i preživljavanju hepatocita, te potencijalno u malignoj transformaciji hepatocita.

Smanjena ekspresija gena za receptor X farnezoida i SHP te povećana ekspresija gena za marker proliferacije Ki-67, cikline, kinaze ovisne o ciklinu, receptor ERBB2, mTOR-a i eEF1A2-a upućuju na ključnu ulogu *HNF1A* u regulaciji proliferacije hepatocita.

### **1.2.2. Uloga gena *HNF1A* u kontroli metabolizma jetre**

Metaboličko reprogramiranje, koje se obično može uočiti u tumorskim stanicama, potrebno je za preživljenje stanica, odnosno potrebno je tumorskim stanicama kako bi zadovoljile povećanu potrebu za energijom. Ono je također jedna od osnova tumorigeneze, a nedavna otkrića pokazala su da su metaboličke prilagodbe, kao što su visoke stope glikolize i lipogeneze, regulirane onkogenim signalima (Swinnen i sur. 2006). Aberantna, prekomjerna ekspresija gena glikolize i lipogeneze, uz inhibiciju gena glukoneogeneze, pokazana je kod HCA-a i najvjerojatnije je odgovorna za povećanu sintezu i nakupljanje lipida u hepatocitima. Stanični modeli, HepG2 i Hep3B, pokazali su da inaktivacija gena *HNF1A* (uz pomoć siRNA) ponavlja isti obrazac deregulacije gena koji sudjeluju u navedenim procesima te vodi nakupljanju lipida u stanicama HCC-a (Pelletier i sur. 2010). Ovi rezultati sugeriraju važnost inaktivacije gena *HNF1A* za patobiologiju HCC-a, slično kao i za patobiologiju HCA-a.

### **1.2.3. Uloga gena *HNF1A* u angiogenezi i epitelno-mezenhimskoj tranziciji**

Važan korak tumorigeneze je i angiogeneza, proces formiranja novih krvnih žila iz postojećih, uz rast i migraciju endotelnih stanica kako bi se zadovoljile povećane potrebe stanica tumora za kisikom. Na staničnim modelima HepG2 i Hep3B s inaktivacijom gena *HNF1A* (uz pomoć siRNA) dokazana je akumulacija podjedinice A trombocitnog faktora rasta (PDGFA, od engl. *platelet-derived growth factor subunit A*) i njegova heterodimera,

podjedinice B trombocitnog faktora rasta (PDGFB, od engl. *platelet-derived growth factor subunit B*) (Pelletier i sur. 2010). Faktori rasta PDGF imaju važnu ulogu u regulaciji embrionalnog razvoja, migracije stanica, preživljenja stanica, kemotaksije i proliferacije stanica. Oni su potentni mitogeni stanica mezenhimalnog podrijetla (Heldin i Westermarck 1999) te je dokazano da mogu djelovati kao angiogeni faktori, potičući vaskularizaciju tumora (Battegay i sur. 1994).

Druga važna uloga faktora rasta PDGF je njihova funkcija autokrinih faktora u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji (EMT, od engl. *epithelial to mesenchymal transition*). EMT je temeljni proces koji se odvija tijekom normalnog razvoja, upalnih procesa i zacjeljivanja rana. Tijekom EMT polarne epitelne stanice stječu fenotip fibroblasta, obično gube međustaničnu adheziju, mijenjaju ekspresijski uzorak površinskih molekula te luče enzime iz obitelji metaloproteaza matriksa (MMP, od engl. *matrix metalloproteinase*). Te opsežne promjene ekstracelularnog matriksa povećavaju pokretljivost i invazivni potencijal stanica, što podsjeća na metastatske procese gdje stanice tumora napuštaju dobro organizirane epitelne strukture i odlaze na udaljena mjesta. Invazivnost i metastaziranje ključni su koraci tumorigeneze kod malignih tumora (in vivo korelacija EMT-a i kasnog stadija karcinogeneze upućuju na ulogu EMT-a i u progresiji HCC-a) (Gotzmann i sur. 2004) te je dokazano da inhibicija faktora rasta PDGF može stabilizirati invazivni fenotip. Faktori rasta PDGF neophodni su za EMT induciran transformirajućim faktorom rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ , od engl. *transforming growth factor beta*) (Gotzmann i sur. 2006). TGF $\beta$  je upalni citokin koji ima ulogu u regulaciji niza procesa, između ostalog u regulaciji rasta stanica, diferencijacije, migracije, apoptoze, stanične adhezije, preživljenja i upalnih procesa. U normalnim stanicama gen za TGF $\beta$  djeluje kao tumor supresorski gen time što njegova ekspresija zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi, odnosno zaustavlja proliferaciju te inducira apoptozu (Kumar i sur. 2011). TGF $\beta$  ima dvostruki efekt u patobiologiji HCC-a, ovisno o stadiju tumorigeneze (Gotzmann i sur. 2006). U ranom stadiju HCC-a zabilježena je inhibicija TGF $\beta$  signalnog puta, što odgovara njegovoj ulozi tumor supresora (Kumar i sur. 2011), dok je u kasnom stadiju HCC-a zabilježena akumulacija TGF $\beta$ . U takvim stanicama TGF $\beta$  aktivira transkripciju seta gena koji sudjeluju u promjeni fenotipa stanice (EMT), što rezultira migracijom hepatocita te progresijom tumora (Gotzmann i sur. 2006).

Represija gena za E-kadherine, proteine uključene u održavanje čvrstih međustaničnih veza i strukture tkiva, ključan je događaj povezan s početkom epitelne dediferencijacije zato što vodi gubitku međustaničnog kontakta i reorganizaciji citoskeleta. Inaktivacija E-kadherina

je neophodna za proces stanične invazije (Behrens i sur. 1989). Transkripcijski faktor, protein cinkova prsta SNAI (od engl. *zinc finger protein SNAI*), ili poznatije SNAIL, odgovoran je za represiju gena za E-kadherine (Cano i sur. 2000). Inhibicijom endogene ekspresije *HNF1A* (uz pomoć siRNA) u staničnim linijama HepG2 i Hep3B smanjena je ekspresija gena za E-kadherine i neke druge proteine međustaničnih veza, dok je povećana ekspresija gena za mezenhimske markere i nekoliko ključnih transkripcijskih faktora uključenih u EMT, od kojih su najbitniji SNAIL1 i SNAIL2. Jaka korelacija između ekspresije gena za E-kadherin i HNF1 $\alpha$  govori o direktnoj regulaciji samim HNF1 $\alpha$  ili indirektnoj regulaciji putem SNAIL-a. Na isti način bi represija samog SNAIL-a mogla biti direktno regulirana pomoću HNF1 $\alpha$  ili indirektno, uz TGF $\beta$ . U staničnim linijama HepG2 i Hep3B koje imaju inhibiranu ekspresiju *HNF1A*, povećana je i ekspresija gena za TGF $\beta$ 1 izoformu (Pelletier i sur. 2011) čiji signalni put i sam ima sposobnost aktivacije transkripcije gena za SNAIL proteine (Gotzmann i sur. 2006). TGF $\beta$  signalni put je, kao i HNF1 $\alpha$ , uključen u diferencijaciju jetre i sudjeluje u nekoliko razvojnih koraka, posebice u proliferaciji i diferencijaciji hepatoblasta u hepatocite. Kako je HNF1 $\alpha$  uključen u kasnijim koracima diferencijacije hepatocita, predložen je model po kojem HNF1 $\alpha$  negativno kontrolira ekspresiju TGF $\beta$ , što bi moglo biti povezano s uspostavom i održavanjem diferencijacije hepatocita i zaustavljanjem proliferacije (Pelletier i sur. 2011). U svakom slučaju, indukcija angiogeneze i EMT-a inaktivacijom HNF1 $\alpha$  povezana je s povećanom migracijom hepatocita.

#### 1.2.4. Uloga gena *HNF1A* u fukozilaciji

Fukozilacija je jedna od najvažnijih vrsta glikozilacije koja je povezana s razvojem tumora. Ona je kao i glikozilacija posttranslacijska modifikacija koja obogaćuje kompleksnost i funkciju proteina i lipida. Fukozilacija je proces adicije fukozilne skupine na akceptorsku molekulu (konjugat oligosaharida i proteina ili lipida) N-glikan (oligosaharid kovalentno vezan za dušik, najčešće asparagina, proteina), O-glikan (oligosaharid kovalentno vezan za hidroksilnu skupinu, najčešće serina ili treonina, proteina) ili glikolipid (oligosaharid kovalentno vezan za lipid) (Miyoshi i sur. 2008). Najčešća je N-fukozilacija. Fukoza je deoksi-heksoza, monosaharid od 6 atoma ugljika bez hidroksilne skupine na 6. poziciji, i jedini monosaharid u L-konformaciji. Za njegovu adiciju na molekule potrebne su tri vrste enzima: enzimi koji u citosolu sintetiziraju supstrat gvanozin difosfat fukozi ili GDP-fukozi, transporteri GDP-fukoze (do Golgijevog aparata) te fukoziltransferaze (FUT, od engl. *fucosyltransferase*) koje tamo izvršavaju adiciju supstrata na glikoproteine (Becker i Lowe

2003). Tri različita enzima sintetiziraju GDP-fukozu; za sintezu direktno iz fukoze potreban je jedan enzim, a za sintezu iz GDP-manoze dva. S druge strane postoji jedanaest različitih FUT proteina od kojih FUT8 ima ulogu u centralnoj fukozilaciji (od engl. *core fucosylation*), adiciji fukoze na središnji N-acetilglukozamin (GlcNAc, od engl. *N-acetylglucosamine*), dok ostali imaju ulogu u antenarnoj ili fukozilaciji grananja (od engl. *antennary fucosylation*) (Miyoshi i sur. 2008). Više od polovice poznatih proteina su modificirani kovalentno vezanim N-glikanima, od kojih većina sadrži fukozu. Pravilna fukozilacija je stoga neophodna u brojnim biološkim funkcijama, primjerice u pravilnom sklapanju proteina, sekreciji proteina, staničnoj signalizaciji, imunološkoj funkciji itd., pri čemu glikani značajno mijenjaju strukturu i aktivnost proteinskog dijela glikoproteina te povećavaju varijabilnost funkcije. Tako na primjer selektini, transmembranski proteini, u ekstracelularnom matriksu prepoznaju specifične ugljikohidrate glikoproteina koji se nalaze izvan stanice ili na površini drugih stanica. Selektini sudjeluju u protoku informacija što je važno za održavanje stanične adhezije, u interakcijama domaćina i patogena, ali i za inicijaciju upalnog odgovora, budući da proteini akutne faze upale imaju promijenjene obrasce fukozilacije u mnogim patološkim stanjima (na primjer u koronarnim bolestima, diabetesu, kongenitalnim i imunološkim bolestima, kao i u velikom broju tumora) (Lauc i sur. 2010).

Eksperimenti na tkivu HCC-a pokazali su akumulaciju GDP-fukoze i povećanu ekspresiju njenih transportera u odnosu na okolno tkivo. Prekomjerna ekspresija tih transportera u Hep3B modelima prouzročila je značajan porast stanične fukozilacije, sugerirajući koregulaciju glavnih enzima fukozilacije u jetri (Miyoshi i sur. 2008). Inhibicijom ekspresije *HNF1A* (pomoću siRNA) u staničnim linijama HepG2 promijenjena je ekspresija nekoliko *FUT* gena. Točnije, smanjena je ekspresija *FUT* gena čiji proteini sudjeluju u antenarnoj fukozilaciji, a povećana je ekspresija gena *FUT8*. Regulacijom aktivacije antenarne, odnosno represije centralne fukozilacije, *HNF1 $\alpha$*  je direktno ili indirektno glavni regulator transkripcije gena uključenih u različite faze procesa fukozilacije (Lauc i sur. 2010). Suprotno tome, eksperimenti na samom tkivu HCC-a pokazali su da tumorsko i okolno tkivo, kao i normalno tkivo, pokazuju slične razine fukozilacije, uključujući centralnu fukozilaciju (Mehta i sur. 2012). Takvi rezultati pokazuju da može postojati dodatna regulacija na razini tkiva koja uspješno održava stabilnost fukozilacije unatoč inaktivaciji *HNF1A*. U tumorskim stanicama, u odnosu na okolno i na zdravo tkivo, također je primijećena povećana koncentracija tetraantenarnih (od engl. *tetra-antennary*) N-glikana, kompleksnih ugljikohidrata s četiri slobodne grane na nereducirajućem kraju.

Tetraantenarni N-glikani nastaju reakcijom adicije GlcNAc na rastući N-glikan koja je katalizirana enzimom N-acetilglukozaminil transferaza 5 (GnT-5, od engl. *N-acetylglucosaminyltransferase V*). Tetraantenarni N-glikani uglavnom se nalaze na molekulama stanične površine kao što su adhezijske molekule ili receptori faktora rasta (Mehta i sur. 2012). GnT-5 je već ranije povezan s hepatokarcinogenezom u mišjim modelima (Miyoshi i sur. 1993), kao i grananje N-glikana s metastaziranjem i sa staničnom proliferacijom putem aktivacije Akt signalnog puta (Lau i sur. 2007). Moguće je da je HCC povezan s povećanom adicijom tetraantenarnih N-glikana na proteine koji su uključeni u održavanje stanične adhezije. Promjena obrasca glikozilacije oslabila bi međustanične veze te dovela do otpuštanja fukoziliranih glikoproteina u krvotok. Ta hipoteza povezuje rezultate u kojima je u tkivu HCC-a i okolnom, odnosno zdravom tkivu zabilježena slična razina fukozilacija, s rezultatima mnogih radova koji navode da je u serumu pacijenata s HCC-om dobivena povećana razina N-glikana i općenito fukozilacije (Mehta i sur. 2012). Periferna krv pacijenata s MODY3 kojima je epigenetički utišan *HNF1A* također ima promijenjen profil glikana, uključujući povećanu koncentraciju tetraantenarnih N-glikana, u odnosu na plazmu kontrolne skupine u kojima *HNF1A* nije utišan (Zoldoš i sur. 2012).

Pokazano je da *HNF1A* regulira GnT-4 $\alpha$  glikoziltransferazu koja katalizira reakciju adicije GlcNAc na rastući N-glikan u  $\beta$ -stanicama Langerhansovih otočića gušterače (Ohtsubo i sur. 2011). Iz tog podatka, uz činjenicu da su isti obrasci tetraantenarnih N-glikana uočeni i u tkivu kod pacijenata s HCC-om i u krvi pacijenata s MODY3 kojima je utišan *HNF1A* (velik dio proteina plazme potječe iz jetre) može se zaključiti da *HNF1A* negativno regulira GnT-5. Na taj bi način smanjena ekspresija gena *HNF1A* također mogla biti uključena u proces nastanka i progresije HCC-a.

## 2. Hipoteza i cilj istraživanja

### 2.1. Hipoteza

U ovom sam istraživanju analizirala razinu ekspresije gena *HNF1A* u tumorskim stanicama hepatocelularnog karcinoma i stanicama okolnog tkiva jetre koje u najvećem broju slučajeva predstavlja cirozu. Pretpostavka istraživanja je bila da je ekspresija gena *HNF1A* u tumorskim stanicama smanjena u odnosu na stanice okolnog tkiva.

### 2.2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je odrediti značajnost promjene ekspresije gena *HNF1A* za patobiologiju hepatocelularnog karcinoma.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- Sakupiti uzorke pacijenata kojima je dijagnosticiran HCC i kod kojih je poznata etiologija bolesti.
- Iz uzoraka tumorskog tkiva i okolnog tkiva jetre izolirati RNA.
- Prevesti RNA u komplementarnu DNA reverznom transkripcijom.
- Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu odrediti razinu ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom tkivu i okolnom tkivu jetre.
- Analizirati potencijalnu razliku u razini ekspresije gena *HNF1A* u stanicama hepatocelularnog karcinoma i okolnog tkiva.
- Razinu ekspresije gena *HNF1A* usporediti s dostupnim podacima o razvoju i napretku bolesti pojedinih bolesnika kako bi se procijenio njegov značaj za patobiologiju ovog tumora.



## 3. Materijali i metode

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Uzorci tkiva

U radu sam koristila uzorke jetre fiksirane formalinom, uklopljene u parafin (FFPE, od engl. *formalin-fixed paraffin embedded*), dobivene od 49 bolesnika s histopatološki potvrđenom dijagnozom hepatocelularnog karcinoma. Uzorci su prikupljeni od pacijenata koji su bili kandidati za transplantaciju jetre u Kliničkoj bolnici Merkur između 2006. i 2011. godine. Nakon morfološke analize uzorci tkiva svakog pacijenta razdijeljeni su u dvije zasebne parafinske kocke. Uzorci skupine A predstavljaju tumorska tkiva, a uzorci skupine B dio jetre koji se nalazi neposredno uz tumor.

Prosječna dob pacijenata iznosila je 60 godina, sa 57% pacijenata u dobi od 60 ili više godina. Od 49 pacijenata 75% su bili muškarci, 25% žene. 45% slučajeva imalo je alkohol kao pozadinski faktor rizika, 29% infekciju virusom HCV, 10% infekciju virusom HBV, a preostalih 16% neki drugi faktor, više faktora ili nepoznati faktor rizika. U trenutku dijagnoze 59% pacijenata nije bilo kvalificirano za transplantaciju po Milanskim kriterijima. Broj i veličina tumora su varirali. Broj je varirao između jednog do više od devet tumora, sa srednjom vrijednosti od 3 tumora po pacijentu. Veličina tumora varirala je između 0,2 i 9 mm. Svi pacijenti imali su klasični histološki tip tumora, s kompleksnim tipom rasta tumora i, najčešće, s umjerenim stupnjem diferencijacije. Žilna invazija zabilježena je kod 31% pacijenata, a metastaze su bile prisutne samo kod jednog pacijenta. Predoperativni rezultati količine  $\alpha$ -fetoproteina (AFP, od engl. *alpha-fetoprotein*, serumski glikoprotein koji se ukoliko je veći od 400 ng/mL može koristiti pri postavljanju dijagnoze HCC-a; u HCC-u njegove vrijednosti mogu biti između normalnih, manjih od 10 ng/mL pa sve do 100 000 ng/mL (Bialecki i Di Bisceglie 2005) u serumu su bili dostupni za 45 pacijenata od kojih je 29% imalo vrijednost višu od 100 ng/mL. Vrijednosti ukupnog bilirubina u serumu varirale su između 5 i 446  $\mu\text{mol/L}$ , sa srednjom vrijednosti 82,1  $\mu\text{mol/L}$  i medijanom 51  $\mu\text{mol/L}$ . Vrijednosti za kreatinin varirale su između 18,9 i 506  $\mu\text{mol/L}$  sa srednjom vrijednosti 101,3  $\mu\text{mol/L}$  i medijanom 87  $\mu\text{mol/L}$ . Vrijednosti zgrušavanja krvi vremenskim testom protrombina varirale su s vrijednostima INR-a (od engl. *international normalised ratio*, vrijeme zgrušavanja uspoređeno s normalnim vrijednostima, standardizirano referencom; veća vrijednost INR predstavlja dulje vrijeme zgrušavanja) između 1 i 2,68, sa srednjom

vrijednosti 1,5 i medijanom 1,45. U trenutku završetka istraživanja 24% pacijenata je umrlo, a bolest se ponovno pojavila kod 20% pacijenata.

Ovaj je rad dio većeg projekta odobrenog od etičke komisije KB Merkur.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija RNA

Iz rezova uzoraka HCC-a i okolnog tkiva fiksiranih formalinom, uklopljenih u parafin, izolirala sam RNA pomoću kemikalija iz komercijalno dostupnog seta High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Njemačka), koristeći protokol proizvođača.

Koncentraciju izolirane RNA izmjerila sam na uređaju NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, UK) te je pohranila na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2. Reverzna Transkripcija

Izoliranu RNA prevela sam u cDNA metodom reverzne transkripcije. Reakciju sam provela prema protokolu:

Smjesa 1: 1  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{M}$ ) nasumičnih heksamera (Random Hexamers, Applied Biosystems, SAD), 1  $\mu\text{L}$  smjese deoksiribonukleotida (dNTP) (10 mM od svakog), 1  $\mu\text{g}$  RNA te destilirane vode očišćene od RNaza do ukupnog volumena od 10  $\mu\text{L}$ . Epruvete sam potom stavila na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min radi denaturacije sekundarnih struktura RNA pa na led najmanje 5 min kako bi se nasumični heksameri mogli vezati za RNA.

Smjesa 2: 5  $\mu\text{L}$  destilirane vode očišćene od RNaza, 4  $\mu\text{L}$  5X pufera za PrimeScript reverznu transkriptazu (TaKaRa BIO INC, Japan), 0,5  $\mu\text{L}$  (200 U/ $\mu\text{L}$ ) inhibitora RNaza (RNasin Plus RNase Inhibitor, Promega, SAD) i 0,5  $\mu\text{L}$  (200 U/ $\mu\text{L}$ ) reverzne transkriptaze PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa BIO INC).

Smjesa 3: 5,5  $\mu\text{L}$  destilirane vode očišćene od RNaza, 4  $\mu\text{L}$  5X pufera za PrimeScript reverznu transkriptazu i 0,5  $\mu\text{L}$  (200 U/ $\mu\text{L}$ ) inhibitora RNaza (RNasin Plus RNase Inhibitor, Promega).

U svaki uzorak sa smjesom 1 dodala sam 10  $\mu\text{L}$  smjese 2. Za negativnu kontrolu reverzne transkripcije u duplikate uzoraka sa smjesom 1 dodala sam 10  $\mu\text{L}$  smjese 3.

Uvjeti reakcije bili su: 42 °C 60 min radi provođenja reverzne transkripcije, a potom na 70 °C 15 min kako bi se deaktivirao enzim. Dobivenu cDNA pohranila sam na -20 °C.

Kvalitetu dobivene cDNA ispitala sam umnažanjem kontrolnog gena koji je uvijek eksprimiran u stanicama, odnosno čija je RNA uvijek prisutna pa je stoga njegova detekcija pokazatelj uspješne reakcije reverzne transkripcije. Za kontrolu kvalitete cDNA lančanom reakcijom polimerazom umnožila sam gen za hipoksantin-gvanin fosforibozil transferazu 1 (*HPRT1* od engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-1*), odnosno gen za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*, od engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) prema sljedećim protokolima:

Smjesa za umnažanje gena *HPRT1* PCR-om: 10,3 µL destilirane vode očišćene od RNaza, 1 µL (1 µM) uzvodne početnice za gen *HPRT1* (Sigma-Aldrich, USA), 1 µL (1 µM) nizvodne početnice za gen *HPRT1* (Sigma-Aldrich), 1,6 µL smjese dNTP-ova (2,5 mM od svakog), 2 µL 5X pufera za Ex Taq polimerazu (TaKaRa BIO INC), 4 µL cDNA i 0,1 µL (5 U/µL) Ex Taq DNA polimeraze (TaKaRa BIO INC). Uvjeti reakcije bili su: 95 °C 1 min, 50 ciklusa 95 °C 30 sec; 55 °C 30 sec; 72 °C 30 sec, te završna elongacija 72 °C 10 min. Produkte sam pohranila na +4 °C.

Smjesa za umnažanje gena *GAPDH* PCR-om: 8,3 µL destilirane vode očišćene od RNaza, 2 µL (1 µM) uzvodne početnice za gen *GAPDH* (Sigma-Aldrich), 2 µL (1 µM) nizvodne početnice za gen *GAPDH* (Sigma-Aldrich), 1,6 µL smjese dNTP-ova (2,5 mM od svakog), 2 µL 5X pufera za Ex Taq polimerazu (TaKaRa BIO INC), 4 µL cDNA i 0,1 µL (5 U/µL) Ex Taq polimeraze (TaKaRa BIO INC). Uvjeti reakcije bili su: 95 °C 1 min, 45 ciklusa 95 °C 30 sec; 64 °C 30 sec; 72 °C 30 sec, te završna elongacija 72 °C 10 min. Produkte sam pohranila na +4 °C.

Rezultate lančane reakcije polimerazom analizirala sam elektroforezom na 2% agaroznom gelu uz upotrebu boja koje interkaliraju u dvolančanu DNA, etidij bromid (EtBr, od engl. *ethidium bromide*) ili SYBR Safe (Life technologies, SAD).

### **3.2.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu**

Razinu ekspresije gena *HNF1A* odredila sam lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (q-RT PCR, od engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*) koristeći specifičnu hidrolizirajuću probu Hs00167041\_m1 (TaqMan, Applied Biosystems)

konstruiranu na način da ne umnaža genomsku DNA. Kao endogenu kontrolu koristila sam gen za hidrosimetilbilan sintazu (*HMBS*, od engl. *hydroxymethylbilane synthase*), čiju sam razinu ekspresije odredila koristeći specifičnu hidrolizirajuću probu Hs00609297\_m1 (TaqMan, Applied Biosystems) također konstruiranu na način da ne umnaža genomsku DNA. Lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu za 49 uzoraka tumorskog tkiva i 49 uzoraka okolnog tkiva provela sam u duplikatima i za ciljani gen i za endogenu kontrolu. Koristila sam komercijalno dostupnu smjesu kemikalija (TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems) prema standardiziranom protokolu (TaqMan Gene Expression Assays protocol, Applied Biosystems) na uređaju 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena koristila sam  $\Delta\Delta C_t$  metodu. Komparativna  $C_t$  ili  $\Delta C_t$  metoda koristi aritmetičku formulu  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  koja određuje količinu ciljnog gena, normaliziranu pomoću endogene kontrole u odnosu na kalibrator. Na kraju reakcije dobila sam podatke o ekspresiji gena, u obliku  $C_t$  vrijednosti (od engl. *threshold cycle*, ciklus u kojem je fluorescencija signalne molekule prešla granicu pozadinske fluorescencije) za gen *HNFI A* i endogenu kontrolu gen *HMBS* u tumorskom i u okolnom tkivu. Nakon normalizacije odredila sam razinu ekspresije svih uzoraka tumorskog i netumorskog tkiva te omjer ekspresije u te dvije vrste tkiva.

#### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Budući da dobiveni podaci nisu pratili normalnu distribuciju, koristila sam neparametrijske testove. Podatke koji su uključivali nominalne vrijednosti (spol, dob iznad ili ispod 60 godina, različita podjela etiologija, ishod, zadovoljen Milanski kriterij, stupanj diferencijacije, postojanje žilne invazije, pojava metastaza, ponovna pojava tumora) analizirala sam hi-kvadrat testom. Podatke koji su uključivali kontinuirane varijable (broj dana, tjedana i godina koliko su praćeni pacijenti, dob pacijenta, vrijednosti zgrušavanja, ukupnog bilirubina, kreatinina i  $\alpha$ -fetoproteina (AFP) u serumu te  $\Delta C_t$  za gen *HNFI A* tumorskog i  $\Delta C_t$  za gen *HNFI A* okolnog tkiva) usporedila sam Spearmanovim rho testom. Mann-Whitney U test koristila sam kako bih procijenila postoji li razlika u ekspresiji gena *HNFI A* između tumorskog i okolnog tkiva jetre. Test sam također koristila kako bih procijenila postoji li razlika u distribuciji ostalih kontinuiranih varijabli (broj dana, tjedana i godina koliko su praćeni pacijenti, dob pacijenta, vrijednosti zgrušavanja, ukupnog bilirubina, kreatinina i AFP-a u serumu te  $\Delta C_t$  za gen *HNFI A* tumorskog i  $\Delta C_t$  za gen *HNFI A* okolnog

tkiva) unutar dobi pacijenata (iznad ili ispod 60 godina), spola pacijenata (muški i ženski), etiologije tumora (virusnog i ostalog podrijetla, odnosno alkoholnog i ostalog podrijetla), preživljenja pacijenata (živi ili umrli), klasifikacije njihovog tumora po Milanskim kriterijima (unutar ili izvan kriterija) i ponovne pojave tumora (da ili ne).

Za obradu svih podataka koristila sam program STATISTICA®, a dobivene rezultate interpretirala sam sa 5%-tnom razinom značajnosti.

## 4. Rezultati

### 4.1. Koncentracija RNA

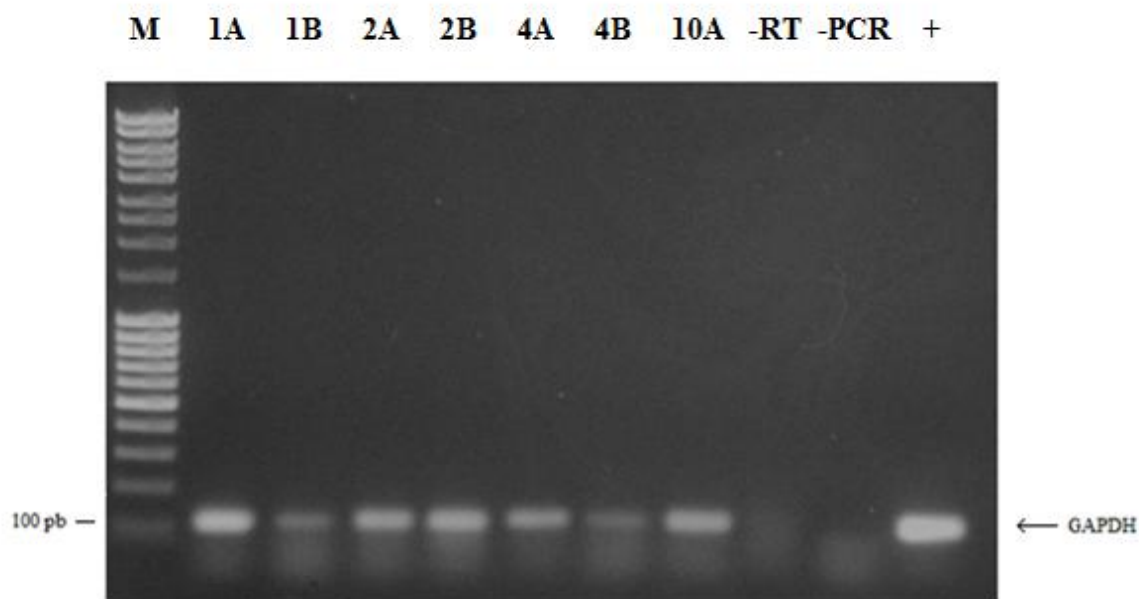
Koncentracije izoliranih RNA iz rezova uzoraka tumorskog tkiva fiksiranih formalinom, uklopljenih u parafin, varirale su između 22 i 264,3  $\mu\text{g/mL}$  sa srednjom vrijednosti 107,9  $\mu\text{g/mL}$  i medijanom 96,4  $\mu\text{g/mL}$ . Koncentracije izoliranih RNA iz rezova uzoraka okolnog tkiva jetre, fiksiranih formalinom, uklopljenih u parafin, varirale su između 23,3 i 455,6  $\mu\text{g/mL}$  sa srednjom vrijednosti 245,3  $\mu\text{g/mL}$  i medijanom 234,2  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 1).

Tablica 1. Koncentracija RNA ( $\mu\text{g/mL}$ ), izolirane iz tkiva hepatocelularnog karcinoma i okolnog tkiva jetre fiksiranog formalinom, uklopljenog u parafin (A: tumorsko tkivo, B: okolno tkivo)

Uzorak	Koncentracija RNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Uzorak	Koncentracija RNA ( $\mu\text{g/mL}$ )
1A	93,7	1B	161,0
2A	223,1	2B	161,6
3A	86,1	3B	158,4
4A	252,2	4B	196,9
5A	126,2	5B	23,3
6A	90,5	6B	212,2
7A	65,4	7B	200,0
8A	130,0	8B	216,5
9A	29,0	9B	61,2
10A	25,2	10B	286,8
11A	264,3	11B	414,4
12A	109,8	12B	275,7
13A	187,3	13B	219,6
14A	103,0	14B	196,4
15A	101,1	15B	270,2
16A	94,5	16B	95,5
17A	131,9	17B	71,8
18A	185,9	18B	132,8
19A	91,8	19B	85,4
20A	36,0	20B	245,6
21A	100,8	21B	329,0
22A	164,8	22B	370,4
23A	121,0	23B	85,6
24A	150,7	24B	320,6
25A	46,4	25B	179,0
26A	86,7	26B	412,2
27A	23,6	27B	299,2
28A	161,4	28B	382,6
29A	109,0	29B	277,6
30A	199,6	30B	432,8
31A	176,4	31B	415,4
32A	138,0	32B	333,2
33A	102,9	33B	455,6
34A	38,5	34B	190,4
35A	43,9	35B	292,8
36A	139,0	36B	180,9
37A	41,4	37B	294,4
38A	78,5	38B	260,4
39A	22,0	39B	234,2
40A	87,3	40B	263,2
41A	96,4	41B	165,6
42A	85,0	42B	308,4
43A	38,0	43B	134,0
44A	44,7	44B	405,6
45A	87,0	45B	232,8
46A	187,8	46B	210,8
47A	71,2	47B	321,6
48A	83,5	48B	335,4
49A	132,5	49B	210,8

## 4.2. Kvaliteta cDNA uzoraka

Nakon reverzne transkripcije lančana reakcija polimerazom početnicama specifičnima za gen *HPRT1* pokazivala je kontaminaciju ili nespecifično umnažanje pa sam cDNA svih uzoraka umnožila početnicama specifičnima za gen *GAPDH*. Rezultati su pokazali da je reverzna transkripcija uspješno provedena u 91 uzorku, odnosno u 45 uzoraka tumorskog i 46 uzoraka netumorskog tkiva (Slika 1). U preostalih 7 uzoraka lančana reakcija polimerazom početnicama za kontrolni gen nije dala produkt.



Slika 1. Umnažanje gena *GAPDH* za uzorke 1A, 1B, 2A, 2B, 4A, 4B te 10A uz negativnu kontrolu reverzne transkripcije (-RT) te negativnu i pozitivnu kontrolu lančane reakcije polimerazom (-PCR, +).

## 4.3. Razina ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom i okolnom tkivu

Od ukupno 98 uzoraka, rezultati  $C_t$  vrijednosti za gen *HNF1A* pokazali su ekspresiju u 38 uzoraka tumorskog tkiva i u 44 uzorka okolnog tkiva jetre.  $C_t$  vrijednosti za gen *HMBS* pokazale su njegovu ekspresiju u 46 uzoraka tumorskog tkiva i u 49 uzoraka okolnog tkiva.  $\Delta C_t$  za gen *HNF1A* (normaliziran ekspresijom gena *HMBS*) odredila sam u ukupno 36 uzoraka tumorskog tkiva te u 44 uzorka okolnog tkiva.

Vrijednosti  $\Delta C_t$  za gen *HNF1A* tumorskog tkiva varirale su između -1,48 i 2,40 sa srednjom vrijednosti -0,05, medijanom -0,17 i standardnom devijacijom 0,7. Vrijednosti  $\Delta C_t$

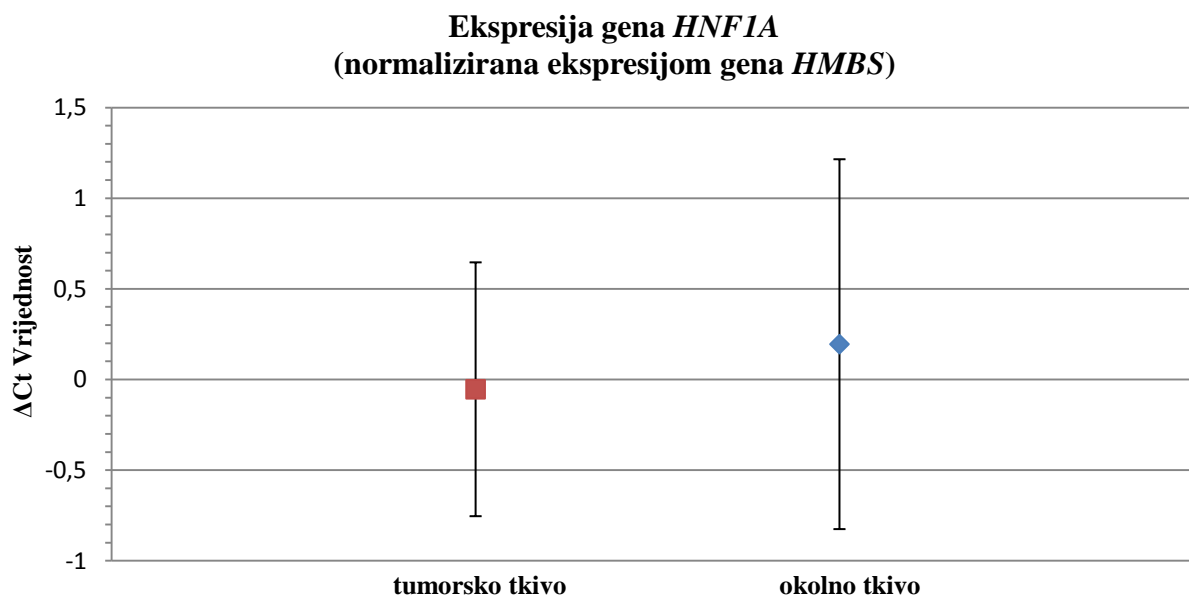


za gen *HNFI1A* okolnog tkiva varirale su između -2,18 i 2,81 sa srednjom vrijednosti 0,20, medijanom 0,38 i standardnom devijacijom 1,02 (Tablica 2, Slika 2).

$\Delta\Delta C_t$  vrijednost za gen *HNFI1A* u tumorskom tkivu u odnosu na okolno iznosila je -0,25, odnosno gen je u prosjeku bio 1,19 puta više eksprimiran u tumorskom nego u okolnom tkivu zahvaćene jetre (razlika u ekspresiji varirala je od 30% niže ekspresije u tumorskom tkivu do 2,02 puta više ekspresije u tumorskom tkivu).

Tablica 2. Ekspresija gena *HNFI1A*, normalizirana ekspresijom gena *HMBS*, tumorskog i okolnog tkiva jetre s hepatocelularnim karcinomom, dobivena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu.

Uzorak	$\Delta Ct$ (tumorsko tkivo) <i>HNFI1A - HMBS</i>	Uzorak	$\Delta Ct$ (okolno tkivo) <i>HNFI1A - HMBS</i>
1A	x	1B	x
2A	-0,77	2B	1,01
3A	0,47	3B	x
4A	-1,38	4B	-1,04
5A	x	5B	x
6A	2,40	6B	-0,60
7A	-0,06	7B	-0,49
8A	1,28	8B	1,95
9A	0,44	9B	0,76
10A	x	10B	0,85
11A	0,50	11B	0,28
12A	x	12B	0,72
13A	-1,48	13B	0,51
14A	0,03	14B	0,45
15A	0,14	15B	-0,90
16A	-0,87	16B	-0,32
17A	x	17B	0,98
18A	-1,24	18B	0,59
19A	x	19B	x
20A	1,51	20B	-0,42
21A	x	21B	-1,70
22A	-0,42	22B	-0,97
23A	-0,48	23B	-1,26
24A	-0,31	24B	0,43
25A	x	25B	2,81
26A	-0,81	26B	-0,50
27A	2,26	27B	0,53
28A	-1,17	28B	-0,01
29A	0,47	29B	-0,14
30A	-0,22	30B	0,15
31A	1,31	31B	0,33
32A	-1,37	32B	0,76
33A	-0,34	33B	1,18
34A	-0,14	34B	0,92
35A	0,90	35B	-0,35
36A	x	36B	0,45
37A	1,28	37B	1,06
38A	0,63	38B	-0,39
39A	x	39B	1,46
40A	-1,42	40B	0,54
41A	-1,38	41B	0,48
42A	0,04	42B	1,43
43A	x	43B	-0,72
44A	x	44B	-0,56
45A	-0,20	45B	0,11
46A	x	46B	0,44
47A	0,50	47B	x
48A	-0,99	48B	-0,02
49A	-0,99	49B	-2,18



Slika 2. Srednja vrijednost ekspresije gena *HNF1A*, normalizirane ekspresijom gena *HMBS*, uzoraka tumorskog i svih uzoraka okolnog tkiva jetre s hepatocelularnim karcinomom.

#### 4.4. Povezanost razine ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom i okolnom tkivu s ostalim markerima patobiologije tumora

Statistički značajna razlika u razini ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom tkivu i u okolnom tkivu jetre nije utvrđena ( $p=0,054$ ).

Spearmanov rho test pokazao je statistički značajnu pozitivnu korelaciju razine transkripcije gena *HNF1A* u tkivu jetre oko tumora i vrijednosti količine  $\alpha$ -fetoproteina (AFP) u serumu pacijenata ( $p=0,049$ ). Statistički značajna korelacija nije utvrđena između razine ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom tkivu i ostalih ispitivanih varijabli. Značajne su bile negativne korelacije vrijednosti AFP-a u serumu i vremena zgrušavanja ( $p=0,006$ ) te vrijednosti AFP-a u serumu i ukupnog bilirubina ( $p=0,018$ ). Utvrđena je i pozitivna korelacija vrijednosti ukupnog bilirubina i vremena zgrušavanja ( $p=0,000$ ) te pozitivna korelacija vrijednosti ukupnog bilirubina i koncentracije kreatinina ( $p=0,008$ ).

Rezultati Mann-Whitney U testa nisu pokazali statistički značajne razlike u ekspresiji gena *HNF1A* niti u tumorskom niti u okolnom tkivu jetre u odnosu na spol, podjelu pacijenata na mlađe i starije od 60 godina, etiologiju tumora (podjelu pacijenata na virusno i ostala podrijetla, odnosno alkoholno i ostala podrijetla), ishod bolesti, klasifikaciju tumora po

Milanskim kriterijima ili ponovnu pojavu tumora. Statistički je značajno dulje vrijeme zgrušavanja ( $p=0,000$ ) i viša vrijednost ukupnog bilirubina ( $p=0,008$ ), odnosno niža vrijednost AFP-a ( $p=0,013$ ) kod pacijenata koji su imali alkohol kao pozadinski faktor rizika. Statistički je značajna bila i niža vrijednost ukupnog bilirubina ( $p=0,010$ ) i kraće vrijeme zgrušavanja ( $p=0,003$ ) kod pacijenata koji su imali virus kao pozadinski faktor rizika. Statistički je značajno dulje vrijeme zgrušavanja kod muškaraca ( $p=0,019$ ).

Muškarci su statistički značajno češće imali alkoholnu etiologiju ( $p=0,007$ ) dok su žene u podlozi bolesti češće imale infekciju HCV-om ( $p=0,015$ ). Tumori pacijenata koji su imali infekciju HCV-om češće nisu zadovoljavali Milanske kriterije dok su tumori čija je etiologija uključivala infekciju HBV-om češće zadovoljavali Milanske kriterije ( $p=0,005$ ). Prisutnost žilne invazije bila je značajno češća kod onih tumora koji nisu zadovoljili Milanske kriterije ( $p=0,022$ ).

## 5. Diskusija

Usporedba razine ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom tkivu hepatocelularnog karcinoma i okolnom tkivu zahvaćene jetre pokazala je da ne postoji značajna razlika između ta dva dijela jetre. Iako razina ekspresije gena *HNF1A* u tim dijelovima jetre nije značajno različita, suprotno očekivanom vidljiva je nešto viša razina ekspresije tog gena u tumorskom tkivu nego u okolnom tkivu jetre (od parova u kojima je bila određena ekspresija i u tumorskom i u okolnom tkivu, 66,7% imalo je višu razinu ekspresije tog gena u tumorskom tkivu, dok je 33,3% imalo višu razinu ekspresije u okolnom tkivu jetre). HNF1 $\alpha$ , kao transkripcijski aktivator hepatocita i ključan protein za održavanje funkcije jetre, regulira ekspresiju mnogih gena uključenih u procese proliferacije, angiogeneze, epitelno-mezenhimske tranzicije, fukozilacije te glikolize, lipogeneze i glukoneogeneze. Utišana ekspresija gena *HNF1A* povezana je s deregulacijom tih signalnih putova, dok je sama deregulacija navedenih procesa dio tumorigeneze HCC-a. Kako okolno tkivo zahvaćene jetre najčešće predstavlja cirozu, koja je i sama patološko stanje koje se smatra predkarcinomskim stanjem HCC-a, moguće je da utišana ekspresija gena *HNF1A* predstavlja značajniji doprinos u razvoju ciroze nego prelasku ciroze u karcinom. Sukladno dobivenim rezultatima u prijašnjim je studijama također primijećena nešto viša razina ekspresije gena *HNF1A* i u ranom i u kasnom stadiju HCC-a u odnosu na razinu njegove ekspresije u ciroznom tkivu, pri čemu je ekspresija tog gena bila niža u sve tri vrste tkiva u odnosu na normalnu jetru (Behnke i sur. 2012).

Nadalje, rezultati ovog istraživanja pokazali su veliku varijabilnost razine ekspresije gena *HNF1A* i u tumorskom tkivu hepatocelularnog karcinoma i u okolnom tkivu zahvaćene jetre. Morfološka dijagnoza većine solidnih, malignih tumora često varira od izrazito homogene do heterogene dijagnoze te je na primjeru karcinoma jajnika (Jochumsen i sur. 2007) primijećena značajna intertumorska heterogenost, čak i kod tumora slične histologije i stadija. Histopatološke razlike tumora mogle bi objasniti dobivene varijacije u razini ekspresije gena *HNF1A* i u tkivu hepatocelularnog karcinoma.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajnu pozitivnu korelaciju razine transkripcije gena *HNF1A* u tkivu jetre oko tumora, koje u najvećem broju slučajeva predstavlja cirozu, i vrijednosti količine  $\alpha$ -fetoproteina (AFP) u serumu tih pacijenata. AFP je glikoprotein čija se koncentracija u serumu, ukoliko je povećana, smatra potvrdom HCC-a. Povišene vrijednosti količine AFP-a isto tako su primijećene kod pacijenata s kroničnim

hepatitisom (20% veće vrijednosti) i cirozom (40% veće vrijednosti) sa značajnim varijacijama tijekom perioda kronične bolesti jetre. Također je uočeno da vrijednosti količine AFP-a mogu biti povišene tijekom predkliničke faze HCC-a, prije mogućnosti detekcije karcinoma (Johnson 2001). Pozitivna korelacija razine transkripcije gena *HNF1A* u tkivu jetre oko tumora i vrijednosti količine AFP-a u serumu može biti posljedica aktivacije transkripcije AFP-a od strane samog HNF1 $\alpha$  upravo u stanicama ciroze - poznato je da regija promotora AFP-a sadrži nekoliko mjesta vezanja transkripcijskog aktivatora HNF1 $\alpha$  (Yu i sur. 2008).

Budući da je tkiva dostupnog za izolaciju RNA bilo malo te da su istraživanja rađena na uzorcima fiksiranim formalinom, uklopljenim u parafin (FFPE), pri čemu sam tretman formalinom utječe na stvaranje kovalentnih veza između makromolekula što rezultira degradacijom RNA, koncentracija dobivene RNA je očekivano niska. Uzorci tkiva svakog pacijenta razdijeljeni su u dvije zasebne parafinske kocke, na tumorsko tkivo i tkivo jetre koje se nalazi neposredno uz tumor. U tumorskom tkivu u usporedbi s odgovarajućim okolnim, netumorskim tkivom dobivena je dvostruko niža koncentracija RNA iz približno iste količine stanica. U ranijim istraživanjima također je primijećena razlika u koncentraciji RNA izolirane iz uzoraka fiksiranih formalinom, uklopljenih u parafin, u tumorskom i netumorskom tkivu. U odgovarajućim parovima tkiva primijećene su niže koncentracije RNA u tumorskom tkivu (uzorci debelog crijeva), ali i više koncentracije RNA u tumorskom tkivu (uzorci pluća) u usporedbi s odgovarajućim okolnim tkivom (Doleshal i sur. 2008). Uzrok dobivenim varijacijama stoga bi mogao biti različit oblik prilikom pohrane materijala i različit rez tkiva (Doleshal i sur. 2008) ili su takve varijacije posljedica veće degradiranosti RNA u tumorskom tkivu koje pokazuje različit sastav proteina od netumorskog tkiva (Kim i sur. 2010) Navedene razlike u degradiranosti, zbog normalizacije razine ekspresije endogenom kontrolom, ipak ne bi trebale utjecati na rezultate razina ekspresije u različitim dijelovima jetre (Doleshal i sur. 2008).

Podaci o kliničkoj slici pacijenata s hepatocelularnim karcinomom koji govore o napredovanju bolesti, etiologiji te spolu i dobi pacijenata pokazali su se konzistentnima u odnosu na dostupne podatke iz literature. Duže vrijeme zgrušavanja, povećane vrijednosti ukupnog bilirubina i povećane vrijednosti kreatinina govore o smanjenoj funkcionalnosti jetre. Vrijednosti ukupnog bilirubina i vremena zgrušavanja kod pacijenata bile su izrazito visoke, s pozitivnom korelacijom, sukladno prijašnjim istraživanjima po kojima su pacijenti s višim vrijednostima ukupnog bilirubina imali dulje vrijeme zgrušavanja (Carr i sur. 2014a). Pozitivna korelacija vrijednosti ukupnog bilirubina i koncentracije kreatinina očekivana je

budući da obje vrijednosti predstavljaju disfunkciju jetre. Visoke vrijednosti bilirubina izravno predstavljaju disfunkciju jetre budući da se bilirubin nakuplja zbog nemogućnosti njegova procesiranja u jetri (Limdi i Hyde 2003), dok visoke koncentracije kreatinina predstavljaju disfunkciju jetre neizravno, time što ona uzrokuje disfunkciju bubrega i nakupljanje kreatinina (Francoz i sur. 2010). U prijašnjim istraživanjima duže vrijeme zgrušavanja i povećane vrijednosti ukupnog bilirubina ne pokazuju konzistentnu korelaciju s višim vrijednostima AFP-a (Trevisani i sur. 1995; Carr i sur. 2014a; Pancoska i sur. 2010; Carr i sur. 2014b).

Kronična konzumacija alkohola i u ovom je radu, kao i u prijašnjim studijama, povezana sa smanjenom koagulacijom (Setshedi i sur. 2010). Također, pacijenti s alkoholnom etiologijom tumora češće su imali niže vrijednosti AFP-a u serumu (Gelatti i sur. 2003) te visoke vrijednosti ukupnog bilirubina (Lee i sur. 2014). Rezultati ovog rada potvrđuju povezanost virusne etiologije, naročito infekcije HBV-om, i niže vrijednosti ukupnog bilirubina u odnosu na ostale etiologije tumora (Miyagawa i sur. 1996). Rezultati također potvrđuju da pacijenti s virusnom etiologijom tumora najčešće imaju nepromijenjeno vrijeme zgrušavanja (Gelatti i sur. 2003). Slični odnosi etiologije i spola – veći broj muških pacijenata s alkoholnom etiologijom te veća učestalost infekcije HCV-a kod žena – uočeni su u obližnjim zemljama (Donato i sur. 2002), ali ne i u ostatku svijeta (Chen i sur. 2006). Dobiveni rezultati koji su utvrdili duže vrijeme zgrušavanja kod muškaraca i kod pacijenata s alkoholnom etiologijom kao podlogom bolesti stoga su očekivani.

Milanski kriteriji predstavljaju način selekcije pacijenata s najboljom prognozom, prikladnih za transplantaciju jetre. Korelacija između prisutnosti žilne invazije i onih tumora koji nisu zadovoljili Milanske kriterije ne čudi budući da je odsutnost žilne invazije jedan od Milanskih kriterija (El-Serag 2011). Prema ranijim istraživanjima tumori pacijenata koji imaju infekciju HCV-om imaju nešto lošije vrijednosti unutar modela koji procjenjuje jačinu bolesti jetre (*MELD* od engl. *model for end stage liver disease*) te značajno lošije preživljenje nakon transplantacije u odnosu na tumore čija je etiologija uključivala infekciju HBV-om (Tandoi i sur. 2013). Neka istraživanja pokazala su da pacijenti s infekcijom HBV-om i HCV-om imaju slične karakteristike, bolje u odnosu na pacijente s ostalim etiologijama bolesti (Stroffolini i sur. 1998). Rezultati tih istraživanja odgovaraju ovdje prikazanim rezultatima po kojima su tumori čija je etiologija uključivala infekciju HBV-om češće zadovoljavali Milanske kriterije, dok tumori pacijenata koji su imali infekciju HCV-om češće nisu zadovoljavali Milanske kriterije.

Ukupno, rezultati pokazuju reprezentativnu skupinu pacijenata s hepatocelularnim karcinomom kod kojih nije bilo moguće dokazati da promjena ekspresije gena *HNF1A*, na razini transkripcije, sudjeluje u koraku transformacije predkarcinomskog stanja u karcinom. Iako su uzorci tkiva bili arhivski, fiksirani formalinom, uklopljeni u parafin, pa su time imali niži prinos RNA i bili dijelom degradirani, podaci su pouzdani budući da je kvaliteta RNA zadovoljila potrebe za daljnju analizu (kvaliteta cDNA za 7 uzoraka potvrđena je osjetljivijom metodom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu).

Iako rezultati jesu reprezentativni, uzorci pacijenata uključivali su tumorsko tkivo i dio jetre koji se nalazi neposredno uz tumor, pa bi se iz tog razloga ovo istraživanje moglo proširiti analizom razine ekspresije gena *HNF1A* u tkivu zdravih jetara, odnosno tkivu jetre osoba koje nemaju niti cirozu niti karcinom. Također, budući da je skupina od 49 pacijenata imala različitu etiologiju bolesti što je moglo uzrokovati uočene varijacije, ovakvo istraživanje bilo bi dobro ponoviti na većem uzorku i homogenijoj skupini pacijenata koja kao pozadinu bolesti ima samo jedan od navedenih faktora rizika te podatke o razini ekspresije gena *HNF1A* usporediti s podacima o razini njegove ekspresije u tkivu ciroze tih pacijenata, kao i zdrave jetre.



## 6. Zaključci

- Različite koncentracije RNA izolirane iz tumorskog i okolnog tkiva jetre ukazuju na pojačanu degradaciju makromolekula u tumorskom tkivu.
- Varijabilnost razine ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom tkivu ukazuje na visoku heterogenost ovog tumora.
- Promjena ekspresije gena *HNF1A* nije uključena u razvoj hepatocelularnog karcinoma iz predkarcinomskog stadija.

## 7. Literatura

- Amiri A., Noei F., Jeganathan S., Kulkarni G., Pinke D. E., Lee J. M. 2007. eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene* 26:21, 3027-3040.
- Barrett J. C., Clayton D. G., Concannon P., Akolkar B., Cooper J. D., Erlich H. A., i sur. 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41:6, 703-707.
- Battegay E. J., Rupp J., Iruela-Arispe L., Sage E. H., Pech M. 1994. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 125:4, 917-928.
- Becker D. J., Lowe J. B. 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13:7, 41R–53R.
- Behnke M., Reimers M., Fisher R. 2012. The expression of embryonic liver development genes in hepatitis C induced cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Cancers* 4:3, 945-968.
- Behrens J., Mareel M. M., Van Roy F. M., Birchmeier W. 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108:6, 2435-2447.
- Bialecki E. S. i Di Bisceglie A. M. 2005. Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma *HPB* 7:1, 26–34.
- Bluteau O., Jeannot E., Bioulac-Sage P., Marqués J. M., Blanc J. F., Bui H., Beaudoin J. C., i sur. 2002. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet* 32:2, 312-315.
- Boyault S., Rickman D. S., de Reynies A., Balabaud C., Rebouissou S., Jeannot E. i sur. 2007. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45:1, 42-52.
- Bulla G. A., Aylmer C. M., Dust A. L., Kurkewich J. L., Mire L. K., Estanda A. B. 2012. Genome-wide analysis of hepatic gene silencing in hepatoma cell variants. *Genomics* 100:3, 176-183.

- Cano A., Perez-Moreno M. A., Rodrigo I., Locascio A, Blanco M. J., del Barrio M. G. i sur. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:2, 76–83.
- Carr B. I., Guerra V., Giannini E. G., Farinati F., Ciccarese F., Ludovico Rapaccini G., Di Marco M. 2014. Association of abnormal plasma bilirubin with aggressive hepatocellular carcinoma phenotype. *Semin Oncol* 41:2, 252-258.
- Carr B. I., Pancoska P., Giannini E. G., Farinati F., Ciccarese F., Ludovico Rapaccini G., Di Marco M. i sur. 2014. Identification of two clinical hepatocellular carcinoma patient phenotypes from results of standard screening parameters. *Semin Oncol* 41:3, 406-414.
- Cereghini S. 1996. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 10:2, 267–282.
- Chen C. H., Huang G. T., Yang P. M., Chen P. J., Lai M. Y., Chen D. S., Wang J. D., Sheu J. C. 2006. Hepatitis B- and C-related hepatocellular carcinomas yield different clinical features and prognosis. *Eur J Cancer* 42:15, 2524-2529.
- Chi Y. I., Frantz J. D., Oh B. C., Hansen L., Dhe-Paganon S., Shoelson S. E. 2002. Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Mol Cell* 10:5, 1129-1137.
- Costantini S., Di Bernardo G., Cammarota M., Castello G., Colonna G. 2013. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* 518:2, 335-345.
- Doleshal M., Magotra A. A., Choudhury B., Cannon B. D., Labourier E., Szafranska A. E. 2008. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 10:3, 203-211.
- Donato F., Tagger A., Gelatti U., Parrinello G., Boffetta P., Albertini A., Decarli A., Trevisi P. i sur. 2002. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 155:4, 323-331.
- El-Serag H. B., Rudolph K. L. 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132:7, 2557-2576.
- El-Serag H. B. 2011. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 365:12, 1118-1127.

- Farazi P. A., DePinho R. A. 2006. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6:9, 674-687.
- Francoz C., Prié D., Abdelrazek W., Moreau R., Mandot A., Belghiti J., Valla D., Durand F. 2010. Inaccuracies of creatinine and creatinine-based equations in candidates for liver transplantation with low creatinine: impact on the model for end-stage liver disease score. *Liver Transpl* 16:10, 1169-1177.
- Gelatti U., Donato F., Tagger A., Fantoni C., Portolani N., Ribero M. L., Martelli C., Trevisi P., Covolo L. i sur. 2003. Etiology of hepatocellular carcinoma influences clinical and pathologic features but not patient survival. *Am J Gastroenterol* 98:4, 907-914.
- Gotzmann J., Mikula M., Eger A., Schulte-Hermann R., Foisner R., Beug H. i sur. 2004. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res* 566:1, 9–20.
- Gotzmann J., Fischer A. N., Zojer M., Mikula M., Proell V., Huber H., Jechlinger M. i sur. 2006. A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* 25:22, 3170-3185.
- He N., Park K., Zhang Y., Huang J., Lu S., Wang L. 2008. Epigenetic inhibition of nuclear receptor small heterodimer partner is associated with and regulates hepatocellular carcinoma growth. *Gastroenterology* 134:3, 793-802.
- Heldin C. H., Westermark B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:4, 1283-1316.
- Inoki K., Corradetti M. N., Guan K. L. 2005. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37:1, 19-24.
- Jochumsen K. M., Tan Q., Hølund B., Kruse T. A., Mogensen O. 2007. Gene expression in epithelial ovarian cancer: a study of intratumor heterogeneity. *Int J Gynecol Cancer* 17:5, 979-985.
- Johnson P. J. 2001. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 5:1, 145–159.
- Kim I., Morimura K., Shah Y., Yang Q., Ward J. M., Gonzalez F. J. 2007. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28:5, 940–946.

Kim J. W., Ye Q., Forgues M., Chen Y., Budhu A., Sime J., Hofseth L. J., Kaul R., Wang X. W. 2004. Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis. *Hepatology* 39:2, 518-27.

Kumar M., Zhao X., Wang X. W. 2011. Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine? *Cell Biosci* 1:1, 5.

Lau K. S., Partridge E. A., Grigorian A., Silvescu C. I., Reinhold V. N., Demetriou M., i sur. 2007. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129:1, 123–134.

Lauc G., Essafi A., Huffman J. E., Hayward C., Knežević A., Kattla J. J., Polašek O. i sur. 2010. Genomics Meets Glycomics - The First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1a as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation. *PLoS Genet* 6:12, e1001256.

Lee F. Y., Lee H., Hubbert M. L., Edwards P. A., Zhang Y. 2006. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci* 31:10, 572-580.

Lee M., Kim W., Choi Y., Kim S., Kim D., Yu S. J., Lee J. H., Kim H. Y., Jung Y. J., Kim B. G. 2014. Spontaneous evolution in bilirubin levels predicts liver-related mortality in patients with alcoholic hepatitis. *PLoS One* 9:7, e100870.

Limdi J. K., Hyde G. M. 2003. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J* 79:932, 307-312.

Mehta A., Norton P., Liang H., Comunale M. A., Wang M., Rodemich-Betesh L., Koszycki A. i sur. 2012. Increased Levels of Tetra-antennary N-Linked Glycan but Not Core Fucosylation Are Associated with Hepatocellular Carcinoma Tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21:6, 925-933.

Miyagawa S., Kawasaki S., Makuuchi M. 1996. Comparison of the characteristics of hepatocellular carcinoma between hepatitis B and C viral infection: tumor multicentricity in cirrhotic liver with hepatitis C. *Hepatology* 24:2, 307-310.

Miyoshi E., Nishikawa A., Ihara Y., Gu J., Sugiyama T., Hayashi N. Fusamoto H., i sur. 1993. N-acetylglucosaminyltransferase III and V messenger RNA levels in LEC rats during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 53:17, 3899–3902.

- Miyoshi E., Moriwaki K., Nakagawa T. 2008. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem* 143:6, 725-729.
- Nault J. C., Zucman Rossi J. 2013. Molecular Classification of Hepatocellular Adenomas. *Int J Hepatol* 2013, 315947.
- Nyunt O., Wu J. Y., McGown I. N., Harris M., Huynh T., Leong G. M., Cowley D. M., Cotterill A. M. 2009. Investigating Maturity Onset Diabetes of the Young. *Clin Biochem Rev* 30:2, 67-74.
- Ohtsubo K., Chen M. Z., Olefski J. M., Marth J. D. 2011. Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat Med* 17:9, 1067-1075.
- Pancoska P., Carr B. I., Branch R. A. 2010. Network-based analysis of survival for unresectable hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 37:2, 170-181.
- Pelletier L., Rebouissou S., Paris A., Rathahao-Paris E., Perdu E., Bioulac-Sage P. i sur. 2010. Loss of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  function in human hepatocellular adenomas leads to aberrant activation of signaling pathways involved in tumorigenesis. *Hepatology* 51:2, 557-566.
- Pelletier L., Rebouissou S., Vignjevic D., Bioulac-Sage P., Zucman-Rossi J. 2011. HNF1 $\alpha$  inhibition triggers epithelial-mesenchymal transition in human liver cancer cell lines. *BMC Cancer* 11, 427.
- Plentz R. R., Schlegelberger B., Flemming P., Gebel M., Kreipe H., Manns M. P. i sur. 2005. Telomere shortening correlates with increasing aneuploidy of chromosome 8 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42:3, 522-526.
- Pontoglio M., Barra J., Hadchouel M., Doyen A., Kress C., Bach J. P., Babinet C., Yaniv M. 1996. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84:4, 575-585.
- Raza A., Sood G. K. 2014. Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol* 20:15, 4115-4127.

Rebouissou S., Vasiliu V., Thomas C., Bellanné-Chantelot C., Bui H., Chrétien Y. i sur. 2005. Germline hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  mutations in renal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* 14:5, 603-661.

Rudolph K. L., Chang S., Millard M., Schreiber-Agus N., DePinho R. A. 2000. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 287:5456, 1253-1258.

Schlaeger C., Longerich T., Schiller C., Bewerunge P., Mehrabi A., Toedt G., i sur. 2008. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 47:2, 511-520.

Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:3, 311-322.

Servitja M. J., Pignatelli M., Maestro M. A., Cardalda C., Boj S. F., Lozano J., Blanco E., i sur. 2009. HNF1 $\alpha$  (MODY3) Controls Tissue-Specific Transcriptional Programs and Exerts Opposed Effects on Cell Growth in Pancreatic Islets and Liver. *Mol Cell Biol* 29:11, 2945-2959.

Setshedi M., Wands J. R., M de la Monte S. 2010. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid Med Cell Longev* 3:3, 178-185.

Stoot J. H., Coelen R. J., De Jong M. C., Dejong C. H. 2010. Malignant transformation of hepatocellular adenoma into hepatocellular carcinomas: a systematic review including more than 1600 adenoma cases. *HPB* 12:8, 509-522.

Stroffolini T., Andreone P., Andriulli A., Ascione A., Craxi A., Chiaramonte M., Galante D., i sur. 1998. Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol* 29:6, 944-952.

Swinnen J. V., Brusselmans K., Verhoeven G. 2006. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:4, 358-365.

Tandoi F., Ponte E., Saffioti M. C., Patrono D., Mirabella S., Lupo F., Romagnoli R., Salizzoni M. 2013. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma within Milan Criteria in patients with Model for End-Stage Liver Disease score below 15: the impact of the etiology of cirrhosis on long-term survival. *Transplant Proc* 45:7, 2711-2714.

Trevisani F., D'Intino P. E., Caraceni P., Pizzo M., Stefanini G. F., Mazziotti A., Grazi G. L. i sur. 1995. Etiologic factors and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. Differences between cirrhotic and noncirrhotic Italian patients. *Cancer* 75:9, 2220-2232.

Wain H. M., Bruford E. A., Lovering R. C., Lush M. J., Wright M. W., Povey S. 2002. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79:4, 464-470.

Willson J. S. B., Godwin T. D., Wiggins G. A. R., Guilford P. J., McCall J. L. 2013. Primary hepatocellular neoplasms in a MODY3 family with a novel *HNF1A* germline mutation. *J Hepatol* 59:4, 904-907.

Yamagata K., Oda N., Kaisaki P. J., Menzel S., Furuta H., Vaxillaire M., Southam L., i sur. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384:6608, 455-458.

Yu M., Wang J., Li W., Yuan Y. Z., Li C. Y., Qian X. H., Xu W. X., Zhan Y. Q., Yang X. M. 2008. Proteomic screen defines the hepatocyte nuclear factor 1alpha-binding partners and identifies HMGB1 as a new cofactor of HNF1alpha. *Nucleic Acids Res* 36:4, 1209-1219.

Zhou X., Tan M., Stone Hawthorne V., Klos K. S., Lan K. H., Yang Y. i sur. 2004. Activation of the Akt/ mammalian target o frapamycin/ 4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res* 10:20, 6779-6788.

Zoldoš V., Horvat T., Novokmet M., Cuenin C., Mužinić A., Pučić M., Huffman J. E., i sur. 2012. Epigenetic silencing of *HNF1A* associates with changes in the composition of the human plasma N-glycome. *Epigenetics* 7:2, 164-172.

[http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#gene\\_sym](http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#gene_sym)

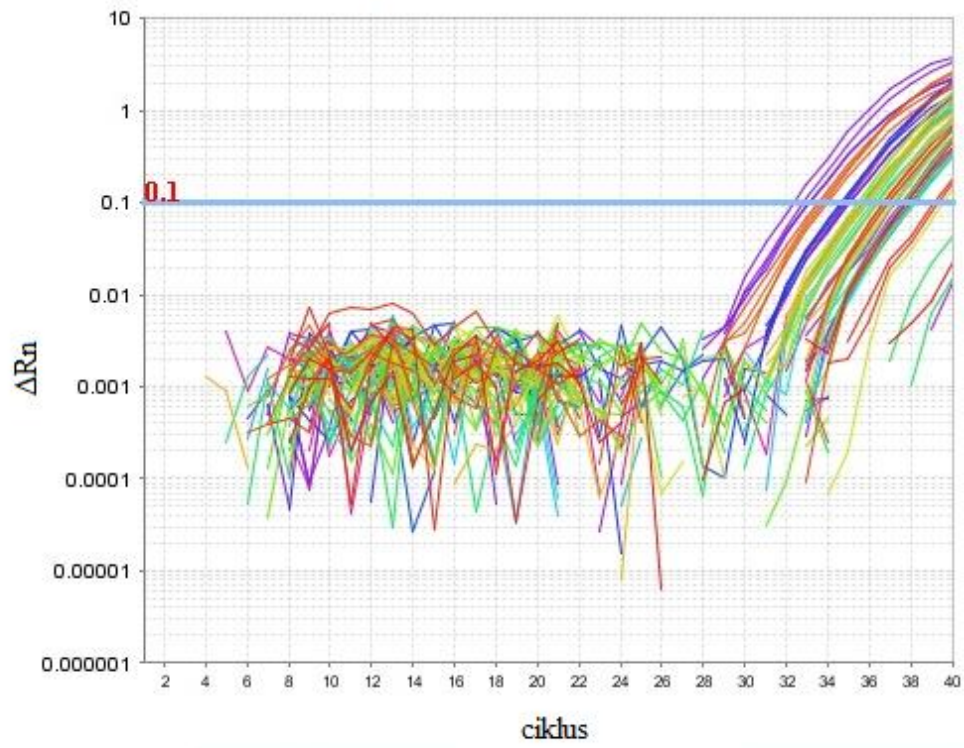


## 8. Prilozi

Popis priloga:

- Prilog I: Reprezentativni prikaz amplifikacijske krivulje dobivene lančanom reakcijom polimerazom; pokazuje varijacije količine DNA (proporcionalno logaritmu fluorescencije signalne molekule kojoj je oduzeta pozadinska fluorescencija) ovisno o ciklusu reakcije.

# amplifikacijska krivulja



Prilog I

## 9. Životopis

Rođena sam 20. travnja 1990. u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Medvedgrad i Gimnaziju Lucijana Vranjanina kao odlična učenica. Akademske godine 2009./2010. upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Završila sam ga u rujnu 2012., čime sam stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol.). Akademske godine 2012./2013. upisala sam diplomski studij molekularne biologije koji trenutno završavam. Tijekom studija volontirala sam na projektima poput „Noć biologije“ i „Moja prva Knjiga“, a radila sam i kao instruktora aerobnog treninga. Odlično se služim engleskim jezikom u čitanju, pisanju i komunikaciji te poznajem osnove njemačkog jezika. Informatički sam pismena.