

Polimorfizmi gena BIRC5 i ekspresija izoformi proteina survivina u karcinomu dojke

Vincetić, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:093083>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Magdalena Vincetić

Polimorfizmi gena BIRC5 i ekspresija izoformi proteina
survivina u karcinomu dojke

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom doc. dr. sc. Vesne Musani i suvodstvom izv. prof. dr. sc. Inge Marijanović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Vesni Musani na poticanju na razmišljanje, savjetima i svojoj pomoći oko izvođenja diplomskog rada.

Zahvaljujem voditelju laboratorija doc. dr. sc. Petru Ozretiću što mi je omogućio izradu diplomskog rada u njihovom laboratoriju te na savjetima i pomoći sa statistikom.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ingi Marijanović na stručnom savjetovanju.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima, Domagoju, Ivani i Katarini na njihovoj potpori, strpljenju i vjerovanju u mene.

Također zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinjeli nastajanju ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Polimorfizmi gena *BIRC5* i ekspresija izoformi proteina survivina u karcinomu dojke

Magdalena Vincetić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Karcinom dojke je jedan od najčešćih karcinoma i vodeći je uzrok smrti od raka kod žena diljem svijeta i u Hrvatskoj. Postoje jako velike razlike u preživljenju kod pacijentica zbog čega postoji potreba za otkrivanje osjetljivih dijagnostičkih i prognostičkih markera. Survivin, kodiran genom *BIRC5*, je jedan od proteina inhibitora stanične smrti i njegova razina je znatno povećana u gotovo svim tumorima dok u normalnim diferenciranim tkivima odraslih organizama nije eksprimiran. U karcinomu dojke je njegova ekspresija povezana s povećanom otpornošću na kemo- i radioterapiju, višim histološkim stupnjem, mlađom dobi obolijevanja, veličinom tumora i negativnim statusom estrogenskih receptora. Istraživala sam polimorfizme gena *BIRC5* i ekspresiju različitih izoformi survivina u karcinomu dojke metodom analize heterodupleksa, sekvenciranjem DNA i metodom qRT-PCR. Pronašla sam jedanaest polimorfizama gena *BIRC5* i njihove frekvencije u pacijenticama s karcinomom dojke se nisu značajno razlikovale od frekvencija u zdravim kontrolama. Čini se da polimorfizmi gena *BIRC5* nemaju značajnu ulogu u nastanku karcinoma dojke, no moguće je da bi veći broj uzoraka pokazao drugačije rezultate. Pretpostavka da se određivanjem razine ekspresije nekih izoformi gena *BIRC5* može razlikovati tumorsko od zdravog tkiva potvrđena je za pet od osam izoformi.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: survivin; gen *BIRC5*; polimorfizmi; izoforme; karcinom dojke
81 stranica, 45 slika, 20 tablica, 136 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Voditelj: Dr. sc. Vesna Musani, doc.

Suvoditelj: Dr. sc. Inga Marijanović, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Inga Marijanović, izv. prof.

Dr. sc. Silvija Černi, doc.

Dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

Rad prihvaćen: 19. veljače 2020. godine

BIRC5 gene polymorphisms and expression of survivin protein isoforms in breast cancer

Magdalena Vincetić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Breast cancer is one of the most common cancers and is the leading cause of cancer deaths in women worldwide and in Croatia. There are very large differences in patient survival, which is why there is a need to detect sensitive diagnostic and prognostic markers. Survivin, encoded by the *BIRC5* gene, is one of the proteins of cell death inhibitors (apoptosis) and its level is significantly increased in almost all tumors, whereas it is not expressed in normal differentiated tissues of adult organisms. In breast cancer, its expression is associated with increased resistance to chemo- and radiotherapy, higher histologic grade, younger age, tumor size and negative estrogen receptor status. I studied *BIRC5* gene polymorphisms and expression of various survivin isoforms in breast cancer by heteroduplex analysis, DNA sequencing, and qRT-PCR. I found eleven *BIRC5* gene polymorphisms and their frequencies in patients with breast cancer did not differ significantly from the frequencies in healthy controls. *BIRC5* gene polymorphisms do not appear to play a significant role in the development of breast cancer, but it is possible that a larger sample size would show different results. The assumption that by determining the expression level of some isoforms of the *BIRC5* gene can be differentiated tumor-free from healthy tissue was confirmed for five of the eight isoforms.

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: survivin; *BIRC5* gene; polymorphisms; isoforms; breast cancer
81 pages, 45 figures, 20 tables, 136 references, original in: croatian

Supervisor: Dr. sc. Vesna Musani, Asst. Prof.

Cosupervisor: Dr. sc. Inga Marijanović, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Inga Marijanović, Assoc. Prof.

Dr. sc. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. sc. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 19th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Survivin	1
1.1.1. Struktura survivina	1
1.1.2. Alternativno prekrajanje survivina	2
1.1.3. Polimorfizmi gena <i>BIRC5</i>	4
1.1.4. Regulacija ekspresije survivina	5
1.1.4.1. Transkripcijska regulacija	6
1.1.4.2. Posttranslacijska regulacija	7
1.1.4.3. Regulacija povezana s receptorskim tirozin kinazama	8
1.1.5. Lokalizacija survivina	9
1.1.6. Funkcije survivina u stanici	11
1.1.6.1. Mitoza	11
1.1.6.2. Mitohondrij	11
1.1.6.3. Matičnost	12
1.1.6.4. Migracija i angiogeneza	12
1.1.6.5. Stanična smrt	13
1.2. Karcinom dojke i survivin	14
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Uzorkovanje	18
3.2. Izolacija genomske DNA	18
3.3. Određivanje koncentracije DNA	19
3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	19
3.4.1. Odabir fragmenata za umnažanje metodom PCR	20
3.4.2. Postupak metode PCR	22
3.5. Elektroforeza	22
3.5.1. Elektroforeza na agaroznom gelu	22
3.5.2. Postupak elektroforeze na agaroznom gelu	23
3.6. Analiza heterodupleksa	24
3.6.1. Flourescentna detekcija heterodupleksa (High resolution melting)	26
3.7. Sekvenciranje	26

3.8. Izolacija RNA.....	27
3.9. Određivanje koncentracije RNA	27
3.10. Reverzna transkripcija	28
3.11. Kvantitativni real-time PCR (qRT-PCR)	29
3.12. Statistička analiza.....	30
4. REZULTATI.....	32
4.1. Genotipizacija.....	32
4.1.1. Promotorska regija oko polimorfizma c.-1547	33
4.1.2. Promotorska regija oko polimorfizma c.-625	34
4.1.3. Promotorska regija oko polimorfizma c.-241	37
4.1.4. Ekson 1	39
4.1.5. Ekson 4	41
4.1.6. 3' UTR regija oko c.9809	44
4.1.7. 3' UTR regija oko c.10611	45
4.2. Analiza ekspresije gena <i>BIRC5</i>	47
4.2.1. Razina ekspresije izoformi gena <i>BIRC5</i> u uzorcima karcinoma dojke i kontrolnim uzorcima zdravog tkiva dojke.....	47
4.2.2. Korelacija između ekspresija različitih izoformi gena <i>BIRC5</i>	53
4.2.3. Povezanost polimorfizama gena <i>BIRC5</i> s ekspresijom izoformi gena <i>BIRC5</i> u uzorcima karcinoma dojke i kontrolnim uzorcima zdravog tkiva dojke	54
5. RASPRAVA.....	63
5.1. Polimorfizmi gena <i>BIRC5</i>	63
5.2. Ekspresija izoformi gena <i>BIRC5</i>	65
5.3. Povezanost polimorfizama i ekspresije izoformi gena <i>BIRC5</i>	66
6. ZAKLJUČAK	67
7. LITERATURA.....	68
ŽIVOTOPIS	81

POPIS KRATICA

3' UTR - eng. 3' untranslated region, 3' netranslatirana regija

5' UTR - eng. 5' untranslated region, 5' netranslatirana regija

BH domena - eng. Bcl-2 homology domain, Bcl-2 domena homologije

BIR - eng. Baculoviral IAP Repeat, bakulovirusna IAP ponavljanja

BIRC2 - eng. BIR-containing 2, gen koji sadrži domene IAP bakulovirusa 2

BIRC3 - eng. BIR-containing 3, gen koji sadrži domene IAP bakulovirusa 3

BIRC5 - eng. BIR-containing 5, gen koji sadrži domene IAP bakulovirusa 5

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

CDK1 - eng. cyclin-dependent kinase 1, kinaza ovisna o ciklinima 1

CDK4 - eng. cyclin-dependent kinase 4, kinaza ovisna o ciklinima 4

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

cIAP1 - eng. cell IAP1, stanični IAP1

cIAP2 - eng. cell IAP2, stanični IAP2

CPC - eng. chromosomal passenger complex, kromosomski putnički kompleks

CRM1 - eng. chromosome region maintenance protein 1, protein održavanja kromosomske regije 1

dNTP - eng. deoxyribonucleoside triphosphate, deoksiribonukleozid trifosfat

EGFR - eng. epidermal growth factor receptor, receptor epidermalnog faktora rasta

HBXIP - eng. hepatitis B virus X-interacting protein, X-intereagirajući protein virusa hepatitisa B

HER2 - eng. human epidermal growth factor receptor 2, receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2

HIF-1 α - eng. hypoxia-inducible factor-1 α , faktor 1 α induciran hipoksijom

Hsp90 - eng. heat shock protein 90, protein toplinskog šoka 90

HWE - eng. Hardy-Weinberg equilibrium, Hardy-Weinberg ravnoteža

IAP – eng. inhibitor of apoptosis proteins, inhibitor apoptotskih proteina

IGF-1R - eng. insulin-like growth factor 1 receptor, receptor faktora rasta sličnog inzulinu 1

ILP2 - eng. IAP-like protein 2, protein 2 sličan IAP-u

INCENP - eng. inner centromere protein, protein unutarne centromere

MEK/MAPK - eng. mitogen-activated-protein kinases, protein kinaze aktivirane mitogenima

mTOR - eng. mammalian/mechanistic target of rapamycin, ciljna molekula rapamicina u sisavaca

ML-IAP - eng. melanoma IAP, melanom IAP

NAIP – eng. neuron apoptosis inhibiting protein, protein koji inhibira apoptozu neurona

NES - eng. nuclear export signal, jezgrin izlazni signal

NF- κ B - eng. nuclear factor kappa-B, jezgreni faktor kappa B

NLS - eng. nuclear localisation signal, jezgrin lokalizacijski signal

Oct4 - eng. octamer-binding transcription factor 4, oktamer-vezujući transkripcijski faktor 4

PAI-1 - eng. plasminogen activator inhibitor 1, inhibitor plazminogenkog aktivatora 1

PCR - eng. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom

PI3K/Akt - eng. phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B or Akt, fosfatidilinozitol 3 kinaza/protein kinaza B ili Akt

Plk1 - eng. Polo-like kinase 1, kinaza slična Polo kinazama 1

PKB - eng. protein kinase B, protein kinaza B; nazvana i AKT1

Rb - eng. retinoblastoma protein, retinoblastomski protein

RBCL pufer - eng. Red Blood Cell Lysis Buffer, pufer za lizu eritrocita

SDS - eng. sodium dodecyl sulfate, natrij dodecil sulfat

SEM - eng. standard error of the mean, standardna pogreška srednje vrijednosti

shRNA - eng. short hairpin RNA, mala ukosnica RNA

SNP - eng. single nucleotide polymorphism, polimorfizam jednog nukleotida

STAT3 - eng. signal transducer and activator of transcription 3, provodnik signala i aktivator transkripcije 3

TNF - eng. tumor necrosis factor, faktor nekroze tumora

TRAIL-R1 - tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1, receptor za ligand koj inducira apoptozu povezan s TNF

uPA - eng. urokinase plasminogen activator, urokinazni plazminogeni aktivator

UV - eng. ultraviolet light, ultraljubičasta svjetlost

VEGF - eng. vascular endothelial growth factor, vaskularni endotelni faktor rasta

XIAP-XAF-1 - eng. X-linked inhibitor of apoptosis protein - XIAP-associated factor 1, X-vezani inhibitor apoptoze - XIAP-vezani faktor 1

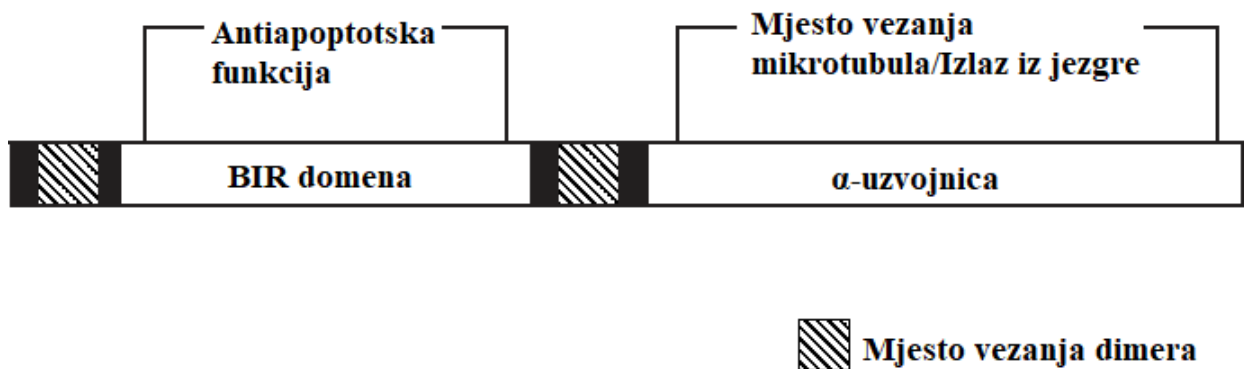
1. UVOD

1.1. Survivin

Gen *BIRC5* (eng. Baculoviral IAP Repeat-Containing 5, gen koji sadrži domene IAP bakulovirusa 5) odnosno njegov proteinski produkt survivin jedan je od prvih otkrivenih proteina inhibitora apoptoze (IAP) koji čine važnu obitelj proteina regulatora apoptoze (Deveraux i sur. 1997). Njegova ekspresija je regulirana tijekom razvoja organizma te se eksprimira tijekom diferencijacije stanica i kod ljudi i kod miševa (Adida i sur. 1998). Survivin je obično ekspimiran u embrionalnim tkivima, a homozigotna delecija survivina rezultira ranom embrionalnom smrću, pokazujući njegovu bitnu ulogu u staničnom razvoju, diferencijaciji i homeostazi (Uren i sur. 2000). Također, otkriveno je da se survivin selektivno eksprimira u tumorskim stanicama, ali ne i u normalnim tkivima (Ambrosini i sur. 1997). Prekomjerna ekspresija survivina često je povezana s razvojem raka, lošom prognozom i otpornošću na kemoterapijske lijekove. Pored toga, pronađene su različite izoforme survivina, povezane s boljim ili lošijim reakcijama na kemoterapiju, ovisno o izoformi i vrsti raka. Ovim radom nastoji se utvrditi uloga polimorfizama gena *BIRC5* i ekspresije izoformi survivina u karcinomu dojke.

1.1.1. Struktura survivina

Ambrosini i sur. su 1997. godine klonirali gen *BIRC5* koji kodira ljudski survivin. Obuhvaća 14,7 kb na telomernom kraju kromosoma 17q25, sadrži četiri eksona razdvojena s tri introna i kodira protein od 142 aminokiseline veličine 16,5 kDa (Ambrosini i sur. 1997, Wheatley i McNeish 2005). Ima promotor bez regije „TATA-box“ s CpG otokom (~250 nt), jednu regiju CHR (eng. cell cycle homology region, homologna regija staničnog ciklusa), tri elementa CDE (eng. cell-cycle dependent element, element ovisan o staničnom ciklusu) i brojna mjesta Sp1. Delecija elemenata CHR i CDE u području promotora *BIRC5* dovodi do gubitka ekspresije ovisne o staničnom ciklusu koja je potrebna za bazalne transkripcijske potrebe ekspresije survivina (Fengzhi i Altieri 1999). Sve dosadašnje izoforme survivina sadrže samo jednu od karakterističnih N-terminalnih domena BIR (eng. Baculovirus IAP Repeat, bakulovirusna IAP ponavljanja), a produljena karboksi-terminalna α -uzvojnica zamjenjuje IAP karakterističnu domenu „RING - finger“ (Slika 1).



Slika 1. Struktura i funkcije survivina (Yamamoto i sur. 2008).

Domena BIR je važna za antiapoptotsku funkciju, dok amfipatska α -uzvojnica djeluje na tubulinske strukture (Wheatley i McNeish 2005). Survivin se u otopini kristalizira kao homodimer; dva monomera survivina međusobno reagiraju preko središnje vezne regije, pomoću N-terminalnih ostataka Leu6 i Trp10 (Verdecia i sur. 2000). Budući da izoforme survivina pokazuju različita svojstva povezana s apoptozom, stvaranje heterodimera između izoformi survivina moglo bi biti važno u regulaciji njegove funkcije s potencijalno značajnim implikacijama u karcinogenezi.

1.1.2. Alternativno prekrajanje surivina

Alternativno prekrajanje prekursora glasničke RNA (pre-mRNA) je proces tijekom ekspresije gena kojim se spajaju eksoni kako bi mogli stvoriti različite mRNA i proteine. To je važan postupak koji održava raznolikost genoma. Pokazano je da naslijeđene i stečene promjene u prekrajanju pre-mRNA imaju značajnu ulogu u razvoju bolesti čovjeka i mnogi geni povezani s rakom su regulirani alternativnim prekrajanjem (Boidot i sur. 2009). Gen *BIRC5* ima četiri dominantna eksona (1, 2, 3, 4) i tri kriптиčka eksona (2B, 3B i 3 γ) te tri introna, a kodira deset alternativno prekrojenih varijanti odnosno izoformi od kojih je osam s poznatom funkcijom (Kabagwira i Wall 2017, Sah i Seniya 2015, Sampath i sur. 2017).

Survivin divljeg tipa otkio je Ambrosini sa suradnicima (1997). Transkript survivina divljeg tipa čine eksoni 1, 2, 3 i 4 koji nakon prekrajanja tvore transkript od 426 pb te kodiraju protein koji sadrži 142 aminokiseline (ak) i ima 16,5 kDa (Ambrosini i sur. 1997). Smatra se da ima prvenstveno antiapoptotsku ulogu i da može stvarati heterodimere s drugim izoformama, a lokalizacija mu je primarno citoplazmatska (Chaopotong i sur. 2012, Noton i sur. 2006).

Caldas i suradnici (2005) su otkrili novu izoformu survivina, survivin 2 α . Transkript mu se sastoji od eksona 1 i 2 i prvih 197 nukleotida (od kojih su 195 nekodirajući) introna 2, što ukupno iznosi 225 pb te kodira protein od 74 ak i 8,5 kDa. Posjeduje skraćenu domenu BIR

koja je inače nužna za antiapoptotsku aktivnost te ne postoji α -uzvojnica na njegovom C-kraju (Caldas i sur. 2005). Funkcionalna ispitivanja pokazala su da survivin 2 α smanjuje antiapoptotsku aktivnost survivina. Lokalizira se u jezgri i citoplazmi u interfaznim stanicama, no pokazano je i da izravno kolokalizira sa survivinom divljeg tipa tijekom različitih stadija mitoze (Caldas i sur. 2005). Istraživanja na karcinomu dojke pokazala su da je survivin 2 α dominantna varijanta survivina eksprimirana u karcinomu dojke (Moniri Javadhesari i sur. 2013).

Survivin 2B ima dodatni ekson 2B umetnut između eksona 2 i 3 (Mahotka i sur. 2002). Novi kriptički ekson 2B nastao je ubacivanjem dijela introna 2 veličine 69 pb koji kodira dodatne 23 ak te se smatra da nova domena sadrži potencijalna mjesta N-glikozilacije i N-miristolacije. Stoga protein survivin 2B ima sveukupno 165 ak i molekulsku masu od 18,5 kDa te posjeduje skraćenu domenu BIR, pa se smatra da ima proapoptotske funkcije, a nema dokaza da sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa (Mahotka i sur. 2002). Zajedno sa survivinom Δ Ex3 dimerizira *in vitro* sa svojim homologom divljeg tipa, tvoreći heterodimere sa smanjenom aktivnošću (Noton i sur. 2006). Utvrđeno je da survivin 2B ima primarnu lokalizaciju u citoplazmi (Chaopotong i sur. 2012).

Vietri i suradnici (2006) su otkrili izoformu survivin 3 α , koji sadrži eksone 1 i 2 te ekson 3B i sastoji se od ukupno 386 pb. Kodira protein od 78 ak, od kojih je 73 ak iz survivina divljeg tipa i 5 dodatnih ak (MRELC) te se smatra da ima antiapoptotsku funkciju (Vietri i sur. 2006). Pronađen je u karcinomu dojke, ali ne i u rubnim tkivima (Moniri Javadhesari i sur. 2013) i stoga se trenutno smatra važnim ili indikativnim za početak i progresiju karcinoma dojke te je potrebno više istražiti ulogu ove izoforme.

Survivin 3B ima sva uobičajna 4 eksona uz dodatni ekson 3B, kojeg tvori fragment od 165 pb introna 3, koji je okružen eksonima 3 i 4 sa svake strane (Badran i sur. 2003). Stvaranje novog STOP kodona unutar eksona 3B rezultira otvorenim okvirom čitanja od 363 pb te nastaje skraćeni protein od 120 ak. Survivinu 3B nedostaje α -uzvojnica na C-kraju, koja se nalazi u survivinu divljeg tipa, što ukazuje na to da on vjerojatno nije povezan s G2 fazom i mitozom. No, posjeduje cjelovitu domenu BIR, zbog čega se smatra da ima antiapoptotsku ulogu jer skraćivanje domene BIR sprječava njene antiapoptotske učinke (Badran i sur. 2003). Végran i suradnici (2013) su pokazali da survivin 3B inducira otpornost tumorskih stanica na citotoksičnost prirodnih stanica ubojica (eng. natural killer cells, NK) sa smanjenom staničnom vijabilnošću u stanicama tretiranim siRNA za survivin 3B. Također, survivin 3B igra ulogu u otpornosti tumorskih stanica na kemoterapijske lijekove. Pokazalo se da su antiapoptotske

sposobnosti survivina 3B posljedica njegove sposobnosti vezanja i inhibicije prokaspaze 6 (Végran i sur. 2013).

Sampath i suradnici (2017) su otkrili još dvije izoforme survivina, survivin 3γ (koju o ovome radu nazivamo survivin $3\gamma M$) i survivin $3\gamma V$. Survivin 3γ se sastoji od eksona 1, 2, 3 i novog eksona 3γ koji se nalazi u intronu 3 te kodira protein koji ima 125 ak od kojih novih 12 ak na C-kraju. Dodavanje 4 baze (ACAG) rezultira pomakom okvira čitanja koji stvara novi C-kraj i dovodi do nastaka izoforme survivin $3\gamma V$. Survivin $3\gamma V$ kodira protein koji ima 137 ak. Nukleotidne sekvence survivina 3γ i $3\gamma V$ su visoko homologne sekvencama Alu za koje se zna da uvode alternativne signale prekrajanja. Obje izoforme imaju antiapoptotsku aktivnost sličnu survivinu divljeg tipa pružajući otpornost na kemoterapijske lijekove u neoplastičnim stanicama i proliferaciju rasta u netransformiranim stanicama (Sampath i sur. 2017).

Mahotka i suradnici (2002) su, paralelno s otkrićem izoforme survivin 2B, otkrili i survivin $\Delta Ex3$ koji pokazuje gubitak eksona 3. Sastoji se od 329 pb i kodira protein od 137 ak. Gubitak eksona 3 vodi do pomaka okvira čitanja u translaciji koji rezultira novom C-terminalnom sekvencom s mogućim mjestom za N-miristilaciju (Mahotka i sur. 2002). Posjedujući poremećenu domenu BIR i prisutnost signala NLS (eng. nuclear localisation signal, jezgrin lokalizacijski signal) upućuje na to da survivin $\Delta Ex3$ preferira ostanak u jezgri (Chaopotong i sur. 2012, Mahotka i sur. 2002). Pokazano je da je eksprimiran u najmanje 13 različitih vrsta karcinoma, ali za razliku od survivina divljeg tipa, opisano je da ima konfliktne antiapoptotske i proapoptotske funkcije (Sah i Seniya 2015). Pored toga, kada se dimerizira sa survivinom divljeg tipa, podržava angiogenezu (Espinosa i sur. 2012). Ceballos-Cancino i suradnici (2007) pokazali su da je survivin $\Delta Ex3$ lokaliziran u jezgri i u mitohondrijima, a Malcles i suradnici (2007) tome su dodali i citoplazmatsku lokalizaciju.

1.1.3. Polimorfizmi gena *BIRC5*

Posljednjih godina pokrenuta su istraživanja povezanosti polimorfizama jednog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism, SNP) prisutnih u genu *BIRC5* s njegovom ekspresijom i potencijalnom ulogom u nastanku različitih tumora. Do sada se pokazalo da određeni polimorfizmi gena *BIRC5* u regulatornim regijama (promotor i 3' UTR regija) odnosno uzvodno i nizvodno od kodirajuće regije gena, ali i u eksonu 4, mogu utjecati na stabilnost i razinu ekspresije njegove mRNA (Wang 2012, Shi 2012), a time i na razvoj tumora. Otkriveno je nekoliko SNP-ova gena *BIRC5* koji su povezani s ekspresijom survivina i nastankom tumora. Neki su povezani s preživljenjem (kolorektalni karcinom (Antonacopoulou

i sur. 2010) i karcinom dojke (Shi i sur. 2012)), osjetljivošću (karcinom želuca (Cheng i sur. 2008), mokraćnog mjehura (Kawata i sur. 2011) i hepatocelularni (Hsieh i sur. 2012) karcinom) ili pak s dobi pojave (karcinom jajnika (Han i sur. 2009) i dojke (Sušac i sur. 2019)) tumora. Neki od ovih polimorfizama stvaraju mjesta vezivanja ili za transkripcijske faktore ili za regulatorne miRNA te potencijalno mogu utjecati na razinu survivina.

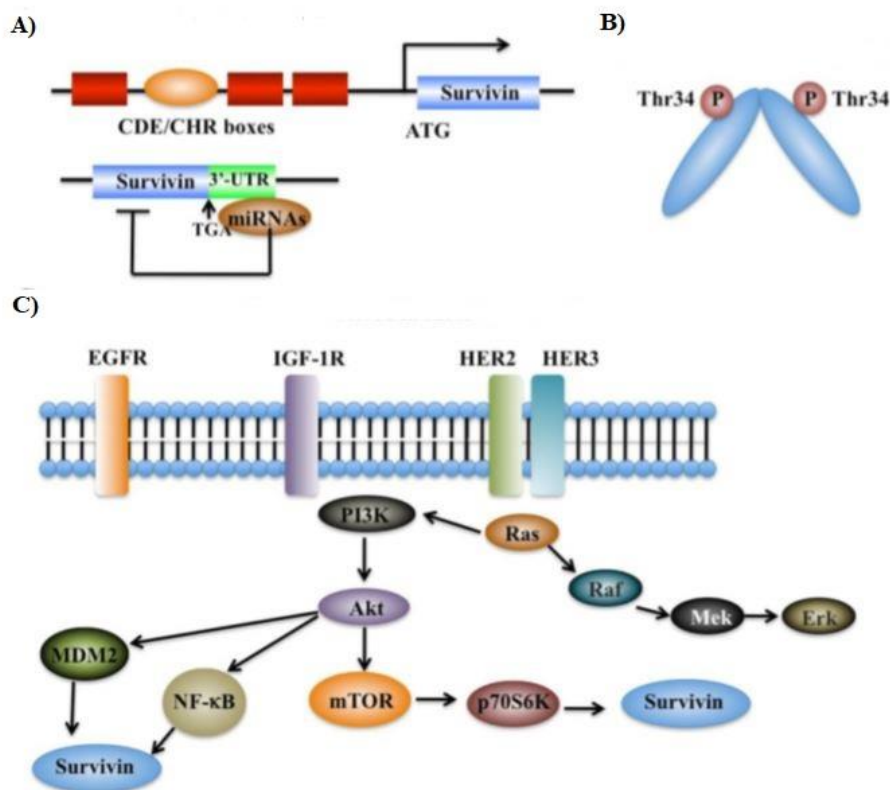
Tako je najčešće proučavani SNP, koji se nalazi u regiji promotora gena za survivin, supstitucija G u C na položaju -31 (rs9904341 (c.-31G>C), -31 bazu uzvodno od prvog nukleotida start kodona ATG). Xu i sur. (2004) prvi su istražili ulogu ovog polimorfizma u tumorskim staničnim linijama i otkrili da je prisutna mutacija povezana s prekomjernom ekspresijom survivina i na razini mRNA i proteina. Također su pokazali da je ovom mutacijom izmijenjena transkripcija ovisna o staničnom ciklusu, modificirajući motiv za vezanje represora CDE/CHR, koji je smješten u proksimalnom području promotora survivina (Xu i sur. 2004).

Boidot i sur. (2010) su pokazali da još jedan SNP u promotoru, stvara "alternativno" mjesto vezanja transkripcijskog faktora GATA-1, koje može pojačati ekspresiju survivina u karcinomu dojke. Polimorfizam rs17887126 (c.-235G>A) u promotoru gena *BIRC5* može predstavljati marker agresivnosti karcinoma dojke. Ciljanje survivina ili GATA-1 moglo bi poslužiti kao učinkovita terapijska strategija kod karcinoma dojke, posebno onih koji imaju taj polimorfizam.

1.1.4. Regulacija ekspresije survivina

U dosadašnjim istraživanjima ekspresija survivina utvrđena je u stanicama fetalnih tkiva koje su regulirane apoptozom tijekom razvoja (Adida i sur. 1998, Liggins i sur. 2003), dok u normalnim, krajnje diferenciranim stanicama odraslih tkiva ekspresija do sada nije zabilježena. Zanimljivo je da je survivin diferencijalno eksprimiran u mnogobrojnih zloćudnim bolestima čovjeka, uključujući karcinom dojke (Izawa i sur. 2002, Nasu i sur. 2002, Ryan i sur. 2005, Tanaka i sur. 2000). Ekspresija survivina regulirana je transkripcijskim i posttranslacijskim mehanizmima (Slika 2). Povezana je i s aberantnom aktivacijom niza receptorskih tirozin kinaza poput receptora HER2 (eng. human epidermal growth factor receptor 2, receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2, poznat i kao ErbB2) (Xia i sur. 2006), receptora EGFR (eng. epidermal growth factor receptor, receptor epidermalnog faktora

rasta) (Peng i sur. 2006) i IGF-1R (eng. insulin-like growth factor 1 receptor, receptor faktora rasta sličnog inzulinu 1) (Witta i sur. 2011).



Slika 2. Regulacija ekspresije survivina: A) Transkripcijska regulacija, B) Posttranslacijska regulacija, C) Glavni signalni putevi uključeni u ekspresiju survivina (Chen i sur. 2016).

1.1.4.1. Transkripcijska regulacija

Geni koji su ovisni o staničnom ciklusu te imaju najvišu ekspresiju u G2 fazi i u mitozu, obično sadrže jedinstvene promotorske elemente kao što su CDE i CHR, koji služe za kontrolu transkripcije gena (Müller i Engeland 2010). Genomska sekvenca survivina sadrži represivni element CDE/CHR, što ukazuje na to da je gen *BIRC5* reguliran staničnim ciklusom (Slika 2A). Li i suradnici (1998) su utvrdili da je ekspresija survivina slaba u G1 fazi, nešto viša u S fazi i najviša u G2/M fazi. Njegova ekspresija je nužna za prijelaz iz G2 faze u mitozu te se njeno povećanje u ovoj fazi može objasniti porastom inhibicije koja se javlja tijekom G1 i S faze. Aktivirana kinaza CDK4 (eng. cyclin-dependent kinase 4, kinaza ovisna o ciklinima 4), koja je aktivna samo tijekom G1 i S faze, fosforilira protein Rb (eng. retinoblastoma protein, retinoblastomski protein) koji se veže na promotor survivina i potiskuje njegovu aktivnost (Jiang i sur. 2004). U G2 fazi, kinaza CDK4 je inaktivirana stoga Rb nije fosforiliran i nije u

stanju potisnuti aktivnost promotora, što izaziva povećanje ekspresije survivina za prijelaz iz G2 u mitozu.

Pronađene su i razne kratke nekodirajuće miRNA (eng. microRNA) koje negativno reguliraju ekspresiju survivina na posttranskripcijskoj razini. Vežanje miRNA većinom na 3' UTR njegove mRNA dovode ili do degradacije mRNA ili smanjenja translacije survivina (Slika 2A). Neke od značajnijih miRNA koje ciljaju survivin u različitim karcinomima su: miR-16 u karcinomu debelog crijeva (Ma i sur. 2013), miR-34a u karcinomu pločastih stanica glave i vrata (Kumar i sur. 2012), miR-203 u karcinomu prostate (Saini i sur. 2011), itd. Svaki karcinom ima jedinstveni uzorak ekspresije miRNA.

1.1.4.2. Posttranslacijska regulacija

Posttranslacijske modifikacije proteina kao što su fosforilacija, acetilacija i ubikvitinacija mogu utjecati na razinu ekspresije survivina. Utvrđeno je da je mitotička fosforilacija survivina u njegovoj domeni BIR na Thr34 pomoću kinaze CDK1 (eng. cyclin-dependent kinase 1, kinaza ovisna o ciklinima 1) (Slika 2B) bitna za očuvanje stabilnosti proteina, staničnu lokalizaciju, interakciju s drugim proteinima i zaštitu stanice tijekom staničnog ciklusa (O'Connor i sur. 2000, O'Connor i sur. 2002). Ovakva modifikacija negativno regulira survivin tijekom mitoze te mora doći ili do defosforilacije ili do uklanjanja takvoga proteina kako bi stanice dovršile diobu (Barrett i sur. 2009). Slično tome, kinaza aurora B fosforilira survivin tijekom mitoze na Thr117 i osigurava da ostane povezan s centromerama sve dok se svi kromosomi ne orijentiraju pravilno. Nužno je da dođe do defosforilacije survivina kako bi došlo do prijelaza u anafazu (Wheatley i sur. 2004, Wheatley i sur. 2007). Fosforilacija survivina tijekom mitoze na Ser20 pomoću kinaze Plk1 (eng. Polo-like kinase 1, kinaza slična Polo kinazama 1) je ključna za staničnu diobu, pravilnu orijentaciju kromosoma i staničnu proliferaciju (Colnaghi i Wheatley 2010). Nakon fosforilacije, kao bitna modifikacija pokazala se acetilacija survivina na Lys129 pomoću histon acetiltransferaze. Takav acetilirani survivin se veže na N-terminalnu domenu transkripcijskog faktora STAT3 (eng. signal transducer and activator of transcription 3, provodnik signala i aktivator transkripcije) i potiskuje transaktivaciju promotora ciljnih gena pomoću STAT3 te samim time smanjuje njihovu ekspresiju i inhibira stanični rast (Wang i sur. 2010). Ubikvitinacija survivina se najčešće odvija na nekoliko lizinskih ostataka, a najznačajnija je monoubikvitinacija Lys48 i Lys63 čime se postiže regulacija interakcije protein-protein. Tako je ubikvitinacija Lys63 potrebna za povezivanje survivina s centromerama, dok je njegova deubikvitinacija nužna za odvajanje od centromera (Vong i sur. 2005). Identificiran je i put ubikvitin-proteasom koji

regulira proteolizu survivina na način ovisan o staničnom ciklusu (Zhao i sur. 2000). Utvrđeno je da kompleks XIAP-XAF-1 (eng. X-linked inhibitor of apoptosis protein - XIAP-associated factor 1, X-vezani inhibitor apoptoze - XIAP-vezani faktor 1) uzrokuje proteosomsku razgradnju survivina jer takva interakcija potiče E3 ligaznu aktivnost domene „RING“ proteina XIAP i djeluje na survivin izravnom poliubikvitinacijom (Arora i sur. 2007). Nepravilno funkcioniranje ovoga mehanizma može dovesti do nepravilne regulacije survivina u stanicama karcinoma. Interakcija survivina s proteinskim šaperonom Hsp90 (eng. heat shock protein 90, protein toplinskog šoka 90) stabilizira survivin i štiti ga od proteosomske razgradnje te na taj način sprječava staničnu smrt (Fortugno i sur. 2003).

U inhibiciji survivina na posttranslacijskoj razini ključnu ulogu imaju inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima i šaperona Hsp90. Inhibitori kinaza CDK kao što su flavopiridol i purvalanol A imaju sposobnost inhibicije fosforilacije survivina na Thr34 te na taj način ubrzavaju proteosomsku razgradnju survivina (Wall i sur. 2003, Iizuka i sur. 2007). Primjena takvih inhibitora rezultira smanjenjem ekspresije survivina i pokretanjem stanične smrti. Inhibitori šaperona mogu spriječiti interakciju survivina i Hsp90 što dovodi do destabilizacije survivina, supresije stanične proliferacije te stanične smrti. Jedan od takvih inhibitora je shepherdin, antagonist kompleksa survivin-Hsp90, koji inhibira funkciju Hsp90 vezanjem na domenu koja veže ATP na N-kraju ili istisnućem već vezanog ATP-a (Gyurkocza i sur. 2006).

1.1.4.3. Regulacija povezana s receptorskim tirozin kinazama

Koekspresija članova obitelji tirozin-kinaznih receptora ErbB, kao što su EGFR i ErbB2, igra važnu ulogu u karcinogenezi dojke regulacijom razine ekspresije survivina (Asanuma i sur. 2005). U stanicama karcinoma dojke, aktivacija receptora EGFR vezanjem liganda EGF nizvodno aktivira put PI3K/Akt (eng. phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B or Akt, fosfatidilinozitol 3 kinaza/protein kinaza B ili Akt) i izaziva povećanje razine HIF-1 α (eng. hypoxia-inducible factor-1, faktor 1 α induciran hipoksijom) koji kao transkripcijski faktor izaziva jaku ekspresiju survivina, što vodi do povećane otpornosti na apoptozu, a samim time i na kemoterapijske lijekove poput paklitaksela i docetaksela (Peng i sur. 2006). Aktivacija signalnog puta PI3K/Akt vezanjem liganda IGF-1 na receptor IGF-R1 u stanicama karcinoma može izazvati nizvodnu aktivaciju proteina mTOR (eng. mammalian/mechanistic target of rapamycin, ciljna molekula rapamicina u sisavaca) koji posljedično fosforilira i aktivira kinazu p70S6K1 te potiče prekomjernu ekspresiju survivina (Vaira i sur. 2007, Zhao i sur. 2010). ErbB2, koji je često prekomjerno ekspimiran u stanicama karcinoma dojke, također izaziva aktivaciju signalnog puta PI3K/Akt koji pojačava ekspresiju

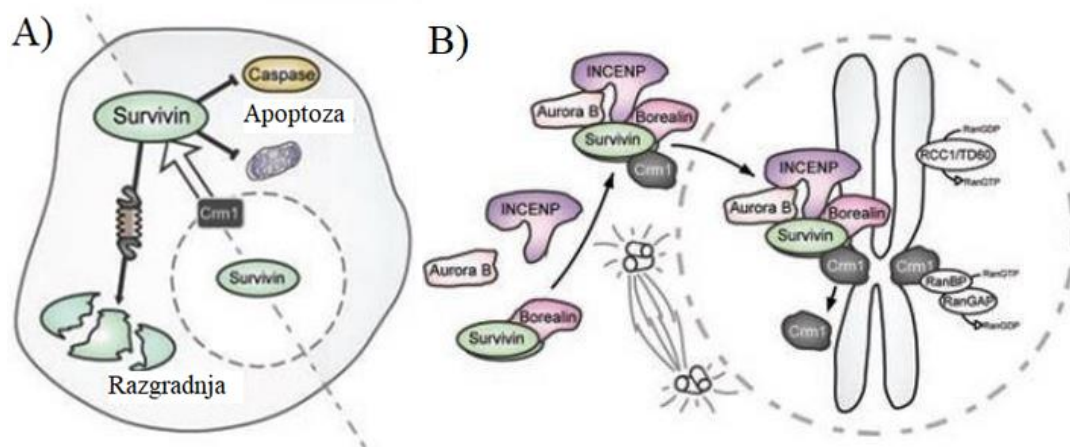
transkripcijskih faktora NF- κ B (eng. nuclear factor kappa-B, jezgreni faktor-kappa B) i c-myc te naposljetku dolazi do prekomjerne ekspresije survivina (Papanikolau i sur. 2011). Razina survivina i otpornost na apoptozu dramatično opadaju kada se stanice liječe herceptinom, monoklonskim antitijelom protiv ErbB2 (Asanuma i sur. 2005). Pokazano je da nakon tretiranja stanica s EGF dolazi i do aktivacije signalnog puta MAPK (eng. mitogen-activated-protein kinases, protein kinaze aktivirane mitogenima) te se njegovom inhibicijom javlja smanjenje ekspresije survivina (Peng i sur. 2006).

1.1.5. Lokalizacija survivina

U dosadašnjim istraživanjima, survivin je pronađen i u jezgrenom odjeljku i u citoplazmatskom odjeljku gdje ima različite uloge (Fortugno i sur. 2002). Ova dvojna lokalizacija u skladu je s ulogama survivina u promoviranju stanične proliferacije i kontroli staničnog preživljenja. Jezgreni survivin funkcionira kao regulator mitoze i održava integritet diobenog vretena (Uren i sur. 2000), a citoplazmatski survivin ima antiapoptotsku ulogu (O'Connor i sur. 2002). Mull i suradnici (2014) su ispitali lokalizaciju survivina i ustanovili da je tijekom interfaze survivin prisutan i u jezgri i u citoplazmi. Nakon raspada jezgrine ovojnice tijekom profaze, survivin nije više difuzno raspoređen, već se nalazi samo u centromerama kromosoma gdje ostaje sve do metafazno-anafaznog prijelaza. U metafazi se može pronaći i u centromerama i u intercentrometnim regijama što je u skladu s njegovom funkcijom kao proteina kromosomskog putničkog kompleksa (eng. chromosomal passenger complex, CPC), a tijekom anafaze je povezan C-krajem s interzonalnim mikrotubulima (Li i sur. 1998, Mull i sur. 2014).

U eukariotskim stanicama, važan mehanizam kontrole stanične lokalizacije raznih makromolekula je aktivni prijenos iz jezgre u citoplazmu koji se odvija kroz kompleks jezgrinih pora te je prisutan i u tumorskim stanicama (Weis 2003). Iako je survivin protein male molekulske mase, njegov prijenos iz jezgre ovisi o vezanju na protein CRM1 (eng. chromosome region maintenance protein 1, protein održavanja kromosomske regije 1, poznat i kao eksportin 1) pomoću kratke hidrofobne sekvence NES (eng. nuclear export signal, jezgrin izlazni signal) (Colnaghi i sur. 2006, Stauber i sur. 2006). Centralni NES nalazi se između domene BIR i C-terminalne uzvojnice survivina odnosno u dimerizacijskoj domeni te je negativno moduliran homodimerizacijom survivina koja sprječava interakciju s CRM1. Iz toga zaključujemo da je centralni NES aktivan samo u monomerima survivina (Engelsma i sur. 2007). Wang i suradnici (2010) su utvrdili da dinamični omjer između acetilacije i deacetilacije survivina određuje hoće li protein stvarati homodimere ili će heterodimerizirati s proteinom

CRM1. Acetilacija survivina na Lys129 za posljedicu ima homodimerizaciju i ostanak u jezgri, a deacetilacija promovira stvaranje monomera i interakciju s CRM1 te daljnji prijenos iz jezgre u citoplazmu (Wang i sur. 2010). Povećane razine survivina u citoplazmi posljedično djeluju antiapoptotski, a može doći i do proteosomske razgradnje survivina u citoplazmi (Knauer i sur. 2007). Interakcija survivina i CRM1 ključna je za dvojnu ulogu survivina (Slika 3) (Knauer i sur. 2007, Stauber i sur. 2007). Uz važnost proteina CRM1 za prijenos survivina iz jezgre u citoplazmu, ova interakcija je uključena i u vezanje kompleksa CPC na centromeru u ranoj profazi osiguravajući pravilno razdvajanje kromosoma u kasnijim fazama (Knauer i sur. 2006). Dok je prijenos survivina iz jezgre poznat, unos survivina u jezgru još uvijek nije točno poznat, iako se zna da nema signal NLS (Stauber i sur. 2007) te su potrebna daljnja istraživanja ovog mehanizma.



Slika 3. Dvojna aktivnost survivina kroz interakciju s CRM1: A) Prijenos survivina iz jezgre u citoplazmu i B) Vezanje kompleksa CPC na centromeru (Knauer i sur. 2007).

U tumorskim stanicama otkrivena je i lokalizacija survivina između dviju mitohondrijskih membrana (Dohi i sur. 2004). Prema novijim istraživanjima, unos survivina u mitohondrije ovisi o MTS (eng. mitochondrial targeting signal, signal ciljanja mitohondrija) na njegovom N-kraju, koji je bogat prolinom i tvori amfipatsku α -uzvojnica (Dunajová i sur. 2016). Alternativno, survivin se može unijeti u mitohondrije i posredno pomoću proteina AIP (eng. aryl hydrocarbon receptor-interacting protein, aril ugljikovodični receptor-intereagirajući protein) koji stupa u interakciju sa sekvencom EQLAAMD na C-kraju survivina (Kang i sur. 2011), kao i Hsp90 koji stupa u interakciju s njegovom domenom BIR (Fortugno i sur. 2003). Samo mitohondrijski survivin, koji je otpušten u citoplazmu kao odgovor na apoptotske podražaje, ima mogućnost interakcije s XIAP-om i kofaktorom HBXIP (eng. hepatitis B virus X-interacting protein, X-intereagirajući protein virusa hepatitisa B). Razina mitohondrijskog

survivina se povećava kao odgovor na stanični stres odnosno uvjete poput hipoksije (Dohi i sur. 2004).

Posljednja istraživanja ukazuju i na izvanstaničnu lokalizaciju survivina u tumorima koji posljedično postaju otporniji na kemoterapiju, imaju povećan metastatski potencijal te brže proliferiraju (Khan i sur. 2009). Utvrđeno je da se survivin iz tumorskih stanica aktivno izlučuje pomoću egzosoma, i u bazalnom stanju i u stresnim uvjetima (Khan i sur. 2011).

1.1.6. Funkcije survivina u stanicima

1.1.6.1. Mitoza

Survivin je lokaliziran u kromosomima tijekom faze G2 i profaze gdje kontrolira slaganje diobenog vretena ovisno o kromatinu (Kelly i sur. 2007). Tijekom prometafaze prelazi u centromere, u metafazi se nalazi u ekvatorijalnoj ravnini, a nakon što kromatide migriraju na polove vretena tijekom anafaze i telofaze više nije povezan s centromerama, ali se nalazi u središnjoj zoni vretena. Naposljetku, tijekom citokineze, survivin se nalazi u diobenoj brazdi i usmjerava cijeli proces (Wheatley i sur. 2001). Prema njegovoj lokalizaciji tijekom mitoze, zaključeno je da je survivin dio kompleksa CPC te kao takav igra važnu ulogu u pravilnom razdvajanju sestrinskih kromatida tijekom anafaze i održavanju stabilnosti genoma (Skoufias i sur. 2000). U kompleksu je udružen s INCENP-om (eng. inner centromere protein, protein unutarnje centromere), borealinom i Ser/Thr protein kinazom aurora B koja predstavlja aktivnu enzimsku komponentu CPC-a (Bolton i sur. 2002, Gassmann i sur. 2004). Za sastavljanje diobenog vretena oko kromosoma ključna je fosforilacija H3 na Thr3 pomoću Ser/Thr kinaze haspin tijekom prometafaze. Tu modifikaciju prepoznaje survivin svojom BIR-domenom i dolazi do vezanja ostatka kompleksa CPC na to mjesto te posljedične aktivacije kinaze aurora B (Kelly i sur. 2010). Aurora B fosforilira survivin na Thr117, tijekom prometafaze i citokineze, što igra ulogu u lokalizaciji CPC. Kada je survivin fosforiliran, ne može se vezati na fosforilirani H3 i ne slaže se kompleks CPC te dolazi do smanjenja razine survivina u centromerama (Wheatley i sur. 2007). Gubitak ili iscrpljivanje survivina u stanicima može dovesti do oštećenja u prometafazi, mitotske katastrofe i neuspjele citokineze.

1.1.6.2. Mitohondrij

Pronalazak survivina u mitohondriju je fenomen povezan s tumorskim, ali ne i normalnim stanicama te može utjecati na njihov metabolizam. U istraživanju koje su proveli Hagenbuchner i suradnici (2013) na stanicama neuroblastoma, utvrdili su da prekomjerna ekspresija survivina, kao posljedica dodatne kopije kromosoma 17, uzrokuje reprogramiranje

metabolizma ovih stanica. Točnije, dolazi do prijelaza iz proizvodnje energije putem oksidativne fosforilacije u proces aerobne glikolize (Warburgov učinak) koja je povezana s agresivnim fenotipom tumorskih stanica i metastazama (Hagenbuchner i sur. 2013, Stern i sur. 2002). S druge strane, Rivadeneira i suradnici (2015) su, u stanicama glioblastoma i karcinoma prostate, ustanovili da se pri pojačanoj ekspresiji survivina recipročno povećava i oksidativna fosforilacija. Točnije, survivin u interakciji s mitohondrijskim Hsp90 omogućava stabilnost i pravilno slaganje podjedinica kompleksa važnih za provedbu oksidativne fosforilacije (Rivadeneira i sur. 2015). S obzirom na ovakve kontradiktorne rezultate, potrebna je provedba dodatnih istraživanja kako bi se utvrdila točna funkcija survivina u mitohondrijima tumorskih stanica.

1.1.6.3. Matičnost

Survivin je visoko eksprimiran u embrionalnim tkivima i embrionalnim matičnim stanicama (Adida i sur. 1998). Mull i suradnici (2014) su utvrdili da je survivin uključen u održavanje matičnosti stanica tako da su utišali survivin koristeći shRNA (eng. short hairpin RNA, mala ukosnica RNA). Utišavanjem survivina posljedično se smanjila ekspresija transkripcijskih faktora povezanih s pluripotencijom, Nanog i Oct4 (eng. octamer-binding transcription factor 4, oktamer-vezujući transkripcijski faktor 4, poznat i kao POU5F1) (Mull i sur. 2014). Ovo je u skladu s ranije provedenim istraživanjem u kojemu je homozigotnim „knock-outom“ survivina u embriju miša došlo do smrti embrija jer je ekspresija survivina nužna za razvoj embrionalnih matičnih stanica (Conway i sur. 2002).

1.1.6.4. Migracija i angiogeneza

Sekvenca MTS na N-kraju survivina omogućuje njegov ulazak u mitohondrije tumorskih stanica i vezanje na protoonkogenu protein tirozin kinazu c-Src. Zajednička aktivnost pospješuje migraciju stanica mijenjanjem dinamike žarišne adhezije što doprinosi napretku tumorigeneze (Dunajová i sur. 2016).

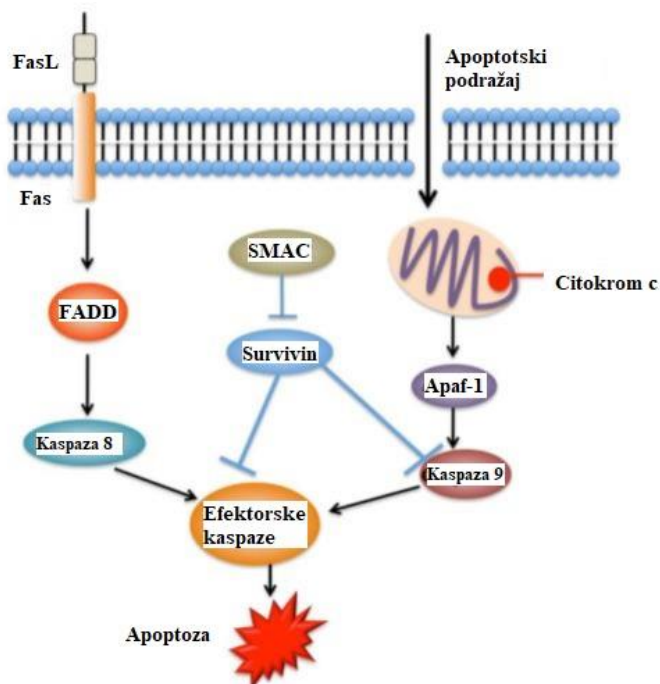
Za održavanje stabilnosti endotelnih stanica koje stvaraju nove krvne žile u procesu angiogeneze, nužna je inhibicija njihove apoptoze. To je omogućeno povećanom ekspresijom survivina, induciranom pomoću proteina VEGF, koji sprječava aktivnost kaspaze 3 i inhibira apoptozu induciranu s proteinom TNF α što ukazuje na njegovu proangiogenu ulogu (O'Connor i sur. 2000). Angiogeneza također igra ključnu ulogu u tumorigenezi. Fernández i suradnici (2014) su nedavno utvrdili da u tumorskim stanicama postoji uzvodna amplifikacijska petlja u

kojoj ekspresija survivina povećava transkripciju VEGF ovisnu o β -katenin/Tcf/Lef, preko signalnog puta PI3K/Akt, i tako promiče nastanak krvnih žila.

1.1.6.5. Stanična smrt

Apoptoza (programirana stanična smrt) predstavlja obrambeni mehanizam za uklanjanje oštećenih ili nezdravih stanica odnosno ima važnu ulogu u homeostazi stanica i kontroli rasta. Postoje dva signalna puta koja vode do apoptoze. Prvi je unutarnji (intrinzični; mitohondrijski) put koji se aktivira različitim stresnim signalima (npr. kemoterapijskim lijekovima koji oštećuju DNA) i drugi, vanjski (ekstrinzični) put koji se aktivira proapoptotskim receptorskim signalima na staničnoj površini (Hengartner 2000). Ova dva puta se sastaju na nivou efektorskih (izvršiteljskih) kaspaza (npr. kaspaza 3, 6 i 7) koje su cisteinske aspartat-specifične proteaze koje cijepaju neke esencijalne stanične proteine (Hengartner 2000). Unutarnji apoptotski put reguliran je proapoptotskim (npr. Bid, Bak i Bax) i antiapoptotskim (npr. Bcl-2 i Bcl-XL) članovima obitelji Bcl-2 koje karakterizira najmanje jedna, a najviše četiri konzervirane domene BH (eng. Bcl-2 homology domain, domena Bcl-2 homologije) i hidrofobna regija na C-kraju (Adams i Cory 1998, Hengartner 2000). Uz ovu obitelj, proteini IAP koje karakterizira jedna do najviše tri domene BIR, također imaju važnu ulogu u regulaciji unutarnjeg puta programirane stanične smrti djelujući kao endogeni inhibitori kaspaza (Deveraux i Reed 1999). Obitelj IAP čini osam do sada pronađenih članova: XIAP, cIAP1, cIAP2, Apolon, ML-IAP (eng. melanoma IAP, melanom IAP), survivin, protein 2 sličan IAP-u (ILP2) te NAIP (protein koji inhibira apoptozu neurona) (Deveraux i Reed 1999, Hawkins i sur. 2001). Pokretanje unutarnjeg puta programirane stanične smrti naposljetku vodi do permeabilizacije mitohondrija i naknadne aktivacije izvršiteljskih kaspaza (Salvesen i Dixit 1997). Vanjski put apoptoze, nakon primanja izvanstaničnih signala smrti, pokreće se aktiviranjem obitelji citokinskih receptora smrti TNF (eng. tumor necrosis factor, faktor nekroze tumora), uključujući receptore TNF-R1, Fas (APO-1, CD95), TRAIL-R1 (eng. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1, receptor za ligand koj inducira apoptozu povezan s TNF) i TRAIL-R2 (Smith i sur. 1994). Navedena dva puta apoptoze mogu se povezati cijepanjem proapoptotskog faktora Bid (Luo i sur. 1998). Oba puta kontrolira niz kaspaza, kao što su inicijatorske kaspaze (kaspaza 8 i 9) i izvršiteljske kaspaze (kaspaza 3, 6,

7) (Fulda i Debatin 2006). Inicijatorska (vršna) kaspaza 9 nizvodno aktivira kaspaze 3 i 7, koje su odgovorne za razgradnju stanica apoptotskim putem (Slika 4) (Brentnall i sur. 2013).



Slika 4. Funkcije survivina u vanjskom i unutarnjem putu apoptoze (Chen i sur. 2016).

Prekomjerna ekspresija survivina povezana je s inhibicijom stanične smrti pokrenute vanjskim ili unutarnjim apoptotskim putevima. Aktivnost kaspaza se smanjuje ekspresijom survivina, u homodimernom i monomernom stanju (Pavlyukov i sur. 2011), no za razliku od drugih IAP-ova survivin ima samo jednu BIR domenu (Ambrosini i sur. 1997) i ne veže se izravno na kaspaze u fiziološkim koncentracijama. Utvrđeno je da survivin djeluje sa svojim kofaktorima HBXIP i XIAP, povezujući se preko BIR domene (Dohi i sur. 2004, Marusawa i sur. 2003), kako bi utjecao na interakciju XIAP-a s kaspazama ili kako bi pojačao inhibični učinak drugih članova obitelji IAP, poput cIAP1 (eng. cell IAP1, stanični IAP1; poznat i kao *BIRC2*) ili cIAP2 (eng. cell IAP2, stanični IAP2; poznat i kao *BIRC3*), koji dalje djeluju uzvodno u vanjskom apoptotskom putu (Verhagen i sur. 2001, Dohi i sur. 2004).

1.2. Karcinom dojke i survivin

Karcinom dojke heterogena je bolest s različitim molekularnim profilima, morfologijom, kliničkim ponašanjem i odgovorima na terapiju. Vodeći je uzrok smrti od raka u žena diljem svijeta i njegova učestalost i dalje raste. Glavni se razlozi nalaze u velikoj sklonosti metastaziranju u ranoj fazi i stečenoj otpornosti na širok spektar sredstava protiv raka (Gonzalez-Angulo 2007). Jednom kada se rak proširio izvan limfnih čvorova dojke i

regionalnih limfnih čvorova, čini se da je neizlječiv (Gralow 2006). U takvim slučajevima, kemoterapija ili radioterapija smatraju se glavnim liječenjem, ali popraćeni su različitim štetnim učincima. Ova činjenica naglašava važnost odabira osjetljivih dijagnostičkih i prognostičkih markera u ranoj fazi i učinkovitijeg ciljanog liječenja ove bolesti.

Nassar i suradnici (2008) su u svom istraživanju uočili da je 84% karcinoma pokazalo jezgreno obojenje za survivin, dok su normalne kontrole zdravog tkiva dojke bile negativne. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da se survivin ekspirira u različitim zloćudnim bolestima, uključujući karcinom dojke, ali ne i u neneoplastičnim tkivima. Pozitivna ekspresija survivina kod karcinoma dojke predviđala je znatno veći rizik od recidiva bolesti, a pokazalo se da je povezana i s metastazama u limfnim čvorovima (Li i sur. 2014). Jha i suradnici (2012) su u svom istraživanju koristili imunohistokemiju survivina koji je pokazao ekspresiju u 65,3% uzoraka karcinoma dojke, dok je detekcijom mRNA survivina pomoću metode RT-PCR identificiran u 93,6% slučajeva. Isto istraživanje pokazalo je povezanost ekspresije survivina s prekomjernom ekspresijom HER2, VEGF, uPA (eng. urokinase plasminogen activator, urokinazni plazminogeni aktivator) i PAI-1 (eng. plasminogen activator inhibitor 1, inhibitor plazminogenog aktivatora 1). Ovo je u skladu s prethodnim istraživanjem koje su proveli Ryan i suradnici (2006) na 420 nemetastatskih uzoraka tkiva karcinoma dojke primjenom metode ELISA gdje je pokazana visoka ekspresija survivina u 90% slučajeva i povezanost s prekomjernom ekspresijom proteina HER2, VEGF, uPA i PAI-1 (Ryan i sur. 2006). Youssef i suradnici (2008) istraživali su ekspresiju survivina i povezanost s kliničkopatološkim parametrima, proliferacijom i molekularnom klasifikacijom karcinoma dojke. U tom istraživanju je ekspresija survivina, koja je otkrivena u 78,5% karcinoma dojke, bila povezana s veličinom tumora, visokim histološkim stupnjem (stupnjem nediferenciranosti), metastazama u limfnim čvorovima, uznapredovalim stadijem tumora, proliferacijom i negativnim statusom receptora estrogena/progesterona. Također, Span i suradnici (2004) su pomoću metode qRT-PCR utvrdili prekomjernu ekspresiju survivina u 275 uzoraka tkiva karcinoma dojke te povezanost s visokim histološkim stupnjem (niskom razinom diferenciranosti) kao i negativnim statusom receptora estrogena. Sušac i suradnici (2019) su u svom istraživanju na karcinomu dojke također utvrdili da je prekomjerna ekspresija survivina povezana s negativnim statusom receptora estrogena, kao i povezanost pojedinih polimorfizama gena *BIRC5* s ranom dobi pojave karcinoma. S druge strane, Kennedy i suradnici (2003) su, istraživanjem ekspresije survivina imunohistokemijom na 293 uzoraka karcinoma dojke, došli do zaključka da prekomjerna ekspresija survivina nije povezana s

kliničkopatološkim parametrima kao što su veličina tumora, histološki stupanj, nodalni status, status receptora estrogena i da kao takav može poslužiti kao prognostički indikator dobrog ishoda bolesti. Zbog postojanja očitih razilaženja u rezultatima istraživanja, potrebno je dodatno poraditi na istraživanju utjecaja survivina kao dijagnostičkog i prognostičkog markera u karcinomu dojke.

2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Kako je poznato da je protein survivin eksprimiran gotovo isključivo u tumorskom tkivu te da su polimorfizmi gena *BIRC5* povezani s nastankom različitih tipova tumora, hipoteza ovog istraživanja je da bi se genotipizacija i određivanje razine ekspresije mogle koristiti u dijagnostici raka dojke. Cilj ovog istraživanja je ispitati postoji li povezanost polimorfizama gena *BIRC5* s ekspresijom izoforni survivina u karcinomu dojke te rizikom od pojave bolesti. Na taj bi se način ispitaio potencijalni značaj gena *BIRC5* kao dijagnostičkog i prognostičkog biomarkera u karcinomu dojke.

Sa znanstvenog aspekta ovakvo istraživanje doprinijelo bi rasvjetljavanju uloge survivina u razvoju karcinoma dojke te značaju pojedinih polimorfizama i ekspresije pojedinih izoforni kao eventualnih dijagnostičkih biljega te razvoju potencijalnih terapija baziranih na njegovoj inhibiciji.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- Utvrditi učestalost polimorfizama gena *BIRC5* kod pacijentica s karcinomom dojke te zdravim kontrolama.
- Usporediti učestalost polimorfizama kod pacijentica i zdravih kontrola u svrhu otkrivanja povezanosti polimorfizama gena *BIRC5* s pojavom karcinoma dojke.
- Utvrditi ekspresiju osam izoforni gena *BIRC5* na razini ekspresije mRNA.
- Istražiti povezanost polimorfizama gena *BIRC5* s ekspresijom pojedinih izoforni.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje

Uzorci pacijentica za istraživanje (svježa krv i svježe tkivo tumora te okolnog zdravog tkiva) prikupljani su u Klinici za tumore KBC Sestara milosrdnica i KBC Zagreb od 2015. do 2018. godine. Uzorci zdravih kontrola su skupljani iz nekoliko domova za starije i nemoćne osobe i domova zdravlja tijekom 2005. i 2006. godine. Kod 18 uzoraka karcinoma dojke je kvaliteta DNA iz krvi i RNA iz tkiva bila dovoljno dobre kvalitete za potrebe istraživanja. Za svaki uzorak korišten u istraživanju dobiven je informirani pristanak pacijentica. Ispunjen je laboratorijski formular, potpisan od kliničara, kao i suglasnost za sudjelovanje u istraživanju potpisana od strane pacijentica.

3.2. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz uzoraka pune krvi (leukocita, bijelih krvnih stanica) metodom izoliranja. Eritrociti su uklonjeni osmotskom lizom, a nakon toga je bilo nužno razgraditi leukocite te se iz njihove jezgre oslobodila DNA. Proteini su uklonjeni izoliranjem pomoću NaCl (natrijevog klorida). Postupak izolacije genomske DNA metodom izoliranja iz pune krvi odvijao se u dvije faze.

Uzorci pune krvi čuvani su na -20°C u epruvetama koje su zatim izvađene i obrisane alkoholom. Nakon toga su stavljani u epruvete od 50 mL i ostavljeni da se krvi otopi. Takva krv prelivena je iz staklenih epruveta u nove nezračene epruvete i isprana s puferom RBCL (eng. Red Blood Cell Lysis Buffer, pufer za lizu eritrocita) te je svaka nadopunjena istim do 40 mL volumena. Lagano je promućkano izvrtanjem i držano na ledu 15 min. Centrifugirano je 10 min pri 5000 rpm i 4°C (Universal 320R, Hettich, Njemačka). Nakon toga odliceni su supernatanti i na taloge je dodano 5 mL pufera RBCL, trešeno je na vibracijskoj miješalici dok se talozi nisu razbili. Zatim je nadopunjeno puferom RBCL do 25 mL volumena i centrifugirano 10 min pri 5000 rpm i 4°C . Ponavljan je postupak ispiranja s puferom RBCL dok talozi leukocita nisu prešli iz crvene u blijedožutu boju. Nakon toga uklonjeni su supernatanti i na taloge je dodano po 2,5 mL pufera SE (natrij klorid i natrij EDTA). Trešeno je na vibracijskoj miješalici dok se talozi nisu razbili te u svaki uzorak dodano 200 μL 10% pufera SDS (eng. sodium dodecyl sulfate, natrij dodecil sulfat) i 15 μL proteinaze K. Epruvete su ostavljene u vodenoj kupelji preko noći pri 37°C .

Epruvete su izvađene iz kupelji i prelive je sadržaj svake u plastične epruvete od 13 mL te je dodano 750 μ L 5 M NaCl i trešeno na vibracijskoj mješalici do mliječno bijele boje. Centrifugirano je 15 min pri 5000 rpm na sobnoj temperaturi. Supernatante su prelive u nove sterilne epruvete od 15 mL i dodano je 3,5 mL izopropanola te miješano ručno laganim okretanjem mikroepreveta dok DNA nije postala vidljiva. DNA je zahvaćena sterilnom staklenom Pasteurovom pipetom te isprana u apsolutnom etanolu. Pasteureovom pipetom DNA je prenešena u mikroeprevete od 2 mL s odgovarajućim volumenom (100-500 μ L) TE pufera (tris acetat i EDTA) te ostavljena da se otapa preko noći pri 4°C na rotacijskom stalku.

3.3. Određivanje koncentracije DNA

U svrhu određivanja koncentracije nukleinskih kiselina upotrebljava se niz različitih metoda. Najčešće je u upotrebi spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije UV svjetla (eng. ultraviolet light, ultraljubičasta svjetlost) pri valnoj duljini 260 nm u purinskim i pirimidinskim bazama DNA. U ovome istraživanju za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracija DNA otopljenih u TE puferu korišten je uređaj NanoPhotometer® N60/N50 (Implen, Njemačka). Postupak je započet na način da je na mjesto na uređaju predviđeno za mjerenje mikropipetom prvo stavljeno 1 μ L pufera TE koji je poslužio kao pozadinska korekcija na otapalo, a nakon toga je dalje redom nanošen svaki uzorak i određivana mu je koncentracija. Računalo je ugrađeno u uređaj i automatski izračunava koncentraciju DNA iz apsorbancije UV svjetla pri valnoj duljini 260 nm, a mjeri i čistoću uzorka računanjem omjera apsorbancija na dvije valne duljine: 260 i 280 nm. Za otopinu s omjerom A260/A280 od 1,8 do 2,0 smatra se da sadrži čistu DNA. Manje vrijednosti upućuju na kontaminaciju proteinima, a više na kontaminaciju s RNA (Pećina-Šlaus, 2009).

3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (eng. polymerase chain reaction, PCR) je metoda *in vitro* eksponencijalnog umnažanja željenih fragmenata dvolančane DNA (dDNA) kako bi se stvorile tisuće do milijuni ili više kopija tih istih fragmenata. Principi koji stoje iza svake reakcije PCR, bez obzira na uzorak DNA, su isti. Za postavljanje PCR-a potrebno je pet osnovnih komponenti, a prva od njih je DNA „kalup“ za umnažanje, zatim dvije oligonukleotidne početnice koje su kratki odsječci DNA koji pokreću reakciju PCR i dizajnirani tako da se vežu na obje strane DNA odsječka koji želimo umnožiti. Sljedeća komponenta je smjesa dNTP-ova (eng. deoxyribonucleoside triphosphate, deoksiribonukleozid trifosfat) odnosno dATP, dGTP, dCTP, dTTP koji predstavljaju građevne blokove potrebne za

sintezu novog lanca DNA pomoću termostabilne DNA Taq polimeraze koja je četvrti ključni sastojak. Posljednji sastojak je pufer koji sadrži kalijev klorid (KCl) koji olakšava sparivanje početnih oligonukleotida te magnezijev klorid (MgCl₂), koaktivator Taq polimeraze koji utječe na mnoge parametre PCR-a kao što su sparivanje početnih oligonukleotida, disocijacija DNA, specifičnost produkta i dr. Metoda PCR uključuje proces zagrijavanja i hlađenja zvan termički ciklus koji se obavlja strojno. Tri su glavna koraka PCR-a koja tvore jedan ciklus: denaturacija - kada se dvolančani „kalup“ DNA zagrijava kako bi ga se razdvojilo (pri temperaturi od 92 do 96°C) na dva jednolančana. Prijanjanje - kada se temperatura snizi (od 55 do 72°C) kako bi se DNA početnice mogle pričvrstiti na „kalup“. Sinteza - kada se temperatura povisi (68-72°C) i sintetizira se novi DNA lanac Taq polimerazom. Ova tri koraka se ponavljaju 25-45 puta, udvostručujući broj kopija DNA u svakom ciklusu reakcije. Nakon završetka PCR-a, elektroforezom se može provjeriti količina i veličina proizvedenih fragmenata DNA.

3.4.1. Odabir fragmenata za umnažanje metodom PCR

Cjelokupno kodirajuće područje gena *BIRC5* (uključujući alternativne eksone 2B, 3B i 3γ) je genotipizirano, uključujući najčešće SNP-ove u *BIRC5* promotoru i 3' UTR regiji koji su odabrani iz SNP baze podataka Nacionalnog centra za biotehnologiju (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Ti polimorfizmi obično se koriste u asocijacijskim istraživanjima (vidi [Han i sur. 2009, Xu i sur. 2004, Hsieh i sur. 2012, Antonacopoulou i sur. 2010, Shi i sur. 2012, Jang i sur. 2008]) Većina ovih studija otkrila je da polimorfizmi u 5' i 3' regijama imaju najveći utjecaj na ekspresiju survivina (Aynaci i sur. 2013) i mogu doprinijeti riziku od različitih vrsta karcinoma (Wang i sur. 2012). Prema dosadašnjim istraživanjima petnaest polimorfizama se pokazalo zanimljivima u potencijalnoj ulozi u nastanku tumora. Šest se nalazi u promotoru, jedan u 5' UTR regiji, jedan u intronu 2, jedan u eksonu 4, i šest u 3' UTR regiji (Sušac i sur. 2019). Tijekom tog istraživanja dizajnirano je trinaest parova početnica za trinaest PCR produkata koji su navedeni u tablici (Tablica 1). Početnice za odabrane fragmente dizajnirane su prema sekvenci gena *BIRC5* (GeneID: 332) iz baze GenBank pod brojem NG_029069.1 pomoću mrežnog programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Untergrasser i sur. 2012.).

Tablica 1. Sekvence početnica za genotipizaciju i uvjeti metode PCR. Nazivi početnica fragmenata pronađenih u regulatornim regijama su prema glavnom polimorfizmu prisutnom u fragmentu.

UMNAŽANI FRAGMENT	DULJINA UMNAŽANOG FRAGMENTA (pb)	T _m /°C	SEKVENCE POČETNICA (F, R)*
<i>BIRC5</i> c. -1547	228	66	F 5'-GGAGGAGAGAAAGGGAGGAA-3' R 3'- GGCTGGTCTCAAACCTCCTGA-3'
<i>BIRC5</i> c.-625	175	60	F 5'-CCCCTGACTCCAGAAGGTG-3' R 5'- TCAGACAGGAGAGCTTTACAGG-3'
<i>BIRC5</i> c.-241	159	62	F 5'- GATTACAGGCGTGAGCCACT-3' R 5'- GTGTGCCGGGAGTTGTAGTC-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 1	251	58	F 5'-GACTACAACCTCCCGGCACAC-3' R 5'-CCTCCAAGAAGGGCCAGT-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 1a	264	58	F 5'-AGCCCTTTCTCAAGGACCAC-3' R 5'-CTCGATGGGGACAAAGCAG-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 2.1	250	62	F 5'-CACTCACGAGCTGTGCTGTC-3' R 5'-GAAGCAATGAGGGTGGAAAG-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 2.2	242	60	F 5'-CGATGGGCTTTGTTTTGAAC-3' R 5'-CAGGGTCTGCTGATGTATTCTG-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 2B	147	64	F 5'-CCCTTCTCTGCCCTTAATCC-3' R 5'-TAGTGGAGACGGGGTTTCAC-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 3	342	62	F 5'-AGAGGTGCCATATGGGAATG-3' R 5'-CATTGAACAGGGTTTGAGCA-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 3B	229	60	F 5'-CCCTGGATTTGCTAATGTGA-3' R 5'-AGCTCTGCTCTTAACCACTGC-3'
<i>BIRC5</i> Ekson 4	310	62	F 5'- CTGGGAAGCTCTGGTTTCAG-3' R 5'- CTGGTGCCACTTTCAAGACA-3'
<i>BIRC5</i> c.9809	161	60	F 5'- TGCATGACTTGTGTGTGATGA-3' R 5'- CCGTTTCCCAATGACTTAG-3'
<i>BIRC5</i> c.10611	159	60	F 5'-TGTATCATCCGGGCTCCTT-3' R 5'-ACAGAGGCTGGAGTGCATTT-3'

* (F, eng. forward) i (R, eng. reverse) početnice

3.4.2. Postupak metode PCR

Napravljena reakcijska smjesa od 10 μL sadržavala je 1 μL 10 \times boje LCGreen Plus+ (Idaho Technology, SAD), 1 μL komercijalno dostupnog 10 \times PCR pufera s 20 mM MgCl_2 koji sadrži goveđi albumin iz seruma (Idaho Technology, SAD), 0,2 μL smjese nukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 50 mM svaki; Roche, Švicarska), 0,5 μL svake početnice (500 nM svaki), 1 μL DNA uzorka, 0,08 μL FastStart Taq DNA polimeraze (Roche, Švicarska) te H_2O do ukupnog volumena od 10 μL . Zbog visokog sadržaja GC u DNA sekvenci promotorske regije za uspješnije umnažanje bilo je potrebno u sve PCR fragmente smještene u promotoru dodati pufer „GC-RICH“ (Roche, Švicarska). U reakcijsku smjesu reakcije PCR prvo je dodana voda, a zatim ostali reagensi i enzim. Prije stavljanja u PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) sve je kratko promiješano na vibracijskoj mješalici i centrifugirano.

Nakon početne denaturacije od 4 minute na 95°C, slijedilo je 45 ciklusa, svaki od 30 sekundi na 95°C, 45 sekundi na temperaturi sparivanja (58-66°C, ovisno o fragmentu) i 30 sekundi na 95°C. Nakon završne elongacije od 7 minuta na 72°C, slijedilo je stvaranje heterodupleksa od 1 minute na 98°C i 5 minuta na 40°C. Nakon toga održavana je temperatura od 4°C.

3.5. Elektroforeza

Jedna od značajnih tehnika u analizi DNA je elektroforetska tehnika koja služi za razdvajanje sličnih tipova molekula (proteina, nukleinskih kiselina) na osnovi njihove različite pokretljivosti u gelu koji se nalazi u polju istosmjerne električne struje. Kako je molekula DNA negativno nabijena u polju istosmjerne električne struje ona putuje prema pozitivnoj elektrodi (anodi) u viskoznom puferu.

3.5.1. Elektroforeza na agaroznom gelu

Elektroforeza na agaroznom gelu jedna je od najčešćih tehnika elektroforeze koja je relativno jednostavna za izvođenje, ali ne posjeduje veliku moć razlučivanja. Agarozni gel se sastoji od mikroskopskih pora koje djeluju kao molekularno sito koje odvaja molekule na temelju naboja, veličine i oblika. Ova analitička metoda prikladna je za razdvajanje fragmenata DNA različitih veličina u rasponu od 100 pb do 40 kb. Elektroforeza na agaroznom gelu koristi se u svrhu provjere uspješnosti, efikanosti i specifičnosti reakcije PCR.

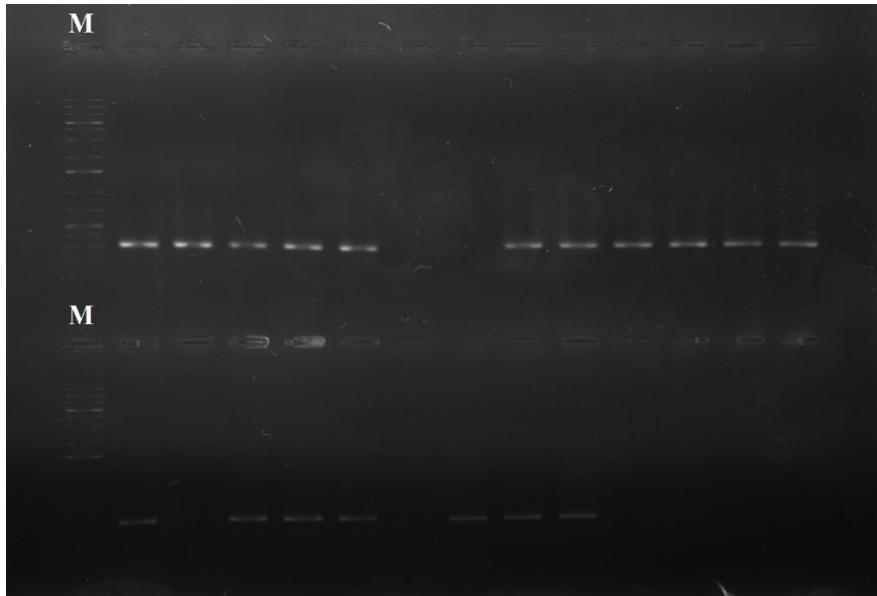
Za vizualizaciju razdvojenih fragmenata DNA korištena je boja MIDORI^{Green} Advance koja je sigurna alternativa tradicionalnom etidijevom bromidu. To je nekancerogena i manje mutagena boja za otkrivanje dDNA, jDNA i RNA u agaroznim gelovima s vrlo visokom osjetljivošću.

MIDORI^{Green} Advance emitira zelenu fluorescentnu boju kad se veže na DNA ili RNA. Ima dva vrha ekscitacije sekundarne fluorescencije (~270 nm; ~290 nm) i jedan vrh jake ekscitacije oko 490 nm. Emisija fluorescencije centrirana je na ~530 nm. Za osvjetljavanje gela UV svjetlom, a time i određivanje položaja DNA u gelu, koristi se UV transiluminator.

3.5.2. Postupak elektroforeze na agaroznom gelu

Produkti reakcije PCR analizirani su u 1% gelu agaroze pripremljenom pomoću TAE pufera (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) (Sigma, SAD) i MIDORI^{Green} 1 µg/mL (Nippon Genetics, Njemačka). 1%-tni (w/V) gel pripremljen je otapanjem 0,8 g agaroze (Sigma, SAD) u 80 mL pufera 1×TAE. Nakon zagrijavanja gela i potpunog otapanja agaroze, dodano je 5 µL MIDORI^{Green} boje (1 µg/mL) radi vizualizacije produkata PCR reakcije. Blago ohlađena agarosa (50-60°C) izlivena je u plastičnu kadicu i ostavljena polimerizirati.

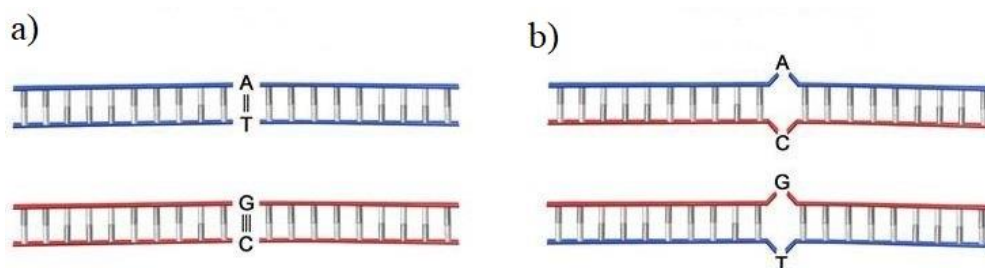
Polimerizirani gel je postavljen u uređaj za elektroforezu i nanošeni su uzorci u jažice. U prvu jažicu nanešen je standard (Fermentas) (3,5 µL (110 ng/µL) 1 kb Plus) koji služi za usporedbu i procjenu veličine PCR produkta (Slika 5). U svaku od ostalih jažica nanešeni su po 2,5 µL PCR produkta pomiješanog s 1 µL pufera za nanošenje uzoraka (0,05% bromfenol plavo, 0,05% ksilen cijanol, 50% glicerol). Za elektroforezu je korišten 1×TAE pufer (50×TAE: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH=8,0) koji se koristio i za izradu gela. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 V, 30 minuta. Za detekciju i fotografiranje gelova korišten je Image Alliance 4.7 (UVItec Limited, Ujedinjeno kraljevstvo).



Slika 5. Prikaz 1%-tnog agaroznog gela s PCR produktima fragmenata eksona 4 kontrolnih uzoraka 34, 36, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 56, 57, 59, 62, 64, 66, 67, 69,70, 71 i negativne kontrole (M = 1 kb+ DNA standard)

3.6. Analiza heterodupleksa

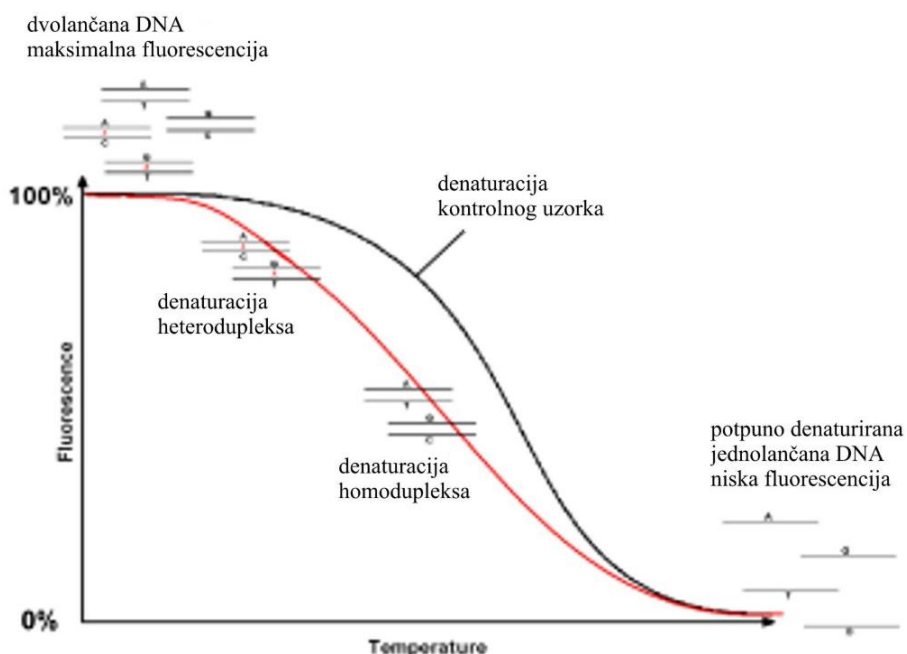
Analiza heterodupleksa je neizravan način otkrivanja mutacija i polimorfizama koji se temelji na analizi produkata reakcije PCR. Metoda korištena za analizu heterodupleksa je fluorescentna detekcija heterodupleksa odnosno mekšanje DNA visoke rezolucije (High resolution melting). Heterodupleks je dvostruka uzvojnica nukleinske kiseline u kojoj su uzvojnice originalno iz različitih lanaca. Njegov nastanak temelji se na činjenici da kada se dvije različite molekule DNA zajedno denaturiraju na visokoj temperaturi i zatim ostave da se ohlade, dio molekula će se međusobno „pogrešno“ spariti i pritom će nastati heterodupleks (Slika 6).



Slika 6. Prikaz DNA dupleksa: a) homodupleksi, b) heterodupleksi

(<https://www.cancer.gov/>)

Kada je u pitanju genotipizacija, mekšanje DNA visoke rezolucije postaje tehnika izbora jer je jeftina, jednostavna, točna i brza. Mekšanje visoke rezolucije zahtijevalo je novu instrumentaciju. Prvi instrument visoke razlučivosti razvijen pod nazivom HR-1 (Idaho Technology, USA) i dalje je najprecizniji s najvećom brzinom analize. Pored posebne instrumentacije, za mekšanje u visokoj rezoluciji koriste se posebne boje za zasićenje koje fluoresciraju samo u prisutnosti dvolančane DNA. Ove boje su uključene u proces umnažanja metodom PCR. U reakciji PCR-a koristi se boja koja fluorescira kad se veže uz dvolančanu molekulu DNA, u našem slučaju to je boja LC Green Plus+. Kako se uzorak zagrijava porastom temperature, tako se DNA denaturira, otpušta boju i intenzitet fluorescencija pada. Krivulja mekšanja ili disocijacije je grafički prikaz ovisnosti fluorescencije produkta o temperaturi (Slika 7).



Slika 7. Krivulja mekšanja ili krivulja disocijacije

Do pada fluorescencije dolazi pri temperaturi koja odgovara temperaturi mekšanja (T_m) PCR produkta. Pri toj temperaturi dolazi do razdvajanja komplementarnih lanaca i oslobađanja interkalirajuće boje koja prestaje fluorescirati. Čak i jedna promjena baze uzrokovat će razlike u krivulji mekšanja. Osim krivulje disocijacije, postoje još dva grafička prikaza detekcije heterodupleksa. To su derivacijska krivulja (ovisnost negativne prve derivacije intenziteta fluorescencije o temperaturi ($-dI/dT$)) i krivulja razlike (razlika između intenziteta fluorescencije uzorka i referentnog „normalnog“ uzorka za svaku točku mjerenja). Najvažnija aplikacija za mekšanje visoke rezolucije je skeniranje gena odnosno potraga za postojanjem nepoznatih varijacija u PCR amplikonima prije ili kao alternativa sekvenciranju. Mutacije u

PCR produktima detektiraju se mekšanjem visoke rezolucije jer mijenjaju oblik krivulja mekšanja DNA.

3.6.1. Flourescentna detekcija heterodupleksa (High resolution melting)

Radi analize polimorfizama gena *BIRC5*, trinaest PCR fragmenata podvrgnuto je metodi mekšanja DNA visoke rezolucije (HR-1, Idaho Technology, USA) kako je opisano u Cvok i sur. (2008). Metoda je bazirana na svojstvu molekule heterodupleksa da se denaturira na drugačijoj temperaturi od „normalno“ sparene DNA.

Nakon što je reakcija PCR završila uzorci su analizirani na aparatu za praćenje denaturacije HR-1 (High resolution melter) koji ih zagrijava i prati pad fluorescencije. Uzorci, čije su se krivulje mekšanja DNA razlikovale od normalne, sekvencirani su. Zbog velikog broja nađenih polimorfizama u PCR fragmentu za ekson 4, svi su uzorci izravno sekvencirani.

3.7. Sekvenciranje

Sekvenciranje DNA je postupak određivanja slijeda nukleotidnih baza (A, T, C i G) u fragmentu DNA od interesa. Fragmenti DNA dužine do oko 900 pb rutinski se sekvenciraju korištenjem metode koja se naziva sekvenciranje po Sangeru ili metoda terminacije lanca. Ovakvim sekvenciranjem nastaju produkti različitih duljina koji završavaju fluorescentno obilježenim dideoksinukleotidima na 3' kraju. Fragmenti se potom razdvajaju kapilarnom elektroforezom. Molekule se električnom strujom ubrizgavaju u dugačku staklenu kapilaru ispunjenu gel polimerom.

Neposredno prije reakcije sekvenciranja po Sangeru bilo je nužno produkte reakcije PCR pročistiti od početnica i viška nukleotida. To je napravljeno pomoću kompleta ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, SAD) tako da je 10 µL PCR produkta pipetom prenešeno u čistu mikroeprevetu te je u svaku dodano 0,5 µL enzima ExoSAP-IT. Uzorci su zatim inkubirani 30 minuta na 37°C, a potom zagrijavani 15 minuta na 85°C. Reakcija sekvenciranja rađena je u volumenu od 10 µL, od čega je 1 µL kompleta za sekvenciranje (BigDye Terminator v1.1 Applied Biosystems, SAD), 1 µL F ili R početnica, 3 µL PCR produkta te 5 µL H₂O. Uvjeti reakcije sekvenciranja bili su sljedeći: 1 minuta na 96°C, zatim 25 ciklusa od 10 sekundi na 96°C, 5 sekundi na 50°C i 4 minute na 60°C. Kada je reakcija došla do kraja, uzorci su precipitirani s 25 µL apsolutnog etanola, s dodatkom 1 µL 0,125 M EDTA i 1 µL 3 M Na-acetata, 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su centrifugirani 50 minuta na 3000 rpm (Universal 320R, Hettich, Njemačka) i supernatant je odliven. Zatim je talog ispran s 125 µL 70% etanola, ponovno centrifugiran 50 minuta na 3000 rpm i osušen.

Uzorci su zatim otopljeni u 20 μL Hi-Di formamida (Applied Biosystems, SAD), denaturirani 2-5 minuta na 95°C i ohlađeni u ledenom stalku. Nakon toga uzorci su nanešeni na sekvencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD) i analizirani programom Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems, SAD) te uspoređivani s referentnom sekvencom programom BioEdit 7.2.5.

3.8. Izolacija RNA

Svi koraci izolacije RNA iz stanica rađeni su na ledu kako bi se očuvao njen integritet. Također, svi koraci centrifugiranja rađeni su u centrifugi ohlađenoj na $+4^\circ\text{C}$. Na talog stanica u pločicama sa 6 bunarića dodano je 500 μL TRIzola (Invitrogen Life Technologies, SAD) te inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. TRIzol reagens je monofazna otopina fenola i gvanidin izotiocijanata. Tijekom homogenizacije tkiva ovaj reagens održava integritet RNA uz istovremeno narušavanje integriteta staničnih membrana i rastvaranje staničnih komponenti. Nakon toga je dodano 100 μL kloroforma i sadržaj mikroeprevete je dobro promiješan mućkanjem te inkubiran na sobnoj temperaturi 5 minuta. Sljedeći korak je bio centrifugiranje u centrifugi ohlađenoj na $+4^\circ\text{C}$, 15 minuta na 13200 rpm čime se otopina razdvojila u gornju vodenu fazu, međufazu i donju, organsku fazu. RNA je ostala u gornjoj, vodenoj fazi te se ta faza prebacila u čistu mikroeprevetu. Za precipitaciju RNA je dodano 250 μL izopropanola, dobro se promućkalo i inkubiralo 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se centrifugiralo 15 minuta u ohlađenoj centrifugi na 13200 rpm. Potom je supernatant odliven i bačen vodeći računa da se ostavilo 15-20% vodene faze iznad međufaze kako bi se izbjegla kontaminacija proteinima, a RNA je ostala u precipitatu. Precipitat RNA je ispran sa 500 μL 75%-tnog etanola i centrifugiran u ohlađenoj centrifugi 10 minuta pri 13200 rpm. Zatim je ponovno odliven supernatant, a mikroepreveta je ostavljena otvorena kako bi se osušio talog odnosno kako bi preostali etanol ishlapio. Naposljetku, RNA je otopljena u 30 μL sterilne vode i pohranjena u hladnjaku na -80°C do daljnje upotrebe.

3.9. Određivanje koncentracije RNA

Koncentracija RNA mjerena je na spektrofotometru NanoPhotometer® N60/N50 (Implen, Njemačka). Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm. Postupak je započet na način da je na mjesto na uređaju predviđeno za mjerenje mikropipetom prvo nanešeno 1 μL vode koja je služila kao pozadinska korekcija na otapalo. Uređaj ima u sebi ugrađeno računalo putem kojeg je prikazana koncentracija RNA te omjeri A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Omjer A_{260}/A_{280} govori o čistoći RNA i što je taj omjer bliži 2 to je RNA

čišća, ako je omjer niži može se raditi o kontaminaciji proteinima koji apsorbiraju pri 280 nm. Omjer A_{260}/A_{230} također govori o čistoći uzorka i on je za čist uzorak u rasponu 2-2,2, ako je niži to može značiti da je u uzorku zaostalo TRIzola koji apsorbira na 230 nm.

3.10. Reverzna transkripcija

RNA je vrlo osjetljiva molekula te ju je iz tog razloga potrebno, prije analize ekspresije gena kvantitativnim real-time PCR-om, prevesti u cDNA (eng. complementary DNA, komplementarna DNA) koja je znatno stabilnija. To je napravljeno uz pomoć enzima reverzna transkriptaza koja transkribira RNA u sebi komplementarnu cDNA.

Reakcija reverzne transkripcije rađena je s 1 µg RNA. Za ovu reakciju korišten je komplet za reverznu transkripciju (Applied Biosystems, SAD) koji sadrži sve potrebne komponente. U ukupni volumen od 25 µL je ulazilo 8,5 µL reakcijske smjese (10x pufer (10% v/v), 4 mM dNTP, 10x početnice (10% v/v), 1 U/µL inhibitora RNaza i 2,5 U/µL reverzne transkriptaze), 1 µg RNA te je nadopunjeno H₂O do konačnog volumena (Tablica 2).

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

Komponenta	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen (za reakciju od 25 µL)
10x pufer	10x	1x	2,5
25x dNTP	100 mM	4 mM	1
10x nasumične početnice	10x	1x	2,5
inhibitor RNaza	20 U/µL	1 U/µL	1,25
MultiScribe™ reverzna transkriptaza	50 U/µL	2,5 U/µL	1,25

Reakcija reverzne transkripcije se odvijala u PCR uređaju (GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems, SAD) prema navedenom programu (Tablica 3).

Tablica 3. Program reverzne transkripcije.

	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Vrijeme	10 min	120 min	5 min	∞

Nakon reakcije reverzne transkripcije, cDNA je pohranjena na -20°C do korištenja.

3.11. Kvantitativni real-time PCR (qRT-PCR)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu („Real-time PCR“) je postupak koji se temelji na standardnom PCR-u. Osnovna razlika i veliko tehnološko unapređenje je uvođenje istovremene detekcije produkta PCR-a odnosno mogućnost praćenja umnažanja novonastalih molekula DNA sa svakim ciklusom reakcije. Tijekom reakcija PCR-a količina DNA se udvostručuje te se svakim ciklusom eksponencijalno povećava količina DNA u uzorku. To se prati pomoću fluorescentne boje SYBR Green koja se interkalira u novonastale lance DNA. Razina fluorescencije se povećava svakim ciklusom, a ciklus u kojem ima dovoljno DNA da bi fluorescencija porasla iznad praga detekcije naziva se C_t vrijednost. qRT-PCR pretpostavlja da je količina nosintetizirane DNA tijekom eksponencijalne faze reakcije PCR proporcionalna početnoj količini kalupa DNA. Na taj način se određuje proizvoljna vrijednost granične fluorescencije u eksponencijalnoj fazi (eng. threshold). Kad razina fluorescencije prelazi tu graničnu razinu definira se ciklus prijelaza granične vrijednosti fluorescencije (eng. threshold cycle, C_t). Što je C_t -vrijednost manja to je početna količina kalupa DNA veća jer je prije postignuta granična razina fluorescencije odnosno što neke DNA u uzorku ima više, ranije će se umnožiti dovoljno da prijeđe prag detekcije. S druge strane, uzorak s manje DNA će imati višu vrijednost C_t . Eventualne razlike u početnoj koncentraciji uzorka ispravljaju se pomoću referentnog gena koji služi kao kontrola jer je njegova ekspresija stabilna (jednaka) u svim tkivima i pod svim uvjetima. Sve C_t -vrijednosti normaliziraju se prema vrijednosti referentnog gena. Za usporedbu razina ekspresije gena između dvije kategorije uzoraka, relativna ekspresija gena izražena je kao promjena ekspresije u odnosu na referentni gen i izračunata kao $2^{-\Delta C_t}$, gdje je ΔC_t razlika u ekspresiji (C_t [ispitivani gen] – C_t [referentni gen]). Za računanje razlike u ekspresiji gena između tumorskih i zdravih uzoraka korištena je formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, gdje je $\Delta\Delta C_t$ razlika između ΔC_t tumorskog tkiva i ΔC_t zdravog tkiva. qRT-PCR se radi u pojedinačnim mikroepruvetama ili pločicama s 96 bunarića u uređaju za kvantitativni real-time PCR Bio-Rad 96 CFX (Bio-Rad Laboratories, SAD).

Detektirana je ekspresija osam izoformi survivina: S wt, S 2 α , S 2B, S 3 α , S 3B, S Δ ex3, S 3 γ M i S 3 γ V te referentnog gena *TBP*. Reakcijska smjesa je napravljena za svaku izoformu posebno. U smjesu su dodani supermix SsoFast™ EvaGreen (Bio-Rad Laboratories, SAD) 2x (50% v/v), početnica F (0,3 mM), početnica R (0,3 mM) te voda do ukupnog volumena 9 μL po uzorku. „Real-time PCR“ je izvođen u duplikatu za svaki uzorak, a za reakcijsku smjesu za

svaki gen napravljena je i jedna dodatna negativna kontrola u koju se ne stavlja uzorak cDNA (eng. no template control, NTC). Nukleotidne sekvence upotrebljenih početnica navedene su u Tablici 4.

Tablica 4. Sekvence početnica korištene za određivanje ekspresije izoformi gena za survivin. Početnice koje nisu iz Antonacopoulou i sur. (2010) su dizajnirane pomoću mrežnog programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Naziv početnice	Sekvence početnica	Referenca
S wt	F - TGACGACCCCATAGAGGAAC R - TCCTTTGCATTTTGTCTTGG	-
S 2α	F - AACTGGCCCTTCTTGGAG R - ACTTACATGGGGTCGTCATC	Antonacopoulou i sur. (2010)
S 2B	F - GATGACGACCCCATTTGG R - TTATGTTCCCTCTCTCGTGATCC	Antonacopoulou i sur. (2010)
S 3α	F - GAGGCTGGCTTCATCCACT R - AGAGCTCTCTCATGGGGTCGT	-
S 3B	F - GCCAAGAACA AAAATTGAGAGAG R - AACAGACCCTGGCAAACATC	Antonacopoulou i sur. (2010)
S Δex3	F - GACGACCCCATGCAAAG R - GTGGCACCAGGGAATAAAC	Antonacopoulou i sur. (2010)
S 3γM	F - GATGACGACCCCATAGAGGA R - GGGTGACAGAGTAAGACCAATTTT	-
S 3γV	F - GATGACGACCCCATAGAGGA R - TGACAGAGTAAGACCCTGTAATTTTG	-
TBP	F - CACGAACCACGGCACTGATT R - TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC	Cong i sur. (2013)

Korišteni su sljedeći uvjeti za qRT-PCR: početna denaturacija na 95°C tijekom 3 minute, 40 ciklusa na 95°C tijekom 15 sekundi, 61°C tijekom 1 minute i konačno krivulja mekšanja sa 75°C na 95°C. Razine ekspresije izračunate su korištenjem formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$, koristeći ekspresiju referentnog gena *TBP*. Za uzorke bez ekspresije određene izoforme nakon 40 ciklusa qRT-PCR-a, Ct vrijednost je postavljena na 40 kako bi se omogućila statistička analiza podataka (McCall i sur. 2014).

3.12. Statistička analiza

Statistički su obrađeni rezultati analize ekspresije i genotipizacije zdrave kontrolne skupine i skupine oboljelih od karcinoma dojke. Frekvencija pojedinog alela izračunata je prema formuli: (dvostruki broj uzoraka s homozigotnim genotipom + broj uzoraka s heterozigotnim genotipom) / dvostruki broj uzoraka). Odstupanje od Hardy-Weinberg

ravnoteže (eng. Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) je testirano pomoću standardnog χ^2 testa. Za ispitivanje normalnosti distribucije podataka o ekspresiji korišten je D'Agostino-Pearsonov test. Za varijable koje su pokazale normalnu distribuciju nakon logaritamske transformacije, za ispitivanje razlika u ekspresiji izoformi upotrijebljeni su nezavisni T-test i jednosmjerna analiza varijance. Relativna ekspresija izoformi je prikazana metodom standardne pogreške srednje vrijednosti (standard error of the mean, SEM). Spearmanov koeficijent korelacije rangova (ρ) korišten je za procjenu korelacije ekspresije između različitih izoformi. Za usporedbu frekvencija polimorfizma korištena su dva statistička testa - Fisherov egzaktni test (2×2 tablice) za frekvenciju alela i χ^2 test (3×2 tablice) za frekvenciju genotipova. Dvosmjerne P -vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Statistička analiza provedena je pomoću MedCalc programa, verzija 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Belgija) i Excel 2010 (Microsoft, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Genotipizacija

Prethodna istraživanja ukazala su da bi petnaest polimorfizama gena *BIRC5* potencijalno moglo biti značajno za nastanak tumora. Pet od njih se nalazi u promotoru, jedan u 5' UTR regiji, jedan u intronu 2, jedan u kodirajućem dijelu eksona 4 i šest u 3' UTR regiji.

U ovome radu analizirano je trinaest fragmenata gena *BIRC5* (Tablica 1): tri u promotorskoj regiji: (c.-1547, c.-625 i c.-241), po dva za ekson 1 (1a i 1) i ekson 2 (2.1 i 2.2), po jedan za ekson 2B, ekson 3, ekson 3B, ekson 4 (koji obuhvaća i početak 3' UTR regije) u kodirajućoj regiji te dva u 3' UTR regiji (c.9809 i c.10611).

U istraživanim regulatornim regijama gena *BIRC5*, promotoru, eksonu 4 i 3' UTR (3' netranslatiranoj regiji) pronađeno je 11 polimorfizama (Tablica 5). Frekvencije genotipova svih pronađenih polimorfizama u kontrolnim uzorcima bile su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ($P > 0,05$) što pokazuje da je metoda genotipizacije dobra za detekciju heterozigotnih genotipova.

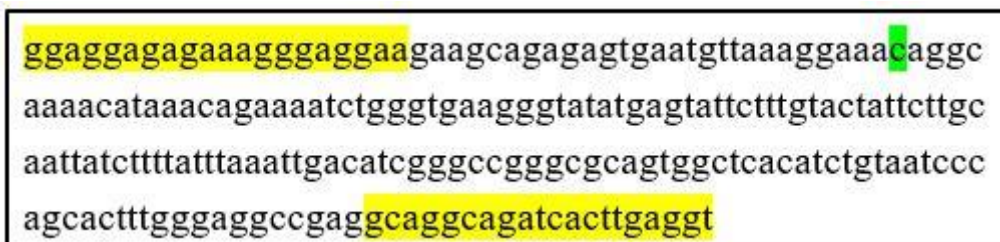
U istraživanim fragmentima za eksone 2, 2B, 3 i 3B u uzorcima karcinoma dojke nije pronađen niti jedan polimorfizam.

Tablica 5. Polimorfizmi gena *BIRC5* pronađeni u ovom istraživanju i njihova pozicija unutar gena.

Pozicija unutar gena	dbSNP ID	Nukleotidna promjena
promotor	rs3764383	c.-1547C>T
promotor	rs8073903	c.-644T>C
promotor	rs8073069	c.-625G>C
promotor	rs17878467	c.-241C>T
promotor	rs17887126	c.-235G>A
5' UTR	rs9904341	c.-31G>C
ekson 4	rs2071214	c.9194G>A
3' UTR	rs2239680	c.9386T>C
3' UTR	rs17882139	c.9387_9388insAA
3' UTR	rs1042489	c.9809T>C
3' UTR	rs2661694	c.10611C>A

4.1.1. Promotorska regija oko polimorfizma c.-1547

U fragmentu DNA gena *BIRC5* c.-1547 veličine 209 pb, umnoženom reakcijom PCR, analizirana je regija od 169 pb koja se nalazi od -1574 do -1406 baze uzvodno od početka translacije. U regiji je u uzorcima karcinoma dojke nađen polimorfizam rs3764383 (c.-1547C>T) (Slika 8).



```
ggaggagagaaaaggaggaggaagaagcagagagtgaatgttaaaggaaacaggc
aaaacataaacagaaaatctgggtgaagggtatatgagtattctttgtactattcttgc
aattatcttttatttaaattgacatcgggccgggcgcagtggtcacaatctgtaatccc
agcactttgggaggccgaggcaggcagatcacttgaggt
```

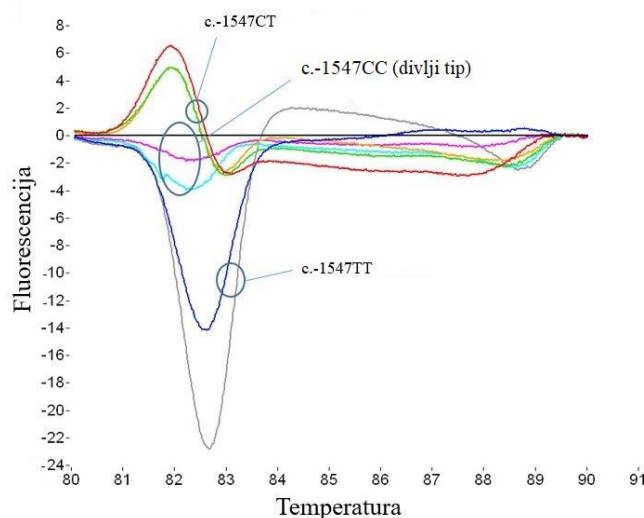
Slika 8. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.-1547 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto) za analizu polimorfizma gena *BIRC5*: rs3764383 (c.-1547C>T) (zeleno).

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-1547C>T (rs3764383) (Slika 9) genotip divljeg tipa (TT) je nađen u 52,7% kontrolnih uzoraka i 38,9% karcinoma. Heterozigotna nukleotidna promjena CT pronađena je u 44,6% kontrola i 55,6% karcinoma. Homozigotna promjena CC pronađena je u samo 2,7% kontrolnih uzoraka i 5,6% karcinoma (Tablica 6). Učestalost alela T u polimorfizmu rs3764383 (c.-1547C>T) kod zdravih kontrola iznosi 75%, a kod pacijenata s karcinomom dojke 66,7%. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 25%, a kod bolesnika 33,3%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 6).

Tablica 6. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.-1547C>T gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (*P*-vrijednost).

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=18)		
genotip	n	%	n	%	<i>P</i>	
TT	39	52,7	7	38,9	0,526	
CT	33	44,6	10	55,6		
CC	2	2,7	1	5,6		
alel	n	%	n	%	<i>P</i>	
T	111	75,0	24	66,7	0,303	
C	37	25,0	12	33,3		

Polimorfizam rs3764383 (c.-1547C>T) analiziran je pomoću krivulje mekšanja (Slika 9).



Slika 9. Analiza polimorfizama rs3764383 (c.-1547C>T) gena *BIRC5*. Prikazana je krivulja razlike kao produkt analize HR-1 programom.

4.1.2. Promotorska regija oko polimorfizma c.-625

U fragmentu DNA gena *BIRC5* c.-625 veličine 175 pb, umnoženom reakcijom PCR, analizirana je regija od 134 pb koja se nalazi od -726 do -592 baze uzvodno od početka translacije. U regiji su pronađena dva polimorfizma: rs8073903 (c.-644T>C) i rs8073069 (c.-625G>C) koji su bili ciljevi istraživanja ove regije (Slika 10).

cccctgactccagaaggtggccctcctggaaaccaggctcgtgcagtcacgatgt
 actcgccgggacagcagatgtctgctgcactccatccctcccctgttcattgtccttcat
 gccctctggagtagatgcttttgcagaggtggcacccctgtaaagctctcctgtctga

Slika 10. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.-625 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto) za analizu polimorfizama gena *BIRC5*: rs8073903 (c.-644T>C) (zeleno) i rs8073069 (c.-625G>C) (plavo).

U analiziranim uzorcima polimorfizma c.-644T>C (rs8073903) (Slika 11) genotip divljeg tipa (TT) je pronađen u 40,5% kontrola i 44,4% karcinoma. Heterozigotna promjena TC je pronađena u 52,7% kontrola i 50% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena CC je pronađena u 6,8% kontrolnih uzoraka i 5,6% karcinoma (Tablica 8). Učestalost alela T u polimorfizmu rs8073903 (c.-644T>C) kod zdravih kontrola iznosi 66,9%, a kod bolesnih pacijenata 69,4%. Učestalost alela C u kontrolama iznosi oko 33,1%, a kod bolesnika 31,6%. U polimorfizmu rs8073069 (c.-625G>C) učestalost alela G u pacijenta iznosi 80,3%, a kod kontrola iznosi 77,7%. Učestalost alela C kod zdravih kontrola iznosi 33,1%, a kod oboljelih pacijenata 30,6%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 7).

Tablica 7. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.-644T>C gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (P -vrijednost).

	KONTROLE		KARCINOMI		P
	(n=74)		(n=18)		
genotip	n	%	n	%	
TT	30	40,5	8	44,4	0,949
TC	39	52,7	9	50,0	
CC	5	6,8	1	5,6	
alel	n	%	n	%	P
T	99	66,9	25	69,4	0,845
C	49	33,1	11	30,6	

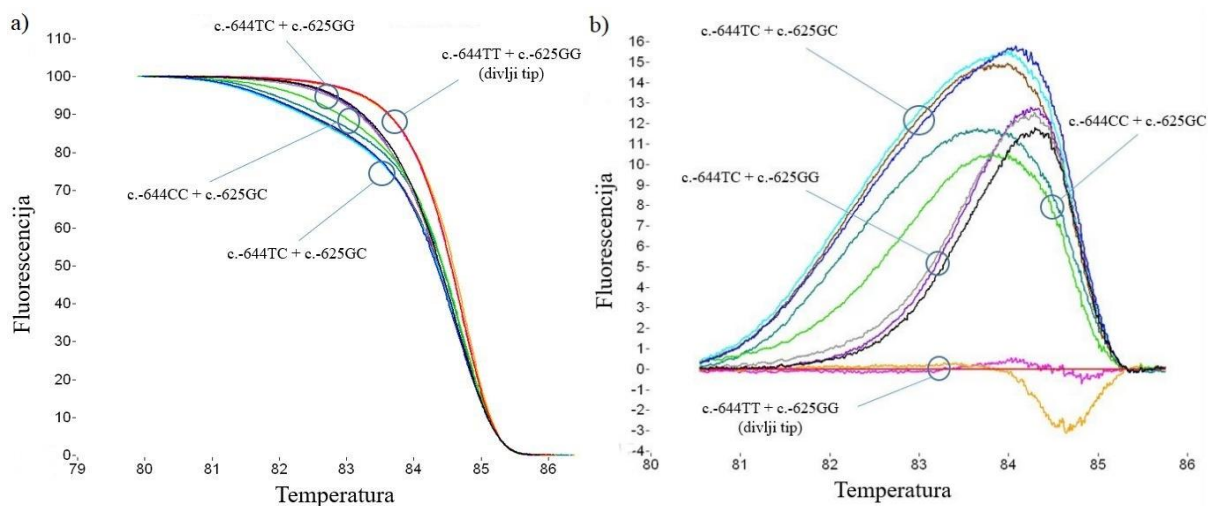
U analiziranim uzorcima polimorfizma rs8073069 (c.-625G>C) (Slika 11) genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 58,1% kontrola i 66,7% karcinoma. Heterozigotna promjena GC je

pronađena u 39,2% kontrola i 33,3% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena CC je pronađena u 2,7% kontrolnih uzoraka i u nijednom uzorku karcinoma (Tablica 9). Učestalost alela G u polimorfizmu rs8073069 (c.-625G>C) kod zdravih kontrola iznosi 77,7%, a kod bolesnih pacijenata 83,3%. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 22,3%, a kod bolesnika 16,7%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 8).

Tablica 8. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.-625G>C gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (P -vrijednost).

		KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=18)		<i>P</i>
genotip	n	%	n	%		
GG	43	58,1	12	66,7	0,672	
GC	29	39,2	6	33,3		
CC	2	2,7	0	0,0		
alel	n	%	n	%	<i>P</i>	
G	115	77,7	30	83,3	0,649	
C	33	22,3	6	16,7		

Polimorfizmi rs8073903 (c.-644T>C) i rs8073069 (c.-625G>C) gena *BIRC5* analizirani su pomoću krivulja mekšanja (Slika 11).



Slika 11. Analiza polimorfizama rs8073903 (c.-644T>C) i rs8073069 (c.-625G>C) gena *BIRC5*. Dva različita prikaza krivulje mekšanja analizirane HR-1 programom: a) krivulja disocijacije i b) krivulja razlike.

4.1.3. Promotorska regija oko polimorfizma c.-241

U fragmentu DNA gena *BIRC5* c.-241 veličine 159 pb, umnoženom reakcijom PCR, analizirana je regija od 119 pb koja se nalazi od -282 do -163 baze uzvodno od početka translacije. U regiji su pronađena dva polimorfizma: rs17878467 (c.-241C>T) i rs17887126 (c.-235G>A) (Slika 12).

```

gattacagggcgtgagccactgcacccggcctgcacgcgttctttgaaagcagtcg
aggggggcgctaggtgtgtgggcagggacgagctggcgcgggcgtcgctgggtgca
ccgcgaccacgggcagagccacgcggcgggaggactacaactcccggcacac
  
```

Slika 12. Slijed nukleotida promotorske regije oko c.-241 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto) za analizu polimorfizama gena *BIRC5*: rs17878467 (c.-241C>T) (zeleno) i rs17887126 (c.-235G>A) (plavo).

U analiziranim uzorcima polimorfizma rs17878467 (c.-241C>T) (Slika 13) genotip divljeg tipa (CC) je pronađen u 78,4% kontrola i u 94,4% karcinoma. Heterozigotna promjena CT je pronađena u 21,6% kontrola i u 5,6% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena TT nije pronađena u niti jednom uzorku (Tablica 11). Učestalost alela C u polimorfizmu rs17878467 (c.-241C>T) kod zdravih kontrola iznosi 89,2%, a kod bolesnih pacijenata 97,2%. Učestalost alela T u kontrolama iznosi 10,8%, a kod bolesnika 2,8%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 9).

Tablica 9. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.-241C>T gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (*P*-vrijednost).

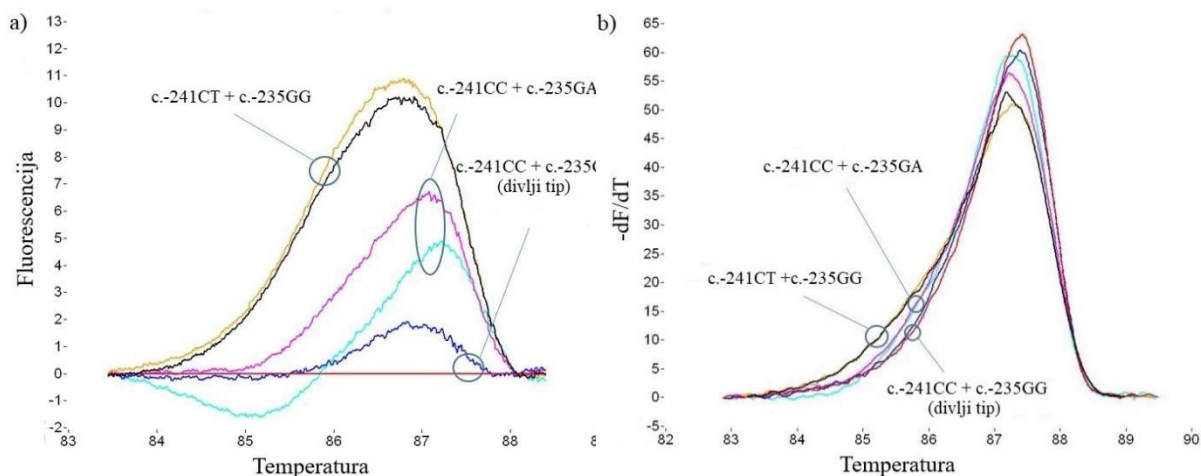
		KONTROLE		KARCINOMI		
		(n=74)		(n=18)		
genotip	n	%	n	%	<i>P</i>	
CC	58	78,4	17	94,4	0,177	
CT	16	21,6	1	5,6		
TT	0	0,0	0	0,0		
alel	n	%	n	%	<i>P</i>	
C	132	89,2	35	97,2	0,201	
T	16	10,8	1	2,8		

U analiziranim uzorcima polimorfizma rs17887126 (c.-235G>A) (Slika 13) genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 97,3% kontrola i u 94,4% karcinoma. Heterozigotna promjena GA je pronađena u 2,7% kontrola i u 5,6% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena AA nije pronađena u niti jednom uzorku (Tablica 12). Učestalost alela G u polimorfizmu rs17887126 (c.-235G>A) kod zdravih kontrola iznosi 98,6%, a kod bolesnih pacijenata 97,2%. Učestalost alela A u kontrolama iznosi 1,4%, a kod bolesnika 2,8%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 10).

Tablica 10. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.-235G>A gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (*P*-vrijednost).

		KONTROLE		KARCINOMI		
		(n=74)		(n=18)		
genotip	n	%	n	%	<i>P</i>	
GG	72	97,3	17	94,4	0,484	
GA	2	2,7	1	5,6		
AA	0	0,0	0	0,0		
alel	n	%	n	%	<i>P</i>	
G	146	98,6	35	97,2	0,482	
A	2	1,4	1	2,8		

Polimorfizmi rs17878467 (c.-241C>T) i rs17887126 (c.-235G>A) gena *BIRC5* su analizirani pomoću krivulja mekšanja (Slika 13).



Slika 13. Analiza polimorfizama rs17878467 (c.-241C>T) i rs17887126 (c.-235G>A) gena *BIRC5*. Dva različita prikaza krivulje mekšanja analizirane HR-1 programom: a) krivulja razlike i b) derivacijska krivulja.

4.1.4. Ekson 1

Ekson 1 je zbog potrebe analize podijeljen u dva PCR fragmenta. U prvom od dva PCR fragmenta gena *BIRC5* analizirano je 22 baze promotorske regije, 121 baza 5' UTR regije, i 70 baza eksona 1. U analiziranoj regiji pronađen je jedan polimorfizam gena *BIRC5*: rs9904341 (c.-31G>C) (Slika 14). U drugom od dva PCR fragmenta analizirano je 60 baza eksona 1 i 165 baza introna 1 i u njemu nisu nađeni polimorfizmi gena *BIRC5*. (Slika 14).

```

gactacaactcccggcacaccccgcgcgccccgcctctactcccagaaggccgcg
gggggtggaccgcctaagaggcggtgcgctcccacatgccccgcggcgcgcca
ttaaccgccagatttgaatcgcgggaccgctggcagagggtggcggcggcgccA
TGGGTGCCCCGACGTTGCCCCCTGCCTGGCAGCC
CTTTCTCAAGGACCACCGCATCTCTACATTCAAGA
ACTGGCCCTTCTTGGAGG
    
```

Slika 14. Slijed nukleotida u PCR fragmentu eksona 1 s označenom 5' UTR regijom (mala, plava slova) i kodirajućim bazama eksona (velika, plava slova) te označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto) za analizu polimorfizma gena *BIRC5*: rs9904341 (c.-31G>C) (zeleno).

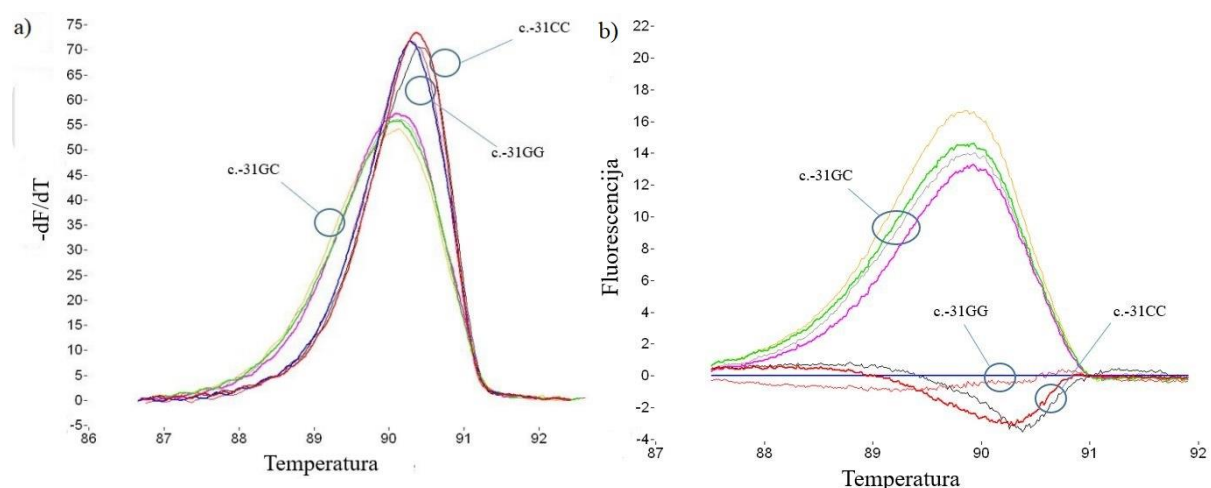
U analiziranim uzorcima polimorfizma rs9904341 (c.-31G>C) (Slika 15) genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 36,5% kontrola i u 33,3% karcinoma. Heterozigotna promjena GC je pronađena u 52,7% kontrola i u 55,6% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena CC

pronađena je u 10,8% kontrola i 11,1% karcinoma (Tablica 13). Učestalost alela G u polimorfizmu rs9904341 (c.-31G>C) kod zdravih kontrola iznosi 62,8%, a kod bolesnih pacijenata 61,1%. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 37,2%, a kod bolesnika 38,9%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 11).

Tablica 11. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.-31G>C gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (P -vrijednost).

		KONTROLE		KARCINOMI		
		(n=74)		(n=18)		
genotip	n	%	n	%	P	
GG	27	36,5	6	33,3	0,969	
GC	39	52,7	10	55,6		
CC	8	10,8	2	11,1		
alel	n	%	n	%	P	
G	93	62,8	22	61,1	0,850	
C	55	37,2	14	38,9		

Polimorfizam rs9904341 (c.-31G>C) gena *BIRC5* je analiziran pomoću krivulja mekšanja (Slika 15).



Slika 15. Analiza polimorfizma rs9904341 (c.-31G>C) gena *BIRC5*. Dva različita prikaza krivulje mekšanja analizirane HR-1 programom: a) derivacijska krivulja i b) krivulja razlike.

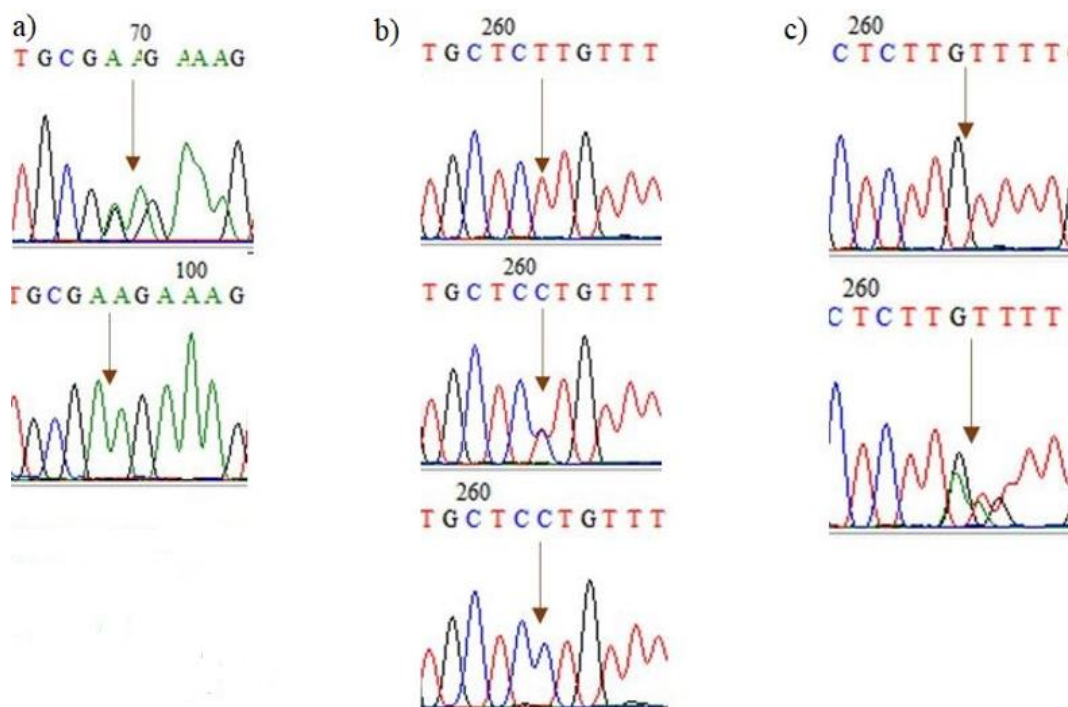
4.1.5. Ekson 4

U PCR fragmentu analizirano je zadnjih 27 baza introna 3, 90 kodirajućih baza eksona 4 i prve 153 baze nekodirajuće 3' UTR regije. U uzorcima karcinoma dojke pronađeno je tri polimorfizma gena *BIRC5*: c.9194G>A, c.9386T>C i c.9387_9388insAA.

```
ctgggaagctctggtttcagtgatgtgtctattctttattccagGCAAAGGAAACCAACAATAA
GAAGAAAGAATTTGAGGAAACTGCGGAGAAAGTGCGCCGTGCCAT
CGAGCAGCTGGCTGCCATGGATTGAggcctctggccggagctgctggtcccagagtg
gctgcaccacttcagggtttattccttggtgccaccagccttctgtggggccccttagcaatgtcttaggaaag
gagatcaacattttcaattagatgtttcaactgtgtctctgtttgtcttgaaagtggcaccag
```

Slika 17. Slijed nukleotida u PCR fragmentu eksona 4 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto) za analizu polimorfizama gena *BIRC5*: rs2071214 (c.9194G>A) (zeleno), rs2239680 (c.9386T>C) (plavo) i rs17882139 (c.9387_9388insAA) (sivo). Velika tiskana plava slova označavaju sekvencu koja se translatira u protein, a mala tiskana plava slova sekvencu koja se prepisuje u mRNA, ali se ne translatira u protein (3' UTR regija).

Ekson 4 ima veći broj polimorfizama i iz tog razloga se nije provodila analiza pomoću krivulja mekšanje nego metodom sekvenciranja (Slika 18).



Slika 18. Polimorfizmi eksona 4 gena *BIRC5* pronađeni u uzorcima karcinoma dojke metodom sekvenciranja: a) rs2071214 (c.9194G>A), b) rs2239680 (c.9386T>C) G>C, c) rs17882139 (c.9387_9388insAA).

Polimorfizam rs2071214 (c.9194G>A) gena *BIRC5* je neuobičajen jer je alel koji se smatra referentnim nije uobičajen u europskoj populaciji. U analiziranim uzorcima polimorfizma rs2071214 (c.9194G>A) genotip divljeg tipa (GG) nije pronađen u nijednom uzorku. Heterozigotna promjena GA je pronađena u 6,8% kontrola i u 11,1% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena AA je pronađena u 93,2% kontrola i u 88,9% karcinoma (Tablica 16). Učestalost alela A u polimorfizmu rs2071214 (c.9194G>A) kod zdravih kontrola iznosi 96,6%, a kod bolesnih pacijenata 94,4%. Učestalost alela G u kontrolama iznosi 3,4%, a kod bolesnika 5,6%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 12).

Tablica 12. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.9194G>A gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (P -vrijednost).

		KONTROLE		KARCINOMI		
		(n=74)		(n=18)		
genotip	n	%	n	%	P	
AA	69	93,2	16	88,9	0,619	
GA	5	6,8	2	11,1		
GG	0	0,0	0	0,0		
alel	n	%	n	%	P	
A	143	96,6	34	94,4	0,624	
G	5	3,4	2	5,6		

U analiziranim uzorcima polimorfizma rs2239680 (c.9386T>C) genotip divljeg tipa (TT) pronađen je u 58,1% kontrola i 44,4% karcinoma. Heterozigotna promjena TC je pronađena u 37,8% kontrola i u 50% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena CC pronađena je u 4,1% kontrola i 5,6% karcinoma (Tablica 19). Učestalost alela T u polimorfizmu rs2239680 (c.9386T>C) kod zdravih kontrola iznosi 77%, a kod bolesnih pacijenata 69,4%. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 23%, a kod bolesnika 30,6%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 13).

Tablica 13. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.9386T>C gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (*P*-vrijednost).

		KONTROLE		KARCINOMI		
		(n=74)		(n=18)		
genotip	n	%	n	%	<i>P</i>	
TT	43	58,1	8	44,4	0,578	
TC	28	37,8	9	50,0		
CC	3	4,1	1	5,6		
alel	n	%	n	%	<i>P</i>	
T	114	77,0	25	69,4	0,388	
C	34	23,0	11	30,6		

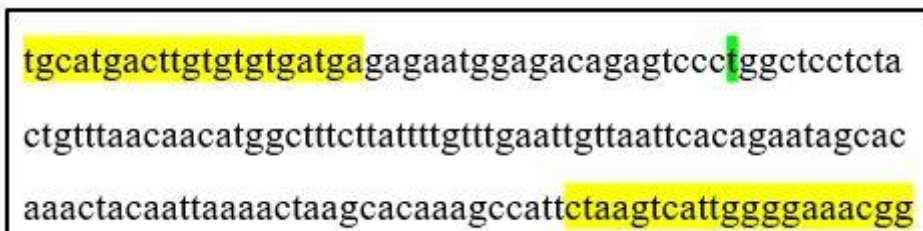
U analiziranim uzorcima polimorfizma rs17882139 (c.9387_9388insAA) genotip divljeg tipa (-/-) pronađen je u 95,9% kontrola i 94,4% karcinoma. Heterozigotna promjena AA/- je pronađena u 4,1% kontrola i u 5,6% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena AA/AA nije pronađena u nijednom uzorku (Tablica 20). Učestalost alela - u polimorfizmu rs17882139 (c.9387_9388insAA) kod zdravih kontrola iznosi 98%, a kod bolesnih pacijenata 97,2%. Učestalost alela AA u kontrolama iznosi 2%, a kod bolesnika 2,8%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 14).

Tablica 14. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.9387_9388insAA gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (*P*-vrijednost).

		KONTROLE		KARCINOMI		
		(n=74)		(n=18)		
genotip	n	%	n	%	<i>P</i>	
-/-	71	95,9	17	94,4	1,000	
AA/-	3	4,1	1	5,6		
AA/AA	0	0,0	0	0,0		
alel	n	%	n	%	<i>P</i>	
-	145	98,0	35	97,2	0,585	
AA	3	2,0	1	2,8		

4.1.6. 3' UTR regija oko c.9809

U fragmentu DNA gena *BIRC5* c.9809 veličine 161 pb, umnoženom reakcijom PCR, analizirana je regija od 120 pb koja se nalazi od c.9789 do c.9909. U regiji je pronađen jedan polimorfizam rs1042489 (c.9809T>C) gena *BIRC5* koji je bio cilj istraživanja ove regije (Slika 19).



tgcatgacttgtgtgatgagagaatggagacagagtccctggctcctcta
 ctgtttaacaacatggctttctattttgttggaattgtaattcacagaatagcac
 aaactacaattaaactaagcacaaagccattctaagtcattggggaaacgg

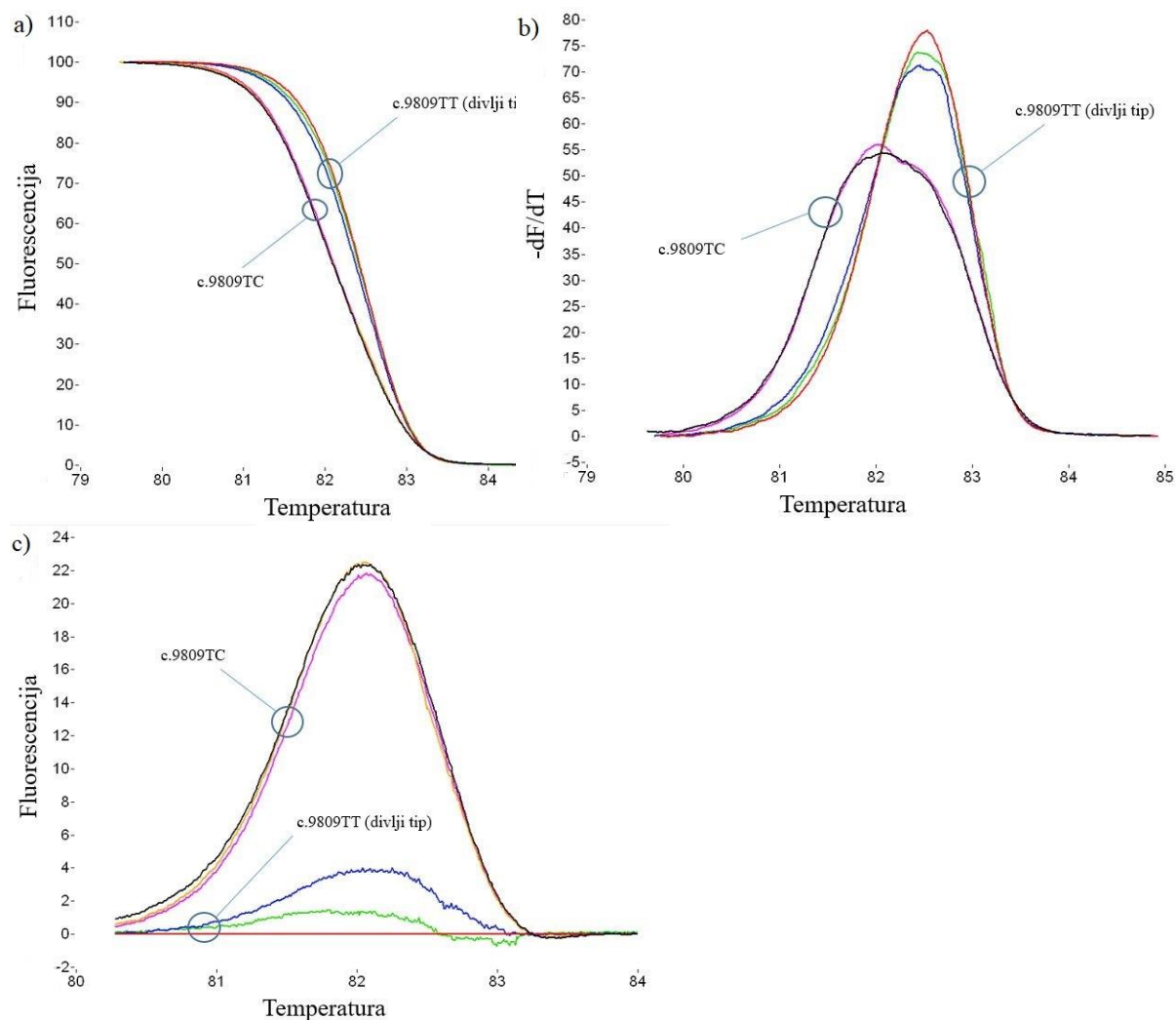
Slika 19. Slijed nukleotida 3' UTR regije oko c.9809 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto) za analizu polimorfizma gena *BIRC5*: rs1042489 (c.9809T>C) (zeleno).

U analiziranim uzorcima polimorfizma rs1042489 (c.9809T>C) (Slika 20) genotip divljeg tipa (TT) je pronađen u 39,2% kontrola i u 55,6% karcinoma. Heterozigotna promjena TC je pronađena u 50% kontrola i u 44,4% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena CC pronađena je u 10,8% kontrola i niti u jednom karcinomu (Tablica 21). Učestalost alela T u polimorfizmu rs1042489 (c.9809T>C) kod zdravih kontrola iznosi 64,2%, a kod bolesnih pacijenata 77,8%. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 35,8%, a kod bolesnika 22,2%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 15).

Tablica 15. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma c.9809T>C gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbi frekvencija (P -vrijednost).

genotip	KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=18)		P
	n	%	n	%	
TT	29	39,2	10	55,6	0,229
TC	37	50,0	8	44,4	
CC	8	10,8	0	0,0	
alel	n	%	n	%	P
T	95	64,2	28	77,8	0,166
C	53	35,8	8	22,2	

Polimorfizam rs1042489 (c.9809T>C) gena *BIRC5* je analiziran pomoću krivulja mekšanja (Slika 20).



Slika 20. Analiza polimorfizma rs1042489 (c.9809T>C) gena *BIRC5*. Tri različita prikaza krivulje mekšanja analizirane HR-1 programom: a) krivulja disocijacije, b) derivacijska krivulja i c) krivulja razlike.

4.1.7. 3' UTR regija oko c.10611

U fragmentu DNA gena *BIRC5* c.10611 veličine 159 pb, umnoženom reakcijom PCR, analizirana je regija od 120 pb koja se nalazi od c.10568 do c.10688. U regiji je pronađen jedan polimorfizam rs2661694 (c.10611C>A) koji je bio cilj istraživanja ove regije (Slika 21).

tgtatcatccgggctcctccgggcagaaacaactgaaaatgcacttcagac
 ccacttatttctgccacatctgagtcggcctgagatagacttttccctctaaact
 gggagaatatcacagtgggttttggtagcagaaaatgcactccagcctctgt

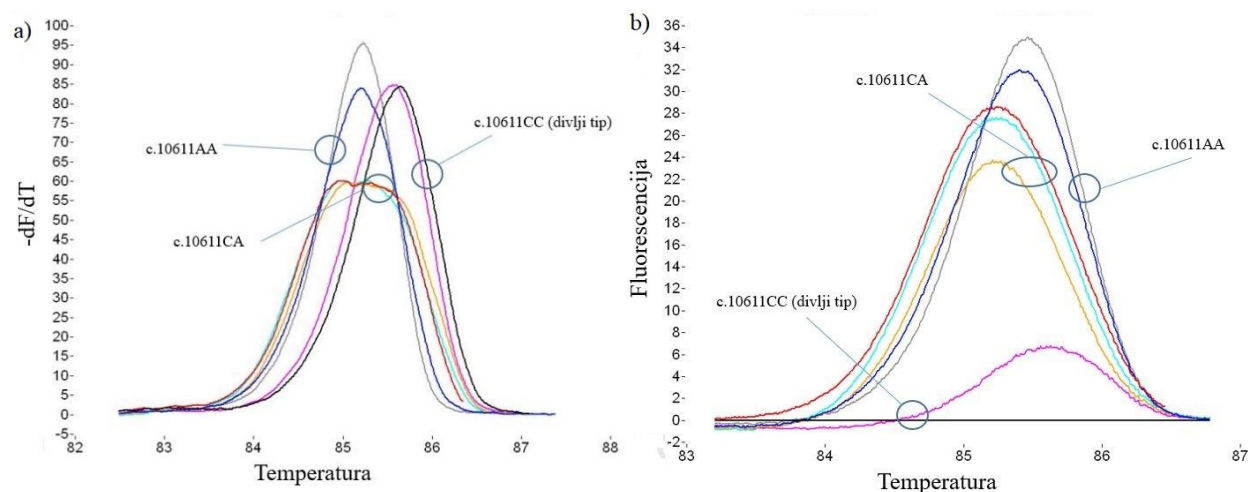
Slika 21. Slijed nukleotida 3' UTR regije oko c.10611 s označenim uzvodnim i nizvodnim početnicama (žuto) za analizu polimorfizma gena *BIRC5*: rs2661694 (c.10611C>A) (zeleno).

U analiziranim uzorcima polimorfizma rs2661694 (c.10611C>A) (Slika 22) genotip divljeg tipa (CC) je pronađen u 54,1% kontrola i u 44,4% karcinoma. Heterozigotna promjena CA je pronađena u 40,5% kontrola i u 50% karcinoma. Homozigotna nukleotidna promjena AA pronađena je u 5,4% kontrola i 5,6% u karcinomu (Tablica 22). Učestalost alela C u polimorfizmu rs2661694 (c.10611C>A) kod zdravih kontrola iznosi 74,3%, a kod bolesnih pacijenata 69,4%. Učestalost alela A u kontrolama iznosi 25,7%, a kod bolesnika 30,6%. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P > 0,05$) (Tablica 16).

Tablica 16. Učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma (c.10611C>A) gena *BIRC5* u kontrolama i uzorcima karcinoma dojke. Prikazan je i rezultat statističke analize usporedbe frekvencija (P -vrijednost).

genotip	KONTROLE (n=74)		KARCINOMI (n=18)		P
	n	%	n	%	
CC	40	54,1	8	44,4	0,755
CA	30	40,5	9	50,0	
AA	4	5,4	1	5,6	
alel	n	%	n	%	P
C	110	74,3	25	69,4	0,536
A	38	25,7	11	30,6	

Polimorfizam rs2661694 (c.10611C>A) gena *BIRC5* je analiziran pomoću krivulja mekšanja (Slika 22).

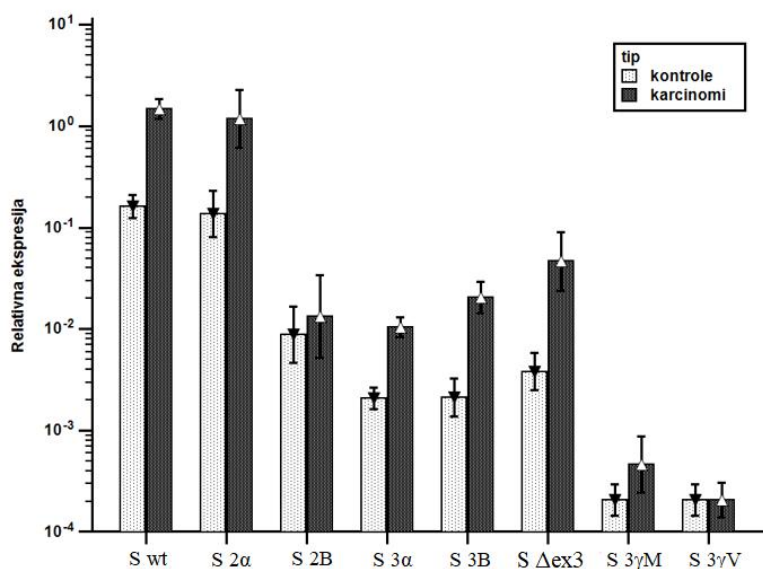


Slika 22. Analiza polimorfizma rs2661694 (c.10611C>A) gena *BIRC5*. Dva različita prikaza krivulje mekšanja analizirane HR-1 programom: a) derivacijska krivulja i b) krivulja razlike.

4.2. Analiza ekspresije gena *BIRC5*

4.2.1. Razina ekspresije izoformi gena *BIRC5* u uzorcima karcinoma dojke i kontrolnim uzorcima zdravog tkiva dojke

Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije osam izoformi gena *BIRC5*: S wt, S 2 α , S 2B, S 3 α , S 3B, S Δ ex3, S 3 γ M i S 3 γ V u 18 uzoraka tkiva karcinoma dojke i pripadajućim kontrolnim uzorcima zdravog tkiva dojke. Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti Δ Ct, odnosno Ct-vrijednosti za svaki gen normalizirane prema Ct-vrijednosti referentnog gena, *TBP*. Razine ekspresije prikazane su kao $2^{-\Delta Ct}$. Analiza je pokazala da su i u karcinomima i u zdravom kontrolnom tkivu najjače eksprimirane izoforme S 2 α i S wt, dok su najslabije eksprimirane izoforme S 3 γ M i S 3 γ V (Slika 23, Tablica 17).



Slika 23. Razine ekspresije izoformi gena *BIRC5* u tkivu karcinoma dojke i pripadajućem kontrolnom zdravom tkivu dojke.

Tablica 17. Srednje vrijednosti razina ekspresije izoformi gena *BIRC5* u tkivu karcinoma dojke i pripadajućem kontrolnom zdravom tkivu dojke. Masnim slovima su označene statistički značajne *P*-vrijednosti (<0,05).

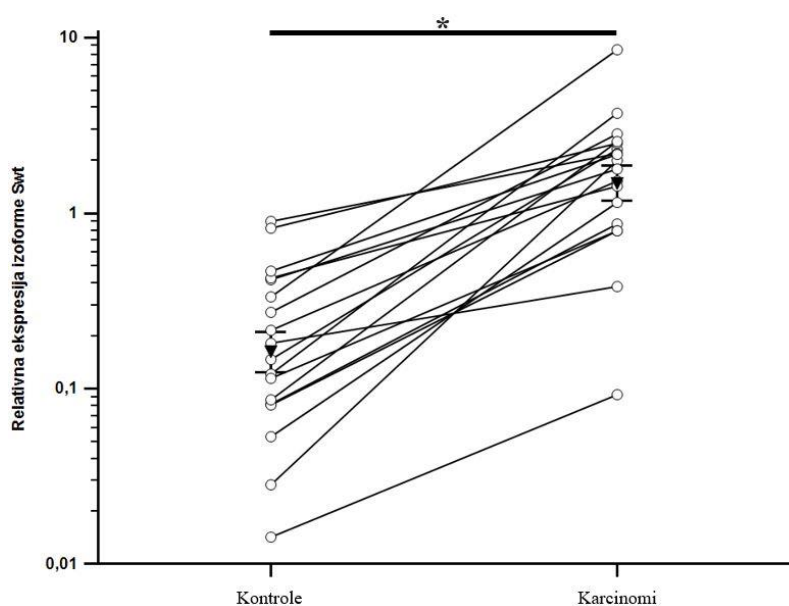
Izoforma	Parni T-test na logaritamski transformiranim vrijednostima				
	KONTROLE		KARCINOMI		<i>P</i>
	srednja vrijednost	SEM*	srednja vrijednost	SEM*	
S wt	0,26551	0,06110	2,09710	0,44027	< 0,0001
S 2α	0,34409	0,08137	3,39741	0,73326	0,0005
S 2B	0,03977	0,01087	0,15725	0,04659	0,542
S 3α	0,00300	0,00054	0,01437	0,00231	< 0,0001
S 3B	0,00633	0,00219	0,03505	0,00746	0,0006
S Δex3	0,01173	0,00405	0,15996	0,03606	0,0001
S 3γM	0,00052	0,00015	0,00321	0,00090	0,187
S 3γV	0,00052	0,00015	0,00056	0,00017	0,983

*SEM - standardna pogreška srednje vrijednosti

S wt izoforma je bila eksprimirana u 100% kontrola i 100% karcinoma koje smo analizirali. S 2α izoforma je bila eksprimirana u 94,4% kontrola i 94,4% karcinoma. Izoforma S 2B je bila

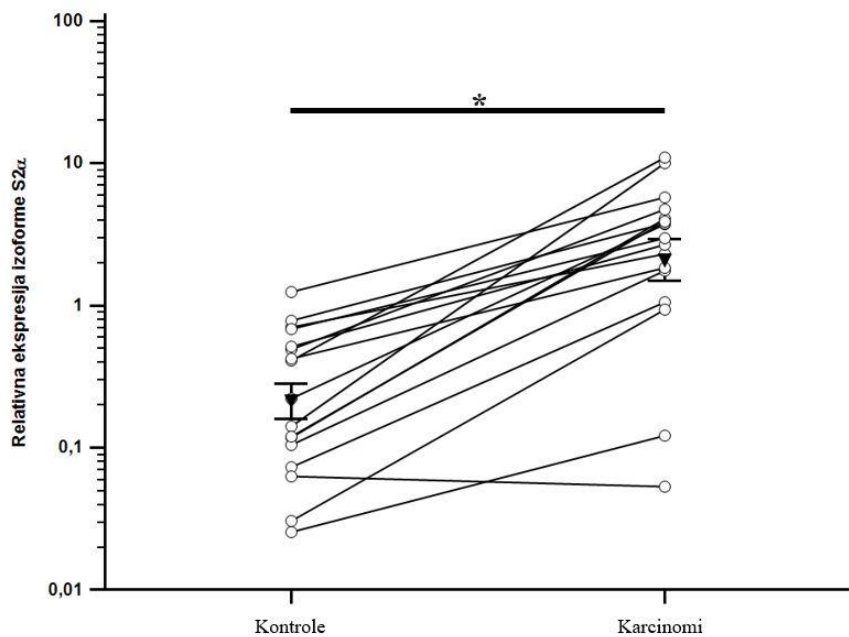
ekspimirana u 72,2% kontrola i 77,8% karcinoma. Izoforma S3 α bila je ekspimirana u 88,9% kontrola i 100% karcinoma. S 3B izoforma je bila ekspimirana u 50% kontrola i 94,4% karcinoma. S Δ ex3 izoforma bila je ekspimirana u 61,1% kontrola i 88,9% karcinoma. Izoforme S 3 γ M i S 3 γ V nisu bile ekspimirane u kontrolnom tkivu, a u tumorskom S 3 γ M 44,4% te S 3 γ V 33,3%.

Usporedba razina ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u tkivu karcinoma i pripadajućem kontrolnom tkivu pokazala je da su sve izoforme osim S 2B, S 3 γ M i S 3 γ V statistički značajno pojačano ekspimirane u tkivu karcinoma (Tablica 17, Slike 24-31).

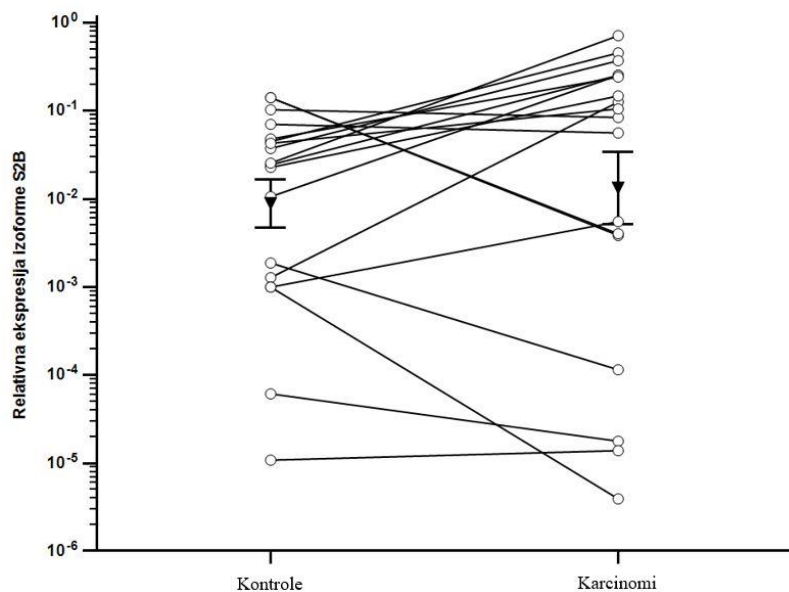


Slika 24. Usporedba relativne ekspresije izoforme S wt gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM.

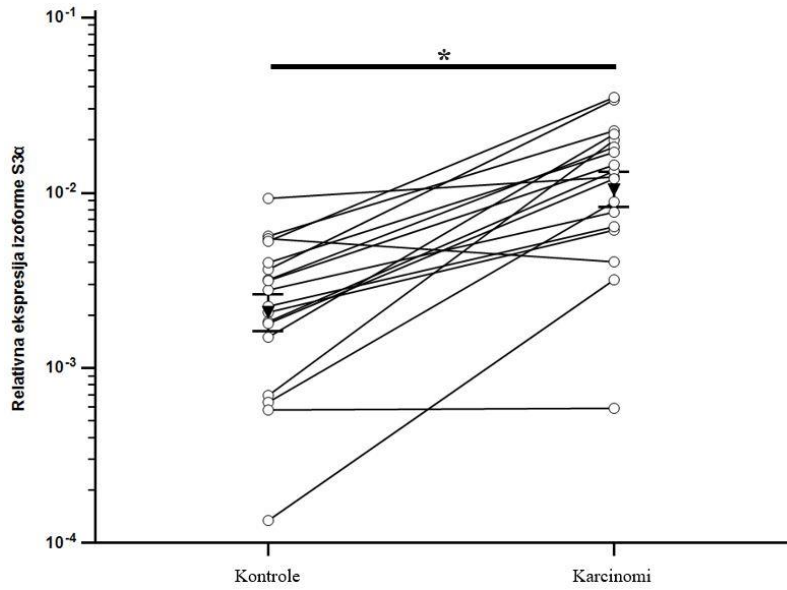
Zvezdica označava $P < 0,05$.



Slika 25. Usporedba relativne ekspresije izoforme S 2α gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Uzorak 36 je izostavljen zbog izrazito niske vrijednosti ekspresije. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM. Zvezdica označava $P < 0,05$.

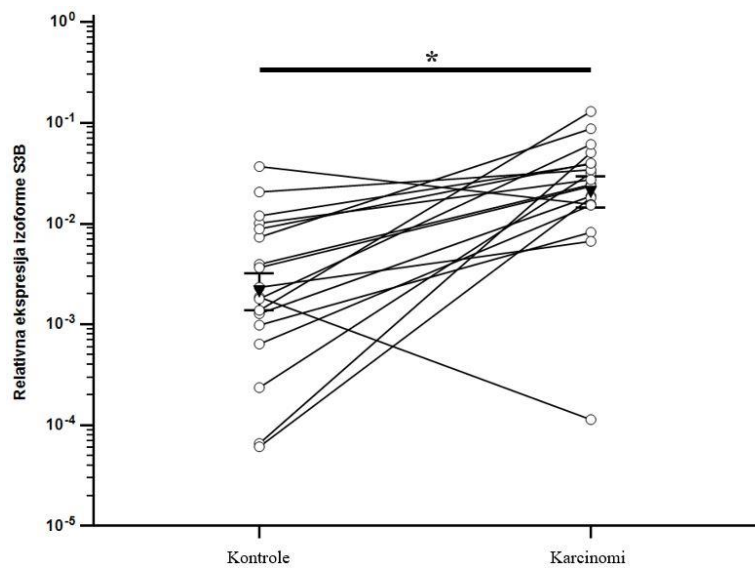


Slika 26. Usporedba relativne ekspresije izoforme S 2B gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM.



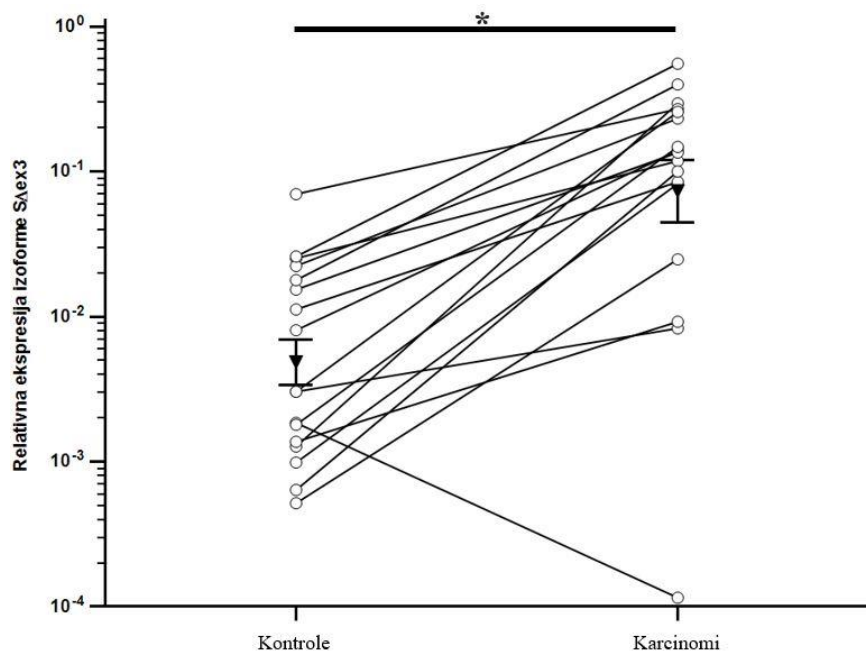
Slika 27. Usporedba relativne ekspresije izoforme S 3 α gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM.

Zvezdica označava $P < 0,05$.

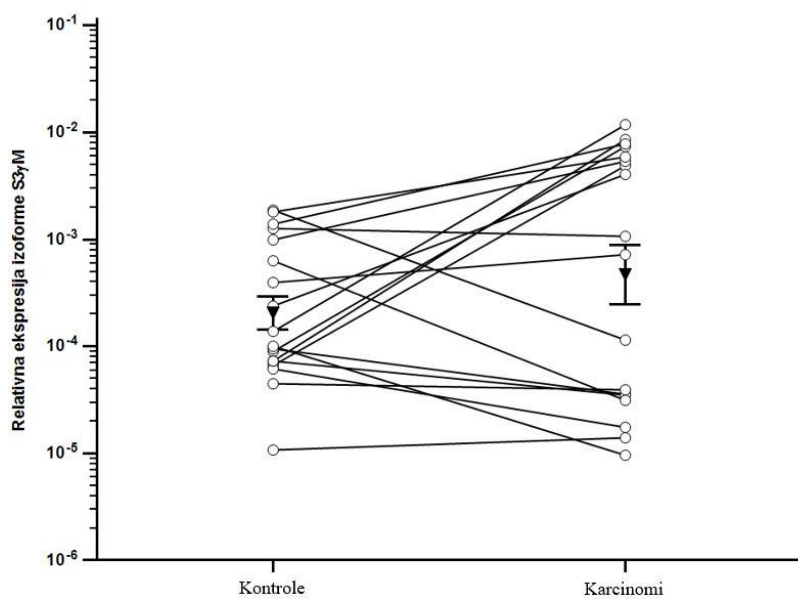


Slika 28. Usporedba relativne ekspresije izoforme S 3B gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM.

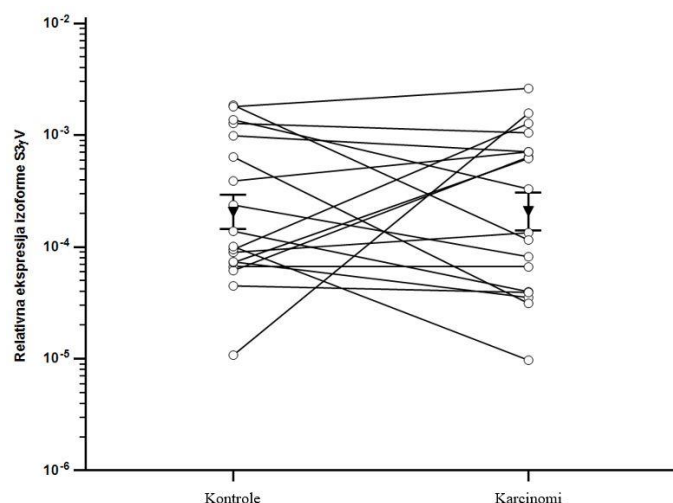
Zvezdica označava $P < 0,05$.



Slika 29. Usporedba relativne ekspresije izoforme S Δ ex3 gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Uzorak 45 je izostavljen zbog izrazito niske vrijednosti ekspresije. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM. Zvijezdica označava $P < 0,05$.



Slika 30. Usporedba relativne ekspresije izoforme S 3 γ M gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM.



Slika 31. Usporedba relativne ekspresije izoforme S 3 γ V gena *BIRC5* u zdravim kontrolama i karcinomima dojke. Na grafu višestrukih varijabli su prikazane srednje vrijednosti \pm SEM.

4.2.2. Korelacija između ekspresija različitih izoformi gena *BIRC5*

Korelacija (povezanost) između ekspresija pojedinih izoformi gena *BIRC5* određena je računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova (ρ), posebno za tumorsko i posebno za zdravo kontrolno tkivo. Analiza je pokazala da je u tkivima karcinoma ekspresija znatno većeg broja izoformi gena *BIRC5* međusobno pozitivno korelirana (Tablice 18 i 19).

Tablica 18. Korelacija između ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u uzorcima tkiva karcinoma dojke. Masnim brojevima označeni su statistički značajni koeficijenti korelacije s pripadajućim *P*-vrijednostima.

S 2 α	S 2B	S 3 α	S 3B	S Δ ex3	S 3 γ M	S 3 γ V	ρ	
0,55 0,019	0,62 0,006	0,55 0,018	0,54 0,021	0,72 0,001	0,24 0,345	0,02 0,926	ρ <i>P</i>	S wt
	0,04 0,874	0,81 <0,0001	0,06 0,817	0,73 0,001	0,01 0,977	0,36 0,140	ρ <i>P</i>	S 2 α
		0,40 0,103	0,74 0,001	0,39 0,113	0,62 0,006	0,11 0,675	ρ <i>P</i>	S 2B
			0,31 0,210	0,78 0,0002	0,20 0,423	0,50 0,036	ρ <i>P</i>	S 3 α
				0,43 0,075	0,29 0,236	0,11 0,663	ρ <i>P</i>	S 3B
					0,14 0,593	0,30 0,229	ρ <i>P</i>	S Δ ex3
						0,16 0,537	ρ <i>P</i>	S 3 γ M

ρ - Spearmanov koeficijent korelacije rangova

Tablica 19. Korelacija između ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u kontrolnim uzorcima zdravog tkiva dojke. Masnim brojevima označeni su statistički značajni koeficijenti korelacije s pripadajućim *P*-vrijednostima.

S 2α	S 2B	S 3α	S 3B	S Δex3	S 3γM	S 3γV	ρ	
0,89 <0,0001	0,52 0,027	0,12 0,627	0,20 0,418	0,55 0,019	0,28 0,257	0,28 0,257	ρ <i>P</i>	S wt
	0,33 0,185	0,15 0,553	0,15 0,565	0,42 0,081	0,28 0,257	0,28 0,257	ρ <i>P</i>	S 2α
		-0,11 0,663	0,16 0,531	0,36 0,139	0,19 0,458	0,19 0,458	ρ <i>P</i>	S 2B
			0,25 0,311	0,19 0,443	0,46 0,055	0,46 0,055	ρ <i>P</i>	S 3α
				0,74 0,001	-0,20 0,423	-0,20 0,423	ρ <i>P</i>	S 3B
					-0,15 0,542	-0,15 0,542	ρ <i>P</i>	S Δex3
						1,00 <0,0001	ρ <i>P</i>	S 3γM

ρ - Spearmanov koeficijent korelacije rangova

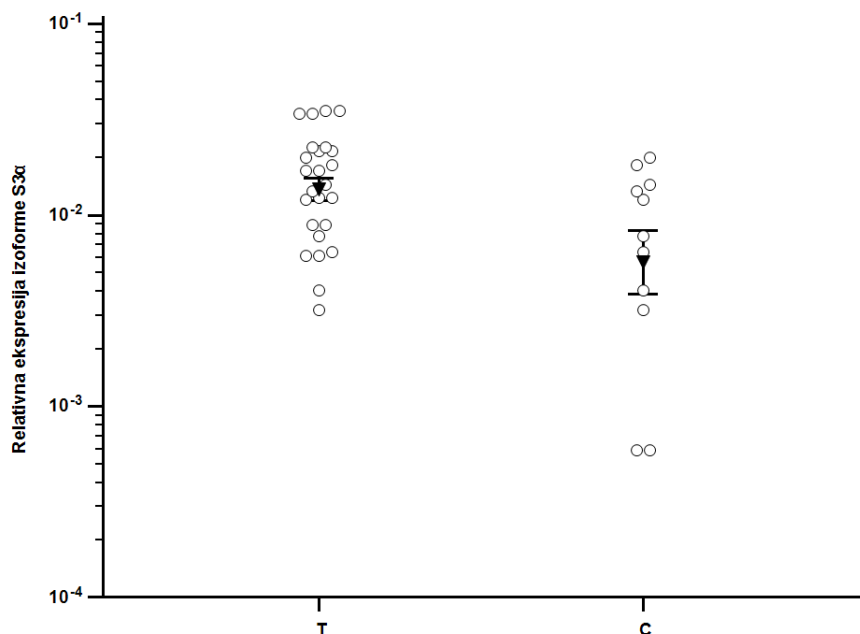
4.2.3. Povezanost polimorfizama gena *BIRC5* s ekspresijom izoformi gena *BIRC5* u uzorcima karcinoma dojke i kontrolnim uzorcima zdravog tkiva dojke

Ispitana je povezanost razine ekspresije osam izoformi gena *BIRC5* s prisutnošću određenog genotipa ili alela osam polimorfizama gena *BIRC5*. U obzir su uzeti samo oni polimorfizmi čiji su pojedini aleli odnosno genotipovi u našim ispitivanim uzorcima nađeni najmanje dva puta (Tablice 6-8, 11-13, 15, 16). Statistička analiza je pokazala da je ekspresija tri izoforme gena *BIRC5*, S 3 α , S 3 γ M i S 3 γ V, bila povezana s alelima i/ili genotipovima četiri polimorfizma gena *BIRC5*: c.-644T>C, c.9386T>C, c.9809T>C te c.10611C>A (Tablica 20).

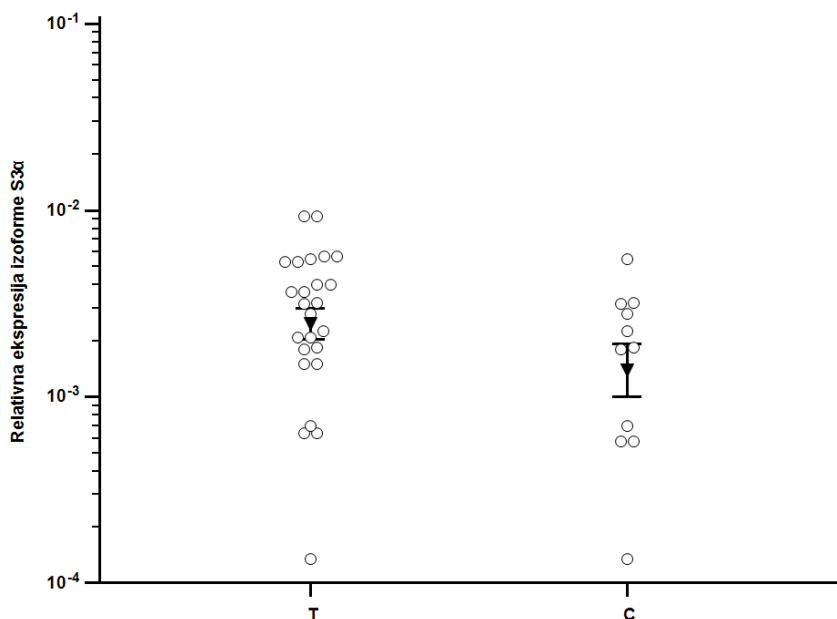
Tablica 20. *P*-vrijednosti statističke analize povezanosti genotipova i alela polimorfizama gena *BIRC5* s ekspresijom izoformi u uzorcima karcinoma dojke i kontrolnim zdravim uzorcima. Masnim brojevima su označene statistički značajne *P*-vrijednosti (< 0,05).

SNP Id.	promjena	izoforma	S wt		S 2 α		S 2B		S 3 α		S 3B		S Δ ex3		S 3 γ M		S 3 γ V	
		tip uzorka	kont.	karc.	kont.	karc.	kont.	karc.	kont.	karc.	kont.	karc.	kont.	karc.	kont.	karc.	kont.	karc.
rs3764383	c.-1547C>T	genotipovi	0,956	0,392	0,604	0,097	0,266	0,301	0,601	0,332	0,248	0,487	0,550	0,452	0,102	0,179	0,102	0,926
		aleli	0,847	0,756	0,952	0,403	0,269	0,233	0,808	0,722	0,473	0,409	0,962	0,216	0,396	0,127	0,396	0,689
rs8073903	c.-644T>C	genotipovi	0,918	0,731	0,700	0,823	0,554	0,778	0,230	0,076	0,794	0,798	0,936	0,123	0,657	0,863	0,657	0,129
		aleli	0,967	0,084	0,924	0,750	0,974	0,913	0,116	0,048	0,860	0,549	0,896	0,128	0,846	0,727	0,846	0,090
rs8073069	c.-625G>C	genotipovi	0,293	0,413	0,753	0,680	0,826	0,493	0,907	0,198	0,349	0,268	0,454	0,309	0,916	0,681	0,916	0,087
		aleli	0,334	0,227	0,770	0,702	0,838	0,526	0,914	0,239	0,388	0,532	0,488	0,349	0,922	0,702	0,922	0,123
rs9904341	c.-31G<C	genotipovi	0,966	0,599	0,823	0,527	0,297	0,321	0,570	0,132	0,232	0,510	0,264	0,659	0,177	0,212	0,177	0,214
		aleli	0,924	0,346	0,915	0,441	0,166	0,181	0,419	0,086	0,377	0,740	0,973	0,786	0,325	0,146	0,325	0,397
rs2071214	c.9194G>A	genotipovi	0,997	0,479	0,900	0,670	0,973	0,502	0,359	0,724	0,672	0,930	0,995	0,525	0,705	0,638	0,705	0,949
		aleli	0,997	0,478	0,899	0,668	0,973	0,500	0,359	0,722	0,670	0,930	0,995	0,523	0,703	0,636	0,703	0,949
rs2239680	c.9386T>C	genotipovi	0,856	0,380	0,668	0,121	0,473	0,412	0,695	0,404	0,114	0,474	0,365	0,471	0,046	0,073	0,046	0,573
		aleli	0,916	0,741	0,984	0,363	0,396	0,277	0,885	0,798	0,292	0,438	0,866	0,361	0,263	0,053	0,263	0,425
rs1042489	c.9809T>C	genotipovi	0,596	0,455	0,847	0,946	0,608	0,612	0,065	0,144	0,860	0,368	0,791	0,405	0,261	0,830	0,261	0,018
		aleli	0,643	0,514	0,865	0,953	0,653	0,657	0,118	0,209	0,877	0,464	0,816	0,468	0,330	0,851	0,330	0,049
rs2661694	c.10611C>A	genotipovi	0,856	0,380	0,668	0,121	0,473	0,412	0,695	0,404	0,114	0,474	0,365	0,471	0,046	0,073	0,046	0,573
		aleli	0,916	0,741	0,984	0,363	0,396	0,277	0,885	0,798	0,292	0,438	0,866	0,361	0,263	0,053	0,263	0,425

Analiza je pokazala da je ekspresija izoforme S 3 α gena *BIRC5* statistički značajno niža u uzorcima karcinoma pacijenata koji su nositelji rjeđeg alela C polimorfizma c.-644T>C ($P=0,048$) gena *BIRC5* (Slika 32), dok u kontrolnom tkivu nema razlike u ekspresiji ($P=0,116$) (Slika 33).

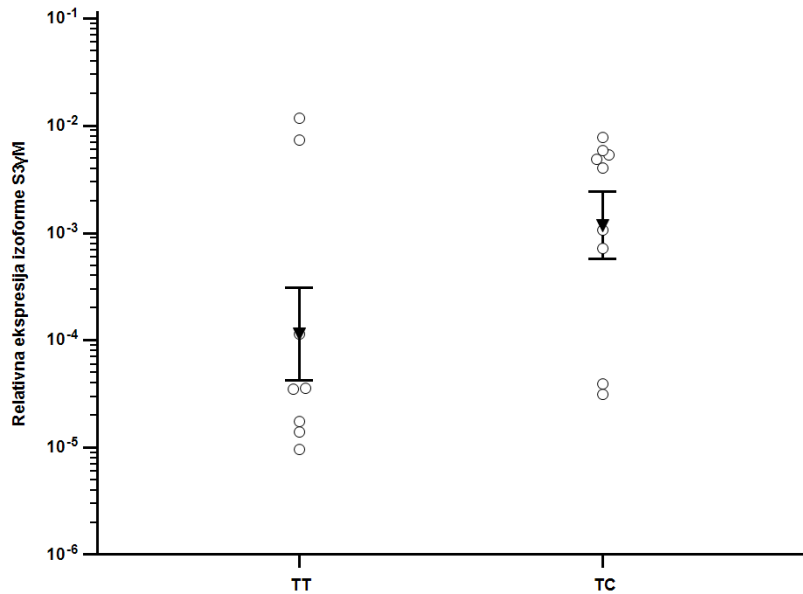


Slika 32. Povezanost alela polimorfizma gena *BIRC5*: c.-644T>C i razine ekspresije izoforme S 3 α u uzorcima karcinoma dojke. T: češći alel, C: rjeđi alel.

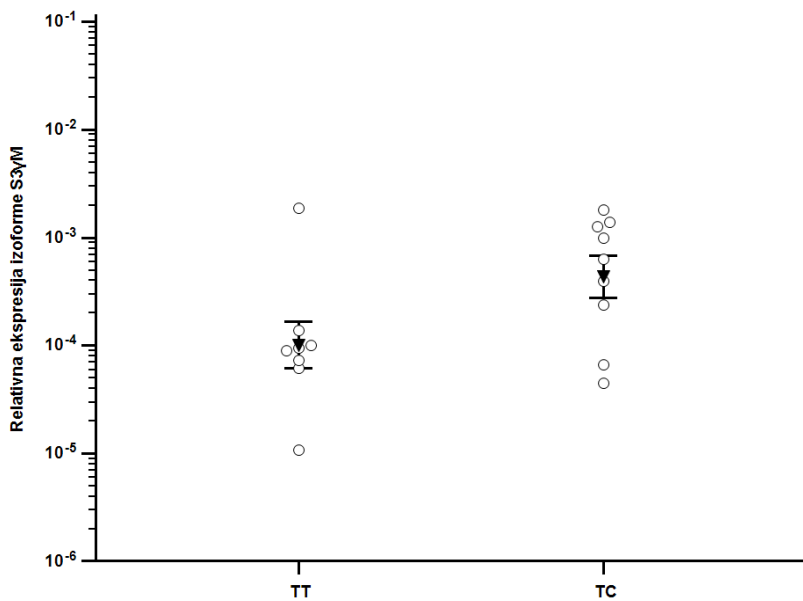


Slika 33. Povezanost alela polimorfizma gena *BIRC5*: c.-644T>C i razine ekspresije izoforme S 3 α u zdravom kontrolnom tkivu dojke. T: češći alel, C: rjeđi alel.

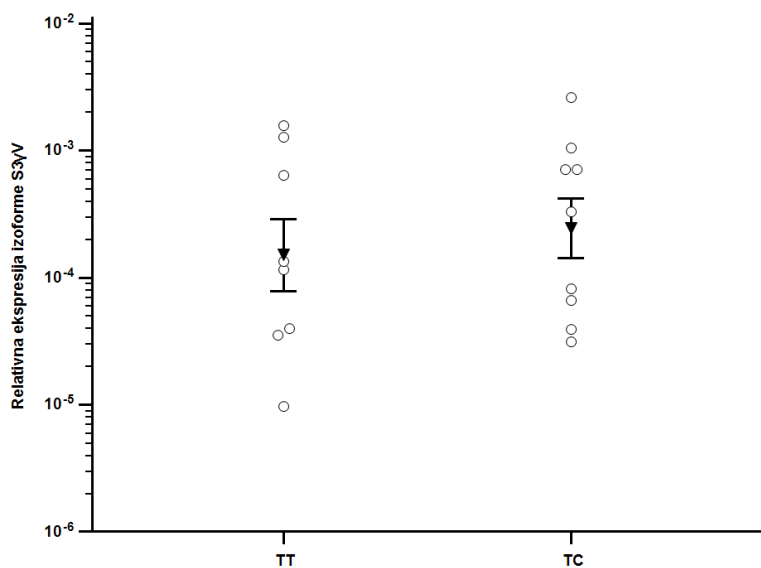
Genotipovi polimorfizma c.9386T>C gena *BIRC5* pokazali su povezanost s razinom ekspresije dvije izoforme: S 3 γ M i S 3 γ V. Ekspresija obje izoforme statistički je značajno povišena u uzorcima zdravog kontrolnog tkiva koje je prikupljeno od pacijentica nositeljica heterozigotnog genotipa TC ($P=0,046$ za obje izoforme) (Slika 35 i 37) dok u tumorskom tkivu nema statistički značajne razlike u razini ekspresije izoforme S 3 γ M ($P=0,073$) i S 3 γ V ($P=0,573$) (Slika 34 i 36).



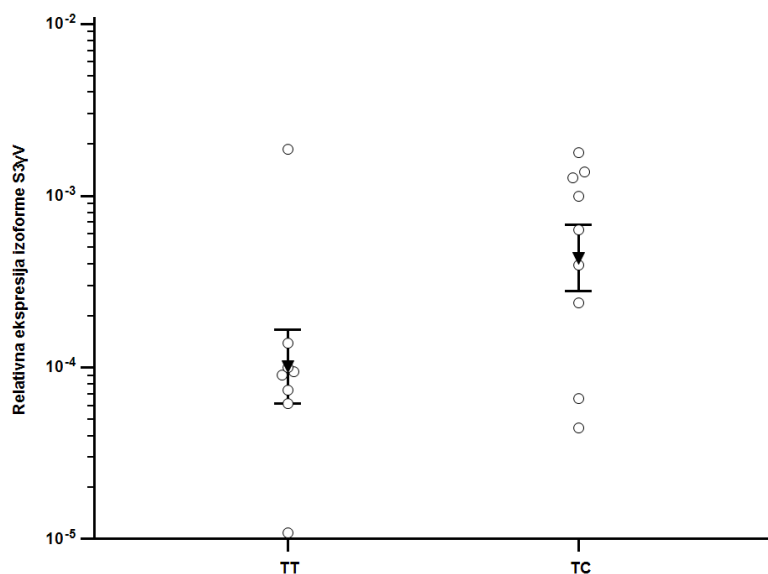
Slika 34. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.9386T>C i razine ekspresije izoforme S₃γM u uzorcima karcinoma dojke. TT: češći homozigotni genotip, TC: heterozigotni genotip.



Slika 35. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.9386T>C i razine ekspresije izoforme S₃γM u zdravom kontrolnom tkivu dojke. TT: češći homozigotni genotip, TC: heterozigotni genotip.



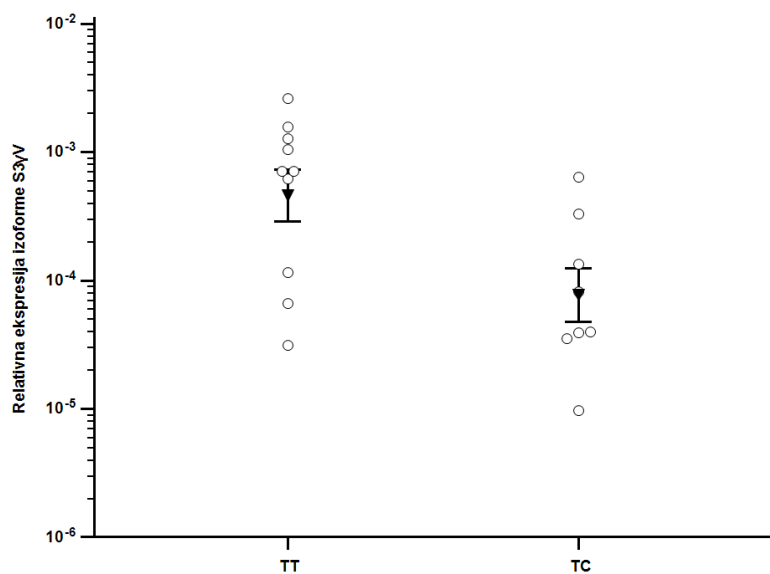
Slika 36. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.9386T>C i razine ekspresije izoforme S 3 γ V u uzorcima karcinoma dojke. TT: češći homozigotni genotip, TC: heterozigotni genotip.



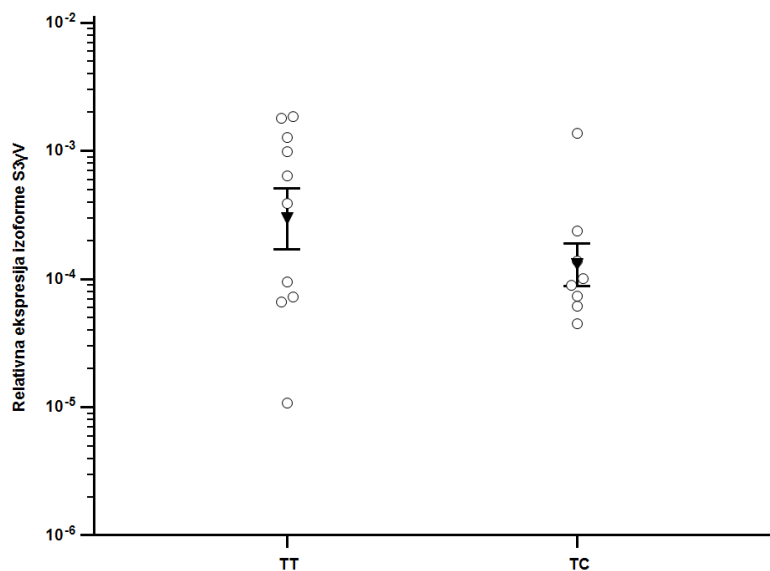
Slika 37. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.9386T>C i razine ekspresije izoforme S 3 γ V u zdravom kontrolnom tkivu dojke. TT: češći homozigotni genotip, TC: heterozigotni genotip.

Nadalje, i genotipovi i aleli polimorfizma c.9809T>C gena *BIRC5* su pokazali povezanost s razinom ekspresije izoforme S 3 γ V, ali samo u tumorskom tkivu. U tkivnim uzorcima karcinoma dojke pacijentica s češćim homozigotnim genotipom TT razina ekspresije te

izoforne je statistički značajno pojačana ($P=0,018$) (Slika 38), što nije bio slučaj u zdravom kontrolnom tkivu ($P=0,261$) (Slika 39).



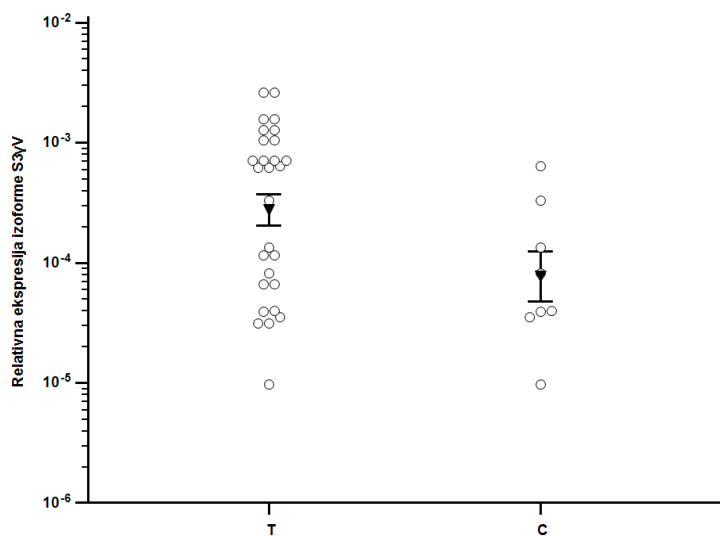
Slika 38. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.9809T>C i razine ekspresije izoforne S 3 γ V u uzorcima karcinoma dojke. TT: češći homozigotni genotip, TC: heterozigotni genotip.



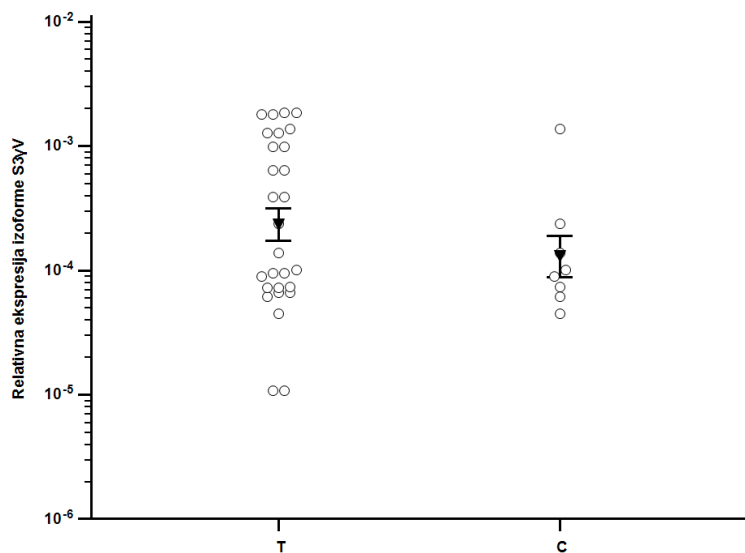
Slika 39. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.9809T>C i razine ekspresije izoforne S 3 γ V u zdravom kontrolnom tkivu dojke. TT: češći homozigotni genotip, TC: heterozigotni genotip.

Isto se pokazalo i za alele tog polimorfizma gena *BIRC5*. Naime, razina ekspresije izoforne S 3 γ V bila je statistički značajno povišena u uzrocima karcinoma kod pacijentica s češćim alelom

T ($P=0,049$) (Slika 40), što također nije bilo primijećeno u kontrolnom tkivu ($P=0,330$) (Slika 41).



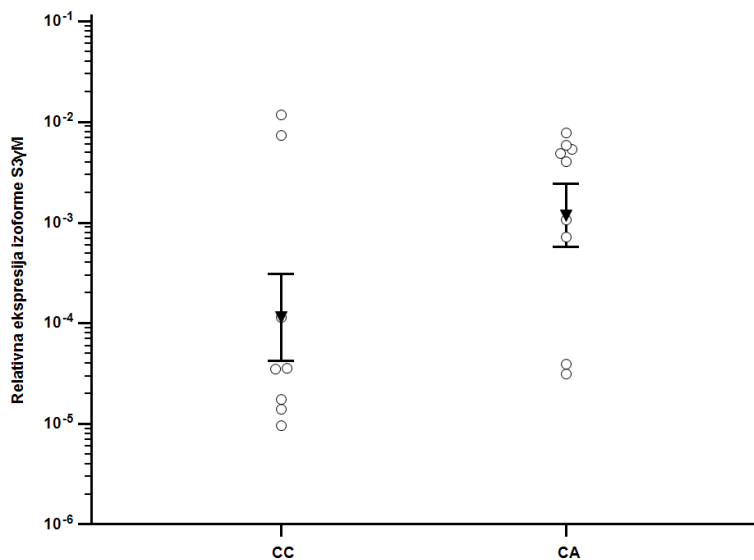
Slika 40. Povezanost alela polimorfizma gena *BIRC5*: c.9809T>C i razine ekspresije izoforme S 3γV u uzorcima karcinoma dojke. T: češći alel, C: rjeđi alel.



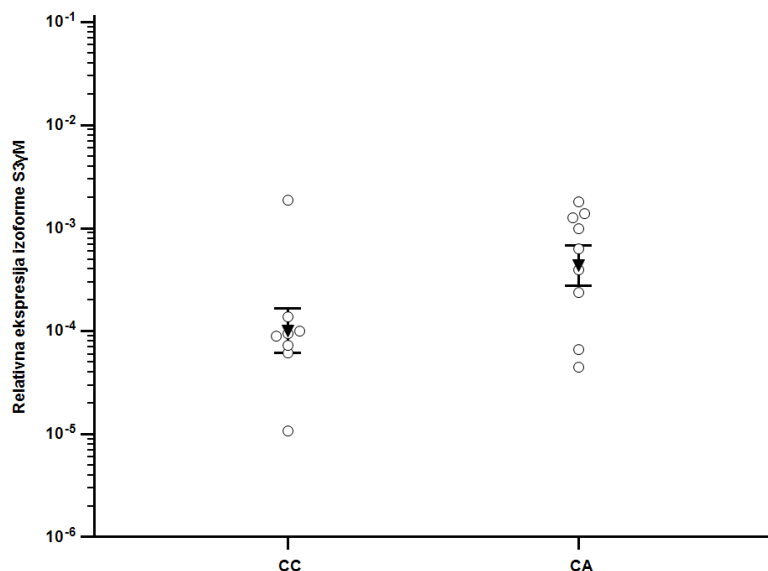
Slika 41. Povezanost alela polimorfizma gena *BIRC5*: c.9809T>C i razine ekspresije izoforme S 3γV u zdravom kontrolnom tkivu dojke. T: češći alel, C: rjeđi alel.

Kao i kod polimorfizma c.9386T>C, i genotipovi polimorfizma c.10611C>A gena *BIRC5* su pokazali povezanost s razinom ekspresije izoformi S 3γM i S 3γV. Ekspresija obje izoforme statistički je značajno bila povišena u uzorcima zdravog kontrolnog tkiva koje je prikupljeno

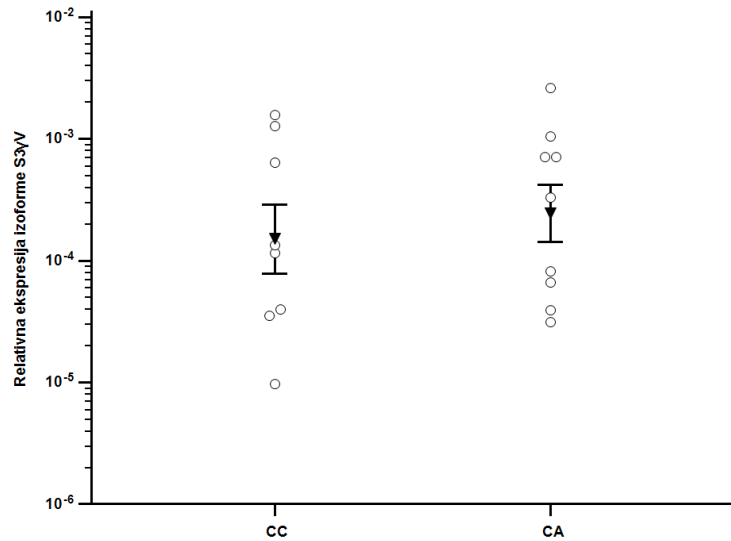
od pacijentica nositeljica heterozigotnog genotipa CA ($P=0,046$ za obje izoforme) (Slika 43 i 45), dok u tumorskom tkivu nema statistički značajne razlike u razini ekspresije izoforme S 3 γ M ($P=0,073$) i S3 γ V ($P=0,573$) (Slika 42 i 44).



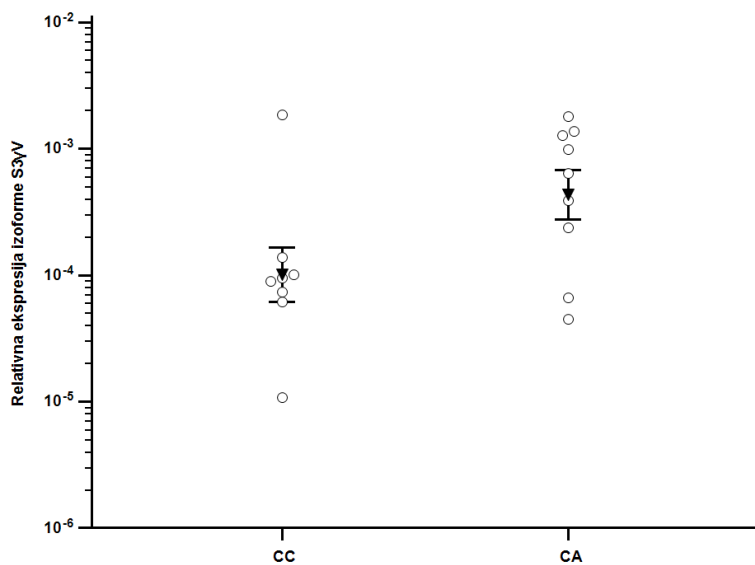
Slika 42. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.10611C>A i razine ekspresije izoforme S 3 γ M u uzorcima karcinoma dojke. CC: češći homozigotni genotip, CA: heterozigotni genotip.



Slika 43. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.10611C>A i razine ekspresije izoforme S 3 γ M u zdravom kontrolnom tkivu dojke. CC: češći homozigotni genotip, CA: heterozigotni genotip.



Slika 44. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.10611C>A i razine ekspresije izoforme S 3γV u uzorcima karcinoma dojke. CC: češći homozigotni genotip, CA: heterozigotni genotip.



Slika 45. Povezanost genotipova polimorfizma gena *BIRC5*: c.10611C>A i razine ekspresije izoforme S 3γV u zdravom kontrolnom tkivu dojke. CC: češći homozigotni genotip, CA: heterozigotni genotip.

5. RASPRAVA

U ovome radu istraživani su polimorfizmi gena *BIRC5* te ekspresija izoformi survivina u karcinomu dojke. Cilj istraživanja je s jedne strane bilo ustanoviti postoji li povezanost polimorfizama gena *BIRC5* s rizikom od obolijevanja od karcinoma dojke i istražiti potencijalnu ulogu gena *BIRC5* kao dijagnostičkog i prognostičkog biomarkera. Također, kako se kod gena *BIRC5* pojavljuje veliki broj izoformi, s različitim ulogama u stanici, drugi cilj istraživanja je bio utvrditi ekspresiju osam različitih izoformi gena *BIRC5* na razini ekspresije mRNA te istražiti povezanost polimorfizama gena *BIRC5* s ekspresijom pojedinih izoformi.

Otkada je otkriven prije više od 20 godina, gen *BIRC5*, kao i njegov proteinski produkt survivin, pokazao se jako zanimljiv u istraživanju raka, zbog njegove karakteristike da je pojačano ekspimiran u velikom broju tumora, a gotovo potpuno odsutan u diferenciranim tkivima odraslih organizama.

5.1. Polimorfizmi gena *BIRC5*

Polimorfizmi gena *BIRC5* su najviše proučavani u promotorskoj regiji gena te u eksonu 4 i 3' UTR. U ovom istraživanju se pokazalo da su to mjesta na kojima se nalazi većina polimorfizama, s obzirom da, osim jednog u eksonu 4, polimorfizmi koji se nalaze u kodirajućoj regiji nisu pronađeni.

U prethodnim istraživanjima gena *BIRC5* u Hrvatskoj (Trnski i sur. 2019, Sušac i sur. 2019) nađeno je petnaest različitih polimorfizama gena *BIRC5*. U ovom istraživanju je nađeno jedanaest, dok četiri polimorfizma nisu nađena u uzorcima pacijentica s karcinomom dojke. To su polimorfizmi s uglavnom vrlo niskom frekvencijom, polimorfizmi rs17878731 (c.-267G>A), rs17885521 (c.9288G>C) i rs17882627 (c.9342G>A) su u dosadašnjim istraživanjima nađeni s frekvencijom od svega 0,7-2,0% i samo polimorfizam rs4789551 (c.221+209T>C) je u kontrolnim uzorcima imao frekvenciju od oko 4,7 % u kontrolama te 1,9-6,4% u pacijenticama s karcinomom dojke, odnosno karcinomom jajnika.

U ovome istraživanju nađeno je jedanaest polimorfizama i njihove frekvencije u pacijenticama s karcinomom dojke se nisu značajno razlikovale od frekvencija u zdravim kontrolama.

Četiri polimorfizma (rs17878467 (c.-241C>T), rs17887126 (c.-235G>A), rs2071214 (c.9194G>A) i rs17882139 (c.9387_9388insAA) su imala frekvenciju ispod 12%. Te frekvencije odgovaraju frekvencijama nađenim u Hrvatskoj, kao i u Europi i ostatku svijeta

(Trnski i sur. 2019, Sušac i sur. 2019, Jang i sur. 2008, Yang i sur. 2009, Boidot i sur. 2008). Zanimljivo je da u Sušac i sur. (2019) polimorfizam c.-235G>A nije nađen.

Sedam čestih polimorfizama gena *BIRC5* su do sada dosta često istraživani:

Polimorfizam rs3764383 (c.-1547C>T) je zanimljiv po tome da referentna sekvenca navodi alel C, dok je u većini istraživanih populacija, pa i u Hrvatskoj, alel T zastupljeniji. Shi i sur. (2012), kao ni Sušac i sur. (2019) nisu našli povezanost tog polimorfizma s povećanim rizikom od razvitka raka dojke. S druge strane Han i suradnici (2009) te Sušac i suradnici (2019) su našli povezanost T alela s ranijom dobi oboljevanja.

Han i suradnici (2009) su utvrdili da polimorfizam rs8073903 (c.-644T>C) nije povezan s rizikom nastanka raka jajnika, a iste godine Yang i suradnici (2009) da isto tako nije povezan ni s nastankom raka jednjaka. Nedavnije istraživanje Sušac i suradnika (2019) pokazalo je da frekvencija ovoga polimorfizma nema utjecaja na nastanak karcinoma dojke, ali njegova prisutnost je povezana s ranijom dobi oboljevanja od karcinoma dojke. Aynaci i suradnici (2013) su pokazali da C/C genotip ima manji rizik za nastanak raka pluća.

Za polimorfizam rs8073069 (c.-625G>C), Yang i suradnici (2009) su pokazali da je njegova frekvencija povezana sa sklonošću nastanka tumora. Han i suradnici (2009) te Shi i suradnici (2012) su povezali ovaj polimorfizam s lošijim preživljenjem.

Polimorfizam rs9904341 (c.-31G>C) se pokazao najistraživanijim polimorfizmom gena *BIRC5*, od njegovog otkrića od strane Xu i suradnika 2004. godine do sada. Xu i suradnici (2004) su pokazali da se ovaj polimorfizam nalazi se u regiji vezanja represora CDE/CHR u promotoru gena *BIRC5* te je povezan s razinom ekspresije survivina i sklonosti razvoja tumora. U istraživanjima je utvrđeno da njegova frekvencija nije povezana s nastankom karcinoma, no pokazala se povezanost s dobi oboljevanja od karcinoma (Han i sur. 2009). Do sada je nekoliko meta-analiza pokazalo značajan utjecaj samo kod azijskih populacija (Srivastava i sur. 2012., Weng i sur. 2012.), dok kod europskih populacija pokazuje proturječne rezultate (Boidot i sur. 2008., Antonacopoulou i sur. 2010., De Maria i sur. 2011.).

Polimorfizam rs2239680 (c.9386T>C) je prvi put analiziran od strane Jang i suradnika 2008. godine. Od tada je pokazano da je C alel povezan s rizikom nastanka raka pluća i višim patološkom stadijem (Zu i sur. 2013). Utvrđeno je i da frekvencija ovoga polimorfizma nije povezana s nastankom karcinoma, no prisustvo alela T je povezano s ranijom dobi oboljevanja od karcinoma (Sušac i sur. 2019).

Jang i suradnici su 2008. također prvi put analizirali i polimorfizam rs1042489 (c.9809T>C) te utvrdili da nije povezan s nastankom raka pluća. Pokazano je da je genotip T/T povezan s rizikom oboljevanja od raka usta (Weng i sur. 2012), a genotip C/C s lošijim preživljenjem kod karcinoma dojke (Shi i sur. 2012) i karcinoma nemalih stanica pluća (Dai i sur. 2010). Sušac i suradnici (2019) su u novijem istraživanju ovoga polimorfizma pokazali da je alel C povezan s ranijom dobi oboljevanja od karcinoma dojke.

Za polimorfizam rs2661694 (c.10611C>A) se pokazalo da nije značajan prognostički marker (Shi i sur. 2012). Analiziranjem ovoga polimorfizma Sušac i suradnici (2019) te Trnski i suradnici (2019) su utvrdili da frekvencija ovoga polimorfizma nije povezana s rizikom oboljevanja od karcinoma dojke ni karcinoma jajnika.

5.2. Ekspresija izoformi gena *BIRC5*

Svih osam promatranih izoformi gena *BIRC5*: S wt, S 2 α , S 2B, S 3 α , S 3B, S Δ ex3, S 3 γ M i S 3 γ V, eksprimirano je u karcinomu dojke. Najjače su eksprimirane izoforme S wt i S 2 α , a najslabije izoforme S 3 γ M i S 3 γ V. Iz ovoga istraživanja vidimo da je većina proučavanih izoformi jače eksprimirana u karcinomima. U istraživanju Trnski i suradnika (2019) pokazan je isti trend ekspresije kod pet izoformi (S wt, S 2 α , S 2B, S 3B, S Δ ex3) koje su proučavali u karcinomu jajnika.

Korelacija između ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u karcinomima je pozitivna, dok u zdravom tkivu izoforme uglavnom nisu pozitivno korelirane. Pavlidou i suradnici (2014) su proveli istraživanje gdje su rezultati ukazali na pozitivnu međusobnu korelaciju tri izoforme gena *BIRC5*: S 2B, S wt i S Δ ex3 u karcinomu dojke. Također, ove međusobne pozitivne korelacije su pokazale i pozitivnu korelaciju s histološkim stupnjem tumora te statusom receptora estrogena. S druge strane, ove izoforme nisu pokazale korelaciju s veličinom tumora, niti statusom receptora progesterona. S druge strane, Khan i suradnici (2014) su utvrdili da su ekspresija i lokalizacija S wt i S Δ ex3 jednake, dok je S 2B pokazao diferencijalnu ekspresiju. Pokazali su da je ekspresija izoforme S 2B povezana s boljim ishodom liječenja u ranom stadiju karcinoma dojke, dok su S wt i S Δ ex3 povezani s agresivnim fenotipom u kasnijim stadijima bolesti, što ukazuje na moguću ulogu S 2B kao antagonista funkcija ove dvije izoforme. U istraživanju koje su proveli Ryan i suradnici (2005) pokazana je pozitivna korelacija izoformi S wt i S Δ ex3 s apoptozom u karcinomu dojke, no to nije bio slučaj za izoformu S 2B. Végran i suradnici (2011) su pokazali da bi ekspresija izoforme S 3B mogla igrati ulogu u staničnom preživljenju kroz antiapoptotski put i tako doprinjeti razvoju karcinoma dojke.

5.3. Povezanost polimorfizama i ekspresije izoformi gena *BIRC5*

Ekspresija četiri izoforme gena *BIRC5*: S 3 α , S 3 γ M i S 3 γ V je bila povezana s alelima i/ili genotipovima četiri polimorfizma gena *BIRC5*: rs8073903 (c.-644T>C), rs2239680 (c.9386T>C), rs1042489 (c.9809T>C) te rs2661694 (c.10611C>A). Rjeđi alel C polimorfizma c.-644T>C povezan je sa statistički značajno nižom ekspresijom izoforme S 3 α u tumorskom tkivu. Heterozigotni genotip TC polimorfizma c.9386T>C pokazao je povezanost s povišenom ekspresijom izoformi S 3 γ M i S 3 γ V u zdravom tkivu. Češći homozigotni genotip TT i češći alel T polimorfizma c.9809T>C povezani su s pojačanom razinom ekspresije izoforme S 3 γ V u tumorskom tkivu. Kao i kod polimorfizma c.9386T>C, heterozigotni genotip CA polimorfizma c.10611C>A povezan je s povišenom ekspresijom izoformi S 3 γ M i S 3 γ V u zdravom tkivu. Povezanost polimorfizama i ekspresije izoformi gena *BIRC5* do sada nije često proučavana. Postoje istraživanja o utjecaju nekoliko polimorfizama na ukupnu ekspresiju survivina, većinom za polimorfizam c.-31G>C (Boidot i sur. 2008, Li i sur. 2013). Također, proučavana je i povezanost polimorfizama c.-31G>C i c.9386T>C s ekspresijom izoformi gena *BIRC5* u kolorektalnom karcinomu te je utvrđena povezanost genotipova c.9386T>C s ekspresijom izoforme S 2 α (Antonacopolou i sur. 2010). Uz to, Trnski i suradnici (2019) pronašli su značajnu povezanost češćih homozigotnih genotipova polimorfizama c.9386T>C (TT) i c.10611C>A (CC) s povišenom ekspresijom izoformi S 2 α i S 3B u karcinomu jajnika.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Učestalost polimorfizama gena *BIRC5* se ne razlikuje značajno između pacijentica s karcinomom dojke i zdravih kontrola.
2. Prisutnost polimorfizama se ne može povezati s pojavom karcinoma dojke.
3. Svih osam istraživanih izoformi gena *BIRC5* su eksprimirane u karcinomima dojke. Ekspresija je najača u izoformama S wt i S 2 α , zatim S Δ ex3, S 3B, S 2B, S 3 α te najmanja u S3 γ M i S3 γ V.
4. Polimorfizmi gena *BIRC5*: rs8073903 (c.-644T>C), rs2239680 (c.9386T>C), rs1042489 (c.9809T>C) te rs2661694 (c.10611C>A) bili su značajno povezani s ekspresijom izoformi S 3 α , S 3 γ M i S 3 γ V.

Hipoteza da bi se genotipizacije polimorfizama gena *BIRC5* mogla koristiti u dijagnostici raka dojke nije se pokazala ispravnom, vrlo vjerojatno zbog relativno malog broja ispitivanih uzoraka. Hipoteza da se određivanjem razine ekspresije nekih izoformi gena *BIRC5* može razlikovati tumorsko od zdravog tkiva potvrđena je za pet od osam izoformi.

7. LITERATURA

Adams J. M., Huang D. C. S., Puthalakath H., Bouillet P., Vairo G., Moriishi K., Hausmann G., O'Reilly L., Newton K., Ogilvy S., Bath M. L. 1999. Control of apoptosis in hematopoietic cells by the Bcl-2 family of proteins. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 64, pp. 351-358). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Adida C., Crotty P. L., McGrath J., Berrebi D., Diebold J., Altieri D. C., 1998. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *The American Journal of Pathology*, **152** (1), 43.

Altieri D. C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, **3** (1), 46.

Altieri D. C. 2006. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Molecular Cancer Therapeutics*, **5** (3), 478-482.

Ambrosini G., Adida C., Altieri D. C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, **3** (8), 917.

Anandharaj A., Cinghu S., Park W. Y. 2011. Rapamycin-mediated mTOR inhibition attenuates survivin and sensitizes glioblastoma cells to radiation therapy. *Acta Biochim Biophys Sin*, **43** (4), 292-300.

Antonacopoulou A. G., Floratou K., Bravou V., Kottorou A., Dimitrakopoulos F. I., Marousi S., Stavropoulos M., Koutras A. K., Scopa C. D., Kalofonos H. P. 2010. The survivin-31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. *Analytical Cellular Pathology*, **33** (5-6), 177-189.

Arora V., Cheung H. H., Plenchette S., Micali O. C., Liston P., Korneluk R. G. 2007. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, **282** (36), 26202-26209.

Asanuma H., Torigoe T., Kamiguchi K., Hirohashi Y., Ohmura T., Hirata K., Sato M., Sato N. 2005. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Research*, **65** (23), 11018-11025.

- Aynaci E., Coskunpinar E., Eren A., Kum O., Oltulu Y. M., Akkaya N., Turna A., Yaylim I., Yildiz P. 2013. Association between survivin gene promoter-31G/C and-644C/T polymorphisms and non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res*, **12** (3), 3975-3982.
- Badran A., Yoshida A., Ishikawa K., Goi T., Yamaguchi A., Ueda T., Inuzuka M. 2004. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **314** (3), 902-907.
- Barrett R. M., Osborne T. P., Wheatley S. P. 2009. Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle*, **8** (2), 278-283.
- Boidot R., Vegran F., Jacob D., Chevrier S., Gangneux N., Taboureau J., Oudin C., Rainville V., Mercier L., Lizard-Nacol S. 2008. The expression of *BIRC5* is correlated with loss of specific chromosomal regions in breast carcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **47** (4), 299-308.
- Boidot R., Végran F., Lizard-Nacol S. 2009. Predictive value of survivin alternative transcript expression in locally advanced breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Molecular Medicine*, **23** (2), 285-291.
- Bolton M. A., Lan W., Powers S. E., McClelland M. L., Kuang J., Stukenberg P. T. 2002. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, **13** (9), 3064-3077.
- Brentnall M., Rodriguez-Menocal L., De Guevara R. L., Cepero E., Boise L. H. 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, **14** (1), 32.
- Caldas H., Honsey L. E., Altura R. A. 2005. Survivin 2 α : a novel survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular Cancer*, **4** (1), 11.
- Ceballos-Cancino G., Espinosa M., Maldonado V., Melendez-Zajgla J. 2007. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene*, **26** (54), 7569-7575.
- Chaopotong P., Kajita S., Hashimura M., Saegusa M. 2012. Nuclear survivin is associated with cell proliferative advantage in uterine cervical carcinomas during radiation therapy. *Journal of Clinical Pathology*, **65** (5), 424-430.
- Chen X., Duan N., Zhang C., Zhang W. 2016. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cancer*, **7** (3), 314.

- Cheng Z. J., Hu L. H., Huang S. J. 2008. Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma. *Ai zheng= Aizheng= Chinese Journal of Cancer*, **27** (3), 258-263.
- Colnaghi R., Connell C. M., Barrett R. M., Wheatley S. P. 2006. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *Journal of Biological Chemistry*, **281** (44), 33450-33456.
- Colnaghi R., Wheatley S. P. 2010. Liaisons between survivin and Plk1 during cell division and cell death. *Journal of Biological Chemistry*, **285** (29), 22592-22604.
- Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339** (6121), 819-823.
- Conway E. M., Pollefeyt S., Steiner-Mosonyi M., Luo W., Devriese A., Lupu F., Bono F., Leducq N., Dol F., Schaeffer P., Collen D. 2002. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology*, **123** (2), 619-631.
- Cvok M. L., Cretnik M., Musani V., Ozretić P., Levanat S. 2008. New sequence variants in *BRCA1* and *BRCA2* genes detected by high-resolution melting analysis in an elderly healthy female population in Croatia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **46** (10), 1376-1383.
- Dai J., Jin G., Dong J., Chen Y., Xu L., Hu Z., Shen H. 2010. Prognostic significance of survivin polymorphisms on non-small cell lung cancer survival. *Journal of Thoracic Oncology*, **5** (11), 1748-1754.
- De Maria S., Lo Muzio L., Braca A., Rega P., Cassano A., Vinella A., Fumarulo R., Serpico R., Farina E., Metafora V., Pannone G., Ravagnan G. P., Metafora S., Rubini C., Carteni M., Mariggio M. A. 2011. Survivin promoter -31G/C polymorphism in oral cancer cell lines. *Oncology Letters*, **2**, 935-939.
- Deveraux Q. L., Reed J. C. 1999. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, **13** (3), 239-252.
- Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S., Reed J. C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, **388** (6639), 300.

- Dohi T., Okada K., Xia F., Wilford C. E., Samuel T., Welsh K., Marusawa H., Zou H., Armstrong R., Matsuzawa S. I., Salvesen G. S. 2004. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **279** (33), 34087-34090.
- Dohi T., Beltrami E., Wall N. R., Plescia J., Altieri D. C. 2004. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, **114** (8), 1117-1127.
- Dunajová L., Cash E., Markus R., Rochette S., Townley A. R., Wheatley S. P. 2016. The N-terminus of survivin is a mitochondrial-targeting sequence and Src regulator. *J Cell Sci*, **129** (14), 2707-2712.
- Engelsma D., Rodriguez J. A., Fish A., Giaccone G., Fornerod M. 2007. Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin. *Traffic*, **8** (11), 1495-1502.
- Espinosa M., Ceballos-Cancino G., Callaghan R., Maldonado V., Patiño N., Ruíz V., Meléndez-Zajgla J. 2012. Survivin isoform Delta Ex3 regulates tumor spheroid formation. *Cancer Letters*, **318** (1), 61-67.
- Fengzhi L. I., Altieri D. C. 1999. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochemical Journal*, **344** (2), 305-311.
- Fernández J. G., Rodríguez D. A., Valenzuela M., Calderon C., Urzúa U., Munroe D., Rosas C., Lemus D., Díaz N., Wright M. C., Leyton L. 2014. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Molecular Cancer*, **13** (1), 209.
- Fortugno P., Beltrami E., Plescia J., Fontana J., Pradhan D., Marchisio P. C., Sessa W.C., Altieri D. C. 2003. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100** (24), 13791-13796.
- Fortugno P., Wall N. R., Giodini A., O'Connor D. S., Plescia J., Padgett K. M., Tognin S., Marchisio P. C., Altieri D. C. 2002. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *Journal of Cell Science*, **115** (3), 575-585.
- Fulda S., Debatin K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, **25** (34), 4798.

- Gassmann R., Carvalho A., Henzing A. J., Ruchaud S., Hudson D. F., Honda R., Nigg E. A., Gerloff D. L., Earnshaw W. C. 2004. Borealin a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*, **166** (2), 179-191.
- Gonzalez-Angulo A. M., Morales-Vasquez F., Hortobagyi G. N. 2007. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Breast Cancer Chemosensitivity*, Springer, 1-22.
- Gralow J. R. 2006. Breast cancer 2004: Progress and promise on the clinical front. *Physica Medica*, **21**, 2.
- Gyurkocza B., Plescia J., Raskett C. M., Garlick D. S., Lowry P. A., Carter B. Z., Andreeff M., Meli M., Colombo G., Altieri D. C. 2006. Antileukemic activity of shepherdin and molecular diversity of hsp90 inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute*, **98** (15), 1068-1077.
- Hagenbuchner J., Kuznetsov A. V., Obexer P., Ausserlechner M. J. 2013. BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. *Oncogene*, **32** (40), 4748.
- Han C. H., Wei Q., Lu K. K., Liu Z., Mills G. B., Wang L. E. 2009. Polymorphisms in the survivin promoter are associated with age of onset of ovarian cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **2** (4), 289.
- Hawkins C. J., Silke J., Verhagen A. M., Foster R., Ekert P. G., Ashley D. M. 2001. Analysis of candidate antagonists of IAP-mediated caspase inhibition using yeast reconstituted with the mammalian Apaf-1-activated apoptosis mechanism. *Apoptosis*, **6** (5), 331-338.
- Hengartner M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407** (6805), 770-776.
- Hsieh Y. S., Tsai C. M., Yeh C. B., Yang S. F., Hsieh Y. H., Weng C. J. 2012. Survivin T9809C, an SNP located in 3'-UTR, displays a correlation with the risk and clinicopathological development of hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, **19** (3), 625-633.
- Izawa A., Kobayashi D., Nasu S., Saito K., Moriai R., Asanuma K., Nakamura M., Yagihashi A., Watanabe N. 2002. Relevance of c-erbB2, PLU-1 and survivin mRNA expression to diagnostic assessment of breast cancer. *Anticancer Research*, **22** (5), 2965-2969.
- Iizuka D., Inanami O., Kashiwakura I., Kuwabara M. 2007. Purvalanol A enhances cell killing by inhibiting up-regulation of CDC2 kinase activity in tumor cells irradiated with high doses of X rays. *Radiation Research*, **167** (5), 563-571.

- Jang J. S., Kim K. M., Kang K. H., Choi J. E., Lee W. K., Kim C. H., Kang, Y.M., Kam, S., Kim, I.S., Jun, J.E., Jung, T. H. 2008. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer*, **60** (1), 31-39.
- Jha K., Shukla M., Pandey M. 2012. Survivin expression and targeting in breast cancer. *Surgical Oncology*, **21** (2), 125-131.
- Jiang Y., Saavedra H. I., Holloway M. P., Leone G., Altura R. A. 2004. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **279** (39), 40511-40520.
- Kabagwira J., Wall N. R. 2017. An Argument to Examine Exosomal Survivin Splice Variant Expression and Patient Survival in Pancreatic Cancer. *Clinical Oncology*, **2**, 1310.
- Kang B. H., Xia F., Pop R., Dohi T., Socolovsky M., Altieri D. C. 2011. Developmental control of apoptosis by the immunophilin aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) involves mitochondrial import of the survivin protein. *Journal of Biological Chemistry*, **286** (19), 16758-16767.
- Kawata N., Tsuchiya N., Horikawa Y., Inoue T., Tsuruta H., Maita S., Satoh S., Mitobe Y., Narita S., Habuchi T. 2011. Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. *International Journal of Cancer*, **129** (8), 1872-1880.
- Kelly A. E., Ghenoiu C., Xue J. Z., Zierhut C., Kimura H., Funabiki H. 2010. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science*, **330** (6001), 235-239.
- Kelly A. E., Sampath S. C., Maniar T. A., Woo E. M., Chait B. T., Funabiki H. 2007. Chromosomal enrichment and activation of the aurora B pathway are coupled to spatially regulate spindle assembly. *Developmental Cell*, **12** (1), 31-43.
- Khan S., Aspe J. R., Asumen M. G., Almaguel F., Odumosu O., Acevedo-Martinez S., De Leon M., Langridge W. H. R., Wall N. R. 2009. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *British Journal of Cancer*, **100** (7), 1073-1086.
- Khan S., Bennit H. F., Turay D., Perez M., Mirshahidi S., Yuan Y., Wall N. R. 2014. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer*, **14** (1), 176.

- Khan S., Jutzy J. M., Aspe J. R., McGregory D. W., Neidigh J. W., Wall N. R. 2011. Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis*, **16** (1), 1-12.
- Knauer S. K., Bier C., Habtemichael N., Stauber R. H. 2006. The Survivin–Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Reports*, **7** (12), 1259-1265.
- Knauer S. K., Krämer O. H., Knösel T., Engels K., Rodel F., Kovács A. F., Dietmaier W., Klein-Hitpass L., Habtemichael N., Schweitzer A., Brieger J. 2007. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *The FASEB Journal*, **21** (1), 207-216.
- Kumar B., Yadav A., Lang J., Teknos T. N., Kumar P. 2012. Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis. *PloS One*, **7** (5).
- Li F. 2003. Survivin study: what is the next wave?. *Journal of Cellular Physiology*, **197** (1), 8-29.
- Li F., Ambrosini G., Chu E. Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P. C., Altieri D. C. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396** (6711), 580.
- Li X. B., Li S. N., Yang Z. H., Cao L., Duan F. L., Sun X. W. 2013. Polymorphisms of survivin and its protein expression are associated with colorectal cancer susceptibility in Chinese population. *DNA and Cell Biology*, **32** (5), 236-242.
- Li Y., Ma X., Wu X., Liu X., Liu L. 2014. Prognostic Significance of Survivin in Breast Cancer: Meta-analysis. *The Breast Journal*, **20** (5), 514-524.
- Liggins C., Orlicky D. J., Bloomquist L. A., Gianani R. 2003. Developmentally regulated expression of survivin in human pancreatic islets. *Pediatric and Developmental Pathology*, **6** (5), 392-397.
- Liu T., Brouha B., Grossman D. 2004. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene*, **23** (1), 39.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94** (4), 481-490.

- Ma Q., Wang X., Li Z., Li B., Ma F., Peng L., , Jiang B. 2013. microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway. *Oncology Reports*, **29** (4), 1652-1658.
- Mahotka C., Liebmann J., Wenzel M., Suschek C. V., Schmitt M., Gabbert H. E., Gerharz C. D. 2002. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death and Differentiation*, **9** (12), 1334.
- Malcles M. H., Wang H. W., Koumi A., Tsai Y. H., Yu M., Godfrey A., Boshoff C. 2007. Characterisation of the anti-apoptotic function of survivin- Δ Ex3 during TNF α - mediated cell death. *British Journal of Cancer*, **96** (11), 1659-1666.
- Marusawa H., Matsuzawa S. I., Welsh K., Zou H., Armstrong R., Tamm I., Reed J. C. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *The EMBO Journal*, **22** (11), 2729-2740.
- McCall M. N., McMurray H. R., Land H., Almudevar A. 2014. On non-detects in qPCR data. *Bioinformatics*, **30** (16), 2310-2316.
- Moniri Javadhesari S., Gharechahi J., Hosseinpour Feizi M. A., Montazeri V., Halimi M. 2013. Transcriptional expression analysis of survivin splice variants reveals differential expression of survivin-3 α in breast cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **17** (4), 314-320.
- Mull A. N., Kla, A., Navara C. S. 2014. Differential localization and high expression of survivin splice variants in human embryonic stem cells but not in differentiated cells implicate a role for survivin in pluripotency. *Stem Cell Research*, **12** (2), 539-549.
- Müller G. A., Engeland K. 2010. The central role of CDE/CHR promoter elements in the regulation of cell cycle-dependent gene transcription. *The FEBS Journal*, **277** (4), 877-893.
- Nasu S., Yagihashi A., Izawa A., Saito K., Asanuma K., Nakamura M., Kobayashi D., Okazaki M., Watanabe N. 2002. Survivin mRNA expression in patients with breast cancer. *Anticancer Research*, **22** (3), 1839-1843.
- Nassar A., Lawson D., Cotsonis G., Cohen C. 2008. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, **16** (2), 113-120.
- Noton E. A., Colnaghi R., Tate S., Starck C., Carvalho A., Ferrigno P. K., Wheatley S. P. 2006. Molecular Analysis of Survivin Isoforms evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*, **281** (2), 1286-1295.

- O'Connor D. S., Grossman D., Plescia J., Li F., Zhang H., Villa A., Tognin S., Marchisio P.C., Altieri, D. C. 2000. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97** (24), 13103-13107.
- O'Connor D. S., Schechner J. S., Adida C., Mesri M., Rothermel A. L., Li F., Nath A. K., Pober J. S., Altieri D. C. 2000. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *The American Journal of Pathology*, **156** (2), 393-398.
- O'Connor D. S., Wall N. R., Porter A. C., Altieri D. C. (2002). A p34cdc2 survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell*, **2** (1), 43-54.
- Papanikolaou V., Iliopoulos D., Dimou I., Dubos S., Kappas C., Kitsiou-Tzeli S., Tsezou A. 2011. Survivin regulation by HER2 through NF- κ B and c-myc in irradiated breast cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **15** (7), 1542-1550.
- Pavlidou A., Kroupis C., Goutas N., Dalamaga M., Dimas K. 2014. Validation of a real-time quantitative polymerase chain reaction method for the quantification of 3 survivin transcripts and evaluation in breast cancer tissues. *Clinical Breast Cancer*, **14** (2), 122-131.
- Pavlyukov M. S., Antipova N. V., Balashova M. V., Vinogradova T. V., Kopantzev E. P., Shakhparonov M. I. 2011. Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *Journal of Biological Chemistry*, **286** (26), 23296-23307.
- Pećina-Šlaus N. (2009): Odabrane metode molekularne biologije. Medicinska naklada, Zagreb, str. 1-19.
- Peng X. H., Karna P., Cao Z., Jiang B. H., Zhou M., Yang L. 2006. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, **281** (36), 25903-25914.
- Rivadeneira D. B., Caino M. C., Seo J. H., Angelin A., Wallace D. C., Languino L. R., Altieri D. C. 2015. Survivin promotes oxidative phosphorylation, subcellular mitochondrial repositioning, and tumor cell invasion. *Sci. Signal.*, **8** (389), ra80-ra80.
- Ryan B. M., Konecny G. E., Kahlert S., Wang H. J., Untch M., Meng G., Pegram M. D., Podratz K. C., Crown J., Slamon D. J., Duffy M. J. 2006. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Annals of Oncology*, **17** (4), 597-604.

- Ryan B., O'Donovan N., Browne B., O'Shea C., Crown J., Hill A. D. K., McDermott E., O'Higgins, N., Duffy M. J. 2005. Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin- Δ Ex3 in breast cancer. *British Journal of Cancer*, **92** (1), 120.
- Sah N. K., Seniya C. 2015. Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumor Biology*, **36** (9), 6623-6631.
- Saini S., Majid S., Yamamura S., Tabatabai L., Suh S. O., Shahryari V., Chen Y., Deng G., Tanaka Y., Dahiya R. 2011. Regulatory role of mir-203 in prostate cancer progression and metastasis. *Clinical Cancer Research*, **17** (16), 5287-5298.
- Salvesen G. S., Dixit V. M. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, **91** (4), 443-446.
- Sampath J., Smith L. M., Fukuda S., Pelus L. M. 2017. Identification and Characterization of Novel Survivin Splice Variants with Anti-Apoptotic Activities. *J Immunol*, **4** (1), 1039.
- Shi H., Bevier M., Johansson R., Enquist-Olsson K., Henriksson R., Hemminki, K., Lenner P., Försti A. 2012. Prognostic impact of polymorphisms in the MYBL2 interacting genes in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **131** (3), 1039-1047.
- Skoufias D. A., Mollinari C., Lacroix F. B., Margolis R. L. 2000. Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *The Journal of Cell Biology*, **151** (7), 1575-1582.
- Smith C. A., Farrah T., Goodwin R. G. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, **76** (6), 959-962.
- Srivastava K., Srivastava A., Mittal B. 2012. Survivin promoter 231G/C (rs9904341) polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis *Mol Biol Rep* **39**, 1509–1516.
- Stauber R. H., Mann W., Knauer S. K. 2007. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Research*, **67** (13), 5999-6002.
- Stauber R. H., Rabenhorst U., Reikik A., Engels K., Bier C., Knauer S. K. 2006. Nucleocytoplasmic shuttling and the biological activity of mouse survivin are regulated by an active nuclear export signal. *Traffic*, **7** (11), 1461-1472.
- Stern R., Shuster S., Neudecker B. A., Formby B. 2002. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Experimental Cell Research*, **276** (1), 24-31.

- Sušac I., Ozretić P., Gregorić M., Cvok M. L., Sabol M., Levanat S., Trnski D., Eljuga D., Seiwerth S., Aralica G., Stanec M. 2019. Polymorphisms in survivin (*BIRC5* gene) are associated with age of onset in breast cancer patients. *Journal of oncology*.
- Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M., Tanigawa N. 2000. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clinical Cancer Research*, **6** (1), 127-134.
- Trnski D., Gregorić M., Levanat S., Ozretić P., Rinčić N., Vidaković T. M., Kalafatić D., Maurac I., Orešković S., Sabol M., Musani V. 2019. Regulation of survivin isoform expression by GLI proteins in ovarian cancer. *Cells*, **8** (2), 128.
- Uren A. G., Wong L., Pakusch M., Fowler K. J., Burrows F. J., Vaux D. L., Choo K. A. 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current Biology*, **10** (21), 1319-1328.
- Vaira V., Lee C. W., Goel H. L., Bosari S., Languino L. R., Altieri, D. C. 2007. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene*, **26** (19), 2678.
- Verdecia M. A., Huang H. K., Dutil E., Kaiser D. A., Hunter T., Noel J. P. 2000. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature Structural & Molecular Biology*, **7** (7), 602.
- Verhagen A. M., Coulson E. J., Vaux D. L. 2001. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome biology*, **2** (7), reviews 3009-1.
- Végran F., Boidot R., Bonnetain F., Cadouot M., Chevrier S., Lizard-Nacol S. 2011. Apoptosis gene signature of Survivin and its splice variant expression in breast carcinoma. *Endocrine-Related Cancer*, **18** (6), 783-792.
- Végran F., Mary R., Gibeaud, A., Mirjolet C., Collin B., Oudot A., Charon-Barra C., Arnould L., Lizard-Nacol S., Boidot R. 2013. Survivin-3B potentiates immune escape in cancer but also inhibits the toxicity of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, **73** (17), 5391-5401.
- Vietri M. T., Cioffi M., Schiavone E. M., Sica V., Molinari A. M. 2006. Identification of a novel survivin splicing variant 3alpha in acute myeloid leukemia.
- Vong Q. P., Cao K., Li H. Y., Iglesias P. A., Zheng Y. 2005. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science*, **310** (5753), 1499-1504.

- Wall N. R., O'Connor D. S., Plescia J., Pommier Y., Altieri D. C. 2003. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Research*, **63** (1), 230-235.
- Wang Q., Chen Z., Diao X., Huang S. 2011. Induction of autophagy-dependent apoptosis by the survivin suppressant YM155 in prostate cancer cells. *Cancer Letters*, **302** (1), 29-36.
- Wang F., Dai J., Daum J. R., Niedzialkowska E., Banerjee B., Stukenberg P. T., Gorbsky G.J., Higgins J. M. 2010. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science*, **330** (6001), 231-235.
- Wang X., Huang L., Xu Y., Shi Z., Wang Y., Zhang J., Wang X., Cao L., Luo H., Chen J., Liu N. 2012. Association between survivin-31G> C promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*, **20** (7), 790.
- Weis K. 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112** (4), 441-451.
- Weng C. J., Hsieh Y. H., Chen M. K., Tsai C. M., Lin C. W, Yang S. F. 2012. Survivin SNP-carcinogen Interactions in Oral Cancer. *J Dent Res* **91** (4), 358-363.
- Wheatley S. P., Barrett R. M., Andrews P. D., Medema R. H., Morley S. J., Swedlow J. R., Lens S. M. 2007. Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. *Cell Cycle*, **6** (10), 1220-1230.
- Wheatley S. P., Carvalho A., Vagnarelli P., Earnshaw W. C. 2001. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Current Biology*, **11** (11), 886-890.
- Wheatley S. P., Henzing A. J., Dodson H., Khaled W., Earnshaw W. C. 2004. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **279** (7), 5655-5660.
- Wheatley S. P., McNeish I. A. 2005. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *International review of cytology*, **247**, 35-88.
- Witta S. E., Yoshida K., Dziadziuszko R., Hirsch F. R. 2011. U.S. Patent Application No. 13/059,931.

- Xia W., Bisi J., Strum J., Liu L., Carrick K., Graham K. M., Treece A. L., Hardwicke M. A., Dush M., Liao Q., Westlund R. E. 2006. Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Research*, **66** (3), 1640-1647.
- Xu Y., Fang F., Ludewig G., Iones G., Jones D. 2004. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA and Cell Biology*, **23** (9), 527-537.
- Yamamoto H., Ngan C. Y., Monden M. 2008. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Science*, **99** (9), 1709-1714.
- Yang X., Xiong G., Chen X., Xu X., Wang K., Fu Y., Yang K., Bai Y. 2009. Polymorphisms of survivin promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **135** (10), 1341-1349.
- Youssef N. S., Hewedi I. H., Abd N. R. 2008. Immunohistochemical expression of survivin in breast carcinoma: relationship with clinicopathological parameters, proliferation and molecular classification. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, **20** (4), 348-357.
- Zhao J., Tenev T., Martins L. M., Downward J., Lemoine N. R. 2000. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Science*, **113** (23), 4363-4371.
- Zhao P., Meng Q., Liu L. Z., You Y. P., Liu N., Jiang B. H. 2010. Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **395** (2), 219-224.
- Zhu H., Zhang G., Wang Y., Xu N., He S., Zhang W., Chen M., Liu M., Quan L., Bai J., Xu N. 2010. Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2- β -catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. *Cancer Science*, **101** (5), 1156-1162.
- Zu Y., Ban J., Xia Z., Wang J., Cai Y., Ping W., Sun W. 2013. Genetic variation in a miR-335 binding site in *BIRC5* alters susceptibility to lung cancer in Chinese Han populations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **430** (2), 529-534.

ŽIVOTOPIS

Magdalena Vincetić rođena 19.02.1996. godine u Vinkovcima. Trenutno živim u prigradskom naselju Osijeka, Tenji. Prva dva razreda osnovne škole pohađala sam u OŠ Ivana Kozarca u Županji, a sljedećih šest u OŠ Tenja u Tenji. Srednju školu sam završila u I. gimnaziji u Osijeku.

Preddiplomski studij biologije na Odjelu biologije u Osijeku završila sam 2017.god. Završni rad „Mikrobne zajednice radioaktivnog otpada“ izradila sam pod vodstvom doc. dr. sc. Goran Palijan.

Laboratorijsku stručnu praksu obavljala sam na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu gdje sam naposljetku i izradila ovaj diplomski rad.