

Izražaj gena TLR9 u tumorima ljudi

Pongrac, Igor

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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:217:655311>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2020-12-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Igor Pongrac

Izražaj gena *TLR9* u tumorima ljudi

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Jasminke Pavelić, znanstvene savjetnice. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

ZAHVALJUJEM...

...mentorici prof. dr. sc. **Jasminki Pavelić** na pruženoj prilici da izradim ovaj rad, te srdačnom vodstvu i susretljivosti...

...sumentorici prof. dr. sc. **Nadi Oršolić** na pomoći tijekom pisanja rada i pomoći vezane uz administrativni postupak obrane...

... dr. sc. **Jeleni Knežević**, na dragocjenim savjetima i stručnoj pomoći tijekom rada u laboratoriju i pisanju rada. Ničeg ne bi bilo bez tvog strpljenja, vedrine, inicijative i...prijateljstva!

...svim djelatnicima **Zavoda za molekularnu medicinu** na ljubaznosti, strpljenju i suradnji...

... roditeljima, seki, obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i ljubavi...

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno- matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

IZRAŽAJ GENA *TLR9* U TUMORIMA LJUDI

Igor Pongrac

Zavod za molekularnu medicinu
Institut „Ruđer Bošković“
Bijenička cesta 54
10 002 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK: Toll-like receptori (TLR) prepoznaju patogenima pridružene molekularne sljedove i omogućuju urođeni imunološki odgovor. Izraženi su i na stanicama tumora različitih tkiva što otvara mogućnost da aktivacija prijenosa signala toll-like receptorima u stanicama tumora igra značajnu ulogu u izbjegavanju imunološkog odgovora. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati, primjenom metode real-time PCR, postoji li i koja je razina izražaja gena *TLR9* u različitim vrstama tumora hipofize, te postoji li izražaj gena *TLR9* u tkivima tumora pluća, i mijenja li se i kako u odnosu na zdravo tkivo. U analizu je uključeno 45 uzoraka tkiva tumora hipofize, 20 uzoraka tkiva tumora pluća i 20 uzoraka zdravog tkiva pluća. Izražaj gena *TLR9* određen je korištenjem tehnologije TaqMan proba. Rezultati analize 45 uzoraka tkiva tumora hipofize pokazali su prisutnost različitih razina izražaja gena *TLR9*; u rasponu od izrazito visoke (2 uzorka; 4,4%) do izrazito niske (9 uzoraka; 20%). Rezultati analize 20 uzoraka tkiva tumora pluća i pripadajućih zdravih tkiva pokazali su u 8 (40%) uzoraka tkiva tumora povećan izražaj gena *TLR9* u odnosu na zdravo tkivo, u 8 (40%) analiziranih uzoraka izražaj gena je bio smanjen, a u 4 uzorka (20%) nepromijenjen.

39 stranica, 4 slike, 4 tablice, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Marulićev trg 20/2

Ključne riječi: toll-like receptor 9, izražaj gena, tumor, hipofiza, pluća

Voditelj: Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić
Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić
Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić
Doc. dr. sc. Zlatko Liber

Rad prihvaćen: 11. veljače 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

EXPRESSION LEVEL OF *TLR9* GENE IN HUMAN TUMOUR TISSUES

Igor Pongrac

Division of Molecular Medicine
Ruđer Bošković Institute
Bijenička cesta 54
10 002 Zagreb, Croatia

SUMMARY: Toll-like receptors (TLRs) recognize pathogen-associated molecular patterns and enable innate immune responses. They are also expressed on tumour cells from a wide variety of tissues, suggesting that TLR activation may be an important event in tumour cell immune evasion. The aim of this study was to determine whether *TLR9* expression is associated with disease manifestation in lung and hypophyseal tumours. Gene *TLR9* expression was evaluated by real-time quantitative RT-PCR. Total mRNA from 45 hypophyseal tumour tissue specimen, 20 lung tumour and 20 normal lung tissue specimen was isolated, purified and retrotranscribed. cDNA was analysed measuring *TLR9* relative expression using TaqMan probe technology. Results of the analysis of hypophyseal tumor tissue samples showed the presence of different levels of *TLR9* gene expression: ranging from very high in 2 samples (4,4%) to distinctively low in 9 samples (20%). Results of the analysis of 20 lung tumor tissue samples and associated healthy tissues showed higher expression of *TLR9* gene in 8 (40%) tumor tissues, in 8 samples (40%) the expression was decreased and in 4 samples (20%) it was unchanged, compared to healthy tissues.

39 pages, 4 figures, 4 tables, 46 references, original in: Croatian

Thesis deposited in Central biological library, Marulićev trg 20/2

Key words: toll-like receptor 9, gene expression, tumour, hypophysis, lung

Supervisor: Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić
Co-supervisor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Reviewers: Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić
Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić
Doc. dr. sc. Zlatko Liber

Thesis accepted: February 11th 2009

POPIS KRATICA

TLR	(toll-like receptor)
IL-1R	(interleukin-1 receptor)
TIR	(Toll/IL-1R)
JNK	(c-Jun-NH2-kinaza)
CpG-ODN	(CpG oligonukleotidi)
pDC	(plazmocitoidne dendritičke stanice)
T _{reg}	(regulatorna stanica limfocita T)
IL	(interleukin)
PGE2	(prostaglandin E2)
FasL	(Fas ligand)
IκB	(inhibitor NF-κB)
IKK	(IκB kinaza)
PRL	(prolaktin)
HR	(hormon rasta)
ACTH	(adrenokortikotropni hormon)
NFA	(nefunkcionalan)
DNA	(od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
RNA	(od engl. <i>ribonucleic acid</i>)
PCR	(od engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RT-PCR	(od engl. <i>reverse transcription – polymerase chain reaction</i>)
Th1	(od engl. <i>T helper 1</i>)
HK	(od engl. <i>housekeeping gene</i>)
cDNA	(od engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
FRET	(od engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
PAMP	(od engl. <i>pathogen associated molecular patterns</i>)
NK	(od engl. <i>natural killer</i>)
DC	(od engl. <i>dendritic cells</i>)
APC	(od engl. <i>antigen presenting cell</i>)

ERK	(od engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
MyD88	(od engl. <i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>)
IRAK	(od engl. <i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>)
TRAF6	(od engl. <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>)
MSC	(od engl. <i>myeloid supressor cells</i>)
TAM	(od engl. <i>tumor-associated macrofage</i>)
TNF- α	(od engl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
NF- κ B	(od engl. <i>nuclear factor κB</i>)
LRR	(od engl. <i>leucine-rich region</i>)
TAK1	(od engl. <i>transforming growth factor-β-activated protein kinase 1</i>)
SAPK	(od engl. <i>stress-activated protein kinase</i>)
MAPK	(od engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
GADPH	(od engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
TGF- β	(od engl. <i>transforming growth factor β</i>)
MCP-1	(od engl. <i>monocyte chemotactic protein 1</i>)
MIF	(od engl. <i>macrophage migration inhibiting factor</i>)
GRO α	(od engl. <i>growth-related oncogene α</i>)
VEGF	(od engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
GM-CSF	(od engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
MMP	(od engl. <i>matrix metalloproteinase</i>)
ICAM-1	(od engl. <i>inter-cellular adhesion molecule 1</i>)
VCAM-1	(od engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)
ELAM-1	(od engl. <i>endothelial cell leukocyte adhesion molecule 1</i>)
c-FLIP	(od engl. <i>cellular fllice inhibitory protein</i>)
c-IAP1	(od engl. <i>cellular inhibitor of apoptosis protein 1</i>)
XIAP	(od engl. <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>)
FI	(od engl. <i>fold induction</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	3
1.1. TOLL-LIKE RECEPTORI.....	3
1.2. PRIJENOS SIGNALA TOLL-LIKE RECEPTORIMA.....	4
1.3. TOLL-LIKE RECEPTOR 9	5
1.4. TUMOR, UPALA I TOLL-LIKE RECEPTORI.....	6
1.4.1. Bijeg od imunološkog nadzora.....	6
1.4.2. Upala	7
1.4.3. Transkripcijski čimbenik NF- κ B.....	8
1.4.4. Izražaj TLR-a na stanicama tumora.....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. ISPITANICI.....	12
3.2. MATERIJALI.....	12
3.3. METODE	13
3.3.1. Homogenizacija tkiva i izolacija ukupne mRNA.....	13
3.3.2. Određivanje koncentracije ukupne RNA i provjera kvalitete elektroforezom u gelu agaroze.....	14
3.3.3. Sinteza cDNA	15
3.3.4. <i>Real-time</i> PCR.....	17
3.3.4.1. <i>Metoda detekcije produkta TaqMan probama</i>	17
3.3.4.2. <i>Ct - vrijednost</i>	18
3.3.4.3. <i>Kvantifikacija produkata PCR</i>	19

4. REZULTATI	22
4.1. IZOLACIJA UKUPNE RNA IZ TKIVA TUMORA I ZDRAVIH TKIVA.....	22
4.2. ANALIZA IZRAŽAJA GENA <i>TLR9</i> U TKIVIMA RAZLIČITIH TUMORA HIPOFIZE.....	23
4.3. ANALIZA IZRAŽAJA GENA <i>TLR9</i> U TKIVIMA TUMORA PLUĆA I ZDRAVIM TKIVIMA PLUĆA	26
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. LITERATURA.....	33

1. UVOD

1.1. TOLL-LIKE RECEPTORI

Obitelj toll-like receptora (TLR) po prvi je puta opisana u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) gdje im je glavna uloga pokretanje imunološkog odgovora na gljivične infekcije (Akira i sur., 2004). Do danas je u sisavaca opisano 13 članova te obitelji, od toga 11 u čovjeku (Huang i sur., 2008). Obitelj TLR-a ima važnu ulogu u pokretanju urođenog imunološkog odgovora na različite patogene, ali i u naknadnom pokretanju stečene imunosti (Kawai i sur., 2006). Nakon poticaja TLR-a odgovarajućim ligandom pokreće se signalni put specifičan za stvaranje proupalne reakcije, među ostalim aktiviranjem transkripcijskog čimbenika NF- κ B (od engl. *nuclear factor – κ B*) (Chen i sur., 2007).

TLR-i su pripadnici superobitelji interleukin-1 receptora (IL-1R). Evolucijski su očuvani proteini. U citoplazmatskoj regiji nalazi se Toll/IL-1R (TIR) domena (Tsan, 2006), homologne građe u svih TLR-a, a u izvanstaničnoj regiji leucinom-bogata domena (LRR, od engl. *leucine-rich region*) (Brodsky i sur., 2007; Takeda i sur., 2005). Regija LRR odgovorna je za prepoznavanje patogenima pridruženih molekularnih sljedova, tzv. PAMP (od engl. *pathogen associated molecular patterns*), a regija TIR sudjeluje u daljnjem unutarstaničnom prijenosu signala, vezanjem adaptorskih molekula (Kawai, 2007).

TLR-i su većinom izraženi na stanicama imunološkog sustava, makrofazima i dendritičkim stanicama (DC, od engl. *dendritic cells*). Sudjeluju u kontroli aktivacije antigen-prezentirajućih stanica (APC, od engl. *antigen presenting cell*) (Barton i sur., 2002). TLR-i se međusobno razlikuju i po smještaju unutar stanice; TLR-i 1, 2 i 4 nalaze se

na membrani stanice, a TLR3 i TLR9 su smješteni na membranama endoplazmatskog retikuluma i endosomima i lizosomima (Ilvesaro i sur., 2007).

1.2. PRIJENOS SIGNALA TOLL-LIKE RECEPTORIMA

Svi pripadnici obitelji TLR-a pokreću jedinstveni unutarstanični prijenos signala koji kulminira aktivacijom transkripcijskog čimbenika NF- κ B te mitogenom aktiviranih protein kinaza MAPK (od engl. *mitogen-activated protein kinase*) kao što su kinaze aktivirane izvanstaničnim signalom ERK (od engl. *extracellular signal-regulated kinase*), p38 i c-Jun N-terminalna kinaza (Barton i sur., 2003).

MyD88 (od engl. *myeloid differentiation primary response protein 88*) je glavni adapterski protein zajednički gotovo svim TLR-ima (Chen i sur., 2008). Vežanjem TIR-domene i MyD88-a regrutira se skupina proteina obitelji IRAK (od engl. *interleukin-1 receptor-associated kinase*) i TRAF6 (od engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) (Huang i sur., 2008). TRAF6 aktivira TAK1 (od engl. *transforming growth factor- β -activated protein kinase 1*) koji fosforilira i aktivira IKK (I κ B kinaza) kompleks što rezultira oslobađanjem i premještajem NF- κ B u jezgru (Akira i sur., 2004). TAK1 također aktivira protein kinazu aktiviranu stresom SAPK (od engl. *stress-activated protein kinase*), c-Jun-NH2-kinazu (JNK) i p38 (Kawai i sur., 2006). Ovim signalnim putevima TLR-i pokreću sintezu citokina kao što su TNF- α , IL-6 i IL-1, glavne posrednike upalnog odgovora (Huang i sur., 2008). Aktivacija prijenosa signala TLR-ima također pokreće dendritičke stanice i makrofage na izlučivanje IL-12, citokina koji usmjerava imunološki odgovor prema Th1 fenotipu (Killeen i sur., 2006).

Neki pripadnici obitelji TLR-a, TLR3 i TLR4, mogu pokrenuti aktivaciju NF- κ B na način neovisan o MyD88 (Chen i sur., 2008). Novije studije ukazuju na postojanje barem još tri druga adaptorska proteina koji mogu biti povezani s prijenosom signala putem TLR-a čime se otvara mogućnost povećavanja specifičnosti različitih TLR-a što za posljedicu može imati i drugačiji imunološki odgovor (Janssens i sur., 2003).

1.3. TOLL-LIKE RECEPTOR 9

Gen *TLR9* čovjeka nalazi se na kraćem kraku kromosoma 3, na poziciji 3p21.3, a analizom slijeda nukleotida utvrđeno je da sadrži dva eksona (Chuang i sur., 2000). Gotovo cijeli protein kodiran je drugim eksonom čijim prepisivanjem i prevođenjem nastaje protein veličine 1032 aminokiseline, molekulske mase 115,9 kDa (Takeshita i sur., 2004).

TLR9 specifično veže nemetilirane sljedove dvolančane DNA bakterijskog i viralnog podrijetla, koji sadrže tzv. CpG-otočiće (Lee i sur., 2007). DNA mikrobnog podrijetla sadrži nemetilirane sljedove CpG koji su izuzetno rijetki u genomskoj DNA sisavaca pa imaju slabo imunostimulatorno djelovanje (Hemmi i sur., 2000). Otkriveno je da sintetski modificirani CpG-oligonukleotidi, CpG-ODN, također imaju sposobnost aktiviranja stanica imunološkog sustava preko TLR9 (Takeda i sur., 2001).

TLR9 je unutar stanice smješten na membranama endoplazmatskog retikuluma (Merrell i sur., 2006). Nakon ulaska specifičnog liganda u stanicu, TLR9 se premješta u endosome i lizosome gdje veže ligand u uvjetima sniženog pH (Bauer, 2006). Fiziološki uvjeti unutar endosoma i lizosoma omogućuju razgradnju virusnih čestica i bakterija što olakšava pristup TLR9 ligandu (Barton i sur., 2006).

TLR9 je uglavnom izražen na stanicama imunološkog sustava, kao što su plazmocitoidne dendritičke stanice (pDC), limfociti B i stanice monocitno-makrofagne loze (Droemann i sur., 2005; Eaton-Bassiri i sur., 2004). Međutim, sve je više dokaza da izražaj TLR9 nije ograničen samo na stanice imunološkog sustava već je uočen i u astrocitima i epitelnim stanicama kao i mnogim stanicama tumora (tumora mozga, dojke, pluća i želuca) (Ilvesaro i sur., 2007).

1.4. TUMOR, UPALA I TOLL-LIKE RECEPTORI

1.4.1. Bijeg od imunološkog nadzora

Sposobnost imunološkog sustava da kontrolira procese nastanka i razvoja tumora naziva se imunološkim nadzorom (Kim i sur., 2007; Zitvogel i sur., 2006). Sama pojava tumora upućuje na nasljedne ili stečene greške u tom sustavu (Diefenbach i sur., 2002; Stewart i sur., 2008).

Tumori koriste niz strategija kako bi onemogućili prepoznavanje od strane imunološkog sustava tj. “pobjegli” imunološkom nadzoru, te okrenuli mehanizme i signalne puteve imunološkog sustava u korist vlastitog rasta i razvoja (Crocchi i sur., 2007; Mitra i sur., 2003). Tako npr. tumor stvara oko sebe poseban mikrokoliš obogaćen regulatornim stanicama limfocita T (T_{reg}) i mijeloidnim supresivnim stanicama (MSC, od engl. *myeloid suppressor cells*) čije su funkcije preusmjerene u toj mjeri da potpomažu razvoj tumora umjesto da pokazuju antitumorsko djelovanje (Nagaraj i sur., 2008; Whiteside, 2008).

Tumor također izlučuje i posebne čimbenike proapoptotičkog ili imunosupresivnog djelovanja koji na razne načine, izravno (TGF- β , IL-10) i neizravno (VEGF, PGE2), inaktiviraju ili mijenjaju funkcije antigen-prezentirajućih stanica (dendritičke stanice,

monociti/makrofazi) u korist tumora (Kim i sur., 2007; Stewart i sur., 2008). Nadalje, odabir stanica tumora koje na svojoj površini pokazuju povećani izražaj proteina FasL, koji navodi efektorske stanice limfocita T na apoptotičku smrt, predstavlja jedinstven način kojim tumor eliminira jednog od najopasnijih protivnika, predstavnika stečene imunosti (Lu i sur., 2008).

1.4.2. Upala

Upala je važan fiziološki proces nužan za obranu organizma te zacjeljivanje i popravljavanje oštećenog tkiva. Upalni proces posredovan je stanicama imunološkog sustava: u početku stanicama urođene imunosti (makrofazima, dendritičkim stanicama, neutrofilima i NK-stanicama), a kasnije i stanicama stečene imunosti (limfociti T i B) koje odgovaraju na signal koji šalje sustav urođene imunosti. Glavna zadaća upalnog procesa je uklanjanje opasnosti od potencijalno patogenih mikroorganizama te oporavak i zacjeljivanje ozljeda poticanjem proliferacije stanica i neovaskularizacije okolnog tkiva. U normalnim je uvjetima upalni proces strogo kontroliran kako bi se infekcija što prije uklonila, a tkivo zacijelilo. Međutim, brojni dokazi upućuju da kronični upalni procesi uzrokovani bakterijskim i virusnim infekcijama mogu posredovati u nastanku tumora. Naime, u čovjeka se kronična infekcija i kronična upala smatraju najvažnijim epigenetičkim čimbenicima koji doprinose nastanku i razvoju tumora (Chen i sur., 2008).

Mikrookoliš kojim se tumor okružuje ima sve osobitosti upalnog procesa. U njemu je visoki udio infiltrirajućih stanica imunološkog sustava koje pokazuju sposobost pojačavanja angiogeneze, stvaranja citokina i pokretanja imunološke otpornosti. Čini se da tumor u svoju okolinu prvo privlači normalne stanice imunološkog sustava izlučivanjem specifičnih citokina (MCP-1, GRO α , IL8), a potom ih mijenja drugom vrstom citokina (IL-

6, TNF-6, MIF) čije se specifično djelovanje odražava na diferencijaciju stanica. Tako promijenjene stanice dalje same izlučuju citokine, hormone i čimbenike rasta koji potiču rast tumora i dovode do imunološke tolerancije (Chen i sur., 2007).

1.4.3. Transkripcijski čimbenik NF- κ B

Transkripcijski čimbenik NF- κ B i signalni putevi koji ga aktiviraju su središnji koordinatori odgovora urođene i stečene imunosti (Karin, 2006). Kompleks NF- κ B i I κ B (inhibitor NF- κ B) je normalno smješten u citoplazmi i inaktivan je. Više od 150 različitih unutar/izvanstaničnih podražaja aktivira I κ B kinazu (IKK) fosforilacijom. Aktivacija IKK dovodi do fosforilacije i ubikvitinacije I κ B što za posljedicu ima njegovu degradaciju putem proteasoma. NF- κ B, oslobođen od inhibitorng utjecaja I κ B, premješta se u jezgru gdje djeluje kao aktivator i promotor izražaja brojnih upalnih čimbenika: citokina (IL-1, IL-2, IL-6 i TNF- α), kemokina (IL-8, MCP-1 i GRO- α), čimbenika rasta (VEGF, GM-CSF), metaloproteinaza matriksa (MMP2, MMP9), adhezijskih molekula (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) i antiapoptotičkih proteina (c-FLIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, BCL-X_L) (Chen i sur., 2007; Merrell i sur., 2006; de Visser i sur., 2006).

Od nedavno je poznato da aktivacija NF- κ B ima važnu ulogu u nastanku i razvoju raka. NF- κ B je vodeći čimbenik koji kontrolira sposobnost zloćudnih stanica da izbjegnu staničnu smrt i važan je u regulaciji angiogeneze i invazivnosti tumora (Karin, 2006). Smatra se da je upravo NF- κ B karika koja nedostaje u vezi upala - nastanak tumora. Ulazak NF- κ B u jezgru i njegova dugotrajna aktivacija, kao npr. u kroničnoj upali, sprečava odstranjenje promijenjenih stanica, a stimulacija sinteze ciklina D1 i G1 vodi do pojačane proliferacije stanica (Karin i sur., 2002).

TLR-i spadaju među vodeće aktivatore transkripcijskog čimbenika NF- κ B i čine prvu liniju obrane od infekcije patogenima, ali kronična aktivacija NF- κ B preko stimuliranih TLR-a može služiti kao pokretač evoluiranja inficiranih ili ozlijeđenih stanica u stanice tumora ili ih navesti na nekontroliranu proliferaciju (Chen i sur., 2007).

1.4.4. Izražaj TLR-a na stanicama tumora

U raznim vrstama tumora dokazana je prisutnost funkcionalnih TLR-a. Osim što promiču proliferaciju stanica tumora, oni utječu na izbjegavanje stanične smrti (npr. smanjivanjem izražaja nekih površinskih molekula kao što je Fas receptor) te pojačavaju invaziju i metastaziranje stanica tumora poticanjem aktivnosti metaloproteinaza (MMP13) i regulacijom izražaja integrina. Čini se da aktivacija TLR-a na stanicama tumora pokreće signalne puteve koji vode do sinteze proupalnih čimbenika i imunosupresivnih molekula. Na taj način povećava se otpornost tumora prema napadima citotoksičnih limfocita T i omogućava izbjegavanje imunološkog nadzora. Tako tumori koriste prijenos signala toll-like receptorima za vlastiti razvoj. Zbog toga bi TLR-i mogli biti nove mete u liječenju osoba oboljelih od tumora i otvoriti vrata novim strategijama borbe protiv raka (Huang i sur., 2008).

Poznato je da TLR-i posredno mogu regulirati i stanice imunološkog sustava (neutrofili, makrofazi vezani uz tumor - TAM, od engl. *tumor-associated macrofage*, dendritičke stanice, eozinofili, mastociti te limfociti B i T) koje infiltriraju tumor kako bi i one pružile daljnju podršku razvoju tumora. Ove se stanice nalaze u potpornoj stromi i u tumoru. Čimbenik nekroze tumora, TNF- α (od engl. *tumor necrosis factor - α*) smatra se glavnim pokretačem NF- κ B u ranim fazama aktivacije i povezan je s hiperaktivacijom NF- κ B u stanicama raka. Ako uzmemo u obzir da unutarstanični prijenos signala posredovan

TLR-ima pokreće sintezu TNF- α i da je sama meta MyD88 signalnog puta NF- κ B, možemo zaključiti da postoje razlozi tezi da prijenosom signala TLR-ima i aktivacijom NF- κ B u kroničnoj upali doprinose okolnostima pogodnim za razvoj tumora (Chen i sur., 2008).

Važnost prijenosa unutarstaničnog signala TLR-ima u razvoju tumora je vidljiva iz brojnih populacijskih studija koje pokazuju povezanost TLR-a s povećanom učestalošću nastanka raka. Razne linije stanica tumora (debelog crijeva, dojke, prostate, pluća) pokazuju ekspresiju raznih TLR-a. Stimulacija stanica tumora sa lipopolisaharidima koji su specifični ligandi za TLR4 rezultira povećanim izražajem proupalnih čimbenika kao što su dušikov monoksid, IL-6 i IL-12. Ovo je omogućuje stanicama tumora oponašanje osobina upalnih stanica te pojačava otpornost istih na djelovanje citotoksičnih limfocita T i napad NK-stanica (Huang i sur., 2008). Tako npr. citokin IL-6 onemogućuje sazrijevanje dendritičkih stanica u mikrookolišu tumora i one ne mogu služiti kao antigen-prezentirajuće stanice te dolazi do imunosupresivnog djelovanja unutarstaničnih signala posredovanih TLR-ima na okolinu tumora, što pogoduje njegovom razvoju (Conroy i sur., 2008). T_{reg} stanice imaju važnu ulogu u ograničavanju antitumorske aktivnosti. Upotreba agonista TLR-a pokazuje potencijal i za inhibiciju i za pojačavanje funkcije stanica T_{reg} (Conroy i sur., 2008). Visoko invazivna stanična linija raka dojke MDA-MB-231 izražava TLR9 koji aktivacijom povećava invazivnost stanica tumora pojačanjem aktivnosti metaloproteinaze 13 (MMP-13). *In vitro* studije ukazuju da korištenje agonista TLR9 stimulira i invazivnost raka prostate aktiviranjem MMP-13. Iako je jasno da tumori izražavaju raznolike funkcionalne TLR-e, nije u potpunosti jasno koji su njihovi ligandi u mikrookolišu tumora (Huang i sur., 2008; Merrell i sur., 2006).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Toll-like receptori su primarno izraženi na stanicama imunološkog sustava, no postoje i studije koje ukazuju na njihov izražaj i značaj u raznim tumorima i staničnim linijama tumora (npr. debelog crijeva, dojke, prostate, pluća i grlića maternice).

Cilj ovog istraživanja bio je, korištenjem metode *real-time* PCR, ispitati:

1. postoji li izražaj gena *TLR9* u tumorima hipofize;
2. postoji li izražaj gena *TLR9* u tumorima pluća, mijenja li se i kako u odnosu na zdravo tkivo.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 65 uzoraka tkiva tumora: 45 uzoraka različitih vrsta tumora hipofize i 20 uzoraka različitih vrsta tumora pluća i 20 pripadajućih zdravih tkiva pluća. Uzorci tkiva tumora hipofize prikupljeni su u Klinici za endokrinologiju Kliničke bolnice „Sestre milosrdnice“, Zagreb. Odstranjeni su tijekom operativnog zahvata te odmah smrznuti u tekućem dušiku. Uzorci tkiva tumora pluća i pripadajuće zdrave kontrole (zdravo tkivo pluća) prikupljeni su u Klinici za pulmologiju Klinike za plućne bolesti „Jordanovac“, Zagreb, tijekom operativnog zahvata te također smrznuti u tekućem dušiku. Svi ispitanici dali su pisani pristanak za izolaciju i analizu mRNA iz uzoraka tumora i pripadajućih zdravih tkiva.

3.2. MATERIJALI

TRIzol® Reagent (Invitrogen, SAD)

kloroform (Kemika, Hrvatska)

2-propanol (Kemika, Hrvatska)

96% etanol (Kemika, Hrvatska)

agaroz (Type i-A, Low EQ), (Sigma, SAD)

etidij bromid, 1 µg/ml (Sigma, SAD)

Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs, Engleska)

Lambda DNA-Bst II Digest (New England Biolabs, Engleska)

High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Njemačka)

TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, SAD)

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD)

dNTP 2,5 mM (Roche, Njemačka)

100 mM dATP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP, 100 mM dCTP

Pufer za elektroforezu (1xTAE):

40 mM Tris-HCl [Tris (Kemika, Hrvatska), HCl (Kemika, Hrvatska)]

1 mM EDTA (Kemika, Hrvatska), pH 8,0

Pufer za nanošenje na gel (6X):

30% glicerola (redestiliran, Kemika, Hrvatska)

0,25% bromfenol plavo (Bio-Rad Laboratories, SAD)

0,25% ksilen cijanol fluorofosfat (Bio-Rad Laboratories, SAD), čuvan na +4°C

3.3. METODE

3.3.1. Homogenizacija tkiva i izolacija ukupne mRNA

Smrznuto tkivo tumora otopljeno je u 1,5 ml TRIzol-a tijekom 10 minuta, usitnjeno škarama te homogenizirano uređajem ULTRA-TURRAX® T18 BASIC (IKA, Njemačka). Svi navedeni koraci izvedeni su na ledu kako bi se spriječila razgradnja RNA. Homogenizirano tkivo inkubirano je 5 minuta te potom pomiješano sa 0,3 ml kloroforma. Nakon lagane trešnje, homogenat je inkubiran 3 minute te centrifugiran (centrifuga tipa 5415R, Eppendorf, Njemačka) 15 minuta pri 12000 g i temperaturi od 4°C. Odvojenom supernatantu je nakon centrifugiranja dodano 0,75 ml izopropanola te je inkubiran 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Smjesa je centrifugirana 10 minuta pri 12000 g i temperaturi od 4°C. Supernatant je odbačen, a talogu je dodano 1,5 ml 75% etanola (75%-tni etanol prethodno pripremljen iz 96%-tnog etanola). Smjesa je snažno promiješana te

centrifugirana 5 minuta pri 7600 g i temperaturi od 4°C. Supernatant je odbačen, a talog koji sadrži ukupnu RNA djelomično posušen te otopljen u 100 µl QH₂O.

Ukupna RNA izolirana iz homogenata tkiva dodatno je pročišćena upotrebom kompleta High Pure RNA Isolation Kit prema uputi proizvođača. Ukratko, otopina RNA je prebačena na kolonu te centrifugirana 15 sekundi pri 8000 g (centrifuga tipa 5415D, Eppendorf, Njemačka) i sobnoj temperaturi. Filtrat je odbačen, a koloni je dodano 100 µl smjese DNaze (90 µl inkubacijskog pufera za DNazu + 10 µl enzima DNaze). Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi koloni je dodano 500 µl pufera I za ispiranje te je centrifugirana 15 sekundi pri 8000 g i sobnoj temperaturi. Filtrat je odbačen, a kolona isprana s 500 µl pufera II za ispiranje te ponovno centrifugirana 15 sekundi pri 8000 g i sobnoj temperaturi. Koloni je potom dodano još 200 µl pufera za ispiranje II te je centrifugirana 2 minute pri 13200 g i sobnoj temperaturi. Kolona je prebačena u novu kušalicu te joj je dodano 30 µl pufera za ispiranje te je centrifugirana 1 minutu pri 8000 g i sobnoj temperaturi. Otopina ukupne RNA pohranjena je na -80°C do analize.

3.3.2. Određivanje koncentracije ukupne RNA i provjera kvalitete elektroforezom u gelu agaroze

Koncentracija ukupne RNA određena je metodom spektrofotometrije, na UV/VID spektrofotometru (Cecil Instruments, SAD), paralelnim mjerenjem apsorbancija pri valnim dužinama od 260 nm (za nukleinske kiseline) i 280 nm (za proteine), kako bi ustanovili razinu onečišćenja proteinima. Pri izračunavanju koncentracije RNA korištena je činjenica da je pri vrijednosti apsorbancije $A_{260}=1$, koncentracija RNA=40 ng/µl. Apsorbancije su mjerene u uzorcima koji su prethodno razrijeđeni u omjeru 1:100 (1µl uzorka RNA / 100 µl QH₂O).

Kvaliteta izolirane ukupne RNA provjerena je elektroforezom u 1% gelu agaroze. Elektroforeza je metoda razdvajanja odsječaka nukleinskih kiselina (DNA ili RNA) koja koristi činjenicu da odsječci nukleinskih kiselina različitih dužina i sekundarnih struktura u električnom polju putuju različitim brzinama. Upotrebom molekularnih biljega poznate molekulske mase moguće je odrediti veličinu željenog odsječka.

Gel agaroze (1%-tni) pripremljen je tako da je 0,5 g agaroze pomiješano s 50 ml ranije pripremljenog 1X TAE pufera za elektroforezu. Nakon toga je termičkim putem (u mikrovalnoj pećnici) otopljena agarozna. Otopljenoj agarozni dodan je etidij bromid (konačna koncentracija 50 µg/ml) te je ulivena u pripremljenu kadu za elektroforezu. Nakon polimerizacije u jažice je nanosena smjesa 5 µl uzorka i 1µl pufera za nanošenje. Paralelno je nanosen i molekularni biljeg „Low Molecular Weight DNA Ladder“. Elektroforezu u gelu agaroze provodili smo u sustavu za horizontalnu elektroforezu (Elchrom, Švicarska), 25 minuta na 100 mV.

Analizirani produkti vizualizirani su osvjetljavanjem gela ultraljubičastim svjetlom (260 nm) pomoću uređaja Image Analyser (Pharmacia Biotech, Švedska).

3.3.3. Sintaza cDNA

Lančana reakcija polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) je *in vitro* metoda umnažanja željenog odsječka DNA pomoću termostabilnog enzima Taq-DNA polimeraze i dvije oligonukleotidne početnice (Kubista i sur., 2006). RT-PCR (od engl. *reverse transcription – polymerase chain reaction*) je oblik lančane reakcije polimerazom čija je specifičnost da nakon reakcije iz početnog materijala molekule mRNA dobijemo komplementarnu dvolančanu DNA, cDNA (Bustin, 2000).

Iz uzoraka ukupne RNA, uz pomoć kompleta TaqMan® Reverse Transcription Reagents i početnica - nasumičnih heksamera, prepisali smo mRNA u cDNA. Reakcijska smjesa za sintezu cDNA pripremljena je kao što je prikazano u tablici 1. Ukupni volumen dodane otopine RNA i QH₂O bio je 9,625 µl, a međusobni omjer u kojem su dodani ovisio je o izmjerenoj koncentraciji svake pojedine otopine RNA. Ukupan volumen reakcijske smjese je bio 25 µl.

Tablica 1. Sastav reakcijskih smjesa za sintezu cDNA.

SASTOJAK	VOLUMEN (µl)	KONAČNA KONCENTRACIJA
25 mM MgCl ₂	5,5	5,5 mM
10X TaqMan RT pufer	2,5	1X
smjesa dNTP	5	500 µM/dNTP
MultiScribe™ reverzna transkriptaza	0,625	1,25 U/µl
nasumični heksameri	1,25	2,5 µM
RNase Inhibitor	0,5	0,4 U/µl
QH ₂ O	9,625	konačna koncentracija RNA 500µg/µl
otopina RNA		

Reakcija RT-PCR-a odvijala se u uređaju za lančanu reakciju polimerazom (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) pri sljedećim uvjetima: inkubacija 10 minuta pri 25°C, zagrijavanje reakcijske smjese na 37°C tijekom 60 minuta, inaktivacija enzima 5 minuta pri 95°C. Sintetizirane cDNA pohranjene su na -20°C do analize.

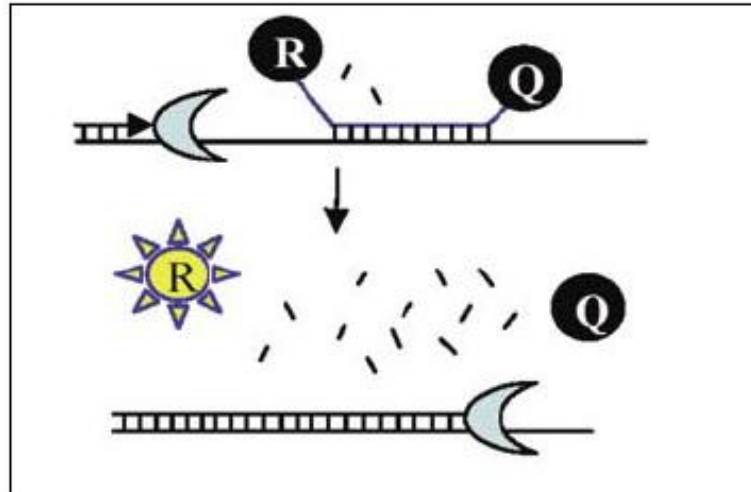
3.3.4. Real-time PCR

Real-time PCR je automatizirana metoda koja se koristi se za praćenje promjena izražaja gena i kvantifikaciju DNA i RNA različitog porijekla. Značajna razlika od klasičnog PCR-a je u tome što se nakon svakog reakcijskog ciklusa mjeri količina umnožene DNA očitavanjem fluorescencije. Naime, povećanje količine sintetizirane DNA (posredno preko povećanja fluorescencije) se prati u „stvarnom vremenu“, pa je metoda po tome dobila ime (Kubista i sur., 2006; Wong i Medrano, 2005).

Mogući su različiti načini analize, tj. moguća je primjena tzv. različitih vrsta kemija; metoda detekcije primjenom tehnologije molekularnih oznaka (od engl. *molecular beacon*), metoda primjene DNA-vezujućih boja (SYBR Green), metoda detekcije različito obilježenim hidrolizirajućim probama (TaqMan) i tehnologije hibridizacijskih sonda (Bustin, 2000).

3.3.4.1. Metoda detekcije produkta TaqMan probama

U ovom radu koristili smo se metodom detekcije TaqMan probama. Detekcija TaqMan probama temelji se na fenomenu rezonantnog prijenosa energije (FRET, od engl. *fluorescence resonance energy transfer*). TaqMan proba je oligonukleotid na koji je s jedne strane kovalentno vezana dojavljivačka boja, a s druge strane prigušivač. Proba ima sposobnost vezanja na jednolančanu DNA. Prigušivač se nalazi u blizini molekule koja služi kao reporter (fluorofor) te blokira njegovu fluorescenciju. TaqMan proba vezana za jednolančanu DNA čini supstrat za egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze što dovodi do oslobađanja reportera koji se udaljava od prigušivača (slika 1). Oslobađanjem dolazi do fluorescentnog signala (Wong i Medrano, 2005).



Slika 1. Metoda detekcije produkata hidolizirajućim (TaqMan) probama. Proba s prigušivačem i reporterom veže se za jednolančanu DNA. Aktivnošću Taq polimeraze dolazi do hidrolize probe, reporter i prigušivač se odvajaju i dolazi do fluorescencije (preuzeto iz Wong i Medrano, 2005). R = reporter; Q = prigušivač

3.3.4.2. Ct - vrijednost

Real-time PCR se može podijeliti u četiri faze: početna faza, rana eksponencijalna faza, log-linearna faza i faza platoa. Tijekom prve faze (prvih 10-15 ciklusa) reakcija polimerizacije tek počinje i razina fluorescencije je preniska za detekciju. Ciklus u kojem određeni uzorak prijeđe prag iznad kojeg se fluorescencija može detektirati naziva se Ct - vrijednost i događa se u ranoj eksponencijalnoj fazi. Ct - vrijednost pojedinog uzorka ovisi o početnoj koncentraciji cDNA. Dakle, što je više određene molekule u uzorku to će se prije moći detektirati njezina fluorescencija, a Ct - vrijednost će biti niža. Usporedbom Ct - vrijednosti za dva gena moguće je odrediti koliko ima jednog transkripta u odnosu na drugi. Tijekom log-linearne faze reakcija je najučinkovitija, a u fazi platoa dolazi do stabilizacije intenziteta fluorescencije i zasićenja reakcije. Naime, komponente reakcije se iscrpe i dolazi do stvaranja ograničavajućih uvjeta (Wong i Medrano, 2005).

3.3.4.3. Kvantifikacija produkata PCR

Dva su načina kvantifikacije početne količine nukleinskih kiselina: apsolutna i relativna. Za apsolutnu kvantifikaciju koristi se serija razrjeđenja standarda poznatih koncentracija kako bi se dobila standardna krivulja. Standardna krivulja predstavlja linearni odnos između Ct vrijednosti i početnih količina ukupne RNA ili DNA. Preko tog odnosa određuje se broj početnih molekula kalupa. U relativnoj kvantifikaciji izražaj gena uzorka mjeri se na temelju vanjskog standarda ili referentnog uzorka – kalibratora (npr. u istraživanju tkiva tumora kalibrator može biti zdravo tkivo). Za korekciju varijacije izražaja između uzoraka koristi se normalizacija izražaja gena, najčešće pomoću izražaja nekog domaćinskog gena (HK, od engl. *housekeeping gen*) koji se bitno ne mijenja (GADPH, β -aktin, ribosomalni proteini – 28S ili 18S). Konačni izračun najčešće se vrši primjenom komparativne $\Delta\Delta Ct$ metode (Wong i Medrano, 2005).

Komparativnom $\Delta\Delta Ct$ metodom rezultati se izražavaju kao promjena izražaja ciljnog gena u odnosu na kontrolu. Za $\Delta\Delta Ct$ metodu nužno je da učinkovitost umnažanja ciljnog gena bude jednaka endogenoj kontroli (Wong i Medrano, 2005). Vrijednost $\Delta\Delta Ct$ računa se po sljedećim formulama:

$$\Delta Ct (\text{uzorak}) = Ct (\text{ciljni gen}) - Ct (\text{endogena kontrola})$$

$$\Delta Ct (\text{referentni uzorak}) = Ct (\text{ciljni gen}) - Ct (\text{endogena kontrola})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{uzorak}) - \Delta Ct (\text{referentni uzorak})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{razina promjene izražaja ciljnog gena}$$

Metoda *real-time* PCR korištena je za određivanje izražaja gena *TLR9* u tkivima tumora adenohipofize te za mjerenje razlike izražaja gena *TLR9* u tkivima tumora pluća i tkivima zdravih pluća. U analizama su korištene komercijalne TaqMan probe za istraživanje gena *TLR9* (TaqMan® Gene Expression Assay, identifikacijska oznaka: Hs00370913_s1, Applied Biosystems, SAD) te TaqMan probe za domaćinski gen – eukariotska 18S rRNA (TaqMan® Gene Expression Assay, identifikacijska oznaka: Hs99999901_s1, Applied Biosystems, SAD). Sve analize rađene su na uređaju CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, SAD) prema uputama proizvođača. Pri tome je korištena pločica s 96 bunarića u kojima su pripremani uzorci i u kojima se odvijala reakcija PCR.

Tablica 2. Sastojci u reakcijskoj smjesi za *real-time* PCR i njihov volumen.

SASTOJAK	VOLUMEN (µl)
TaqMan MasterMix	5
TaqMan proba (<i>TLR9</i> ili HK)	0,25
Q H ₂ O	3,75
UKUPNI VOLUMEN	9

Za svaki set proba (*TLR9* i HK) pripremljena je smjesa prikazana u tablici 2. U svaki bunarić dodano je 9 µl smjese i 1 µl cDNA. Nakon nanošenja, uzorci su kratko centrifugirani i nakon toga stavljeni u uređaj CFX96™ Real-Time System. Uvjeti reakcije prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Program prema kojem se odvijala reakcija *real-time* PCR.

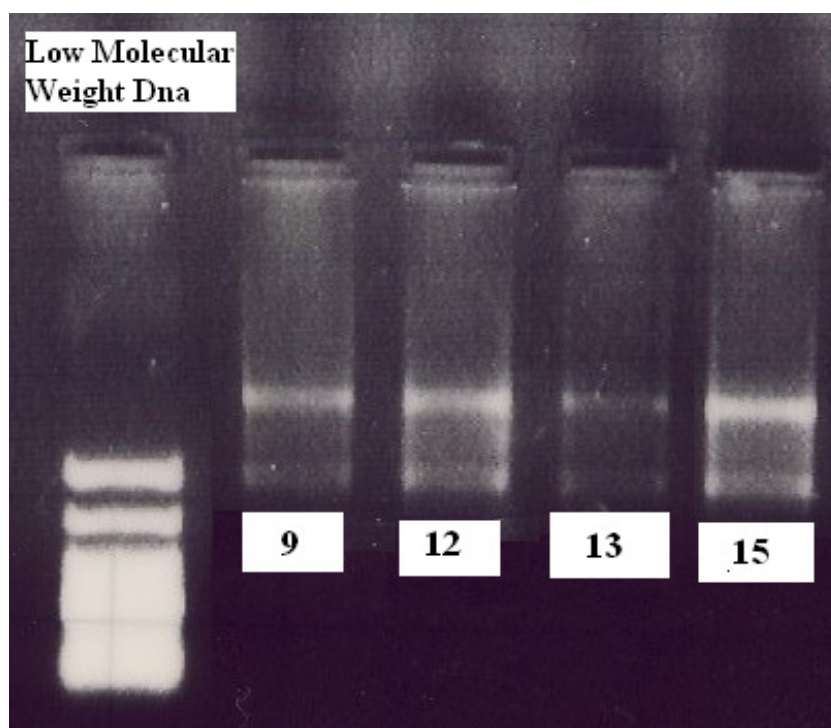
TEMPERATURA	VRIJEME (min)	CIKLUSI
95°C	10:00	1x
95°C	0:15	40x
60°C	1:00	
očitavanje fluorescencije		

4. REZULTATI

4.1. IZOLACIJA UKUPNE RNA IZ TKIVA TUMORA I ZDRAVIH TKIVA

Ukupna RNA izolirana je iz 45 uzoraka tkiva tumora hipofize, 20 uzoraka tkiva tumora pluća i 20 uzoraka zdravih tkiva pluća.

Koncentracije izoliranih RNA bile su u rasponu od 30,3 ng/μl do 1338,3 ng/μl. Sve izolirane RNA vizualizirane su osvjetljavanjem 1%-tnog gela agaroze ultraljubičastim svjetlom (slika 2).



Slika 2. Elektroforeze RNA uzoraka tumora hipofize 9, 12, 13, 15 uz korištenje molekularnog biljega „Low Molecular Weight DNA Ladder“ .

4.2. ANALIZA IZRAŽAJA GENA *TLR9* U TKIVIMA RAZLIČITIH TUMORA HIPOFIZE

Cilj ove analize bio je ispitati postoji li u tkivima različitih vrsta tumora hipofize izražaj gena *TLR9* i kolika mu je razina. S obzirom na vrstu hormona kojeg izlučuju ispitali smo: 14 prolaktinoma (izlučuju prolaktin, PRL), 6 tumora koji izlučuju hormon rasta (HR), 3 tumora koji izlučuju adrenokortikotropni hormon (ACTH), 1 tumor koji izlučuje hormon rasta i prolaktin (HR/PRL), 1 tumor koji izlučuje adrenokortikotropni hormon i prolaktin (ACTH/PRL), 11 nefunkcionalnih tumora (NFA) i 9 tumora čija nam dijagnoza nije poznata.

Iz svih 45 uzoraka tkiva tumora hipofize izolirana je ukupna RNA koja je potom pomoću mRNA-specifičnih početnica prepisana u cDNA. U svrhu određivanja izražaja gena *TLR9* korištene su ranije opisane komercijalno dostupne probe TaqMan, specifične za gene *TLR9* i eukariotsku 18S rRNA koja je korištenu kao domaćinski gen. Istovremeno smo priredili reakciju PCR u koju nije dodan kalup, tzv. NTC (od engl. *non template control*). Ct-vrijednost za uzorak NTC pokazuje u kojem ciklusu reakcije PCR dolazi do pojave fluorescentnog signala bez prisutnosti kalupa. Na taj način odredili smo osnovnu razinu fluorescencije, neovisnu o prisutnosti kalupa, koja je bila specifična samo za probe. Zaključili smo da svi oni uzorci koji imaju Ct-vrijednost nižu od Ct-vrijednosti za uzorak NTC, pokazuju određenu razinu izražaja gena od interesa, što se može smatrati povrdom izražaja gena.

Rezultati ovih analiza pokazali su da svi uzorci tkiva tumora hipofize izražavaju određenu razinu gena *TLR9*. Tablica 4 prikazuje izmjerene vrijednosti Ct za gen *TLR9* i HK u pojedinom uzorku, kao i izmjerene vrijednosti za kontrolu bez kalupa, NTC. Tablica 4

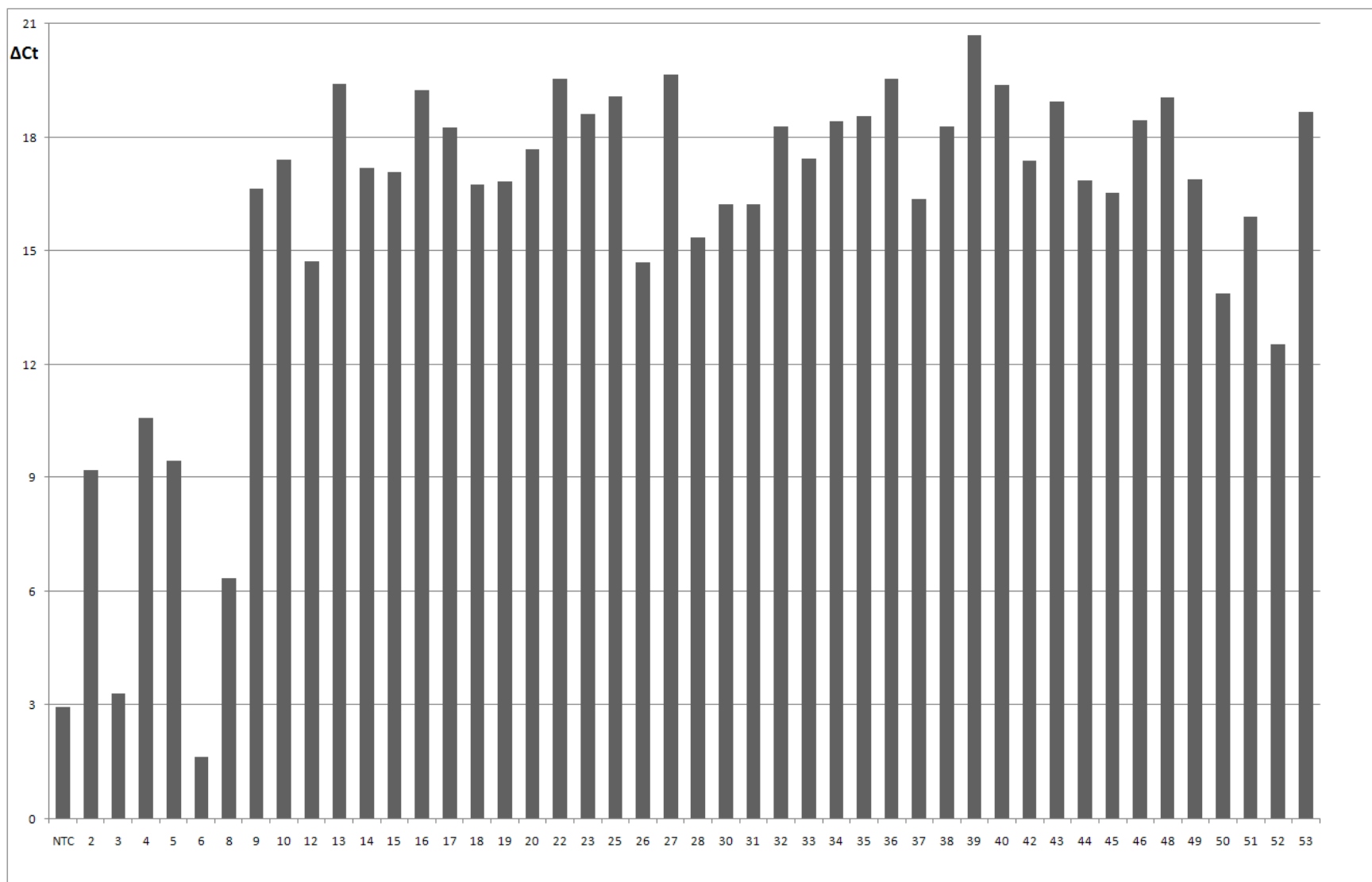
pokazuje i izmjerene vrijednosti ΔCt u pojedinom uzorku. Što je vrijednost ΔCt pojedinog uzorka manja, razina izražaja ciljnog gena je veća.

Tablica 4. Prikaz rezultata analize izražaja gena *TLR9* u tkivima različitih vrsta tumora hipofize iskazanih vrijednostima C_t i ΔCt .

uzorak	C_t (HK)	C_t (TLR9)	ΔCt (uzorak)	uzorak	C_t (HK)	C_t (TLR9)	ΔCt (uzorak)
NTC	32,43	35,39	2,96	28	18,97	34,33	15,36
				30	17,19	33,42	16,23
3	24,11	27,42	3,31	31	17,90	34,13	16,23
4	23,43	34,02	10,59	32	15,83	34,13	18,30
5	20,64	30,08	9,44	33	16,13	33,56	17,43
6	29,64	31,29	1,65	34	14,64	33,06	18,42
8	28,05	34,41	6,36	35	13,75	32,32	18,57
9	12,37	29,03	16,66	36	14,68	34,22	19,54
10	14,56	31,96	17,40	37	15,19	31,55	16,36
12	14,96	29,69	14,73	38	13,03	31,31	18,28
13	11,08	30,48	19,40	39	12,83	33,52	20,69
14	15,36	32,56	17,20	40	13,57	32,96	19,39
15	15,74	32,82	17,08	42	16,37	33,75	17,38
16	15,77	35,02	19,25	43	14,59	33,55	18,96
17	12,25	30,50	18,25	44	17,37	34,23	16,86
18	13,75	30,50	16,75	45	15,27	31,80	16,53
19	14,31	31,15	16,84	46	14,63	33,09	18,46
20	13,95	31,63	17,68	48	14,26	33,32	19,06
22	12,71	32,26	19,55	49	15,10	32,00	16,90
23	14,32	32,94	18,62	50	20,21	34,08	13,87
25	14,95	34,02	19,07	51	18,26	34,18	15,92
26	18,93	33,63	14,70	52	20,56	33,09	12,53
27	11,91	31,57	19,66	53	13,93	32,60	18,67

Opisanim metodama pokazali smo da je u analiziranim uzorcima tkiva tumora hipofize prisutna različita razina izražaja gena *TLR9*; u rasponu od izrazito visoke u 2 uzorka (4,4%; uzorci 3 i 6) do izrazito niske u 9 uzoraka (20%; uzorci 13, 16, 22, 25, 27, 36, 39, 40 i 48). Slika 3 grafički prikazuje vrijednosti ΔC_t za pojedine uzorke tkiva tumora hipofize.

S obzirom da nismo raspolagali zdravim tkivima hipofize, nismo bili u mogućnosti metodom relativne kvantifikacije odrediti razliku u izražaju gena *TLR9* između zdravog tkiva i tkiva tumora.



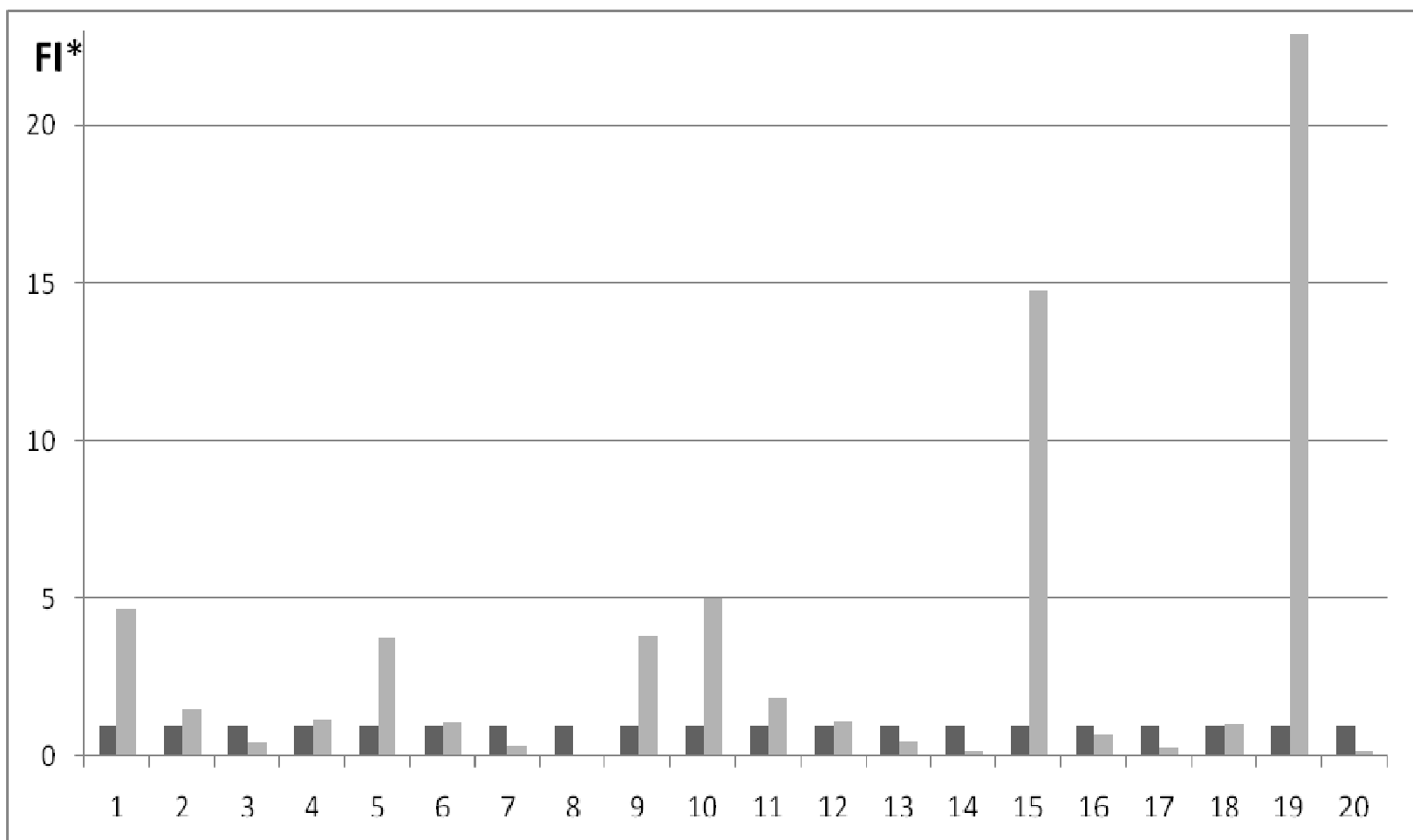
Slika 3. Grafički prikaz vrijednosti ΔC_t za pojedini uzorak tkiva tumora hipofize u svrhu određivanja razine izražaja gena *TLR9*.

4.3. ANALIZA IZRAŽAJA GENA *TLR9* U TKIVIMA TUMORA PLUĆA I ZDRAVIM TKIVIMA PLUĆA

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 20 uzoraka različitih vrsta tumora pluća i 20 pripadajućih zdravih tkiva pluća. Prema raspoloživim patohistološkim nalazima (za samo 10 uzoraka) radilo se o šest uzoraka planocelularnih karcinoma, tri uzorka adenokarcinoma i jednom uzorku karcinoma velikih stanica.

Reakcija *real-time* PCR pripremljena je za svih 20 uzoraka tkiva tumora pluća i 20 pripadajućih zdravih tkiva pluća. U tu svrhu korištene su probe TaqMan specifične za gen *TLR9* i domaćinski gen – eukariotsku 18S rRNA. Razlike izražaja gena *TLR9* u tkivima tumora pluća i tkivima zdravih pluća određene su korištenjem opisane komparativne $\Delta\Delta C_t$ metode.

Rezultati ove analize su pokazali (slika 4) povećani izražaj gena *TLR9* u 8 (40%) uzoraka, smanjeni izražaj u 8 (40%) uzoraka te nepromijenjen izražaj u 4 (20%) uzoraka, u odnosu na izražaj gena *TLR9* u pripadajućem zdravom tkivu pluća



Slika 4. Grafički prikaz rezultata analize komparativne $\Delta\Delta C_t$ metode na uzorcima tkiva tumora pluća (svijetlo obojeni stupci) i pripadajućim zdravim tkivima (tamno obojeni stupci).

*FI (od engl. *fold induction*) – normalizirana vrijednost izražaja gena

5. RASPRAVA

TLR9 je izražen većinom na stanicama imunološkog sustava i njegova od prije poznata funkcija je specifično vezanje nemetiliranih sljedova dvolančane DNA bakterijskog i viralnog podrijetla i pokretanje imunološkog odgovora. Međutim, postoje mnoga istraživanja koja su pokazala izražaj gena *TLR9* i na stanicama neimunskog sustava, konkretno tkivu tumora (Droemann i sur., 2005; Ilvesaro i sur., 2007; Lee i sur., 2007; Meng i sur., 2008; Ren i sur., 2007). Takvi nalazi mogli bi upućivati na zaključak da prisvajanjem prijenosa signala putem TLR9 tumor poboljšava svoj razvoj i agresivnost (Lee i sur., 2007).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoji li i koja je razina izražaja gena *TLR9* u različitim vrstama tumora hipofize. Rezultati analize izražaja gena *TLR9* na svih 45 uzoraka tumora hipofize pokazuju izmjerene Ct - vrijednosti ispod Ct - vrijednosti kontrole bez kalupa za gen *TLR9* čime smo potvrdili postojanje izražaja gena *TLR9* u svim analiziranim tumorima hipofize. Taj rezultat suglasan je s postojećim rezultatima istraživanja tumora pluća, prostate, grlića maternice i mozga gdje je dokazan izražaj gena *TLR9* u tkivu tumora (Droemann i sur., 2005; Ilvesaro i sur., 2007; Lee i sur., 2007; Meng i sur., 2008; Ren i sur., 2007).

Prijašnja istraživanja dokazuju povezanost funkcionalnog izražaja TLR9 s metastatskim potencijalom stanica tumora pluća te je moguće da sličnu ulogu TLR9 ima i u tumorima hipofize (Ren i sur., 2007). Tumorska invazija posredovana TLR9 mogla bi biti jedan od novih mehanizama kojima infekcije potiču nastajanje tumora hipofize. Dokazana je povezanost kronične infekcije humanim papilloma virusom (HPV) i razvoja raka grlića maternice, te se otvaraju mogućnosti da upala uzrokovana infekcijom bakterijskog ili

viralnog podrijetla može biti predkorak poremećenom prijenosu signala TLR9 i dugotrajnoj aktivaciji NF- κ B koja može voditi razvoju tumora. Također, otvara se i mogućnosti da smanjenje izražaja i poremećaj funkcija TLR9, uzrokovani određenom upalom, vode u supresiju domaćinovog imunološkog sustava (Hasan i sur., 2007).

Potrebna su daljnja istraživanja koja bi uključila analizu zdravog tkiva hipofize, kao i histološke metode kako bi se usporedili izražaj i funkcija TLR9 u tkivu tumora hipofize u odnosu na zdravo tkivo te mogao utvrditi eventualni terapijski značaj prijenosa signala posredstvom TLR9 kao mete novih strategija liječenja tumora.

Drugi postavljeni cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoji li izražaj gena *TLR9* u tkivima tumora pluća, mijenja li se i kako u odnosu na zdravo tkivo. Rezultati analize potvrđuju postojanje određene razine izražaja gena *TLR9* u svim tkivima tumora pluća što je suglasno s postojećim rezultatima istraživanja tumora pluća (Droemann i sur., 2005).

Značajno do umjereno povišen izražaj gena *TLR9* u tkivu tumora pluća u odnosu na zdravo tkivo mogao bi upućivati da je u tih oboljelih osoba prisvojen prijenos signala putem TLR9 kako bi se poboljšao razvoj i agresivnost tumora. Ovaj nalaz je u skladu s rezultatima nekih prijašnjih istraživanja povezanosti funkcionalnog izražaja TLR9 s metastatskim potencijalom stanica tumora pluća (Ren i sur, 2007).

Izražaj gena *TLR9* u tkivu tumora uzoraka koji je zanemarivo različit ili istovjetan onome u zdravom tkivu upućuje na zaključak da prijenos signala putem TLR9 u tih oboljelih osoba nije značajno promijenjen i ne može se dovesti u vezu s promjenom metastatskog potencijala tumora. Uzrok razvitka tumora pluća brojni su drugi geni i signalni putevi kao i okolišni čimbenici (Sung i sur., 2008) te je moguće da je u ovih

oboljelih osoba nastanak tumora nepovezan ili samo djelomično povezan s prijenosom signala TLR-ima.

Značajno smanjen izražaj gena *TLR9* u tkivu tumora u odnosu na izražaj u zdravom tkivu upućuje na činjenicu da u ovih oboljelih osoba prijenos signala receptorima TLR9 nije prisvojen kako bi poboljšao razvoj i agresivnost tumora. Čak se otvara mogućnost da je došlo do abnormalne supresije izražaja gena *TLR9* i prijenosa signala posredstvom TLR9 u stanicama tumora.

Za razjašnjenje nejednakog izražaja gena *TLR9* u tkivima tumora pluća potrebna su daljnja istraživanja koja bi obuhvatila mnogo veći broj uzoraka, ali i neke nove metode, kao npr. imunohistološko dokazivanje prisutnosti proteina TLR9 u tkivu tumora pluća. Nadalje, ukoliko bi se dokazala i funkcionalna aktivnost TLR9, mogla bi se pratiti eventualna povezanost kliničke slike oboljelih osoba s razinom izražaja gena *TLR9*. Naime, prijašnja istraživanja povezanosti funkcionalnog izražaja TLR9 s metastatskim potencijalom stanica tumora pluća (Droemann i sur., 2005; Ren i sur, 2007) doveli su u izravnu vezu pogoršanje kliničke slike pacijenata s tumorom pluća i povišeni izražaj gena i proteina TLR9. Također je pokazano da funkcionalno aktivni TLR9 u zloćudnim stanicama tumora pluća odgovaraju na tretman CpG oligonukleotidima produženim preživljenjem i otpuštanjem kemokina. Ovo bi moglo utjecati na razvoj novih strategija liječenja tumora korištenjem TLR9 agonista i antagonista (Droemann i sur., 2005). Tako brojne nove strategije liječenja oboljelih od raka uključuju razvoj agonista TLR9 za samostalno ili kombinirano liječenje s drugim lijekovima (Krieg 2007). Rezultati faza I i II kliničkih testiranja pokazuju da TLR9 agonisti mogu pojačati antitumorsko djelovanje limfocita T kada se koriste kao dodatak cijepivu (Krieg 2008).

6. ZAKLJUČCI

1. Svih 45 uzoraka tkiva tumora hipofize pokazuje određenu prisutnost izražaja gena *TLR9*, u rasponu od izrazito visoke u 2 uzorka (4,4%) do izrazito niske u 9 uzoraka (20%).
2. Svih 20 uzoraka tkiva tumora pluća i pripadajućih zdravih tkiva pokazuje prisutnost izražaja gena *TLR9*; u po 8 (40%) uzoraka pronađen je povećani ili sniženi izražaj gena *TLR9*, a u 4 (20%) uzoraka nepromijenjen, u odnosu na zdravo tkivo.
3. Potrebno je daljnje istraživanje koje bi obuhvatilo i analizu zdravog tkiva hipofize, kao i neke druge metode, kojima bi se usporedili izražaj i funkcija *TLR9* u tkivu tumora hipofize u odnosu na zdravo tkivo. Potrebna je i obrada mnogo većeg broja uzorka tkiva tumora pluća u svrhu daljnjih istraživanja izražaja i funkcije *TLR9* u odnosu na zdravo tkivo.

7. LITERATURA

Akira, S., Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511.

Barton, G.M., Medzhitov, R. (2002) Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 14, 380-383.

Barton, G.M., Medzhitov, R. (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300, 1524-1525.

Barton, G.M., Kagan, J.C., Medzhitov, R. (2006) Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*, 7, 49-56.

Bauer, S. (2006) Toll-erating self DNA. *Nat Immunol*, 7, 13-15.

Brodsky, I., Medzhitov, R. (2007) Two modes of ligand recognition by TLRs. *Cell*, 130, 979-981.

Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-193.

Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.A., Mor, G. (2007) Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am J Reprod Immunol*, 57, 93-107.

Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.A., Steffensen, K.D., Mor, G. (2008) Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene*, 27, 225-233.

Chuang, T.H., Ulevitch, R.J. (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw*, 11, 372-378.

Conroy, H., Marshall, N.A., Mills, K.H. (2008) TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells? A double-edged sword in immunity to tumours. *Oncogene*, 27, 168-180.

Croci, D.O., Zacarías Fluck, M.F., Rico, M.J., Matar, P., Rabinovich, G.A., Scharovsky, O.G. (2007) Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, 56, 1687-1700.

Diefenbach, A., Raulet, D.H. (2002) The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol Rev*, 188, 9-21.

Droemann, D., Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A.J., Branscheid, D., Vollmer, E., Dalhoff, K., Zabel, P., Goldmann, T. (2005) Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res*, 6, 1.

Eaton-Bassiri, A., Dillon, S.B., Cunningham, M., Rycyzyn, M.A., Mills, J., Sarisky, R.T., Mbow, M.L. (2004) Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*, 72, 7202-7211.

Hasan, U.A., Bates, E., Takeshita, F., Biliato, A., Accardi, R., Bouvard, V., Mansour, M., Vincent, I., Gissmann, L., Iftner, T., Sideri, M., Stubenrauch, F., Tommasino, M. (2007) TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*, 178, 3186-3197.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 740-745.

Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J.C., Feng, Z.H., Xiong, H. (2008) TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene*, 27, 218-224.

Ilvesaro, J.M., Merrell, M.A., Swain, T.M., Davidson, J., Zayzafoon, M., Harris, K.W., Selander, K.S. (2007) Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate*, 67, 774-781.

Janssens, S., Beyaert, R. (2003) Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*, 16, 637-646.

Karin, M. (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441, 431-436.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W. (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2, 301-310.

Kawai, T., Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13, 816-825.

Kawai, T., Akira, S. (2007) TLR signaling. *Semin Immunol*, 19, 24-32.

Killeen, S.D., Wang, J.H., Andrews, E.J., Redmond, H.P. (2006) Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *Br J Cancer*, 95, 247-252.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121, 1-14.

Krieg, A.M. (2007) Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest*, 117, 1184-1194.

Krieg, A.M. (2008) Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*, 27, 161-167.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95-125.

Lee, J.W., Choi, J.J., Seo, E.S., Kim, M.J., Kim, W.Y., Choi, C.H., Kim, T.J., Kim, B.G., Song, S.Y., Bae, D.S. (2007) Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog*, 46, 941-947.

Lu, B., Finn, O.J. (2008) T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death Differ*, 15, 70-79.

Meng, Y., Kujas, M., Marie, Y., Paris, S., Thillet, J., Delattre, J.Y., Carpentier, A.F. (2008) Expression of TLR9 within human glioblastoma. *J Neurooncol*, 88, 19-25.

Merrell, M.A., Ilvesaro, J.M., Lehtonen, N., Sorsa, T., Gehrs, B., Rosenthal, E., Chen, D., Shackley, B., Harris, K.W., Selander, K.S. (2006) Toll-like receptor 9 agonists promote

cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res*, 4, 437-447.

Mitra, R., Singh, S., Khar, A. (2003) Antitumour immune responses. *Expert Rev Mol Med*, 5, 1-19.

Nagaraj, S., Gabrilovich, D.I. (2008) Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 68, 2561-2563.

Ren, T., Wen, Z.K., Liu, Z.M., Liang, Y.J., Guo, Z.L., Xu, L. (2007) Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis. *Cancer Biol Ther*, 6, 1704-1709.

Stewart, T.J., Abrams, S.I. (2008) How tumours escape mass destruction. *Oncogene*, 27, 5894-5903.

Sung, H.J., Cho, J.Y. (2008) Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Rep*, 41, 615-625.

Takeda, K., Akira, S. (2001) Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*, 6, 733-742.

Takeda, K., Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.

Takeshita, F., Gursel, I., Ishii, K.J., Suzuki, K., Gursel, M., Klinman, D.M. (2004) Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol*, 16, 17-22.

Tsan, M.F. (2006) Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Semin Cancer Biol*, 16, 32-37.

de Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M. (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6, 24-37.

Whiteside, T.L. (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27, 5904-5912.

Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 75-85.

Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G. (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*, 6, 715-727.