

Uloga gena HOXB13 i njegovih supstrata u progresiji karcinoma jajnika

Šuštić, Tonći

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:217:118361>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tonći Šuštić

**Uloga gena *HOXB13* i njegovih supstrata
u progresiji karcinoma jajnika**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad, izrađen u Molecular Pathology Research Unit i Center for Cancer Research, Massachusetts General Hospital pod vodstvom Doc. dr. sc. Sandre Oršulić, Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, SAD, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici, Doc. dr. sc. Sandri Oršulić, na srdačnom vodstvu, izuzetnom strpljenju i susretljivosti, te na podršci koju mi nesebično pruža. Zahvalan sam i svim članovima njenog laboratorija, a posebice Dr. sc. Deyin Xing-u i Dr. med. Jiangyong Miao-u čiji su praktični savjeti i stručna pomoć bili dragocjeni pri izradi ovog rada. Isto tako ostajem trajno zahvalan Prof. dr. sc. Hrvoju Fulgosiu i Prof. dr. sc. Ivani Weygand-Đurašević koji su mi svojim preporukama omogućili izradu ovog rada.

Posebno se zahvaljujem suvoditeljici ovog rada, Prof. dr. sc. Nadi Oršolić, na ljubaznosti i stručnosti, te na prenesenom znanju i primjeru kojeg uvijek iznova pruža svojim iskustvom i odgovornošću. Srdačno se zahvaljujem i njenom asistentu, Pavlu Josipoviću, na velikoj podršci i savjetima pri pisanju rada.

Trajno sam zahvalan i svojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje u najboljim uvjetima, vjerovali u mene, te usadili neizbrisiv primjer morala i radne etike.

Tonći

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga gena *HOXB13* i njegovih supstrata u progresiji karcinoma jajnika

Tonći Šuštić

Laboratorij za molekularnu patologiju, Centar za istraživanje tumora, Massachusetts General Hospital; Zavod za patologiju, Harvard Medical School, Boston, MA 02129, S.A.D.

HOX geni se povezuju s različitim aspektima neoplastične progresije, budući da ektotopsko izražavanje nekih *HOX* gena promovira staničnu transformaciju *in vitro* i tumorogenezu *in vivo*. Pojačano izražavanje gena *HOXB13* primjećeno je kod visokog postotka tumora dojke i jajnika te se povezuje s izrazito agresivnim kliničkim tijekom. Početni cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj ektotopskog izražavanja gena *HOXB13* u genetički definiranim modelnim staničnim linijama karcinoma jajnika.

Western analizama posredno je identificirano nekoliko gena čije je izražavanje u visokoj pozitivnoj ili negativnoj korelaciji s izražavanjem gena *HOXB13*. Među ovim genima, posebno se istaknuo klasterin, gen čiji se proteinski produkt (CLU) javlja u dvije izoforme. sCLU posjeduje signalnu sekvencu za sekreciju van stanice te mu se pripisuje citoprotektivna uloga, dok je nCLU lokaliziran u citoplazmi, a u slučaju oštećenja stanice odlazi u jezgru gdje obavlja proapoptotsku ulogu. Kao dio projekta identifikacije novih molekularnih meta koje bi bile podložne terapijskoj intervenciji u karcinomu jajnika, ovaj rad opisuje proces dobivanja dviju novih staničnih linija koje predstavljaju primjere međusobno disjunktnih uloga klasterina. Dobivene modelne linije analizirane su *in vitro* i *in vivo*, te je dokazano stabilno ektotopsko izražavanje obiju klasterinskih izoformi.

(51 stranica, 18 slika, 4 tablice, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: karcinom jajnika, mišji model karcinoma jajnika, *HOXB13*, klasterin

Voditelj: dr. sc. Sandra Oršulić, doc.
Suvoditelj: dr. sc. Nada Oršolić, prof.
Ocjenitelji: dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, izv. prof.
dr. sc. Maja Matulić, doc.
dr. sc. Zoran Tadić, doc. (zamjena)

Rad prihvaćen: 2. prosinca 2009.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

***HOXB13* and its downstream targets in ovarian cancer progression**

Tonći Šuštić

Molecular Pathology Research Unit and Center for Cancer Research, Massachusetts General Hospital; Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA 02129, U.S.A.

The *HOX* genes have been implicated in different aspects of the oncogenic process, as ectopic expression of some *HOX* genes promotes cellular transformation *in vitro* and tumorigenesis *in vivo*. The observation that *HOXB13* is expressed in a high percentage of breast and ovarian cancer cell lines and tumors, and that the expression of *HOXB13* is associated with a more aggressive clinical course, led us to investigate the ectopic expression of *HOXB13* in genetically defined ovarian cancer cell lines.

We report identification of several putative *HOXB13* targets among which clusterin takes the most prominent role. Clusterin is present in two distinct isoforms, as secreted clusterin (sCLU) and as nuclear clusterin (nCLU). While the former is associated with cell survival, the latter is pro-apoptotic. As a part of the project aiming to identify new therapeutic targets for ovarian cancer, here we describe the generation of clusterin-overexpressing cell lines, representing two contradictory functions of clusterin. These cell lines have subsequently been analyzed using both *in vitro* and *in vivo* assays. Consequently, stable ectopic expression of both clusterin isoforms has been demonstrated.

(51 pages, 18 figures, 4 tables, 37 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Keywords: ovarian cancer, mouse model of ovarian cancer, *HOXB13*, clusterin

Supervisor: dr. sc. Sandra Oršulić, Asst. Prof.

Cosupervisor: dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, Assoc. Prof.

dr. sc. Maja Matulić, Asst. Prof.

dr. sc. Zoran Tadić, Asst. Prof. (substitute)

Thesis accepted: December 2nd, 2009

SADRŽAJ

1. UVOD	.1
1.1 Karcinom jajnika	1
1.2 Miševi kao modelni organizam u istraživanjima karcinoma jajnika	3
1.3 Opis korištenog modela	5
1.4 <i>HOX</i> geni	8
1.5 Onkogeni utjecaji gena <i>HOXB13</i>	11
1.6 Obrazloženje teme	15
1.6.1 Specifični cilj 1:	17
1.6.2 Specifični cilj 2:	17
2. MATERIJALI I METODE	18
2.1 Odmrzavanje i uzgoj stanica	18
2.2 Brojanje stanica	19
2.3 Izdvajanje staničnih proteina	20
2.4 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	20
2.5 Western blot analiza	21
2.5.1 Elektroforeza	21
2.5.2 Prijenos na membranu	22
2.5.3 Blokiranje	22
2.5.4 Inkubacija s protutijelima	23
2.5.5 Detekcija signala	24
2.6 Molekularno kloniranje	25
2.6.1 Transformacija kompetentnih stanica <i>E. coli</i>	25
2.6.2 Izolacija plazmidne DNA	26
2.6.3 Dvostruka digestija plazmidne DNA	27
2.6.4 Ligacija klasterina u pWZL Blast	29
2.7 Retrovirusna infekcija T1 stanica	30
2.7.1 Lipofekcija	30
2.7.2 Transdukcija	31
2.7.3 Selekcija	31
2.8 Injekcija transformiranih tumorskih stanica u imunodeficientne miševe	32

3. REZULTATI	33
3.1 <i>HOXB13</i> modulira gensko izražavanje u mišjim stanicama karcinoma jajnika	33
3.1.1 Pozitivni utjecaji gena <i>HOXB13</i>	33
3.1.2 Negativni utjecaji gena <i>HOXB13</i>	34
3.1.3 Pozitivan utjecaj gena <i>HOXB13</i> na N-cam (CD56) i klasterin nije ovisan o <i>K-ras</i> signalnom putu	35
3.2 Klasterin kao supstrat gena <i>HOXB13</i>	36
3.2.1 Gen za klasterin ugrađen je u vektor pWZL Blast	36
3.2.2 Ektotopsko izražavanje klasterina ne mijenja brzinu rasta umorskih stanica . . .	38
3.2.2.1 <i>in vitro</i>	38
3.2.2.2 <i>in vivo</i>	39
3.2.3 Western blot analiza T1-klasterin tumora	40
4. RASPRAVA	41
5. ZAKLJUČAK	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

1.1 Karcinom jajnika

Epitelni tumor jajnika odlikuje se najvišom stopom smrtnosti među svim ginekološkim malignim bolestima. U skupini tumorskih oboljenja, karcinom jajnika zauzima peto mjesto na ljestvici smrtnosti žena u Sjedinjenim Američkim Državama (Jemal i sur. 2002). Nije stoga čudno što upravo zloćudni tumori jajnika predstavljaju najveći izazov za kliničare koji se bave ginekološkom onkologijom. Poražavajuća je činjenica da, iako na rak jajnika otpada tek oko jedne četvrtine (23%) svih ginekoloških karcinoma, čak polovica (47%) svih smrti od genitalnog raka uzrokovana je upravo karcinomom jajnika. Od raka jajnika u Hrvatskoj obolijeva 15 od 100 000 žena, a učestalost raste i u zemljama koje su do sada sloville kao zemlje niskog rizika za tu bolest, poput Japana ili Indije. Podaci kazuju da će 1 od 56 novorođenih djevojčica tijekom života oboljeti od ove teške bolesti.

Osim što predstavlja izazov kirurzima, karcinom jajnika je i velika nepoznanica znanstvenoj javnosti. U vrijeme ubrzanog razvoja biomedicinskih znanosti, napredak u temeljnim istraživanjima karcinoma jajnika je bio izuzetno spor, i to uglavnom zbog nepostojanja prikladnih modelnih organizama. Važno je napomenuti da više od 85% tumora jajnika vuče porijeklo iz pokrovnog epitela, dakle riječ je o tzv. epitelnim tumorima, dok su ostali oblici neoplazmi jajnika znatno rjeđi. Brojni pokušaji rasvjetljavanja etiologije ovog karcinoma nisu urodili plodom, jer su se u eksperimentalnim životinjama gotovo bez iznimke razvijali tumori germinalne stanične linije ili stromalnih stanica, ali ne i tumori epitelnog postanka koji su karakteristični za ljudsku populaciju.

Nedostupna anatomska lokacija jajnika i asimptomatska priroda bolesti izuzetno otežava dijagnosticiranje karcinoma dok se on još razvija unutar jajnika. Čak i u kasnijim stadijima bolesti simptomi su uglavnom suptilni a uključuju nadutost, punoću ili pritisak u donjem dijelu trbuha ili zdjelici, bol u trbuhu ili donjim djelovima leđa, gubitak energije, često mokrenje, pečenje kod mokrenja, zatvor, nedostatak apetita, proljeve i mučninu. Ovo su sve redom vrlo uobičajeni simptomi koji se stoga vrlo često pogrešno dijagnosticiraju ili naprosto zanemare. Iz tog razloga, kod više od 75% pacijentica karcinom jajnika se dijagnosticira tek u odvedenoj fazi, i to redovito onda kada je već došlo do peritonealne diseminacije (Holschneider i Berek 2000). Za razliku od mnogih drugih epitelnih tumora koji stupnjevito napreduju i kod kojih se javljaju preneoplastične lezije, većina epitelnih tumora jajnika su invazivni karcinomi koji ne ostavljaju nikakav dokaz o postojanju međufaza benignog ili barem graničnog tipa.

Rak jajnika se najčešće širi tako da direktno zahvati susjedne organe ili pak dođe do eksfoliacije tumorskih stanica iz jajnika, nakon čega slijedi intraperitonealna diseminacija, implantacija i rast metastaza na mezotelnim površinama. Redovito dolazi i do peritonealne obstrukcije limfotoka što, skupa s čimbenicima vaskularne permeabilnosti, uzrokuje akumulaciju ascitesa. Nastali ascites potom dodatno olakšava mehaničku diseminaciju tumorskih stanica unutar abdominalne šupljine. Zbog gibanja peritonealne tekućine u smijeru kazaljke na satu, tumorske stanice uglavnom inicijalno dospijevaju u gornji dio abdominalne šupljine. Osim toga, tumor jajnika se može proširiti i na lokalne limfne čvorove. Za razliku od ostalih karcinoma, krvlju nošene metastaze su vrlo rijetke.

Terapija karcinoma jajnika redovito zahtijeva radikalni operativni zahvat koji najčešće uključuje histerektomiju (kirurško odstranjenje uterusa) s adnektomijom i omentektomijom. Nakon kraćeg poslijeoperacijskog oporavka slijedi kemoterapija, i to čak šest ciklusa polikemoterapije. To je stoga što se prilikom većine kirurških zahvata ustanovi da se tumor proširio po abdominalnoj šupljini pa ga je stoga nemoguće potpuno kirurški otkloniti. Cilj citoreduktivne operacije podrazumijeva uklanjanje čim je moguće više tumorskog tkiva, po mogućnosti bez da se ostavljaju noduli promjera većeg od 1 cm. Ovakav način liječenja ima jako skroman učinak na dugotrajno preživljenje pacijentica, pa se iz tog

razloga većina israživačkih napora usmjerava ka omogućavanju ranije detekcije ovog karcinoma. Takva znanstvena istraživanja su moguća samo uz efikasnu uporabu modelnih organizama u kojima bi se mogao rekapitulirati razvoj i patofiziološka obilježja humanog karcinoma.

1.2 Miševi kao modelni organizam u istraživanjima karcinoma jajnika

Tijekom osamdesetih i devedesetih godina dvadesetog stoljeća, istraživanja tumora jajnika su se uglavnom svodila na ksenotransplantacije humanih karcinoma, odnosno iz njih izvedenih staničnih linija, u imunodeficientne miševe (Hamilton i sur. 1984). Takvi eksperimenti su iznjedrili valjan i reproducibilan sustav koji je tada predstavljao najbolju moguću aproksimaciju izvornom humanom tumoru. Međutim, budući da su se stanične linije redovito izvodile iz pacijentica koje su bolovale od uznapredovalog karcinoma, dobivene stanične linije su već prije kultiviranja posjedovale kompleksan niz genetičkih promjena. Kompleksnost tih mutacija onemogućila je uvid u molekularne događaje koji su odgovorni za malignu transformaciju. Osim toga, ksenotransplantacija ljudskih stanica u imunodeficientne miševe lišava nas mogućnosti donošenja bilo kakvih zaključaka o ulozi imunološkog sustava u incijaciji i progresiji karcinoma jajnika, a upravo razumijevanje imunog protutumorskog odgovora u jajnicima moglo bi biti ključno u rasvjetljavanju mehanizama ove bolesti.

Tek razvojem singeničnih sojeva postalo je moguće proučavati interakcije tumor-domaćin, odnosno protutumorske imune mehanizme. Naime, za razliku od ljudskih tumorskih stanica koje je moguće uspješno presaditi samo u imunodeficientne miševe, transformirane mišje ovarijske stanice moguće je presaditi u singeničnog miša s intaktnim imunim sistemom (Roby i sur. 2000). U transformirane mišje stanične linije moguće je uvesti i nove gene za koje se sumnja da bi mogli imati ulogu u kancerogenezi.

Jedna od glavnih zapreka istraživanju karcinoma jajnika je nepostojanje laboratorijskih životinja koje spontano razvijaju ovaj oblik tumora. Karcinomi epitela jajnika

su kod životinja iznimno rijetki, a jedan od mogućih razloga za tu pojavu se možda krije u strukturnim i funkcionalnim razlikama pokrovnog epitela jajnika kod različitih vrsta. Drugim riječima, moguće je da pokrovni epitel humanih jajnika posjeduje neke specifične karakteristike koje ga čine osjetljivijim na neoplastičnu progresiju. Isto tako valja uzeti u obzir da životni vijek većine laboratorijskih životinja nije dovoljno dug za razvoj ovih neoplazmi, jer u ljudskoj populaciji, vrhunac incidencije epitelnog tumora jajnika nastupa tek u postmenopauzalno doba. To doba obilježavaju sljedeće promjene: (1) u jajnicima je istrošena zaliha spolnih stanica (oocita); (2) smanjena je razina estrogena u cirkulaciji zbog prestanka kontinuiranog razvoja folikula; (3) smanjenje proizvodnje estrogena prati povećanje sekrecije gonadotropina, luteinizacijskog hormona (LH), i folikul stimulirajućeg hormona (FSH); i (4) pokrovni epitel jajnika je prekriven jako izraženim strukturnim aberacijama koje su neminovna posljedica brojnih ovulacija, odnosno naglih puknuća nekad vrlo glatke ovarijske površine. Smatra se da akumulacija genetičkih aberacija u ostarjelim jajnicima, u kombinaciji s postmenopauzalnim uvjetima, predisponira jajnik na neoplastičnu progresiju.

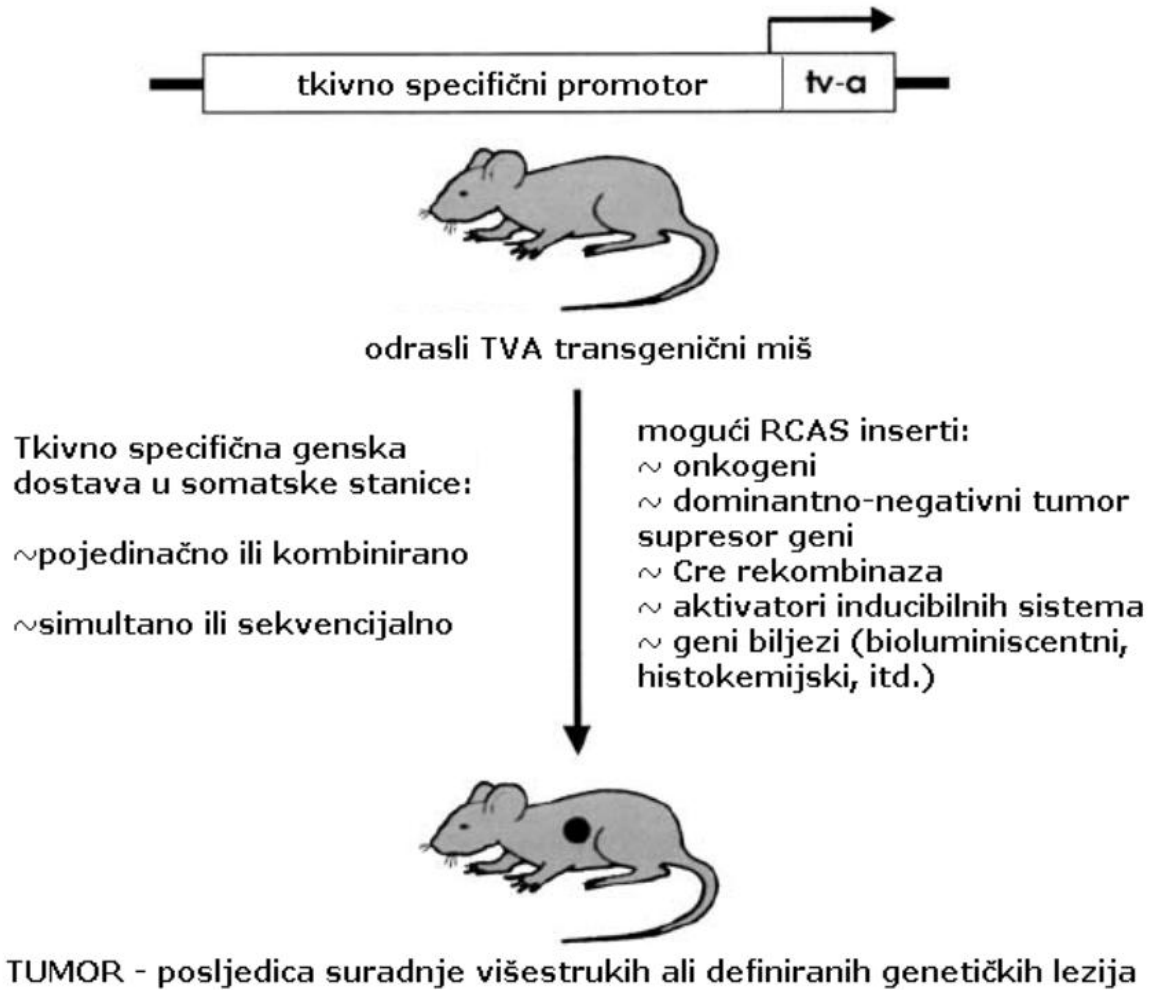
Dugo godina su istraživači diljem svijeta pokušavali dobiti prikladan model za proučavanje karcinoma jajnika. Ovi pokušaji su uglavnom uključivali simuliranje postmenopauzalnih uvjeta, i to na nekoliko načina; iscrpljivanjem zalihe oocita, inhibicijom ili stimuliranjem proizvodnje estrogena, odnosno gonadotropina, transformacijom uz pomoć raznih karcinogena, ozračivanjem X zrakama, neonatalnom timektomijom, i poticanjem procesa starenja. Međutim, pokazalo se da su neoplazme dobivene ovim metodama redovito stromalnog, a ne epitelnog postanka. Uspješno je generirano i nekoliko modela tumora spolnih stanica, ali budući da su neoplazme stromalnih i spolnih stanica kod ljudi izrazito rijetke, ovi modeli se naprosto nisu održali u kompetitivnom polju istraživanja karcinoma jajnika. Tek su nedavno napravljeni prvi koraci u dizajniranju mišjeg modela epitelnog ovarijskog tumora, što je od iznimne važnosti jer upravo iz pokrovnog epitela potječe velika većina ljudskih ovarijskih tumora. Ovaj uspjeh postignut je generiranjem genetički modificiranih miševa koji iskazuju snažnu predispoziciju ka razvoju epitelnog tumora jajnika, ali i direktnim uvođenjem onkogeni u pokrovni epitel ovarijskih stanica (Orsulic i sur. 2002).

1.3 Opis korištenog modela

Uspješna primjena tkivno specifičnih promotora omogućila je modeliranje brojnih malignih oboljenja, ali se na putu generiranja modela za karcinom jajnika isprječila činjenica da stanice pokrovnog epitela jajnika ne iskazuju nikakva specifična svojstva u odnosu na stanice pokrovnog epitela nekih drugih visceralnih organa. To je obeshrabrilu svaku inicijativu da se krene u potragu za tkivno specifičnim promotorom, a smatralo se da je isti neophodan za uspostavljanje ovakvog modela. Drugim rječima, nepoznavanje promotora specifičnog za ovarijski epitel postavilo je pred istraživače naizgled nepremostivu zapreku u pokušaju uspostavljanja linije genetički modificiranih miševa u čijim bi se stanicama ovarijskog epitela izražavanje određenih gena po volji moduliralo. Istraživači su se zato posvetili korištenju promotora onih gena koji se izražavaju u različitim tkivima, uključujući i pokrovni epitel jajnika. Tako su usljedili eksperimenti kojima se poticalo specifično izražavanje *SV40 TAg*, moćnog virusnog onkogeneta (Connolly i sur. 2003).

Iako su se takvim istraživanjima dobili tumori koji histološki podsjećaju na humane ovarijske neoplazme, obzirom da su se oni javljali kod vrlo mladih ženskih miševa, i to između 6-tog i 13-tog tjedna starosti, njihov razvoj vrlo vjerojatno nije predstavljao vjernu sliku onog koji se odigrava u postmenopauzalnih žena. Danas se s razlogom smatra da se većina humanih tumora razvija kao posljedica dugotrajnog akumuliranja brojnih genetičkih aberacija, pa je stoga prijeko potrebno razotkriti multigenetsku etiologiju karcinoma. Da bi se to postiglo, bilo je nužno razviti metode koje omogućavaju sekvencijalno uvođenje višestrukih genetičkih modifikacija u stanice sisavaca. Osim toga, potrebno je imati na umu da većina humanih tumora potječe iz somatskih stanica, odnosno da se inicijacija neoplazije odvija u odrasloj jedinki, za razliku od većine transgeničnih mišjih modela koji redovito nose genetičke modifikacije u germinalnoj liniji. Iz tog razloga razvijena je nova tehnika za simultano uvođenje većeg broja gena u somatske stanice odraslih miševa (Federspiel i sur. 1996). Ovaj sustav se bazira na uporabi ptičjeg RCAS virusa koji inficira specifično one stanice koje su unaprijed potaknute na izražavanje ptičjeg TVA (tumor virus A) receptora.

RCAS (Replication-Competent ASLV long terminal repeat with Splice acceptor) je izveden iz RSV-A (Rous sarcoma virus-A) zamjenom *src* gena s multiklonskom regijom koja može stabilno primiti insert veličine do 2,5 kb (Boerkoel i sur. 1993; Greenhouse i sur. 1988; Hughes i sur. 1987; Petropoulos i Hughes 1991).



Slika 1. Primjena RCAS-TVA metode za dobivanje mišjeg modela tumora somatskim prijenosom gena u točno određene stanične tipove. Ektotopska ekspresija *tv-a* gena, pod kontrolom tkivno ili stanično specifičnog promotora, čini transgeničnog miša podložnim infekciji ptičjim retrovirusom. Ovo omogućava uvođenje gena od interesa u točno određene somatske stanice odraslog miša. Sustav je dizajniran tako da se može koristiti i za procjenu suradnje većeg broja genetičkih lezija, dakle geni se mogu uvoditi pojedinačno ili u kombinaciji. Onkogeni virusi se mogu uvesti svi istovremeno, ili jedan iza drugog (sekvencijalno) kako bi se što bolje imitirala stupnjevita akumulacija genetičkih promjena u tumorskoj progresiji. Tumori koji nastaju kao posljedica primjene ove tehnike sadrže točno određene, definirane genetičke promjene i razvijaju se iz točno određenog staničnog tipa. (Orsulic 2002)

RCAS-TVA sustav omogućava ograničavanje virusne infekcije na točno određeno tkivo postavljanjem TVA pod kontrolu tkivno specifičnog promotora. Ovaj sustav je zato već iskorišten za dobivanje mišjih modela nekoliko humanih tumora, uključujući i tumor jajnika (Orsulic i sur. 2002). Zbog nedostatka promotora specifičnog za ovarijski epitel, korištena je linija transgeničnih miševa koji izražavaju TVA pod kontrolom keratin 5 promotora. Uvođenje gena specifično u jajnike Orsulic i sur. postigli su kirurškim izoliranjem jajnika, nakon čega je provedena infekcija RCAS vektorom *ex vivo*. Budući da su stanice pokrovnog epitela jajnika jedine stanice jajnika koje su potaknute na izražavanje TVA receptora, jedino su one bile podložne infekciji RCAS virusom. Nakon *in vitro* infekcije, stanice pokrovnog epitela se ortotopski injektiraju u imunokompetentne ili u imunodeficijentne miševe. U mišu primatelju tumori redovito postaju detektibilni unutar tri do šest tjedana nakon infekcije, i to ovisno o kombinaciji korištenih onkogeni (Sale i Orsulic 2006).

RCAS vektori se mogu dizajnirati tako da sadrže onkogene, dominantno negativne tumor supresor gene, ili različite gene biljege. Jednostavno rečeno, ova tehnika omogućava uvođenje genetički definiranih aberacija u epitelne stanice jajnika odraslog ženskog miša (Slika 1). Osim toga, ona pruža vrlo učinkovit način za procjenu suradnje određenih gena u onkogenezi jajnika što je iskorišteno za utvrđivanje minimalnog genetičkog zahtjeva za indukciju tumorigeničnog stanja u primarnim stanicama mišjeg epitela jajnika. Preciznije rečeno, uvođenjem kombinacija gena *c-myc*, *K-ras*, i *Akt* u stanice jajnika *p53*-negativnih miševa dokazano je da je gubitak gena *p53* i dodatak bilo koja dva onkogeni među *c-myc*, *K-ras* i *Akt* dovoljan da se inducira transformacija primarnih stanica mišjeg epitela jajnika (Orsulic i sur. 2002). Spomenute genetičke aberacije su često prisutne u ljudskim ovarijskim karcinomima, ali se unatoč tome ne zna na koji način one surađuju u procesu indukcije tumora.

Ortotopska implantacija *ex vivo* inficiranih ovarijskih stanica već za četiri do osam tjedana uzrokuje metastatski tumor jajnika, a pri tom je primjećeno i da vrijeme inkubacije ovisi o upotrebljenoj kombinaciji genetičkih promjena. Inicijalni rast tumora ograničen je na implantirani jajnik nakon čega slijedi širenje na susjedna tkiva i naposljetku metastatski rast

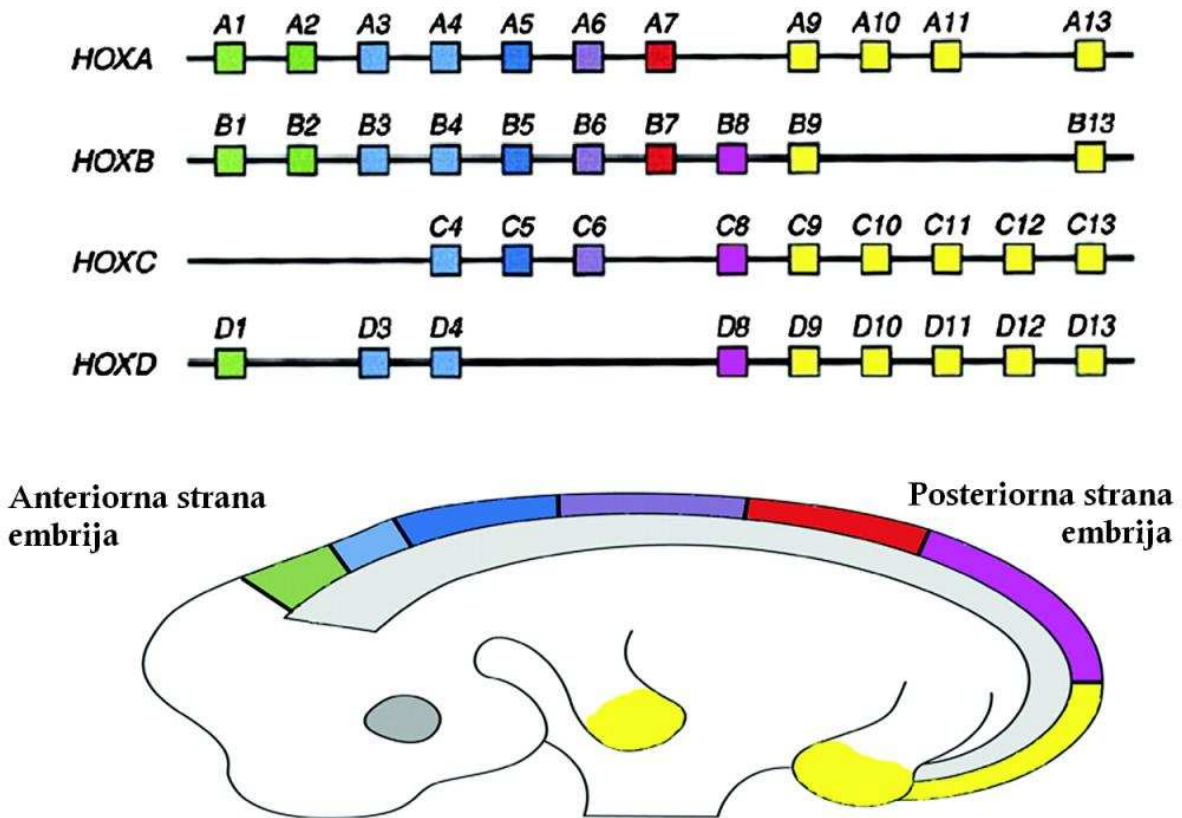
na raznim površinama intraperitonealnih organa i to s posebnim afinitetom prema omentumu i mezenteriju. Ovaj način rasta i metastatskog širenja, koji uključuje pojavu ascitesa i širenje po cijeloj peritonealnoj šupljini, je u visokoj korelaciji s načinom širenja humanog tumora, a metastaze, isto kao i kod čovjeka, ostaju unutar okvira peritoneuma. Sličnost ovog modela s humanim tumorima potvrđena je i na histološkoj razini. Naime, dobiveni tumori histološki nalikuju na serozne papilarne karcinome nađene kod pacijentica koje boluju od raka jajnika. Tako je ovaj model prvi pružio direktan eksperimentalni dokaz da je upravo površinski epitel jajnika izvorišno tkivo iz kojeg se razvijaju serozni ovarijski tumori.

Možda najveća zamjerka RCAS-TVA sustavu je da korištene genetičke manipulacije nisu nužno identične sporadičnim molekularnim događajima *in vivo*. Ipak, genetički precizno definirana narav ovog modela omogućuje proučavanje korelacije genotipa s fenotipom, što zapravo daje bitno jasniji uvid u doprinos pojedine genetičke promjene u procesu tumorske progresije i metastaze. Kada se bude znalo na koji način biokemijski putovi međusobno surađuju u indukciji tumorigeničnog stanja, tada će se moći razvijati i nove terapije koje će precizno ciljati biokemijsku mrežu tumora. Zbog toga što metastatsko ponašanje ovih modelnih tumora vjerno nalikuje onom koji je uočen u kliničkoj praksi, ovaj model će biti pogodan i za razvoj i testiranje novih terapijskih pristupa koji će ciljati na epitelni tumor u njegovoj odvedenoj fazi.

1.4 *HOX* geni

HOX geni spadaju u skupinu *homeobox* gena. To su geni koji sadrže evolucijski vrlo konzerviran motiv DNA duljine oko 180 pb (parova baza) koji kodira za homeodomen. Ona ima svojstvo vezanja za DNA čime utječe na regulaciju transkripcije drugih gena. *HOX* geni kodiraju porodicu evolucijski vrlo konzerviranih transkripcijskih faktora koji imaju ključnu ulogu u razvojnom definiranju anteriorno-posteriorne osi. Široj znanstvenoj javnosti poznati su po tome što njihove mutacije uzrokuju homeozu, pojavu transformacije jednog dijela tijela u drugi tijekom embrionalnog razvoja.

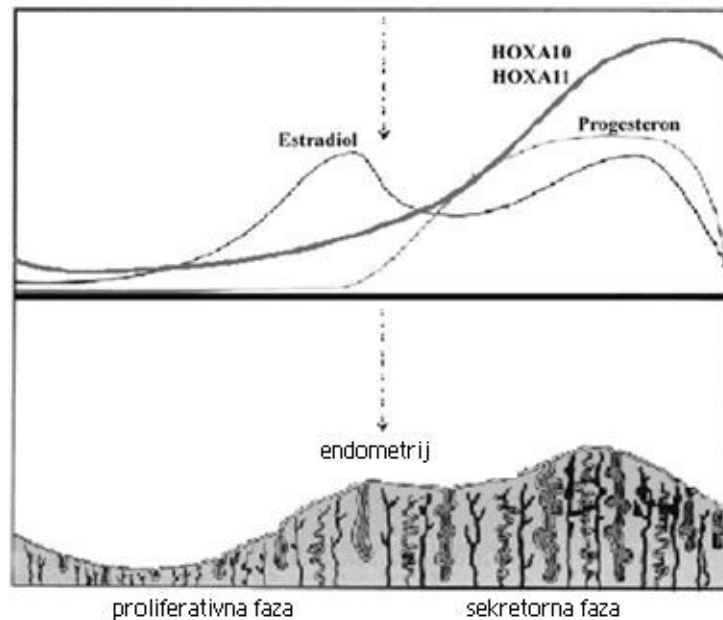
Osim izrazito visokog stupnja evolucijske konzerviranosti, za *HOX* gene je karakteristična pojava vremenske i mjesne kolinearnosti (Slika 2). Vremenska kolinearnost je korelacija između redosljeda gena na kromosomu i redosljeda njihove ekspresije tijekom embrionalnog razvoja. Za razliku od toga, mjesna kolinearnost podrazumijeva korelaciju između redosljeda gena na kromosomu i domena na embriju duž anteriorno-posteriorne osi gdje su eksprimirani ti geni (Imura i Pourquie 2007). Preciznije rečeno, geni smješteni bliže 3' kraju kromosoma izražavaju se ranije i više anteriorno od gena koji su bliže 5' kraju (Hadrys i sur. 2006).



Slika 2. Shematski prikaz genomske organizacije *HOX* klastera sisavaca. Donji dio slike prikazuje raspored izražavanja *HOX* gena tijekom embriogeneze jasno ukazujući na mjesnu kolinearnost. Iako su granice između ekspresijskih domena na ovoj slici oštro odvojene, u kaudalnim regijama dolazi do preklapanja granica njihovog utjecaja. (Daftary i Taylor 2006)

Produkti *HOX* gena (*HOX* proteini) utječu na izražavanje cijelog niza nizvodnih meta (supstrata). Ovaj utjecaj se ostvaruje preciznim vezanjem za regulacijske elemente točno određenih gena, a interakcija *HOX* proteina s DNA redovito uključuje i kofaktore koji povećavaju njenu specifičnost i afinitet. Nizvodne mete *HOX* proteina uključuju signalne proteine, receptore na staničnoj površini, ali i brojne transkripcijske faktore.

Iako je uloga *HOX* gena tijekom embriogeneze relativno dobro opisana, njihova uloga u odrasлом organizmu je još uvijek predmet aktivnog znanstvenog interesa. Tijekom života jedinke *HOX* geni vrlo vjerojatno doprinose održavanju razvojne plastičnosti raznih organa i tkiva. Poznato je da postoje tkiva i organi u kojima matične stanice procesom terminalne diferencijacije neprestano obnavljaju tkivo u kojem se nalaze. Taj proces cikličke zamjene starih stanica novima posebno je lako uočljiv kod hematopoeze, ili pak u reproduktivnim organima žene. Tako primjerice ciklička regeneracija endometrija maternice istovremeno uključuje proliferaciju i diferencijaciju više različitih staničnih linija, kao što su linije epitela, strome i endotela. Ovi procesi diferencijacije nalikuju onima koji se odigravaju tijekom embrionalnog razvoja jer iz nediferenciranih stanica nastaju strukturno i funkcionalno neovisna tkiva. Obzirom da je jasno karakterizirana uloga *HOX* gena u određivanju stanične sudbine tijekom embriogeneze, vrlo je vjerojatno da su isti geni odgovorni i za funkcionalnu diferencijaciju u odrasлом organizmu. U prilog tome ide činjenica da su *HOX* geni i u odrasлом tkivu, isto kao i u embriju, pod snažnom hormonskom regulacijom (Slika 3). Danas je razvidno da tijekom menstrualnog ciklusa *HOX* geni posreduju između steroidnih hormona (estrogena i progesterona) i odgovora kojeg isti uzrokuju (Daftary i Taylor 2006).



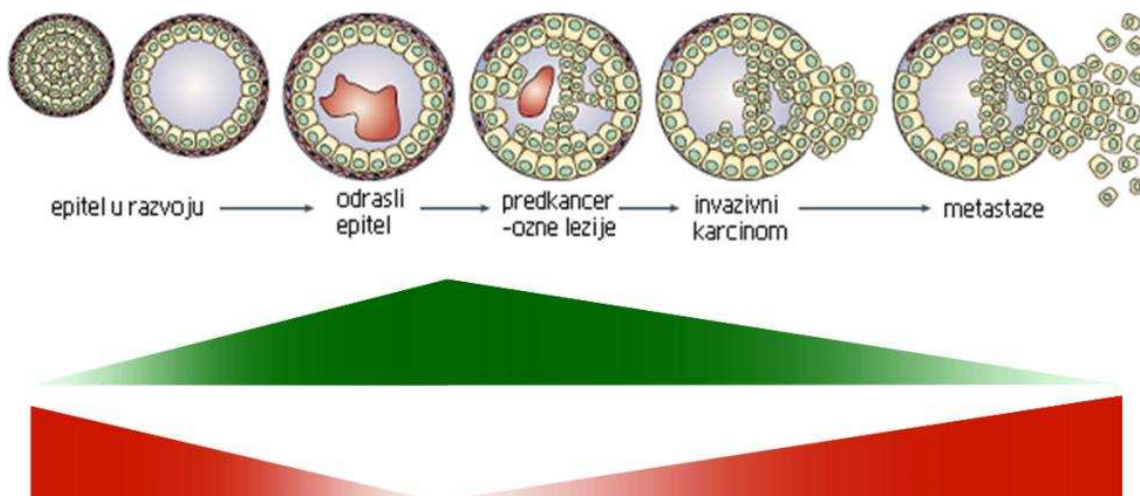
Slika 3. Dijagramski prikaz razina estradiola i progesterona tijekom menstrualnog ciklusa u korelaciji s lokalnim izražavanjem *HOXA10* i *HOXA11* u endometriju maternice. Estradiol i progesteron, vezani za svoje odgovarajuće receptore, lokalno potiču transkripciju ovih *HOX* gena. Visoka razina proteina *HOXA10* i *HOXA11* se vremenski podudara s visokim razinama estrogena i progesterona zajedno. Endokrini *HOX* signalni putovi posreduju u procesu funkcionalne diferencijacije odraslog endometrija, što omogućava implantaciju embrija. (Daftary i Taylor 2006)

1.5 Onkogeni utjecaji gena *HOXB13*

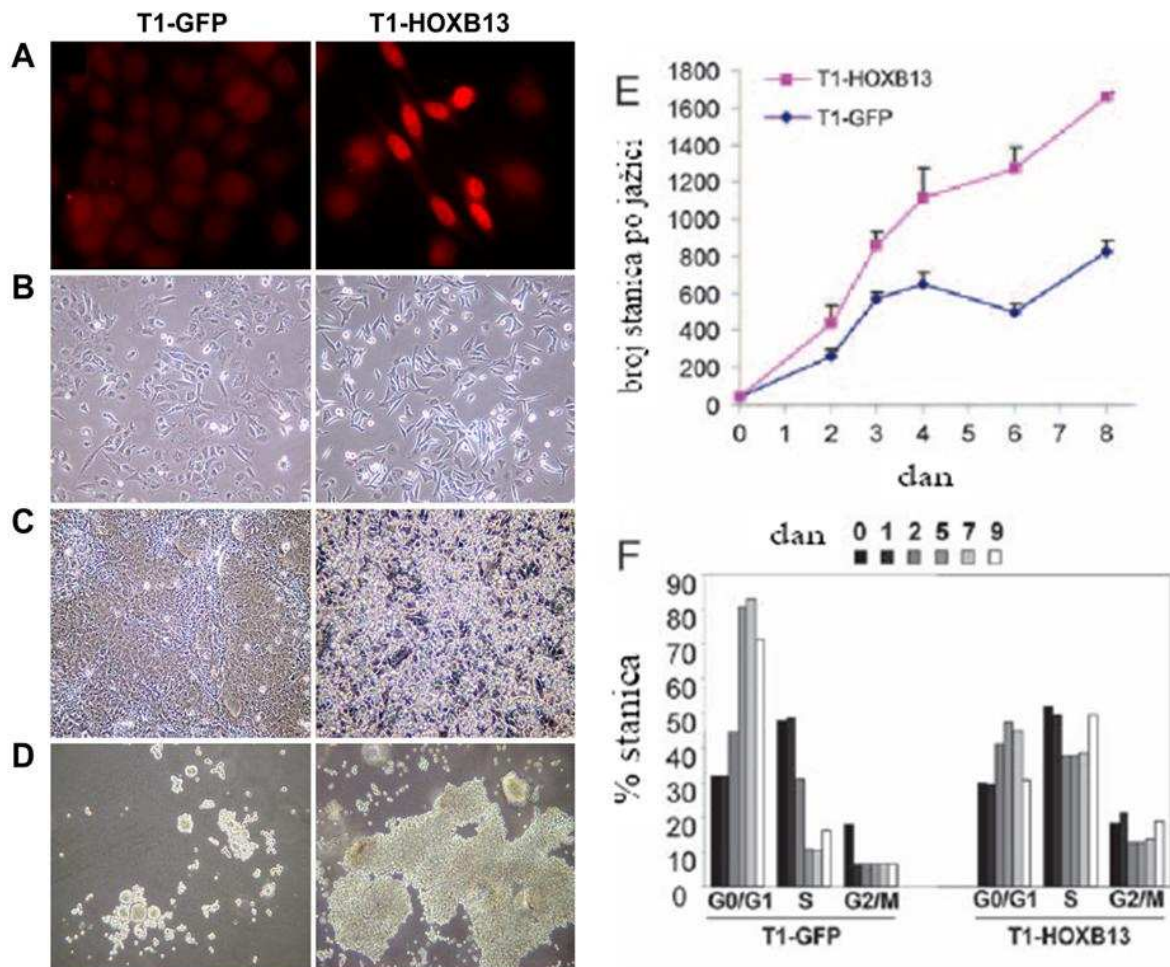
Nedavno je uočeno da ektotopsko izražavanje određenih *HOX* gena promovira straničnu transformaciju *in vitro* i tumorogenezu *in vivo*. Na primjeru estrogen receptor pozitivnih tumora dojke dokazan je visok stupanj korelacije između dereguliranog izražavanja *HOXB13* i agresivnog kliničkog tijeka bolesti (Ma i sur. 2004, Goetz i sur. 2006). U zdravom jajniku izražavanje *HOXB13* je gotovo uvijek ispod razine detekcije, ali je zato isti gen pojačano izražen kod mnogih neoplazmi dojke i jajnika (Yamashita i sur. 2006). Općenito se za homeobox gene može reći da njihovo izražavanje u tumorskom tkivu slijedi vrlo jednostavno pravilo: oni homeobox geni koji se normalno izražavaju u dediferenciranim stanicama doživljavaju pojačano izražavanje tijekom neoplastične progresije. Nasuprot tome, skupina homeobox gena koja se normalno izražava u diferenciranim tkivima doživljava

utišavanje izražavanja u tumorskom tkivu (Slika 4). Ovo, skupa s činjenicom da je izražavanje *HOXB13* u uskoj svezi s izrazito agresivnim kliničkim tijekom i niskom stopom preživljavanja oboljelih žena, otvara mogućnost da upravo *HOXB13* igra ključnu ulogu u tumorogenezi i/ili progresiji ginekoloških malignosti.

Mogućnost da izražavanje *HOXB13* pozitivno utječe na tumorski potencijal provjerena je u laboratoriju Dr. Sandre Oršulić ektotopskim izražavanjem ovog gena u T1 staničnim linijama. T1 stanice su izvedene iz mišjeg ovarijskog karcinoma a sadrže genetičke izmjene u genima *p53*, *c-myc* i *K-ras*. Endogeno izražavanje *HOXB13* u T1 stanicama je ispod razine detekcije QRT-PCR (quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction) metodom. T1 stanice iskazuju tipičnu epitelnu morfologiju, osjetljive su na kontaktnu inhibiciju i sposobne za formiranje kolonija u mekom agaru. Infekcija T1 stanica kontrolnim RCAS-GFP (green fluorescent protein) retrovirusom nije izmjenila ova svojstva u kulturi. Za razliku od toga, ektotopska ekspresija *HOXB13* u T1 stanicama rezultirala je vidljivom fenotipskom promjenom (Slika 5).



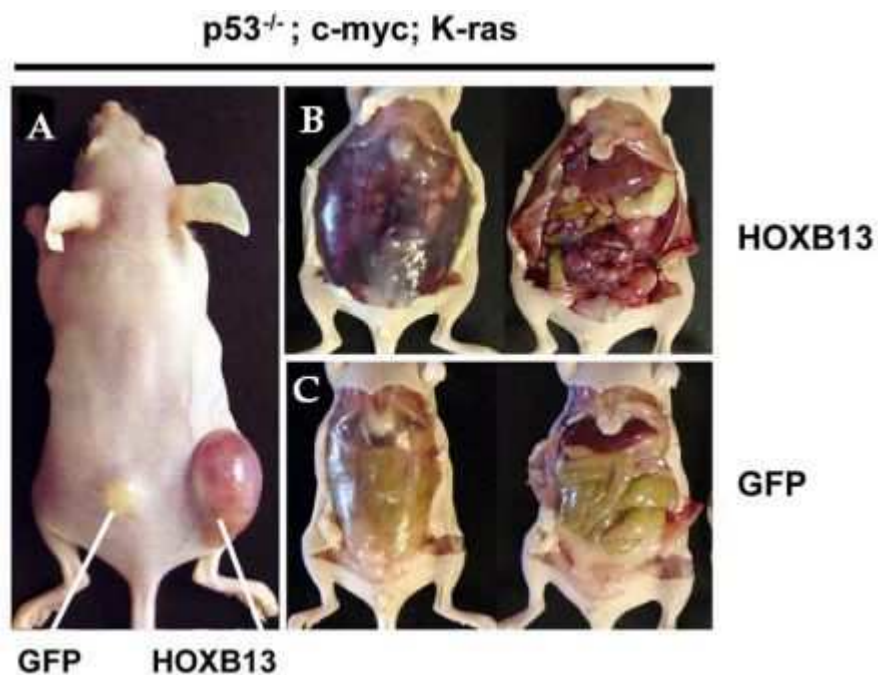
Slika 4. Izražavanje homeobox gena tijekom embriogeneze, u odraslom diferenciranom tkivu, i tijekom kancerogeneze. Homeobox geni koji se pojačano izražavaju u ranom embriju bivaju utišani u procesu stanične diferencijacije, i potom ponovo aktivirani u procesu kancerogeneze. Razina njihovog izražavanja slikovito je prikazana crvenom bojom. Suprotno tome, druga skupina homeobox gena izražena je samo u diferenciranim stanicama (odrasli epitel). Njihovo izražavanje se drastično smanjuje tijekom maligne progresije što je slikovito prikazano zelenom bojom. (Abate-Shen 2002)



Slika 5. Ektotopsko izražavanje gena *HOXB13* u T1 staničnim linijama karcinoma jajnika. (A) Imunofluorescencijska detekcija HOXB13 proteina u T1 stanicama inficiranim kontrolnim RCAS-GFP retrovirusom (T1-GFP) i T1 stanice inficirane RCAS-HOXB13 retrovirusom (T1-HOXB13). (B,C) Morfologija T1-GFP i T1-HOXB13 stanica u jednoslojnoj kulturi pri niskoj (B) i visokoj (C) gustoći. (D) Reprezentativan prikaz višestrukih neovisnih eksperimenata stanične proliferacije u mekom agaru. (E i F) Krivulja rasta (E) i analiza staničnog ciklusa (F) T1-GFP i T1-HOXB13 stanica. (Miao i sur. 2007)

Među morfološkim promjenama koje na razini stanice uzrokuje poticanje izražavanja *HOXB13*, nedvojbeno najuočljivija je izmjena oblika stanice iz epitelnog u mezenhimski tip. Naime, epitelne stanice kvadratasto-ovalnog oblika naglo su se izdužile i tako poprimile vretenast, mezenhimski oblik. Kad su postavljene na rast u visokoj gustoći, T1-HOXB13 stanice su iskazale očit gubitak kontaktne inhibicije, trodimenzionalan rast u kulturi, smanjenu staničnu koheziju i bržu proliferaciju u odnosu na T1-GFP stanice. Osim toga, T1-HOXB13 stanice su i u mekom agaru prolazile diobu bitno brže od T1-GFP stanica.

Kako bi se otkrilo na koji način *HOXB13* utječe na tumorsku progresiju *in vivo*, u laboratoriju Dr. Oršulić subkutano su injicirane stanice T1-HOXB13 i T1-GFP u imunodeficijentne (gole) miševe (Slika 6, A). T1 stanice 3 do 4 tjedna nakon injekcije generiraju tumorsku masu veličine oko 0,5 cm³, a isti se rast postiže i injiciranjem T1-GFP stanica. Za razliku od toga, injekcija T1-HOXB13 stanične suspenzije rezultirala je bitno bržim rastom. Kod svih 30 injiciranih miševa već između 9-tog i 19-tog dana nakon injekcije razvili su se tumori veći od 1,4 cm³. Slično tome, intraperitonealna injekcija T1-HOXB13 stanica u gole miševe uzrokovala je, uz tumor, i pojavu ascitesa već za 12 dana. Za to isto vrijeme kod miševa injiciranih s T1-GFP stanicama nije došlo do formiranja ascitesa (Slika 6, B i C). Iz ovoga se može zaključiti da je, barem u mišjem modelu karcinoma jajnika, *HOXB13* efikasniji u poticanju tumorskog rasta od bilo kojeg dosad testiranog onkogeno među koje spadaju *K-ras*, *Akt*, *Her-2* i *srednji T-antigen* (Miao i sur. 2007).



Slika 6. HOXB13 na mišjem modelu uzrokuje ubranu progresiju karcinoma jajnika. Slika prikazuje razlike u rastu tumora kod miševa koji su injicirani subkutano (A), ili intraperitonealno (B, C) s T1 stanicama inficiranim s RCAS-HOXB13 u usporedbi s T1 stanicama inficiranim s RCAS-GFP. (Miao i sur. 2007)

1.6 Obrazloženje teme

Protein HOXB13 pripada obitelji transkripcijskih faktora, ali njegove vlastite transkripcijske mete još nisu identificirane. Cilj ovog istraživanja je ispitati uloge HOXB13 u progresiji karcinoma jajnika putem identifikacije i analize njegovih direktnih i indirektnih supstrata. Obzirom da HOXB13 iskazuje visoku strukturnu sličnost s ostalim članovima HOX obitelji, on sam ne predstavlja dobru metu za ciljanje farmakološki aktivnim tvarima, ali bi to zato itekako mogli biti supstrati njegovog signalnog puta. Iz tog razloga smo se i odlučili na ovaj pothvat. Kako bih razumio uloge gena *HOXB13* u progresiji karcinoma jajnika i identificirao moguće terapijske mete, u ovom istraživanju sam koristio genetički definiran mišji model karcinoma jajnika.

Oslonac za ovaj pothvat pružilo je uspoređivanje ekspresijskih profila tumorskih uzoraka koji ektotopski izražavaju *HOXB13* u odnosu na one tumore čije stanice imaju zanemarivu ekspresiju ovog gena. Dio dobivenih podataka prikazan je u Tablici 1. Tom inicijalnom analizom otkriveno je otprilike stotinjak gena čije izražavanje je u visokoj korelaciji s izražavanjem *HOXB13*, a neki od njih su se već prije povezivali s neoplastičnom progresijom. Na primjer, visok nivo klasterina je nađen kod brojnih malignih oboljenja, uključujući i rak jajnika (Xie i sur. 2005), a u laboratoriju Dr. Oršulić je pokazano da je izražavanje klasterina više od 10 puta snažnije u T1-HOXB13 tumorima nego u T1-GFP tumorima (Tablica 1). Krenuli smo zapravo od pretpostavke da neki od gena koje je ekspresijska analiza iznjela na vidjelo predstavljaju direktne ili indirektne nizvodne mete HOXB13 i stoga zahtjevaju daljnju analizu. Cilj ovog projekta je izdvojiti iz liste potencijalnih supstrata one gene koji su odgovorni za pro-proliferativni učinak *HOXB13*. Identifikacija supstrata će omogućiti njihovo testiranje u terapijske svrhe.

Tablica 1. Dio podataka dobivenih ekspresijskom analizom T1-GFP i T1-HOXB13 tumora. T1-GFP stanice injicirane su subkutano dorzalno lijevo, dok su T1-HOXB13 stanice injicirane na desnu stranu istog miša, kao što prikazuje slika 6, A. Fragmenti klasterinske cDNA su utisnuti na više mjesta na *chip*-u, a zabilježeni nivo izražavanja gena ovisi o intenzitetu hibridizacije sa svakim pojedinim cDNA fragmentom. Klasterin je ovdje označen kao primjer gena čije se izražavanje višestruko povećava u tumorima koji ektotopski izražavaju HOXB13. Razlika brojčanih vrijednosti u prvom i drugom stupcu odraz je razlika u stupnju hibridizacije odgovarajućih mRNA.

medijan GFP	medijan HOXB13	simbol gena	puni naziv gena
7,69	238,4	Car1	ugljična anhidraza 1
529,25	5831,79	Ly6a	lokus A kompleksa limfocitnog antigena 6
82,68	1206,8	Gstt1	glutation S-transferaza, theta 1
13,74	444,85	Htr3a	5-hidroksitriptamin (serotonin) receptor
9,75	66,87	Epb4,114b	eritrocitni protein, vrpca 4,1 - sličan 4b
123,2	3874,71	Clu	klasterin
26,13	301,33	Cyp26a1	citokrom P450, obitelj 26, podobitelj a
11,44	1036,42	Areg	amfiregulin
8,75	970,63	Gcg	glukagon
25,9	276,75	Qpct	glutaminil-peptid ciklotransferaza
59,91	405,09	Scara3	scavenger receptor klase A, član 3
16,38	526,32	Mfap31	protein sličan proteinu 3 asociranom uz mikrovlakna
9,99	1256,33	Aard	protein bogat Ala i Arg domenama
30,6	318,88	Gpr126	receptor vezan za G-protein 126
3565,39	28373,52	Clu	klasterin
75,48	956,7	Gpr85	receptor vezan za G-protein 85
2796,44	26509,08	Clu	klasterin
46,86	866,17	Foxp2	<i>forkhead box P2</i>
40,47	612,91	Vnn1	vanin 1
25,5	1278,87	Car2	ugljična anhidraza 2
274,37	15463	Car3	ugljična anhidraza 3
14,55	1630,35	Tslp	limfopoietin strome timusa
1810,06	21359,27	Clu	klasterin

1.6.1 Specifični cilj 1:

Obzirom da ekspresijska analiza informira samo o količini određenih mRNA u stanici, prvi specifični cilj ovog istraživanja je potvrditi ili osporiti dobivene podatke na proteinskoj razini. Preciznije rečeno, western blot analizom planiram utvrditi imaju li neki od gena koje je na vidjelo iznjela ekspresijska analiza deregulirano proteinsko izražavanje. Kako bih to postigao, uspoređivat ću lizate T1-GFP i T1-HOXB13 stanica i vidjeti na koji način pojačano izražavanje gena *HOXB13* utječe na količinu određenih proteina u stanici. Osim toga, uporaba specifičnih antitijela omogućit će otkrivanje posttranslacijskih modifikacija koje bi se mogle dogoditi kao posljedica onkogenog djelovanja *HOXB13*.

1.6.2 Specifični cilj 2:

Drugi specifični cilj ovog istraživanja obuhvaća funkcionalnu karakterizaciju onih gena koji su dovoljni da izazovu tumorigenična svojstva *HOXB13* izražavajućih stanica. Drugim riječima, nakon što se odlučim za vjerojatne nizvodne mete *HOXB13* signalnog puta, moj cilj je identificirati one gene preko kojih *HOXB13* vrši svoje pro-proliferativne uloge. Kako bih to postigao, provjerit ću jesu li geni koje izaberem dovoljni da sami izazovu promjene slične onima koje izaziva *HOXB13*. Izabrene gene ću direktno transfecirati u T1 stanice i potom pratiti rast tako promijenjenih stanica *in vitro* (u staničnoj kulturi) i *in vivo* (subkutanim injekcijama u imunodeficientne miševe).

Pretpostavljam da će se pravom kombinacijom nizvodnih meta moći rekapitulirati agresivni fenotip *HOXB13* eksprimirajućih stanica. Mišji model karcinoma jajnika kojeg ću koristiti omogućava simultano promatranje više različitih konstrukata (primjerice istovremeno pojačano izražavanje klasterina i dominantno-negativnog E-kadherina). Od posebnog su interesa oni geni koji su nužni za onkogensku aktivnost *HOXB13*, jer samo oni mogu poslužiti kao dobre terapijske mete. U ovom radu koristim klasterin kao primjer kojim ću opisati individualni eksperimentalni pristup analizi potencijalnih supstrata.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Odmrzavanje i uzgoj stanica

Prvi korak u izradi ovog rada uključivao je odmrzavanje prethodno uspostavljenih staničnih linija T1-GFP i T1-HOXB13. Izvorna stanična linija T1, izvedena iz metastatskog tumora jajnika laboratorijskih miševa, negativna je na tumor supresor gen *p53*, a sadrži aktivirane onkogene *c-myc* i *K-ras*. Riječ je o stanicama epitelne morfologije koje su potom u kulturi inficirane retrovirusnim vektorom RCAS u kojeg je ukloniran gen *HOXB13*. Tako nastala stanična linija nazvana je T1-HOXB13. Paralelno s njom, uspostavljena je i kontrolna stanična linija T1-GFP, također inficirana retrovirusnim vektorom RCAS ali takvim u kojeg je, umjesto gena za HOXB13, prethodno ugrađen gen za GFP (*green fluorescent protein*).

Iz tornja s tekućim dušikom (-196°C) sam izvadio ampule sa staničnim linijama T1-GFP i T1-HOXB13, te ih premjestio u toplu vodenu kupelj (37°C). Otopljene stanične suspenzije prenio sam u 5 ml kompletirane tekuće hranjive podloge i centrifugirao 5 min pri $600 \times g$. Supernatant sam odlio, a talog resuspendirao u novih 5 ml kompletne hranjive podloge te nasadio u sterilne petrijevke za uzgoj staničnih kultura promjera 10 cm. U petrijevke sam dodao još 5 ml kompletirane hranjive podloge i spremio ih u inkubator pri 37°C, u atmosferu zasićenu vodenom parom i uz prisustvo 5% CO₂.

Tekuću hranjivu podlogu koju sam koristio za resuspenziju, i kasnije za uzgoj ovih stanica, pripremljao sam na sljedeći način: u 500 ml nekompletirane tekuće hranjive podloge DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*, Mediatech, SAD) dodao sam 50 ml goveđeg fetalnog seruma FBS (*Fetal Bovine Serum*, Mediatech, SAD) i 5 ml otopine koja

sadrži L-glutamin, te antibiotike penicilin i streptomycin (*Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine*, Mediatech, SAD).

Kada bi stanice dosegle potpunu konfluentnost, presađivao sam ih na sljedeći način: usisao sam tekući medij iznad stanica, isprao PBS-om (*Phosphate-Buffered Saline without calcium and magnesium*, Mediatech, SAD), dodao 3 ml otopine tripsina (*Trypsin EDTA 1×*, Mediatech, SAD) te inkubirao pri 37°C tri do četiri minute. Tada sam stanice resuspendirao u 10 ml svježeg medija i centrifugirao 2 min pri 600 × g. Talog stanica sam potom ponovo resuspendirao i nasadio u nove sterilne petrijevke s 10 ml svježe pripravljene kompletirane tekuće hranjive podloge.

2.2 Brojanje stanica

Nakon tripsinizacije i resuspendiranja stanica, staničnu suspenziju sam razrijedio 5 puta, te pomiješao s tripanskim modrilom (*Trypan Blue*, Mediatech, SAD) u omjeru 1:1. Alikvot novonastale suspenzije prenio sam u komoricu za brojanje stanica (hemocitometar) te izbrojao stanice u 64 polja koristeći svjetlosni mikroskop (povećanje 400 ×). Brojao sam neobojene, žive stanice, a njihovu koncentraciju u izvornoj suspenziji računao prema formuli:

$$\text{broj stanica u 1 ml izvorne suspenzije} = \frac{\text{ukupan broj izbrojanih stanica}}{\text{volumen ispod pokrovnice}} \times \text{razrjeđenje}$$

Obzirom da volumen ispod pokrovnice iznosi 4×10^{-4} ml, a ukupno razrjeđenje 10, ista formula se može i jednostavnije pisati:

$$\text{broj stanica u 1 ml izvorne suspenzije} = \text{ukupan broj izbrojanih stanica} \times 25\,000$$

2.3 Izdvajanje staničnih proteina

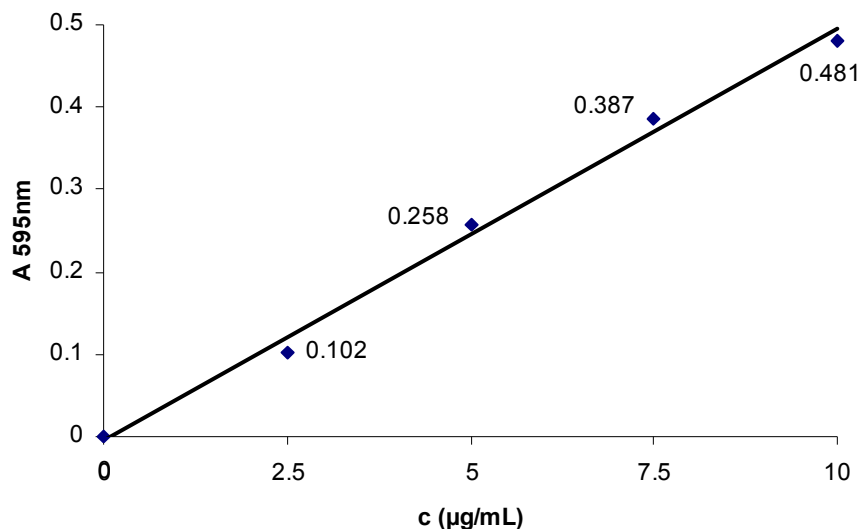
Pufer za izdvajanje staničnih proteina pripremio sam otapanjem tablete koja sadrži inhibitore proteaza i fosfataza (*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet*, Santa Cruz Biotechnology, SAD) u 10 ml pufera za razbijanje stanica (*RIPA Lysis Buffer*, Santa Cruz Biotechnology, SAD).

Stanične linije T1-GFP i T1-HOXB13, koje sam prethodno uzgojio do ~70% konfluentnosti, isprao sam 3 puta PBS-om (*Phosphate-Buffered Saline without calcium and magnesium*, Mediatech, SAD) pri sobnoj temperaturi. Nakon trećeg ispiranja, petrijevke sa stanicama sam prenio u hladnu sobu (na 4°C), te dodao 1 ml pufera za izdvajanje staničnih proteina. Nakon 2 minute inkubacije, površinu petrijevki sam ostrugao strugalicom i tako dobivenu suspenziju prenio u *Eppendorf* ampule koje sam potom postavio na zibalicu. Nakon dodatnih 10 min inkubacije, centrifugirao sam 10 min, pri $10\,000 \times g$, na 4°C. Supernatant sam prenio u nove ampule koje sam pohranio pri -80°C, a talog odstranio.

2.4 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koristeći laboratorijsku otopinu albumina goveđeg seruma BSA (*Beef Serum Albumin*) poznate koncentracije (12,5 µg/ml), priredio sam 5 standardnih otopina koncentracija 0, 2,5, 5, 7,5 i 10 µg/ml. U ove otopine poznate koncentracije sam dodao Bradford reagens (*Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate*, Bio-Rad, SAD) u omjeru 1:5. Nakon 3 minute inkubacije, izmjerio sam apsorbanciju pri 595 nm (čitač *BioMate3, UV-Vis Spectrophotometer*, Thermo Scientific, SAD), a iz dobivenih podataka dobio baždarnu krivulju (Slika 7).

Uzorke nepoznate koncentracije sam razrijedio 1:1200, te postupio na isti način kao i kod standarda. Dobivenu vrijednost koncentracije sam umnožio s vrijednošću razrjeđenja.



Slika 7. Baždarna krivulja dobivena mjerenjem apsorbancije (pri 595 nm) uzoraka poznate koncentracije. Na osnovu ove krivulje, utvrđivao sam koncentracije proteina u priređenim ekstraktima. Ako je vrijednost prelazila 10 $\mu\text{g/ml}$, dani uzorak sam dodatno razrijedio.

2.5 Western blot analiza

2.5.1 Elektroforeza

Ampule s proteinskim ekstraktima sada poznate koncentracije sam izvadio iz -80°C te odmrzavao polagano, na ledu. Nakon odmrzavanja sam dodao *loading* puffer (*Protein Loading Buffer Blue* ($2\times$), National diagnostics, SAD) u omjeru 1:1, te postavio ampule u vrući pijesak (95°C) na 4 min. Uzorke sam potom vorteksirao i stavio na led (4°C). Poznavanje koncentracija proteina u uzorcima omogućilo mi je izračun volumena koji sadrži 20 μg proteina za svaki uzorak, tako sam u svaku jažicu dodao jednaku količinu proteina.

Koristio sam komercijalni poliakrilamidni graduirani gel (*Novex[®] 4-20% Tris-Glycine Gel, 1.0mm × 10 well*, Invitrogen, SAD), a u prvu jažicu sam nanio standard proteina poznate mase (*Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards*, Bio-Rad, SAD). Prvih sat vremena elektroforeze koristio sam napon od 60 V (dok uzorci nisu prošli gel za sabijanje), a preostala dva sata napon je iznosio 80 V.

2.5.2 Prijenos na membranu

Pufer za prijenos sam pripremio razrjeđivanjem koncentrata ($10 \times$ *Transfer buffer*, Bio-Rad, SAD) u 20%-tnoj otopini metanola. U ovako priređenom puferu sam natopio sve elemente prijenosa: spužvice, nitroceluloznu membranu (*Pure Nitrocelulose Membrane 0.2 μ m*, *Trans-Blot[®]*, Bio-Rad, SAD) i poliakrilamidni gel.

U uređaj za polusuhi prijenos (Bio-Rad, SAD) sam naslagao redom: namočene spužvice, nitroceluloznu membranu, poliakrilamidni gel, i ponovo namočene spužvice, pazeći da mjehurići zraka ne ostanu zarobljeni između membrane i gela. Prijenos je trajao sat vremena pri naponu 20 V.

2.5.3 Blokiranje

Nakon prijenosa, membrane sam inkubirao na zibalici sat vremena u 5%-tnoj otopini za blokiranje. Ovu otopinu sam prethodno pripremio otapanjem 10 g obranog mlijeka u prahu (*DifcoTM Skim Milk*, BD biosciences, SAD) u 200ml TBST-a (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*). TBST je otopina koja, po jednoj litri, sadrži 30 ml 5 M NaCl, 10 ml Tris pH 8.0 i 5 ml 10% Tween 20.

2.5.4 Inkubacija s protutijelima

Primarno protutijelo razrijedio sam na željenu koncentraciju u otopini za blokiranje. Membrane sam stavio u plasičnu vrećicu, dodao otopinu primarnog protutijela, vrećicu zatvorio (pazeći da mjehurići zraka ne ostanu zatvoreni unutra), te inkubirao preko noći na zibalici u hladnoj sobi pri 4°C. Popis korištenih protutijela i odgovarajućih razrjeđenja sažeto je prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Popis korištenih protutijela s odgovarajućim razrjeđenjima.

<u>primarna protutijela</u>	<u>izvor</u>	<u>razrjeđenje</u>	<u>proizvođač</u>
β-kenin	miš	1:500	BD biosciences
pan N-cam (CD56)	miš	1:1000	BD biosciences
E-kadherin	miš	1:2000	BD biosciences
fosfo-Stat3 (Tyr 705)	kunić	1:1000	abcam®
fosfo-p70 S6 kinaza (Thr 389)	kunić	1:1000	Cell Signaling
klasterin β	koza	1:1600	Santa Cruz Biotech.
tubulin	štakor	1:1000	abcam®
<u>sekundarna protutijela</u>	<u>izvor</u>	<u>razrjeđenje</u>	<u>proizvođač</u>
<i>Goat Anti-Mouse - HRP Conjugate</i>	koza	1:2000	Bio-Rad
<i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody</i>	koza	1:2000	Cell Signaling
<i>Rabbit polyclonal to Goat IgG - HRP</i>	kunić	1:2000	abcam®
<i>Rabbit polyclonal to Rat IgG - HRP</i>	kunić	1:2000	abcam®

Nakon prekonoćne inkubacije s primarnim protutijelom, membrane sam isprao tri puta u puferu TBST. Prvo ispiranje trajalo je 5 min, drugo 10 min, a treće 15 min, na zibalici.

Sekundarno protutijelo sam razrijedio 1:2000 u otopini za blokiranje, te u ovako priređenoj otopini inkubirao membrane na zibalici 2 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon toga sam ponovio proces trostrukog ispiranja u puferu TBST.

2.5.5 Detekcija signala

Koristio sam sustav za detekciju kemiluminiscencijom *Western Lightning® Plus-ECL* (Perkin Elmer, SAD). Obzirom da su sva korištena sekundarna protutijela konjugirana s hren peroksidazom (HRP, od engl. *horseradish peroxidase*), dodatak njenog supstrata, luminola, uzrokuje njegovu oksidativnu degradaciju pri čemu se emitira svjetlost valne duljine 428 nm. Ova svjetlost ostaje zabilježena na filmu.

Otopinu za kemiluminiscenciju sam pripravio mješanjem otopine A (*Oxidizing Reagent*) i otopine B (*Enhanced Luminol Reagent*) u omjeru 1:1. Pripremljenu otopinu sam ravnomjerno nanio na membranu, te inkubirao tijekom jedne minute.

Nakon inkubacije, membrane sam prenio u odgovarajuće kazete, te odnio u tamnu sobu na autoradiografsku ekspoziciju. Ovisno o jačini signala, vrijeme ekspozicije variralo je od nekoliko sekundi do desetak minuta. Na filmu sam markerom označio položaje membranskih biljega, te skenirao.

2.6 Molekularno kloniranje

2.6.1 Transformacija kompetentnih stanica *E. coli*

U pismenoj pošiljci, na listu papira, sam dobio tri plazmida pIRES2-EGFP (dar Prof. Lee-a s Northwestern University u Chicagu, SAD, prema Zhang i sur. 2006, Slika 8). Jedan plazmid je sadržavao puni gen za klasterin (oznaka: *full*), dok je genu na drugom plazmidu nedostajala sekvenca za sekreciju klasterina van stanice (oznaka: *nl*, od engl. *no leader sequence*), a na trećem mjestu se nalazio prazan vektor (oznaka: *mock*).

Komadiće papira na kojima su se nalazili traženi plazmidi izrezao sam različitim škarama kako ne bi došlo do unakrsne kontaminacije i stavio u ampulu sa 100 µl sterilne vode. Ampule sam zagrijavao 4 sata u toploj vodenoj kupelji (60°C). Za to vrijeme sam izvadio kompetentne stanice *E. coli* (*One Shot® TOP10 Competent Cells*, Invitrogen, SAD) iz zamrzivača (-80°C), i odmrzavao ih na ledu.

U 20 µl koncentrirane otopine kompetentnih stanica *E. coli* dodao sam 1 µl vodene otopine plazmida, te napravio *heat shock* na sljedeći način; smjesu bakterijskih stanica i plazmida sam prvo stavio na led 30 min, nakon čega sam ih na 30 sec premjestio u toplu vodenu kupelj na 42°C, i odmah potom ponovo na led 2 min. Nakon toga sam u ampule dodao 250 µl S.O.C. medija (od engl. *Super Optimal broth with Catabolite repression*, S.O.C. Medium, Invitrogen, SAD) te inkubirao na tresilici 30 min pri 37°C.

Ovako dobivenu kulturu sam nasadio na prethodno ugrijane, komercijalno dostupne petrijevke s LB (Luria-Bertani) medijem i kanamicinom (*LB Agar with Kanamycin*, 25 mg/l, Remel, SAD), te postavio na prekonoćnu inkubaciju pri 37°C.

Za izolaciju plazmidne DNA iz stanica *E. coli* koristio sam QIAfilter™ *Plasmid Maxi Kit 25* (Qiagen, SAD). Po obavljenom protokolu talog plazmidne DNA sam resuspendirao u 200 µl komercijalno dostupnog TE pufera ($1\times$ *Tris/EDTA Buffer Solution*, pH 7.6 ± 0.1 , Fisher Scientific, SAD).

UV spektrofotometrijom sam odredio prinos, odnosno koncentraciju DNA u dobivenim otopinama; 2 µl uzorka sam razrijedio u 198 µl TE pufera (razrjeđenje 1:100) i mjerio apsorbanciju pri 260 nm. Spektrofotometar kojeg sam koristio (*BioMate3, UV-Vis Spectrophotometer*, Thermo Scientific, SAD) preračunavao je dobivene vrijednosti apsorbancija direktno u koncentraciju DNA u µg/ml.

2.6.3 Dvostruka digestija plazmidne DNA

Restrikcijским endonukleazama *Xho I* i *BamH I* sam pocijepao plazmide pIRES2-EGFP kako bih prenio gene za klasterin u novi vektor pWZL Blast (Slika 8). Ovaj vektor, koji je pogodniji za infekciju stanične linije T1, sam linearizirao koristeći restrikcijška mjesta za *Xho I* i *Bgl II* (enzimi *BamH I* i *Bgl II* formiraju kompatibilne 5' ljepljive krajeve, Slika 9). Reakcijske smjese sam pripravo kao je prikazano u Tablici 3, a svi potrebni sastojci od istog su proizvođača: New England Biolabs, SAD. Inkubacija je trajala sat vremena u toploj vodenoj kupelji (37°C).

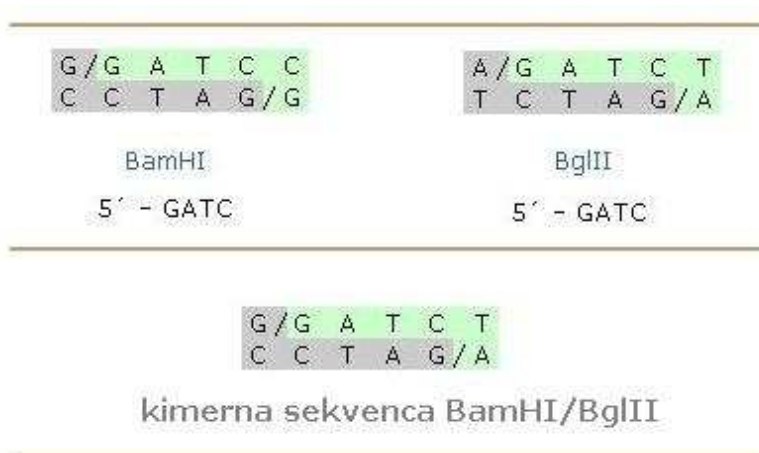
Za vrijeme inkubacije pripravo sam 0,8%-tni agarozni gel otapanjem 1,6g agaroze (Invitrogen, SAD) u 200 ml pufera TAE (*Tris-Acetate buffer and EDTA*, Ambion, SAD). Smjesu sam zagrijao do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Nakon 5 min hlađenja, dodao sam jednu kap etidij-bromida (*UltraPure™ 10mg/ml Ethidium Bromide*, Invitrogen, SAD), te smjesu izlio u predviđeni kalup.

Tablica 3. Sastojci reakcijskih smjesa za dvostruku digestiju. BSA označava otopinu albumina goveđeg seruma (od engl. *Beef Serum Albumin*), dok DDW označava destiliranu i deioniziranu vodu (*Distilled Deionized Water*, Mediatech, SAD).

isjecanje inserta		linearizacija vektora	
<i>NE Buffer 2</i>	4 µl	<i>NE Buffer 3</i>	4 µl
BSA	0,4 µl	BSA	0,4 µl
<i>Xho I</i>	2 µl	<i>Xho I</i>	2 µl
<i>BamH I</i>	2 µl	<i>Bgl II</i>	2 µl
DNA	2 µg	DNA	2 µg
DDW	do volumena 40 µl	DDW	do volumena 40 µl

Nakon inkubacije reakcijske smjese u toploj vodenoj kupelji, u svaku ampulu sam dodao 8 µl *loading* boje (*Blue/Orange Loading Dye*, 6×, Promega, SAD) te nanio u jažice pripremljenog 0,8%-tnog agaroznog gela. Elektroforeza je trajala 90 min pri 80 V.

Odmah po završetku elektroforeze, koristeći UV lampu i sterilne skalpele, izrezao sam djelove gela koji su sadržavali gene za klasterin (insert) i linearizirani plazmid pWZL Blast (vektor), te ih prenio u sterilne *Eppendorf* ampule. Za ekstrakciju DNA iz agaroznog gela koristio sam QIAquick® *Gel Extraction Kit* (Qiagen, SAD).



Slika 9. Restriksijska mjesta enzima *BamH I* i *Bgl II*. Ovi enzimi stvaraju međusobno kompatibilne 5' ljepljive krajeve GATC. Kimernu sekvencu, GGATCT, nastalu ligacijom ovih krajeva, ne prepoznaje više ni jedan od ovih enzima (Slika 13).

2.6.4 Ligacija klasterina u pWZL Blast

Zbog izračuna volumnog odnosa inserta i vektora u ligacijskoj reakciji, bilo je potrebno približno odrediti koncentracije inserta i pocijepanog vektora uzorcima dobivenim ekstrakcijom iz gela. U tu svrhu sam u 10 μl destilirane i deionizirane vode (DDW, *Distilled Deionized Water*, Mediatech, SAD) dodao alikvot uzorka od 2,5 μl i 2,5 μl *loading* boje (*Blue/Orange Loading Dye, 6 \times* , Promega, SAD). Ovako pripravljene uzorke sam vozio na 0,8%-tnom agaroznom gelu, a jakost signala svakog pojedinog uzorka uspoređivao s jakošću signala *Cambrex DNA Quant Ladders* (Cambrex Bio Science Rockland, SAD).

Ligacijsku smjesu priredio sam prema Tablici 4. Volumene sam izračunao tako da omjer vektora prema insertu iznosi 1:3, a reakciju inkubirao preko noći pri 16°C.

Tablica 4. Sastojci ligacijske reakcije. DDW označava destiliranu i deioniziranu vodu (*Distilled Deionized Water*, Mediatech, SAD). T₄ DNA ligaza i odgovarajući T₄ pufer proizvod su Fisher Scientific, SAD.

<u>sastojak</u>	<u>količina</u>
T ₄ ligaza	1 μl
T ₄ pufer	2 μl
vektor	4 μl
insert	6 μl
DDW	7 μl
<i>ukupni volumen</i>	<i>20 μl</i>

Nakon inkubacije uzeo sam 4 μl ligacijske smjese i dodao u 20 μl otopine kompetentnih stanica *E. coli* (*One Shot[®] TOP10 Competent Cells*, Invitrogen, USA), te postupio prema prethodno opisanom protokolu (poglavlje 2.6.1). Za nasadivanje transformirane bakterijske suspenzije koristio sam LB agar s ampicilinom (*LB Agar with Ampicilin-100*, Sigma, SAD), a koncentracija ampicilina u tekućem mediju korištenom za uzgoj iznosila je 100 $\mu\text{g/ml}$.

Plazmidnu DNA izolirao sam koristeći *Perfectprep*[®] *Plasmid Mini Kit* (Eppendorf, SAD). Kako bi potvrdio uspješnost ligacije, alikvot ovako dobivenog uzorka sam inkubirao s enzimima *Xho* I i *Sal* I, te rezultate digestije provjerio na 0,8%-tnom agaroznom gelu. Kolonije koje su prošle ovu provjeru iskoristio sam za uzgoj veće (300 ml) bakterijske kulture iz koje sam izolirao plazmidnu DNA koristeći *QIAfilter*[™] *Plasmid Maxi Kit 25* (Qiagen, SAD). Talog plazmidne DNA sam resuspendirao u 300 µl TE pufera (*1 × Tris/EDTA Buffer Solution*, pH 7.6 ± 0.1, Fisher Scientific, SAD), te spektrofotometrijski odredio koncentraciju (postupak opisan u poglavlju 2.6.2).

2.7 Retrovirusna infekcija T1 stanica

2.7.1 Lipofekcija

Amfotropske stanice za proizvodnju virusnih čestica, LinXA (tzv. *packaging cell line*, Cold Spring Harbor Laboratories, SAD) sam uzgojio do 70% konfluentnosti u velikim petrijevkama (promjera 15 cm). Koristio sam medij bez antibiotika, i kod presađivanja nisam koristio tripsin jer ove stanice ne prijanjaju čvrsto uz podlogu. Kad su dosegle željenu konfluentnost, transfecirao sam ih vektorima pWZL Blast, i to; jednim u kojeg je ugrađen puni gen za klasterin (*full*), jednim u kojeg je ugrađen gen za klasterin bez sekvence za sekreciju (*nl*), i jednim u kojeg je ugrađen gen za GFP (*green fluorescent protein*). Ovu posljednju liniju sam koristio kao pozitivnu kontrolu transfekcije.

Za transfekciju sam koristio Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen, SAD) i postupao prema priloženom protokolu. U 2,5 ml Opti-MEM[®]I *Reduced Serum Medium* (Invitrogen, SAD) dodao sam odgovarajuću količinu plazmidnog vektora te inkubirao 5 min pri sobnoj temperaturi. Za to isto vrijeme sam, u drugoj tubi, pomiješao 7,5 ml istog medija s 300 µl lipofektamina (Lipofectamine[™] 2000, Invitrogen, SAD), i također inkubirao 5 min pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, pomiješao sam odgovarajuću otopinu vektora s otopinom

lipofektamina, te inkubirao dodatnih 20 min pri sobnoj temperaturi. Ovako priređenu smjesu sam dodao u medij LinXA stanica, te inkubirao preko noći na 37°C i uz 5% CO₂.

Sljedeće jutro sam promijenio medij iznad svježe transfeciranih LinXA stanica. Medij koji nije sadržavao antibiotike zamijenio sam kompletiranim tekućim medijem (opisan u poglavlju 2.1). Učinkovitost transfekcije sam provjerio fluorescencijskim mikroskopom Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). Istoga dana sam presadio T1 stanice tako da njihova konfluentnost idućeg dana bude oko 40%.

2.7.2 Transdukcija

Drugog dana nakon transfekcije injekcijom (*BD 5 ml Syringe*, BD biosciences, SAD) sam usisao 5 ml medija iznad transfeciranih stanica te izlio sadržaj u medij T1 stanica koje su narasle do 40% konfluentnosti. Na injekciju sam ugradio filter koji je priječio prolazak stanicama, a propuštao viruse (Millex[®]-AA, *Syringe Driven Filter Unit*, 0.8 µm, MF-Millipore MCE Membrane, SAD). Postupak sam ponovio dva puta, a u medij T1 stanica sam dodao i 20 µl polibrena (Sigma-Aldrich, SAD) da povećam učinkovitost infekcije (konačna koncentracija polibrena u mediju T1 stanica iznosila je 4 µg/ml).

2.7.3 Selekcija

Dva dana nakon infekcije T1 stanice su dosegle maksimalnu konfluentnost. Presadio sam ih koristeći svježe pripravljen kompletirani tekući hranjivi medij u kojeg sam dodao antibiotik blasticidin (Blasticidin 10 mg/ml, Invivo Gen, SAD) tako da njegova konačna koncentracija iznosi 10 µg/ml. Kontrolna linija T1 stanica (koja nije bila inficirana plazmidom pWZL Blast) nije preživjela niti dva dana pod ovom koncentracijom blasticidina. Za razliku od toga, inficirane stanice T1 nastavile su iskazivati punu konfluentnost, a linija koja je bila inficirana vektorom koji sadrži GFP pod mikroskopom je stabilno fluorescirala.

2.8 Injekcija transformiranih tumorskih stanica u imunodeficientne miševe

T1 stanice koje sada stabilno ektotopski izražavaju klasterin sam prvo isprao PBS-om, a potom resuspendirao u 10 ml Opti-MEM[®]I *Reduced Serum Medium* (Invitrogen, SAD). Ovako resuspendirane stanice centrifugirao sam 3 min pri $600 \times g$. Supernatant sam odbacio, a talog stanica ponovo resuspendirao u 700 μ l istog medija.

Miševe sam anestezirao intraperitonealnom injekcijom 250 μ l avertina (2,5% tribrometanol, Sigma-Aldrich, SAD). Dvije minute nakon anestezije, u uspavane miševe sam subkutano dorzalno injicirao 450 μ l stanične suspenzije T1 stanica. Mjesto injekcije sam držao prstom blago pritisnuto otprilike jednu minutu kako injicirana stanična suspenzija ne bi iscurila van. Šest miševa sam injicirao subkutano dorzalno desno sa stanicama T1 full Clu, a na lijevu stranu istog miša stanice T1 GFP. Drugu skupinu od šest miševa sam injicirao subkutano dorzalno desno sa stanicama T1 nl Clu, a na lijevu stranu također kontrolne stanice T1 GFP.

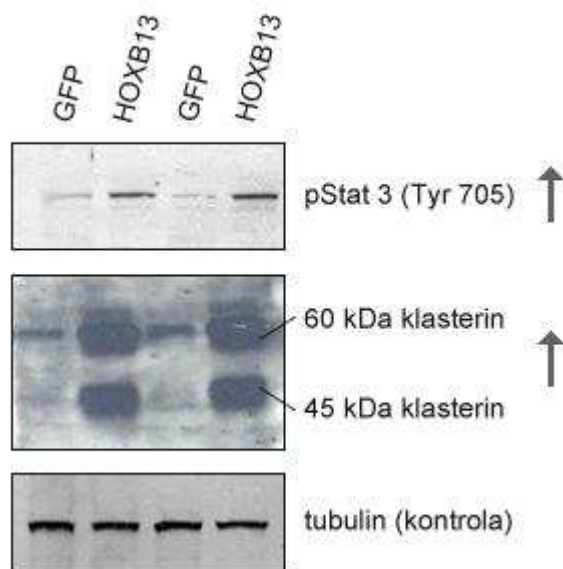
Dan nakon obavljenog postupka sam provjerio da su svi injicirani miševi živi i pokretni. Tri tjedna kasnije (21 dan nakon injekcije), miševi su žrtvovani u CO₂ komori, a rezultati zabilježeni fotografskim aparatom. Narasle tumore sam kirurški odstranio te obavio Western blot analizu prema prethodno opisanom postupku (poglavlja 2.3, 2.4 i 2.5). Dio dobivenog tumorskog tkiva sam stavio u parafin, te poslao na imunohistokemijsku obradu.

3. REZULTATI

3.1 *HOXB13* modulira gensko izražavanje u mišjim stanicama karcinoma jajnika

3.1.1 Pozitivni utjecaji gena *HOXB13*

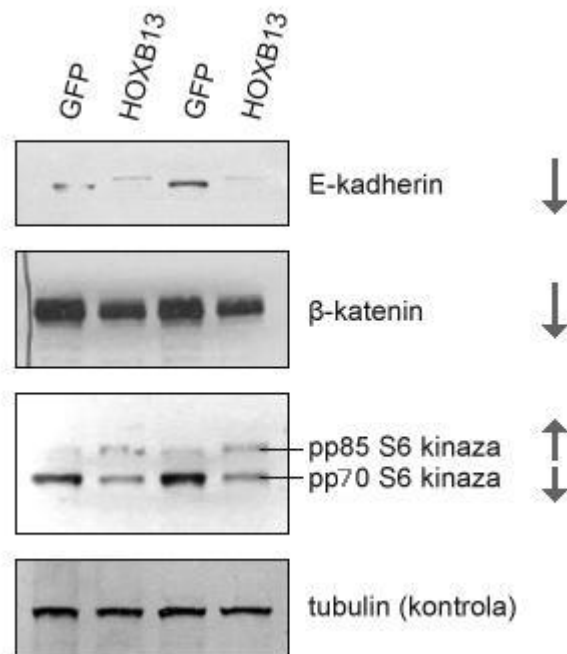
U proteinskom lizatu T1 stanica koje ektoposki izražavaju *HOXB13* utvrđena je veća količina klasterina i fosforiliranog Stat 3, u odnosu na kontrolne T1 stanice koje su istim vektorom potaknute na ektoposko izražavanje GFP-a (Slika 10).



Slika 10. Usporedba proteinskih lizata stanica T1-GFP i T1-HOXB13 metodom Western blot. Radi bolje pouzdanosti rezultata, paralelno sam uspoređivao dva različita lizata iste stanične linije. Strelice na desnoj strani slike, orjentirane prema gore, sugeriraju pozitivan utjecaj HOXB13 na kvantitetu testiranih proteina pStat 3 (Tyr 705) i klasterina.

3.1.2 Negativni utjecaji gena *HOXB13*

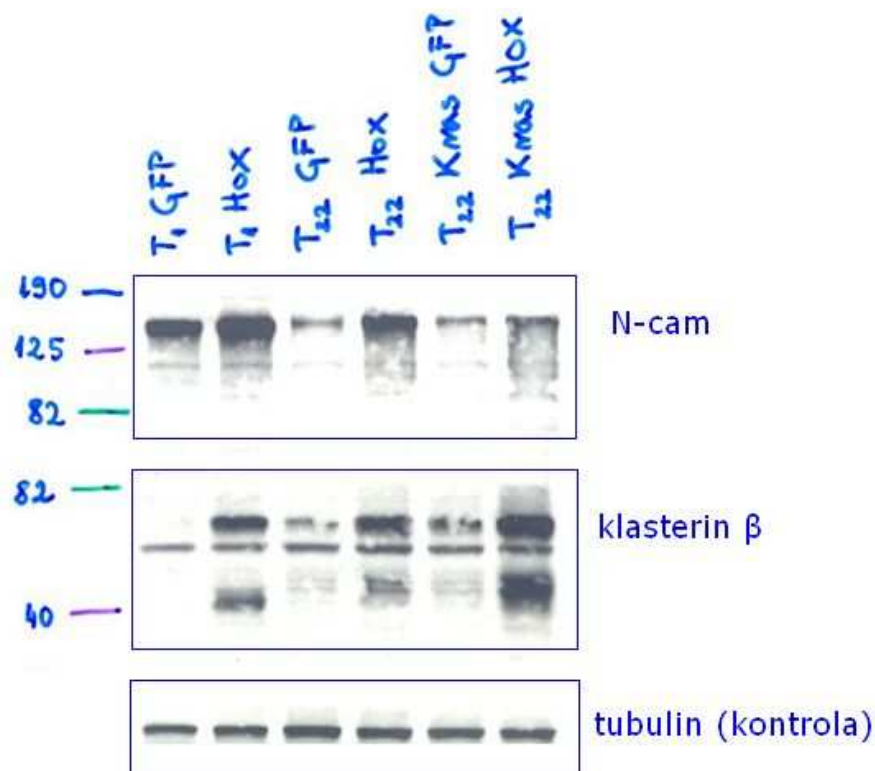
Western blot analiza proteinskih lizata T1-GFP i T1-HOXB13 stanica otkrila je da ektotopsko izražavanje gena *HOXB13* utječe na smanjenje ukupne količine E-kadherina, produkta poznatog tumor supresor gena, i β -katenina, koji između ostalog funkcionira i kao dio kadherinskog kompleksa na površini stanice. Korišteno protutijelo protiv p70 S6 kinaze (Thr389) detektira prisutnost ovog enzima samo ako je fosforilirana bočni ogranak aminokiseline Thr 389. U ovom slučaju, istim protutijelom otkrivena je i prisutnost p85 S6 kinaze fosforilirane na analognom mjestu Thr 412 (Slika 11).



Slika 11. Usporedba proteinskih lizata stanica T1-GFP i T1-HOXB13 metodom Western blot. Strelice na desnoj strani slike, orjentirane prema dolje, sugeriraju da HOXB13 negativno utječe na testirane proteine E-kadherin i β -katenin. Primjer S6 kinaze odražava molekularnu preciznost kojom HOXB13 modulira gensku ekspresiju u epitelnim stanicama jajnika; dok HOXB13 potiče izražavanje pp85 S6 kinaze, izražavanje njene alternativne forme pp70 je pod negativnom regulacijom.

3.1.3 Pozitivan utjecaj gena *HOXB13* na N-cam (CD56) i klasterin nije ovisan o *K-ras* signalnom putu

Miao i sur. (2007) su ustanovili da *HOXB13* potiče tumorogenezu u kontekstu genetičkih alternacija u *p53*, *c-myc* i *K-ras* (T1 stanice), ali ne i u kontekstu genetičkih alternacija u *p53*, *c-myc* i *Akt* (T2 stanice), što upućuje na suradnju *HOXB13* s *K-ras* signalnim putem. Iz tog razloga, ovdje sam testirao ovisi li pozitivna regulacija klasterina i N-cam-a o aktiviranom *K-ras*-u. U tu svrhu sam koristio stanične linije T22 koje, za razliku od T1 stanica, sadrže definirane genetičke promjene u *p53*, *c-myc* i *Akt*, ali ne i u *K-ras*-u. Stanice T22 *K-ras* stabilno su transfecirane pBabe vektorom koji sadrži *K-ras*. Na istim stanicama je potom primjenjena RCAS tehnika za uvođenje gena *HOXB13*, odnosno GFP-a. Analiza (Slika 12) sugerira da *HOXB13* nije u potpunosti ovisan o aktivaciji onkogeno *K-ras*.

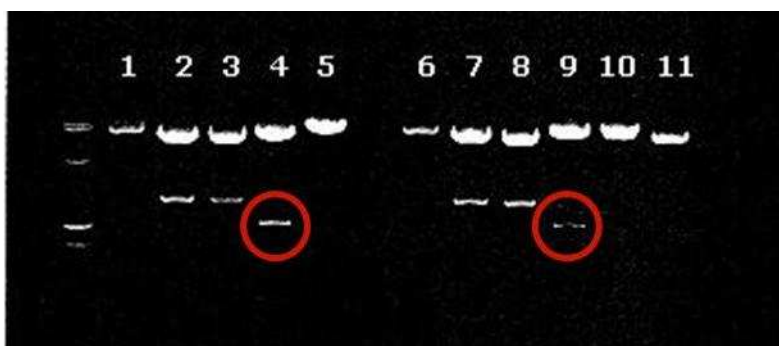


Slika 12. Western blot analiza proteinskih lizata stanica T1-GFP, T1-HOXB13, T22-GFP, T22-HOXB13, T22 *K-ras*-GFP i T22 *K-ras*-HOXB13. Pozitivan utjecaj ektoposke ekspresije gena *HOXB13* na N-cam i klasterin vidljiv je u sve tri testirane stanične linije (T1, T22 i T22 *K-ras*), unatoč tome što stanična linija T22 (za razliku od T1 i T22 *K-ras*) ne sadrži aktivirani onkogen *K-ras*. Ovo sugerira da pojačano izražavanje N-cam-a i klasterina, potaknuto od strane gena *HOXB13*, nije ovisno o *K-ras* signalnom putu.

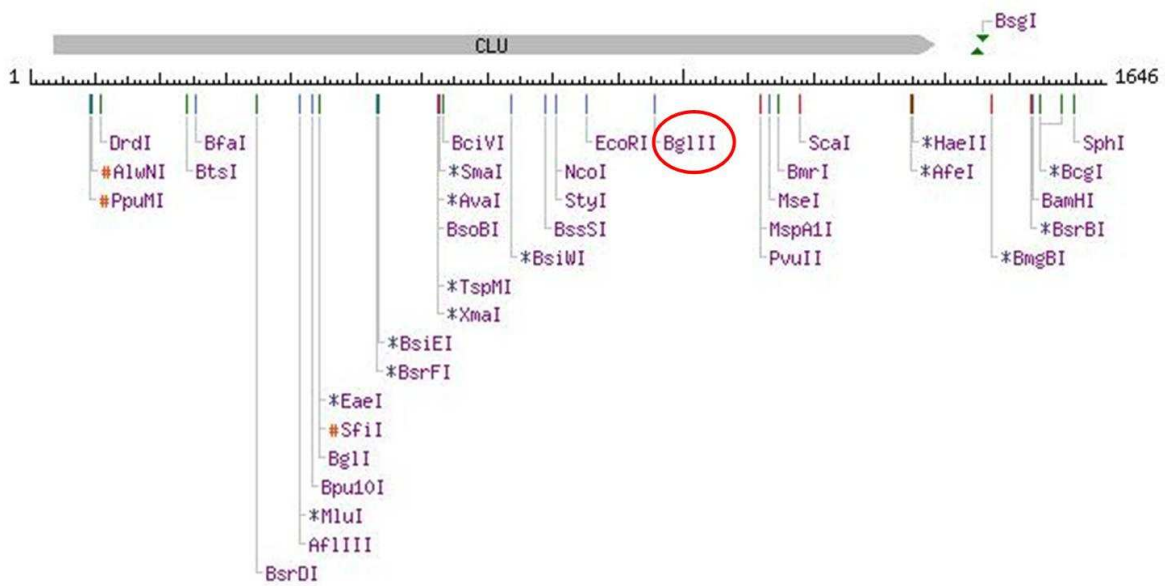
3.2 Klasterin kao supstrat gena *HOXB13*

3.2.1 Gen za klasterin ugrađen je u vektor pWZL Blast

Obzirom da vektor pIRES2-EGFP nije pogodan za stabilnu transfekciju stanica karcinoma jajnika, njegove inserte, klasterin (*Clu*) gene sam prenio u retroviralni vektor pWZL Blast (Slike 13 i 14). Osim gena za cjeloviti klasterin (*full Clu*), kao kontrolu sam klonirao i gen kojemu nedostaje sekvenca za sekreciju klasterina van stanice (*nl Clu*).



Slika 13. Provjera ugradnje gena za klasterin u vektor pWZL Blast na 0,8%-tnom agaroznom gelu. Na lijevoj strani gela (jažice 1 do 5) provjeravam ugradnju gena za cjeloviti klasterin (*full Clu*), a na desnoj (jažice 6 do 10) provjeravam ugradnju kraće alternativne forme istog gena (*nl Clu*). U jažici 11 nalazi se prazan vektor pWZL Blast. Jažice 1 i 6 sadrže izvorni plazmid pIRES2-EGFP s ugrađenim *full Clu* (jažica 1), odnosno *nl Clu* (jažica 6). U jažice 2, 3, 4 i 5, odnosno jažice 7, 8, 9 i 10, nanjeti su produkti dvostruke digestije vektora pWZL Blast s ugrađenim *full Clu* genom (jažice 2 do 5), odnosno *nl Clu* genom (jažice 7 do 10). Za digestiju korišteni su redom enzimi *Xho* I i *Sal* I (jažice 2 i 7), *Xho* I i *Sac* II (jažice 3 i 8), *Xho* I i *Bgl* II (jažice 4 i 9), te *Xho* I i *Bam*H I (jažice 5 i 10). Očekivano, cjepanje restriksijskih mjesta *Xho* I i *Sal* I (pruge 2 i 7), odnosno *Xho* I i *Sac* II (pruge 3 i 8), oslobodilo je insert iz novog vektora, što objašnjava dobivene donje pruge u linijama 2 i 3, odnosno 7 i 8. Obzirom da ligacijom nastalu kimernu sekvencu *Bam*H I/*Bgl* II istoimeni enzimi više ne mogu prepoznati (Slika 9), u linijama 4 i 5, odnosno 9 i 10, nisam očekivao dvostruku, već jednostruku digestiju novonastalog konstrukta. U tom smislu, crveno zaokružene pruge došle su kao iznenađenje koje se može objasniti tek pogledom na restriksijsku mapu *Clu* gena (Slika 14). Naime, unutar ugrađenog inserta postoji mjesto koje prepoznaje enzim *Bgl* II, što ne samo da objašnjava uočene pruge u linijama 4 i 9, već pruža dodatnu potvrdu ugradnje.

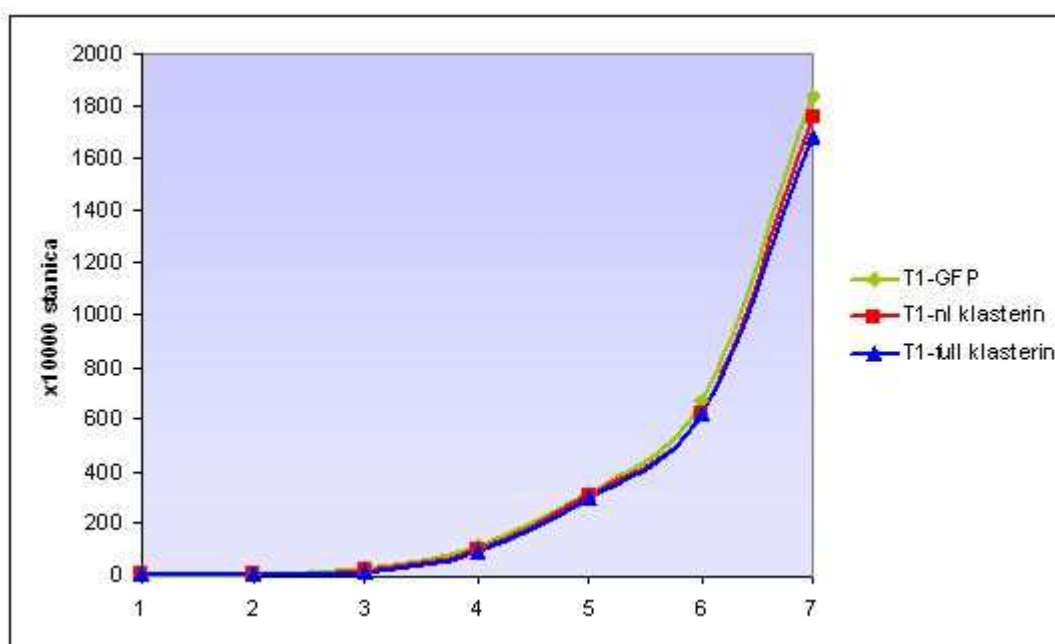


Slika 14. Restriksijska mapa klasterin gena. Označeno restriksijsko mjesto za Bgl II objašnjava pruge detektirane u linijama 4 i 9 na slici 13.

3.2.2 Ektotopsko izražavanje klasterina ne mijenja brzinu rasta tumorskih stanica

3.2.2.1 *in vitro*

Kako bi provjerio može li ektotopsko izražavanje klasterina pospješiti diobu stanica u kulturi na sličan način kako to čini *HOXB13*, izradio sam sedmodnevnu krivulju rasta novonastalih staničnih linija, te njihov rast usporedio s rastom T1 stanica transfeciranih u isto vrijeme s istim vektorom, ali koji, umjesto klasterina, sadrži gen za GFP. Rezultati su pokazali da klasterin ne utječe na brzinu rasta T1 stanica karcinoma jajnika (Slika 15).



Slika 15. Sedmodnevna krivulja rasta T1 stanica stabilno transfeciranih vektorom pWZL Blast koji sadrži gen za klasterin u *full* i *nl* varijanti. Kao kontrola služe T1 stanice transfecirane istim vektorom u kojeg je, umjesto gena za klasterin, ugrađen gen za GFP.

3.2.2.2 *in vivo*

Moguće efekte ektotopske ekspresije klasterina ispitao sam i *in vivo*, subkutanom injekcijama T1-klasterin staničnih linija u imunodeficijentne miševе. Slike 16 i 17 prikazuju injicirane miševе, žrtvovane tri tjedna nakon injektiranja tumorskih stanica karcinoma jajnika. Razlike u stopi rasta tumora nisu uočene, ali su zato narasli tumori iskorišteni za analizu proteinskog ekstrakta, kao i za izradu imunohistokemijskih prereza.



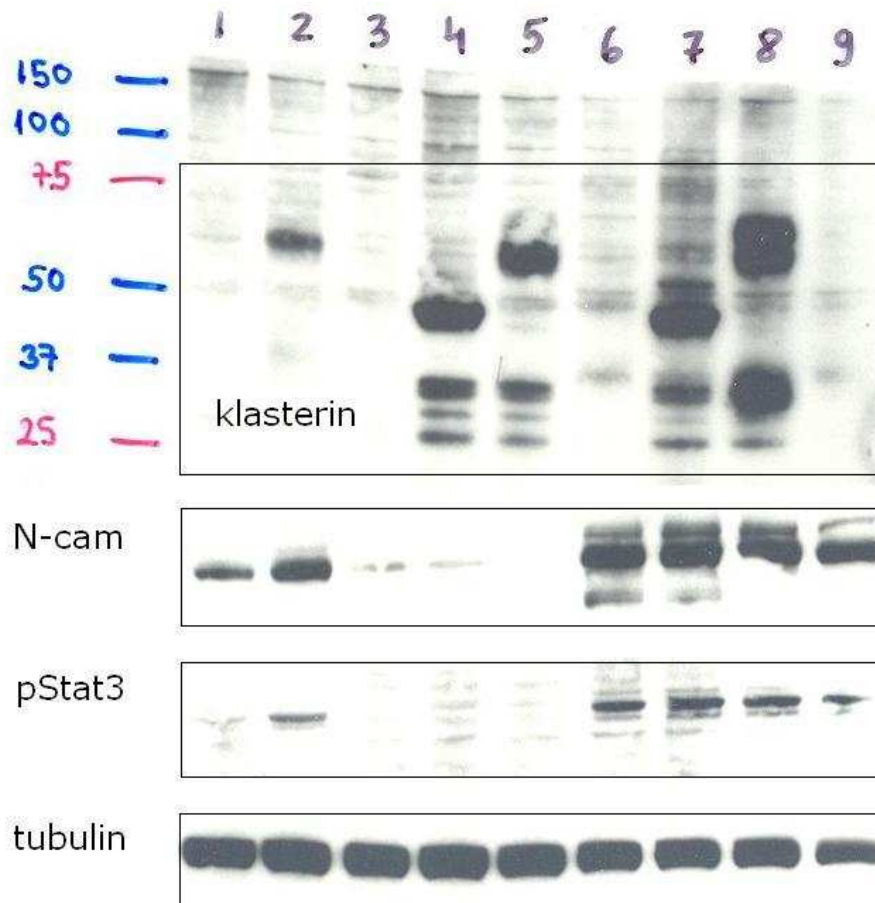
Slika 16. Subkutano dorzalno desno injektirane su stanice T1 full Clu, dok su na lijevu stranu istog miša injektirane T1 GFP stanice. Razlike u masi i veličini razvijenih tumora nisu primjećene.



Slika 17. Subkutano dorzalno desno injektirane su stanice T1 nl Clu, dok su na lijevu stranu istog miša injektirane kontrolne T1 GFP stanice. Kao i kod cjelovitog klasterina, ni ovdje nisu primjećene razlike u masi i veličini razvijenih tumora.

3.2.3 Western blot analiza T1-klasterin tumora

Proteinski ekstrakti izoliranih tumora pružili su dokaz da je izražavanje klasterina u novim T1-klasterin staničnim linijama stabilno i u uvjetima *in vivo*. Osim toga, ova analiza potvrđuje hipotezu o klasterinu kao funkcionalnom genu u karcinomu jajnika (Slika 18).



Slika 18. Izražavanje klasterina u generiranim staničnim linijama je stabilno i u *in vivo* uvjetima. Slika prikazuje Western blot analizu s četiri različita protutijela; klasterin, N-cam, pStat3 (Tyr 705) i α -tubulin koji je korišten kao kontrola. U jažice 1 do 5 nanoseni su proteinski ekstrakti iz stanica uzgajanih u kulturi, i to redom: (1) T1 GFP, (2) T1 HOXB13, (3) T1 GFP (pWZL Blast), (4) T1 nl Clu i (5) T1 full Clu. U jažice 6 do 9 nanoseni su proteinski ekstrakti iz tumora prikazanih na slikama 16 i 17: (6) T1 GFP (pWZL Blast), (7) T1 nl Clu, (8) T1 full Clu i (9) T1 GFP (pWZL Blast). Ekstrakt u liniji 6 je kontrola za liniju 7 (ovi tumori izolirani su iz istog miša, slika 17), dok je ekstrakt u liniji 9 kontrola za liniju 8 (slika 16). Rezultati dobiveni korištenjem antitijela protiv N-cam-a i fosforiliranog Stat3 proteina upućuju da tumorske stanice karcinoma jajnika doživljavaju promjenu genskog izražavanja u novom okolišu, odnosno živom mišu. Usporedbom linija 5 i 8 vidljivo je obilatije izražavanje cjelovitog klasterina u tumorskom tkivu (linija 8), nego u staničnoj kulturi (linija 5), što podupire tezu o klasterinu kao funkcionalnom genu u karcinomu jajnika.

4. RASPRAVA

Na razini stanične morfologije, svakako najuočljivija promjena koju izaziva ektotopsko izražavanje gena *HOXB13* je epitelno-mezenhimski prijelaz. To je proces tijekom kojeg epitelne stanice gube svoje čvrste međustanične spojnice, remodeliraju svoj citoskelet i stiču mezenhimska svojstva, odnosno postaju sposobne za migraciju i formiranje metastaza. Ovaj prijelaz može se opisati i kao svojevrsan povratak stanica pokrovnog epitela jajnika u slabije diferencirano, pluripotentno stanje. Zanimljivo je da se većina gena, čiju diferencijalnu izraženost u *HOXB13* stanicama ova studija potvrđuje, izražava upravo na staničnoj površini (N-cam, E-kadherin, β -katenin) ili čak u izvanstaničnom matriksu (klasterin). Kad se tome pridoda činjenica da su u posljednjih 20 godina, brojne studije dokazale ključnu ulogu izvanstaničnog matriksa u moduliranju genske ekspresije, ne čudi zašto smo u ovom istraživanju tražili potencijalne funkcionalne supstrate *HOXB13* signalnog puta upravo na staničnoj površini.

Mehanizam kojim molekule izvanstaničnog matriksa, u interakciji s transmembranskim receptorima, pokreću signalne putove unutar stanice od iznimne je važnosti upravo zato jer pokazuje da je izvanstanični matriks odgovoran za ispravno pokretanje tkivno specifične genske ekspresije, odnosno za upostavljanje diferenciranog staničnog fenotipa. Danas je već dobro poznato da većina transformiranih tumorskih stanica uspostavlja abnormalne interakcije sa svojim izvanstaničnim okolišem. Izmjenjena interakcija tumorske stanice i njenog okoliša, uz deregulirani stanični ciklus, jedna je od rijetkih zajedničkih karakteristika gotovo svih tumora. Štoviše, Weaver i sur. (1997) su na primjeru karcinoma dojke dokazali da se uspostavljanjem ispravne interakcije između tumorske stanice i njenog izvanstaničnog matriksa može toj istoj stanici povratiti njena normalna, diferencirana funkcija, i to bez obzira na genotipske abnormalnosti akumulirane u jezgri.

Koordinirana interakcija između izvanstaničnog matriksa, receptora faktora rasta, kadherina i integrina nužna je ne samo za uspostavljanje, nego i za održavanje diferenciranog fenotipa, a ovdje predstavljena studija sugerira da *HOXB13* iskazuje svoja onkogeno svojstva upravo posredstvom ovih ključnih elemenata. Novak i sur. (1998) su tako već dokazali da primjerice gubitak izražavanja E-kadherina promovira staničnu pokretljivost, a time i metastatski potencijal stanice. Koncept dinamičkog reciprociteta kojeg su još 1982. predložili Bissell i sur. pomaže nam da, na jednostavan način, sagledamo odnos između izvanstaničnog matriksa i produkata *HOX* gena. Naime, promjene u izvanstaničnom matriksu rezultiraju promijenjenim uzorkom izražavanja *HOX* gena koji potom moduliraju izražavanje površinskih receptora, proteaza koje razgrađuju matriks i njihovih inhibitora. Posljedica ovoga su dodatne promjene u sastavu izvanstaničnog matriksa što potom uzrokuje daljnje promjene u uzorku izražavanja *HOX* gena. U tom kontekstu nije teško objasniti utjecaj gena *HOXB13* na E-kadherin, β -katenin, N-cam ili klasterin.

Ukratko, kadherini su proteinska porodica koja posreduje u kalcij-ovisnim međustaničnim interakcijama, a E-kadherin je nužan za formiranje čvrstih međustaničnih spojnica (*adherence junctions*) koje su osnovno obilježje epitelnih stanica. U kadherinima posredovane međustanične interakcije uključen je i multifunkcionalni citoplazmatski protein β -katenin. On povezuje kadherine s citoskeletom, ali može djelovati i samostalno kao modulator genske ekspresije. Dio je poznatog Wnt signalnog puta koji je ključan u embrionalnom razvoju. Za razliku od kadherina, N-cam (*neural cell adhesion molecule*) posreduje u kalcij-neovisnim međustaničnim interakcijama. N-cam pripada superobitelji imunoglobulina, a izražen je u mnogim staničnim tipovima. Ova studija je pokazala jasnu promjenu njegovog izražavanja u *HOXB13* eksprimirajućim stanicama što ukazuje da *HOXB13* utječe ne samo na kalcij-ovisne, nego i na kalcij-neovisne međustanične interakcije.

Kinaza ribosomalnog proteina S6 (S6K), čije je izražavanje također vidno promjenjeno *HOXB13* eksprimirajućim stanicama, uključena je u regulaciju staničnog rasta i metabolizma. Aktivacija S6 kinaze posredovana je višestrukim fosforilacijama koje koordiniraju signalni putevi mTOR i PI3K (fosfatidil-inozitol-3-kinaza). U zadnje vrijeme se akumuliralo sve više dokaza da stanične odgovore na stres kontroliraju upravo kinaze, ali

specifični mehanizmi ovih regulacija još nisu dovoljno precizno opisani. Tako je primjerice primjećena aktivacija p70 S6 kinaze kao posljedica toplinskog stresa (Lin i sur. 1997), a u ovom istraživanju je pokazano da HOXB13 negativno regulira p70 S6 kinazu dok istovremeno pozitivno utječe na p85 S6 kinazu koja, za razliku od svoje p70 izoforme, posjeduje sekvencu koja ju lokalizira u jezgru stanice ali zašto je njen nivo povišen u *HOXB13* eksprimirajućim stanicama je još uvijek predmet aktivnog istraživačkog rada.

Povišeni nivo fosforiliranog Stat3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) proteina koji je ovdje dokazan u T1-HOXB13 stanicama, nije iznenađenje jer se Stat3 već dugo povezuje s promoviranjem stanične proliferacije, povećanom staničnom pokretljivošću te s razvojem imunološke tolerancije. Osim toga, Stat3 je već prepoznat kao atraktivna terapijska meta za uznapredovale karcinome. Supresija Stat3 signalnog puta korištenjem inhibitora Janus kinaze, AG490 ili primjenom dominantno negativnog Stat3, značajno usporava rast karcinoma dojke i jajnika (Burke i sur. 2001; Li i Shaw 2002).

Ovdje predstavljena studija dio je napora da se identificiraju dodatne molekularne mete koje bi bile podložne terapijskoj intervenciji u karcinomu jajnika. Iz razloga koje ću ovdje pokušati sažeti, odlučili smo se fokusirati upravo na klasterin i to prije svega generiranjem staničnih linija koje ga stabilno ektotopski izražavaju. Naime klasterin se povezuje i s povećanom proliferacijom, i s apoptozom, te njegov gen može djelovati kao svojevrsan molekularni prekidač koji određuje sudbinu stanice. Zbrku unosi što se u literaturi koristi više različitih naziva za ovaj protein. Tako je on, osim kao klasterin (CLU), poznat i kao apolipoprotein J (ApoJ), testosteronom-reprimirani *prostate message-2* (TRPM-2), *complement lysis inhibitor* (CLI), serumski protein 40 (SP-40) ili sulfatirani glikoprotein-2 (SGP-2). Bez obzira na nazivlje, riječ je o visoko konzerviranom, heterodimernom glikoproteinu čije je prisutstvo dosad dokazano u praktički svim humanim tkivima i međustaničnim tekućinama (Shannan i sur. 2006). Unatoč kompleksnom izražavanju, i činjenici da se klasterin javlja u različitim staničnim kompartmentima u različitim formama, u humanom genomu postoji samo jedan gen za klasterin i on se nalazi na kromosomu 8, vrpca 8p21-p12.

Sekretorna forma CLU proteina (sCLU) nastaje translacijom od prvog AUG kodona cjelovite (tzv. full-length) CLU mRNA, čiju sam komplementarnu DNA koristio u ovom istraživanju. Ona kodira za polipeptid koji se sastoji od 449 aminokiselinskih ostataka, od čega prva 22 aminokiselinska ostatka predstavljaju klasičnu hidrofobnu vodeću signalnu sekvencu. Ova sekvencu vodi sCLU protein u endoplazmatski retikulum (ER) gdje dolazi do njegove glikozilacije i proteolitičkog cijepanja na α i β podjedinice. Ove podjedinice su međusobno spojene disulfidnim vezama, te se zajedno izlučuju izvan stanice (Yang i sur. 2000, Collard i sur. 1987). U Western blot analizi sCLU se pojavljuje u dvije različite proteinske pruge, ovisno o stupnju njegove glikozilacije. Jedna sadrži cjeloviti ~60 kDa protein, dok se druga pojavljuje pri ~40 kDa kao smjesa α i β podjedinica pod reducirajućim SDS-PAGE uvjetima koji su korišteni u ovom radu. To je stoga što sekretirani sCLU heterodimer ima masu od oko 80 kDa.

Za razliku od sCLU, translacija nuklearnog klasterina (nCLU) počinje od drugog AUG kodona alternativno izrezane nCLU mRNA. Ova mRNA, za razliku od sCLU mRNA, ne sadrži drugi ekson klasterinskog gena, a upravo se na njemu nalazi prvi AUG kodon kao i sekvencu koja usmjerava protein u endoplazmatski retikulum. Tako se prvo dostupno mjesto početka translacije ove alternativno izrezane mRNA nalazi tek na trećem eksonu klasterinskog gena. Translacijom ove kraće mRNA nastaje 49 kDa prekursor nuklearne forme klasterina (pnCLU). U normalnim humanim stanicama ovaj prekursor ostaje u citoplazmi gdje nije podložan ekstenzivnoj glikozilaciji, kao ni cijepanju na α i β podjedinice. U slučaju oštećenja stanice dolazi do posttranslacijske modifikacije pnCLU proteina tijekom kojeg nastaje zrela proteinska forma nCLU mase 55 kDa. Ova forma klasterina odlazi u jezgru gdje obavlja svoju proapoptotsku ulogu (Leskov i sur. 2003).

Klasterin se inače povezuje s cijelim nizom fizioloških procesa kao što su regulacija imunološkog odgovora (klasterin cirkulira krvlju kao regulacijski komplementarni protein), zatim stanična adhezija, odnosno interakcija stanice s okolinom, stanična diferencijacija i transformacija, regulacija staničnog ciklusa, prijenos lipida, pa čak i popravak DNA (Troughakos i Gonos, 2002; Shannan i sur. 2006). Svi ovi procesi su itekako bitni u karcinogenezi i progresiji tumora. Međutim, dokazi koji su se nakupili posljednjih godina

ukazuju na to da klasterin ima brojne kontradiktorne uloge. S jedne strane, izražavanje klasterina je pojačano u tkivima koja su u procesu apoptoze, a s druge strane postoje jasne indikacije da klasterin služi kao citoprotektivna molekula jer može stabilizirati funkcionalnu 3D strukturu stresom pogođenih proteina (Wilson i Easterbrook-Smith, 2000).

U raznim studijama se implicira da je povećanje količine citoplazmatskog klasterina direktno povezano sa smanjenom stopom apoptoze, te pojačanom agresivnošću, odnosno povećanim metastatskim potencijalom. Regulacija izražavanja klasterina je vrlo vjerojatno u uskoj svezi s različitim stupnjevima progresije karcinoma jajnika, ali točne uloge klasterinskih izoformi su još nisu dovoljno istražene. Osim toga, malo se zna i o unutarstaničnoj lokalizaciji različitih izoformi u tumorskim stanicama što je bio dodatan razlog za generiranje nove T1-klasterin stanične linije. Svi dosad dostupni dokazi upućuju na važnost molekularne studije mehanizama koji su odgovorni za citoprotektivnu ili citotoksičnu ulogu klasterinskih izoformi, a u našim analizama ekspresijskih profila genetički definiranih stanica karcinoma jajnika klasterin se uvijek javlja pri vrhu ljestvice diferencijalno eksprimiranih gena. Iz tog razloga ovaj rad opisuje proces dobivanja dviju novih staničnih linija karcinoma jajnika koje predstavljaju primjere međusobno disjunktne uloga klasterina.

Obzirom da ovdje predstavljeno istraživanje sugerira da je uloga klasterina u karcinomu jajnika bitno suptilnija od poticanja rapidnih dioba kao što to čini *HOXB13*, u sljedećim koracima valja istražiti doprinos klasterina u, primjerice, hipoksičnim uvjetima kakvi vladaju u središtu nascentne tumorske mase. Osim toga, generirane stanične linije omogućit će ispitivanje mogućih uloga klasterina u razvoju kemorezistencije. Ova studija samo je mali dio sve intenzivnijih istraživačkih napora usmjerenih prema rasvjetljavanju zagonetke kako relativno malen broj molekula izvanstaničnog matriksa i membranskih receptora uzrokuje čitav niz kompleksnih fenotipova u rasponu od potpuno diferenciranog do malignog stanja.

5. ZAKLJUČAK

Pod utjecajem gena *HOXB13*, u mišjim stanicama karcinoma jajnika dolazi do značajnih promjena u genskoj ekspresiji na koje se nadovezuju i promjene u proteinskom sastavu stanice, njenih transmembranskih receptora i izvanstaničnog matriksa. Western blot analizom potvrđen je pozitivan utjecaj gena *HOXB13* na izražavanje klasterina, N-cam-a i fosforiliranog Stat 3 proteina, te negativni utjecaj na E-kadherin, β -katenin i fosforiliranu p70 S6 kinazu. Paralelno s tim, dokazano je i povišenje nivoa fosforilirane p85 S6 kinaze, što upućuje na zaključak da *HOXB13* potiče lokalizaciju S6 kinaze u jezgru stanice.

Korištenjem staničnih linija T22 koje ne sadrže aktivirani onkogen *K-ras*, pokazano je da efekti gena *HOXB13* nisu nužno ovisni o aktivaciji *ras* signalnog puta, kao što su to sugerirale druge studije. Konkretno, povećane količine proteina N-cam i klasterin dokazane su u svim testiranim staničnim linijama koje stabilno izražavaju *HOXB13*, neovisno o prisutstvu aktiviranog onkogeno *K-ras*.

Dokazano je i da ektotopsko izražavanje klasterina ne mijenja brzinu proliferacije modelne stanične linije T1, kako u staničnoj kulturi, tako i u imunodeficientnim miševima. Western blot analiza dobivenih T1-klasterin tumora pokazala je da je izražavanje cjelovitog, sekretiranog klasterina (sCLU) u *in vivo* uvjetima još više naglašeno nego u staničnoj kulturi. Obzirom da isti efekt nije primjećen kod proapoptotske, nuklearne forme istog proteina (nCLU), dodan je još jedan prilog hipotezi o sekretiranom klasterinu kao funkcionalnom genu u progresiji karcinoma jajnika. Osim toga, povišene razine N-cam i fosforiliranog Stat 3 proteina u tumorskim ekstraktima, u odnosu na stanične linije iz kojih su isti tumori generirani, daju naslutiti da su tumorske stanice u modelnom organizmu podložnije bržim genetičkim promjenama nego u kulturi.

6. LITERATURA

Abate-Shen C. (2002): Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat. Rev. Cancer* **2**: 777-785.

Bissell M. J., Hall H. G., Parry G. (1982): How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.* **99**: 31-68.

Boerkoel C. F., Federspiel M. J., Salter D. W., Payne W., Crittenden L. B., Kung H. J., Hughes S. H. (1993): A new defective retroviral vector system based on the Bryan strain of Rous sarcoma virus. *Virology* **195**: 669-679.

Burke W. M., Jin X., Lin H. J., Huang M., Liu R., Reynolds R. K., Lin J. (2001): Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* **20**: 7925-7934.

Collard M. W., Griswold M. D. (1987): Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry* **26**: 3297-3303.

Connolly D.C., Bao R., Nikitin A. Y., Stephens K. C., Poole T. W., Hua X., Harris S. S., Vanderhyden B. C., Hamilton T. C. (2003): Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer. Res.* **63**: 1389-1397.

Daftary G. S., Taylor H. S. (2006): Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr. Rev.* **27**: 331-355.

- Federspiel M. J., Swing D. A., Eagleson B., Reid S. W., Hughes S. H. (1996): Expression of transduced genes in mice generated by infecting blastocysts with avian leukosis virus-based retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4931-4936.
- Greenhouse J. J., Petropoulos C. J., Crittenden L. B., Hughes S. H. (1988): Helper independent retrovirus vectors with Rous-associated virus type O long terminal repeats. *J. Virol.* **62**: 4809-4812.
- Goetz M. P., Suman V. J., Ingle J. N., Nibbe A. M., Visscher D. W., Reynolds C. A., Lingle W. L., Erlander M., Ma X. J., Sgroi D. C., Perez E. A., Couch F. J. (2006): A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin. Cancer. Res.* **12**: 2080-2087.
- Hadrys T., Punnamoottil B., Pieper M., Kikuta H., Pezeron G., Becker T. S., Prince V., Baker R., Rinkwitz S. (2006): Conserved co-regulation and promoter sharing of *hoxb3a* and *hoxb4a* in zebrafish. *Dev. Biol.* **297**: 26-43.
- Hamilton T. C., Young R. C., Ozols R. F. (1984): Experimental model systems of ovarian cancer: Applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin. Oncol.* **11**: 285-298.
- Holschneider C. H., Berek J. S. (2000): Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin. Surg. Oncol.* **19**: 3-10.
- Hughes S. H., Greenhouse J. J., Petropoulos C. J., Suttrave P. (1987): Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J. Virol.* **61**: 3004-3012.

- Iimura T., Pourquie O. (2007): Hox genes in time and space during vertebrate body formation. *Dev. Growth Differ.* **49**: 265-75.
- Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M. (2002): Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **52**: 23-47.
- Leskov K. S., Klokov D. Y., Li J., Kinsella T. J., Boothman D. A. (2003): Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 11590-11600.
- Li L., Shaw P. E. (2002): Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J. Biol. Chem.* **277**: 17397-17405.
- Lin R. Z., Hu Z. W., Chin J. H., Hoffman B. B. (1997): Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**: 31196-31202.
- Ma X. J., Wang Z., Ryan P. D., Isakoff S. J., Barmettler A., Fuller A., Muir B., Mohapatra G., Salunga R., Tuggle J. T., Tran Y., Tran D., Tassin A., Amon P., Wang W., Enright E., Stecker K., Estepa-Sabal E., Smith B., Younger J., Balis U., Michaelson J., Bhan A., Habin K., Baer T. M., Brugge J., Haber D. A., Erlander M. G., SgROI D. C. (2004): A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* **5**: 607-616.
- Miao J., Wang Z., Provencher H., Muir B., Dahiya S., Carney E., Leong C-O., SgROI D. C., Orsulic S. (2007): HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 17093-17098.

- Novak A., Hsu S. C., Leung-Hagesteijn C., Radeva G., Papkoff J., Montesano R., Roskelley C. D., Grosschedl R., Dedhar S. (1998): Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4374-4379.
- Orsulic S. (2002): An RCAS-TVA-based approach to designer mouse models. *Mamm. Genome* **13**: 543-547.
- Orsulic S. (2004): Ovarian cancer. U: Holland E. C. (ur.) *Mouse Models of Human Cancer*, John Wiley & Sons, Inc., str. 171-187.
- Orsulic S., Li Y., Soslow R. A., Vitale-Cross L. A., Gutkind J. S., Varmus H. E. (2002): Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system. *Cancer Cell* **1**: 53-62.
- Petropoulos C. J., Hughes S. H. (1991): Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells. *J. Virol.* **65**: 3728-3737.
- Roby K. F., Taylor C. C., Sweetwood J. P., Cheng Y., Pace J. L., Tawfik O., Persons D. L., Smith P. G., Terranova P. F. (2000): Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* **21**: 585-591.
- Sale S., Orsulic S. (2006): Models of ovarian cancer metastasis: Murine models. *Drug Discov. Today Dis. Models* **3**: 149-154.
- Shannan B., Seifert M., Boothman D. A., Tilgen W., Reichrath J. (2006): Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control. *J. Mol. Histol.* **37**: 183-188.

- Shannan B., Seifert M., Leskov K., Willis J., Boothman D., Tilgen W., Reichrath J. (2006): Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ.* **13**: 12-19.
- Trougakos I. P., Gonos E. S. (2002): Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1430-1448.
- Weaver V. M., Petersen O. W., Wang F., Larabell C. A., Briand P., Damsky C., Bissell M. J. (1997): Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in 3-dimensional culture and in vivo using integrin blocking antibodies. *J. Cell Biol.* **137**: 231-245.
- Wilson M. R., Easterbrook-Smith S. B. (2000): Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 95-98.
- Xie D., Lau S. H., Sham J. S., Wu Q. L., Fang Y., Liang L. Z., Che L. H., Zeng Y. X., Guan X. Y. (2005): Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma. *Cancer* **103**: 277-283.
- Yamashita T., Tazawa S., Yawei Z., Katayama H., Kato Y., Nishiwaki K., Yokohama Y., Ishikawa M. (2006): Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int. J. Oncol.* **28**: 931-938.
- Yang C. R., Leskov K., Hosley-Eberlein K., Criswell T., Pink J. J., Kinsella T. J., Boothman D. A. (2000): Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5907-5912.
- Zhang Q., Zhou W., Kundu S., Jang T. L., Yang X., Pins M., Smith N., Jovanovic B., Xin D., Liang L., Guo Y., Lee C. (2006): The leader sequence triggers and enhances several functions of clusterin and is instrumental in the progression of human prostate cancer in vivo and in vitro. *BJU International* **98**: 452-460.