

Ekspresijski profil gena BCL2 i njegovih regulatornih nekodirajućih molekula RNA u seroznom raku jajnika

Božičević, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:483560>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lara Božičević

**Ekspresijski profil gena *BCL2* i njegovih
regulatornih nekodirajućih molekula RNA
u seroznom raku jajnika**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lara Božičević

**Expression profile of BCL2 gene and its
regulatory non-coding RNAs in serous
ovarian cancer**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pod voditeljstvom znanstvenog suradnika dr. sc. Petra Ozretića i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije (mag. educ. biol. et chem.).

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „MIRnaGLI – Novi molekularni mehanizmi kao mete ciljanih terapija: Interakcije molekula mikroRNA i signalnog puta Hedgehog-GLI u seroznom karcinomu jajnika“ [HRZZ IP-2016-06-1268]; Voditeljica: prof. dr. sc. Sonja Levanat

ZAHVALE

Hvala mom mentoru, dr. sc. Petru Ozretiću, na ukazanom povjerenju i beskrajnom strpljenju te nesebičnom dijeljenju znanja tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se i ostalim članovima Laboratorija za nasljedni rak koji su mi pomogli svojim savjetima.

Nadalje, hvala suvoditeljici, izv. prof. dr. sc. Ingi Urlić na pomoći pri pregledavanju rada.

Veliko hvala mojoj obitelji koja je sve ove godine studija bila tu za mene i vjerovala u mene.

Hvala mom dečku Domagoju što je bio uz mene, bodrio me i vjerovao u moj uspjeh.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresijski profil gena *BCL2* i njegovih regulatornih nekodirajućih molekula RNA u seroznom raku jajnika

Lara Božičević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Visoka smrtnost od seroznog raka jajnika visokog gradusa (HGSOC) uzrokovana je njegovim otkrivanjem u kasnoj fazi zbog izostanka ranih simptoma te nedostatka testova za rano otkrivanje. Zato je potrebno bolje razumjeti molekularne mehanizme njegovog nastanka, što može stvoriti nove dijagnostičke i terapijske pristupe. Ciljevi mog istraživanja bili su: na proširenom setu uzoraka HGSOC i kontrolnih uzoraka zdravih jajovoda metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) odrediti ekspresiju gena regulatora apoptoze *BCL2*, njegovih transkripcijskih faktora *GLI1* i *GLI2*, dviju molekula mikroRNA (miRNA) čiji je cilj gen *BCL2*, miR-96-5p i miR-21-5p, te dviju dugih nekodirajućih RNA (lncRNA) koje također mogu vezati te miRNA, *MALAT1* i *XIST*; na osnovu korelacija između ekspresija složiti mrežu odnosa mRNA–miRNA–lncRNA koja bi mogla objasniti epigenetsku regulaciju gena *BCL2* pomoću nekodirajućih molekula RNA, te odrediti dijagnostičku vrijednost dobivenih ekspresija za razlikovanje tumorskog i zdravog tkiva. Rezultati su pokazali da je ekspresija gena *BCL2* i *GLI1* te obiju lncRNA bila značajno snižena, a ekspresija obiju miRNA povišena u raku jajnika. Analiza korelacija pokazala je da bi transkripcijski faktor *GLI1* mogao imati važniju ulogu od *GLI2* u regulaciji ekspresije *BCL2* te da bi ôs *BCL2*–miR-96-5p–*XIST* mogla biti uzrok snižene ekspresije gena *BCL2* u HGSOC. Najveću dijagnostičku vrijednost pokazale su ekspresije *BCL2* i *XIST* (AUC > 0,8).

(82 stranice, 28 slika, 19 tablica, 183 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: rak jajnika, gen *BCL2*, mikroRNA, lncRNA, ekspresija, qRT-PCR

Voditelj: Dr. sc. Petar Ozretić, znan. sur.

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

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš – Sermek

Rad prihvaćen: 4. veljače 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Expression profile of *BCL2* gene and its regulatory non-coding RNAs in serous ovarian cancer

Lara Božičević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

High mortality from high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is caused by its late detection due to the absence of early symptoms and lack of tests for early detection. Therefore, it is necessary to better understand molecular mechanisms of its development, which could create new diagnostic and therapeutic approaches. The goals of my research were: to determine by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), on an extended set of HGSOC and healthy fallopian tube samples, expressions of apoptosis regulator gene *BCL2*, its transcription factors *GLI1* and *GLI2*, two microRNAs (miRNAs) that can target *BCL2*, miR-96-5p and miR-21-5p, and two long non-coding RNAs (lncRNAs) that can also bind these miRNAs, *MALAT1* and *XIST*; based on the correlations between determined expressions, to construct a network of mRNAs–miRNAs–lncRNAs that could explain epigenetic regulation of *BCL2* by non-coding RNAs, and to determine diagnostic value of these expressions for discrimination between tumor and healthy tissue. Results showed that expressions of *BCL2*, *GLI1*, and both lncRNAs were significantly decreased, while expressions of both miRNAs were increased in ovarian cancer. Correlation analysis showed that transcription factor *GLI1* could play more important role than *GLI2* in *BCL2* expression regulating, and that *BCL2*–miR-96-5p–*XIST* axis could be the cause for decreased *BCL2* expression in HGSOC. Expressions of *BCL2* and *XIST* showed highest diagnostic values (AUC > 0.8).

(82 pages, 28 figures, 19 tables, 183 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Key words: ovarian cancer, *BCL2*, microRNA, lncRNA, gene expression, qRT-PCR

Supervisor: Dr. Petar Ozretić, Res. Assoc.

Cosupervisor: Dr. Inga Urlić, Assoc. Prof.

Reviewers:

Assoc. Prof. Inga Urlić

Asst. Prof. Mirela Sertić Perić

Assoc. Prof. Draginja Mrvoš – Sermek

Thesis accepted: February 4, 2021

Sadržaj

POPIS KRATICA

1. UVOD	1
1.1. Rak jajnika – epidemiologija i etiologija	1
1.1.1. Klasifikacija novotvorina jajnika	1
1.1.2. Modeli patogeneze epitelnog raka jajnika.....	2
1.1.3. Serozni rak jajnika visokog gradusa – karakteristike i mehanizmi nastanka.....	4
1.1.4. Jajovod – ishodišni organ za serozni rak jajnika visokog gradusa.....	5
1.2. Signalni put Hedgehog-Gli (Hh-Gli).....	7
1.2.1. Povijesni pregled	7
1.2.2. Komponente signalnog puta Hh-Gli	7
1.2.3. Prijenos signala u signalnom putu Hh-Gli	10
1.3. Gen regulator apoptoze <i>BCL2</i>	13
1.3.1. Gen <i>BCL2</i> i rak jajnika.....	15
1.3.2. Regulacija ekspresije gena <i>BCL2</i> putem transkripcijskih faktora <i>GLI</i>	16
1.4. Nekodirajuće molekule RNA (ncRNA)	18
1.4.1. Molekule mikroRNA.....	18
1.4.1.1. Molekule mikroRNA i rak jajnika	20
1.4.2. Duge nekodirajuće molekule RNA (lncRNA)	20
1.4.2.1. Molekule lncRNA i rak jajnika	22
1.4.2.2. Kompetitivne endogene molekule RNA (ceRNA) – lncRNA kao „mikroRNA spužve“	23
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	25
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. MATERIJALI	26
3.1.1. Uzorci	26
3.2. METODE	26
3.2.1. Izolacija molekula RNA.....	26
3.2.2. Provjera kvalitete i određivanje koncentracije molekula RNA.....	28

3.2.3. Reverzna transkripcija (RT)	29
3.2.3.1. Reakcija RT za određivanje ekspresije mRNA i lncRNA	29
3.2.3.2. Reakcija RT za određivanje ekspresije miRNA.....	31
3.2.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)....	35
3.2.4.1. Određivanje relativne ekspresije mRNA i lncRNA	35
3.2.4.1.1. Uvodavanje početnica za određivanje ekspresije lncRNA	38
3.2.4.2. Određivanje relativne ekspresije miRNA	39
3.2.5. Statistička analiza	41
4. REZULTATI.....	42
4.1. Efikasnost početnica za određivanje ekspresije lncRNA	42
4.2. Ekspresija gena <i>BCL2</i> , <i>GLI1</i> i <i>GLI2</i> u seroznom raku jajnika visokog gradusa i zdravim jajovodima	45
4.3. Ekspresija lncRNA <i>MALAT1</i> i <i>XIST</i> u seroznom raku jajnika visokog gradusa i zdravim jajovodima.....	49
4.4. Ekspresija miRNA miR-21-5p i miR-96-5p u seroznom raku jajnika visokog gradusa i zdravim jajovodima.....	52
4.5. Korelacija između ekspresija istraživanih mRNA, lncRNA i miRNA	55
4.6. Dijagnostička vrijednost ekspresija istraživanih mRNA, lncRNA i miRNA	57
5. RASPRAVA.....	60
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. LITERATURA.....	66
8. ŽIVOTOPIS	82

POPIS KRATICA

3' UTR	eng. 3' untranslated region, 3' netranslatirana regija
5' UTR	eng. 5' untranslated region, 5' netranslatirana regija
BCL2	eng. <i>BCL2</i> apoptosis regulator, gen regulator apoptoze <i>BCL2</i>
ceRNA	eng. competing endogenous RNA, kompetitivna endogena molekula RNA
GLI	porodica transkripcijskih faktora GLI
HGSOC	eng. high-grade serous ovarian cancer, serozni rak jajnika visokog gradusa
Dhh	gen/protein Desert Hedgehog
Disp	protein Dispatched
Hh-Gli	signalni put Hedgehog-Gli
Hip	eng. Hedgehog interacting protein
HRD	eng. homologous recombination dysfunction
lncRNA	eng. long non-coding RNA, dugačka nekodirajuća molekula RNA
miRNA	eng. microRNA, molekula mikroRNA
Ihh	gen/protein Indian Hedgehog
mRNA	eng. messenger RNA, molekula glasnička RNA
ncRNA	eng. non-coding RNA, nekodirajuća molekula RNA
OSE	eng. ovarian surface epithelium, površinski epitel jajnika
XIST	eng. X-inactive specific transcript
TAE	eng. Tris-acetate-EDTA, pufer
Ci	eng. <i>Cubitus interruptus</i> , homolog proteina Gli kod vinske mušice
Ptc	eng. patched, zakrpan
qRT-PCR	eng. real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
RCF	eng. relative centrifugal force, relativna centrifugalna sila
Shh	gen/protein Sonic Hedgehog
Smo	eng. smoothened, gladak
SSD	eng. sterol-sensing domain
SuFu	eng. Suppressor of Fused homolog

1. UVOD

1.1. Rak jajnika – epidemiologija i etiologija

Rak jajnika smatra se čak petom najletalnijom ginekološkom bolešću u zapadnom svijetu te se češće pojavljuje u razvijenim zemljama. (Siegel i sur. 2013, Cramer 2012). Rizik nastanka povećava se sa starosnom dobi pa je tako najviša incidencija zabilježena kod žena u dobi od 70. do 74. godine života te njezina učestalost iznosi 5% u ženskoj populaciji. Najnoviji dostupni podatci govore da je u Republici Hrvatskoj u 2017. godini zabilježeno 24.385 novodijagnosticiranih zloćudnih bolesti (Škerija i sur. 2020).

Problem koji se javlja kod ove bolesti je njezino kasno otkrivanje, u podmaklome stadiju kada, nažalost, dvije glavne metode liječenja (kirurško liječenje i kemoterapija) imaju nepovoljne rezultate glede preživljavanja pacijentica. Još uvijek nije pronađena učinkovita metoda primarnog probira oboljelih žena niti osjetljivija laboratorijska ili klinička detekcija koja bi omogućila otkrivanje bolesti u ranoj fazi. Iz svega navedenog, može se zaključiti kako se preživljenje od ove zloćudne bolesti nije tijekom vremena mnogo mijenjalo i upravo stoga je potrebno bolje poznavanje biologije stanica raka jajnika čija visoka stopa umnažanja uvelike utječe na nepovoljni ishod bolesti, ali i daje mogućnost ciljanog terapijskog djelovanja (Heintz i sur. 2001).

1.1.1. Klasifikacija novotvorina jajnika

Ako se pogleda histogenetska klasifikacija, novotvorine jajnika mogu biti epitelnog porijekla, zatim porijekla zametnih (germinativnih) stanica te mezenhimalnog porijekla. U skladu s preporukom Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i Međunarodne federacije ginekologa i porodničara (FIGO), rak jajnika epitelnog porijekla razvrstava se u tri kategorije: dobroćudni tumori, atipični epitelni proliferativni tumori (tumori niskog zloćudnog potencijala) i zloćudni tumori (Lee i sur. 2003). Više od 90% zloćudnih tumora jajnika jesu tzv. primarni tumori jajnika od kojih su tumori pokrovnog epitela zastupljeni s vrlo velikim postotkom, čak 85 do 90%. Vjeruje se kako svi epitelni tumori jajnika potječu od stanica pokrovnog epitela jajnika, a procesom neoplastične diferencijacije poprimaju različite histološke i kliničke osobine.

Po učestalosti se može izdvojiti pet glavnih histoloških tipova raka jajnika. To su: serozni rak visokog gradusa, endometrioidni, mucinozni, klarocelularni i serozni rak niskog gradusa (Lee i sur. 2003).

1.1.2. Modeli patogeneze epitelnog raka jajnika

Poznata su dva modela kojima se tumači patogeneza epitelnog raka jajnika. To su tradicionalni i novi dvojni model.

Teorija ovulacije smatra se tradicionalnom teorijom patogeneze raka jajnika. Prema njoj, rak jajnika razvija se iz pokrovnog epitela jajnika. (Fathalla 1971, Cramer i Welch 1983). Za vrijeme ovulacije dolazi do njegovog oštećenja što je praćeno upalnim reakcijama, invaginacijom u stromu jajnika da bi se naposljetku stvorile kortikalne inkluzione ciste. Nadalje se, pod utjecajem lokalnih čimbenika te vjerojatno i steroidnih hormona odvija zacjeljivanje, dolazi do proliferacije i maligne transformacije epitela (Fathalla 1971, Cramer i Welch 1983, Purdie i sur. 2003). Tijekom vremena provedeno je nebrojeno mnogo studija koje su vrlo detaljno proučavale jajnike i njihov epitel ne bi li se pronašle prekursorske promjene seroznog raka visokog gradusa. Međutim, to nije dalo nikakvih rezultata jer dovoljno uvjerljiva prekursorska promjena nije bila pronađena. Stoga, zaključuje se, rezultati provedenih studija nisu potvrdili ovu teoriju, pa se formiralo mišljenje da se barem dio raka jajnika razvija – *de novo* (Bell i Scully 1994).

Sljedeća spomenuta teorija naziva se novi dvojni model. Prema njoj, a na temelju molekularnih i genetičkih promjena te kliničko-patološke slike, epitelnog tumora jajnika dijelimo u dvije kategorije: tip 1 i tip 2 (tablica 1).

Tablica 1. Molekularne i genetičke promjene te kliničko-patološke slike karakteristične za tip 1 i tip 2 epitelnog raka jajnika.

TIP TUMORA	PREKURSORSKA LEZIJA	NAJČEŠĆE MUTACIJE GENA	KROMOSOMSKA NESTABILNOST
TUMORI TIP 1			
Serozni rak niskog gradusa	APST, MPSC	<i>KRAS, BRAF</i>	niska
Endometrioidni karcinom niskog gradusa	endometrioza	<i>CTNNB1, PTEN</i>	niska
Klarocelularni karcinom	endometrioza	<i>PIK3CA</i>	niska
Mucinozni	APMT	<i>KRAS</i>	niska
TUMORI TIP 2			
Serozni karcinom visokog gradusa	nepoznata (STIC)	<i>TP53</i>	visoka
Endometrioidni karcinom visokog gradusa	nepoznata	<i>TP53</i>	visoka
Nediferencirani karcinomi	nepoznata	nepoznato	visoka
Karcinosarkom	nepoznata	<i>TP53</i>	visoka

APST = atipično proliferirajući serozni tumor jajnika; MPSC = neinvazivni mikropapilarni serozni karcinom; APMT = atipično proliferirajući mucinozni tumor jajnika; STIC = serozni intraepitelni karcinom jajovoda

Tipu 1 pripadaju serozni i endometrioidni rak niskog gradusa, mucinozni rak te klarocelularni rak (rak svijetlih stanica). Općenito govoreći, tumori tipa 1 su niskog gradusa malignosti i kod njih je razvoj bolesti sporiji te su genetički stabilniji od tumora tipa 2. U kliničkoj praksi prezentirani su velikom tumorskom masom koja je ograničena na područje jajnika, što nazivamo FIGO stadij I (Kurman i sur. 2014).

S druge pak strane, tumori tipa 2 su tumori visokog gradusa, agresivni te se gotovo uvijek prezentiraju u uznapredovalom stadiju. Njih čine serozni i endometrioidni rak visokog

gradusa, nediferencirani rak i karcinosarkom, s time da je najčešći upravo serozni rak visokog gradusa (Güth i sur. 2007).

1.1.3. Serozni rak jajnika visokog gradusa – karakteristike i mehanizmi nastanka

Serozni rak jajnika visokog gradusa čini 85 do 90% seroznog raka, 70% raka površinskog epitela jajnika te je 70-80% smrtnosti od raka jajnika uzrokovano upravo ovim tipom (Bowtell i sur. 2015). Ovi tumori opisani su kao vrlo veliki cistični i čvrsti s čestim područjima krvarenja i nekroze, a najčešći su u starijih pacijentica s prosjekom dobi od 64 godine (Devouassoux-Shisheboran i Genestie 2015).

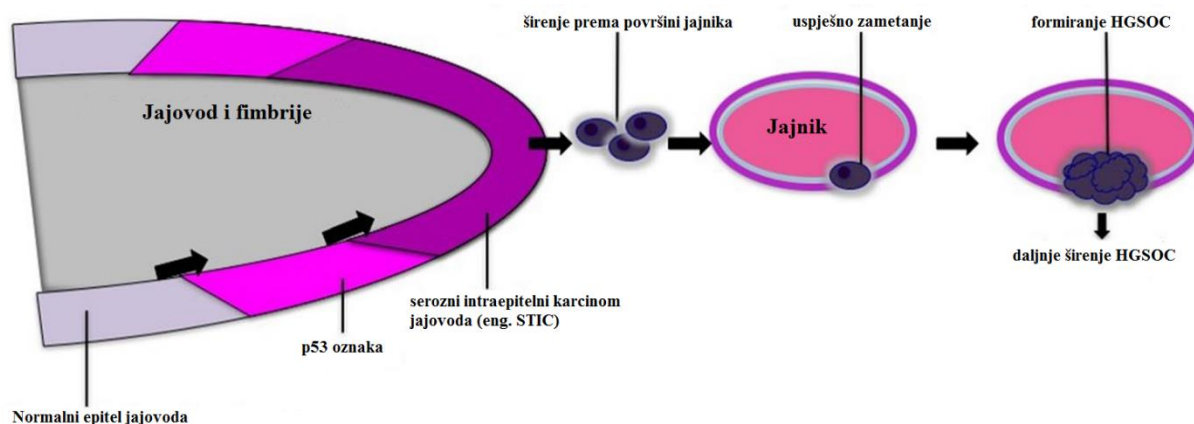
Smatra se da je ova vrsta raka jajnika karakterizirana mutacijom i disfunkcijom proteina p53, genomskom nestabilnošću te uznapređovalom fazom bolesti. S njegovom karcinogenezom su povezane i štetne mutacije u genima *BRCA1* te *BRCA2* kao i u drugim manje penetrantnim genima kao što su *PALB2* i *RAD51C*, koji su uključeni u popravak oštećenja molekule DNA, što ukazuje na moguću osjetljivost na liječenje tvarima koje oštećuju molekulu DNA te inhibitore popravka DNA. Gubitak funkcije tih gena povezan je s izrazom disfunkcija homologne rekombinacije (eng. homologous recombination dysfunction, HRD). Tako je, primjerice, poznato da može postojati serozni rak jajnika visokog gradusa s divljim tipom gena *BRCA1* i *BRCA2* koji imaju prepoznatljiv HRD-fenotip. Također, pokazalo se da su takvi HRD-tumori osjetljivi na određene načine liječenja te se mogu fenotipski otkriti pomoću kompozitnog molekularnog biomarkera čija je karakteristika prediktivnost za odgovor na PARP inhibitore. Upravo zato je korištenje novih spoznaja anatomske i molekularne pozadine seroznog raka jajnika visokog gradusa dovelo do razboritog kreiranja novih kombinacija u načinima liječenja, a sve s ciljem stvaranja staničnog okruženja nalik HRD-u te poticanje novih koristi od samog liječenja (Kohn i Ivy 2017).

1.1.4. Jajovod – ishodišni organ za serozni rak jajnika visokog gradusa

Potruga za ishodišnim organom seroznog raka jajnika visokog gradusa veliki je izazov današnjeg vremena. Zasad je poznato kako se bolest otkrije tek kada metastazira u potrbušnu šupljinu (Peres i sur. 2019). Ali što je s njegovim podrijetlom?

Povijesno gledano, serozni rak jajnika visokog gradusa potječe od površinskog epitela jajnika (eng. ovarian surface epithelium, OSE), ali u današnje vrijeme sve češće se tvrdi da bi mogao potjecati od epitela jajovoda (eng. fallopian tube epithelium, FTE). Zhang i sur. (2019) su u nedavnoj studiji pokazali, koristeći modele miša i organoide raka, kako ishodišna stanica u razvoju seroznog raka jajnika visokog gradusa ima značajan utjecaj na rast raka, njegovo metastaziranje i transkriptom. Studija je također pokazala da upravo ta ishodišna stanica može imati važnu ulogu prilikom primanja prve kemoterapije.

U početku se smatralo da se rak jajnika razvija iz površinskog epitela jajnika koji je bio podvrgnut procesu metaplazije u epitele nalik Müllerovim kanalićima prije nego što se konačno razvio u serozni rak jajnika visokog gradusa (Scully 1995). Međutim, ova teorija ne vrijedi zbog toga što u jajniku nisu primijećene prekursorske lezije (Auersperg 2013). S druge pak strane, dok eksperimentalni dokazi koji pokušavaju identificirati je li ishodišna stanica potekla od površinskog epitela jajnika ili jajovoda mogu biti opovrgnuti, trenutni dokazi idu u prilog teoriji prema kojoj serozni rak jajnika visokog gradusa može podjednako nastati iz površinskog epitela jajnika te jajovoda (Hao i sur. 2017, Lawrenson i sur. 2019). Međutim, važno je naglasiti da je ranije predložena teorija prema kojoj serozni rak jajnika visokog gradusa nastaje iz jajovoda koji se sastoji od diferenciranog epitela sastavljenog od dvije vrste stanica: cilijarnih i sekretornih (slika 1). Prema njoj, fimbrije jajovoda talože stanice raka na ipsilateralni jajnik te na taj način potiču stvaranje tumorskih tvorbi (Kim i sur. 2012).



Slika 1. Razvoj seroznog raka jajnika visokog gradusa iz normalnog epitela jajovoda. Epitel jajovoda građen je od jednog sloja cilijarnih i sekretornih stanica koje su izložene upalnim citokinima povezanim s procesom ovulacije. Taj ponavljajući genotoksični stres uzrokuje oštećenja molekule DNA i inducira mutaciju proteina p53, što dovodi do klonalne ekspanzije fiziološki normalnih epitelnih stanica, što se naziva „p53-potpis“. Daljnje mutacije omogućuju stanicama stjecanje kapaciteta za proliferacijom, što dovodi do razvoja seroznog intraepitelnog karcinoma jajovoda (eng. STIC). Napredak u širenju STIC-a dovodi do ljuštenja invazivnih stanica raka iz fimbrija jajovoda nakon čega se one mogu brzo proširiti na površinu jajnika, uspostaviti stvaranje tumorskih nakupina koje se zatim transformiraju u serozni rak jajnika visokog gradusa. Ljuštenje se također može dogoditi od STIC-a prije same invazije na fimbrije pri čemu relativna veličina jajovoda i jajnika nije reprezentativna (slika je preuzeta i prilagođena iz Klotz i Wimberger 2017).

Poznavanje ishodišne stanice za razvoj seroznog raka jajnika visokog gradusa od velike je važnosti jer predstavlja temelje za bolji razvoj *in vivo* te *in vitro* modela rane karcinogeneze, pomaže u proučavanju preventivnih metodologija i ranog otkrivanja bolesti te također može biti važno u određivanju optimalnih metoda liječenja.

1.2. Signalni put Hedgehog-Gli (Hh-Gli)

1.2.1. Povijesni pregled

Signalni put Hedgehog-Gli otkriven je 1980. godine genetičkom analizom vinske mušice *Drosophila melanogaster* (Nüsslein-Volhard i Wieschaus 1980). Ličinke ženke nosile su gensku mutaciju koja je uzrokovala pojavu „bodlji“ na njihovim leđima. Znanstvenike su te bodlje podsjećale na bodlje ježa (eng. hedgehog), stoga je taj mutirani gen, a po njemu i sam signalni put, nazvan *Hedgehog* (Nüsslein-Volhard i Wieschaus 1980). Taj evolucijski visoko očuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre poznat je i pod drugim nazivima kao što su Hh-Ptc ili Hh/Ptc/Smo, odnosno Hedgehog-Gli ili Hedgehog-Patched. Može se reći da je on, baš kao i drugi fundamentalni signalni putevi, konzerviran od vinske mušice do čovjeka, ali često uz mutacije, duplikacije ili druge promjene koje su se zbile tijekom evolucije. (Murone i sur. 1999). Poznata je njegova važna uloga u embrionalnom razvitku čovjeka, a time i u nastanku mnogih razvojnih bolesti (npr. Gorlinov sindrom ili sindrom nevusa bazalnih stanica), međutim, jednako je bitno spomenuti kako poremećena funkcija signalnog puta Hh-Gli dovodi do nastanka brojnih vrsta tumora, primjerice tumora pluća, dojke, jajnika, prostate te drugih organa i organskih sustava (Hunter 1997). Prema dosadašnjim istraživanjima, smatra se kako je signalni put Hh-Gli odgovoran za nastanak čak jedne trećine svih zloćudnih tumora te zbog toga postaje sve važnijom metom potencijalnih terapija raka (Murone i sur. 1999, Hunter 1997).

1.2.2. Komponente signalnog puta Hh-Gli

Glavne komponente signalnog puta Hedgehog-Gli su također evolucijski konzervirane, a identificirane su uz pomoć istraživanja genetike vinske mušice. Terminologija koja je korištena kako bi se imenovali geni članovi signalnog puta odnosi se na fenotipska obilježja mutanata vinske mušice. Tako je prvi identificirani gen za transmembranski receptorski protein Ptc (eng. patched; hrv. zakrpan) čija je uloga spriječiti prijenos signala ukoliko ligand Hedgehog nije vezan za njega. Ključnu ulogu ima i koreceptor Smo (eng. smoothed; hrv. zaglađen), također transmembranski protein te transkripcijski posrednik signalnog puta *Cubitus interruptus* (Ci), odnosno obitelj Gli transkripcijskih faktora kod kralježnjaka (Briscoe i Théron 2013). Protein GLI1 identificiran je 1987. godine, a gen koji za njega kodira nazvan je prema genskoj amplifikaciji u malignim gliomima, u kojima je nađeno i preko 50 kopija toga

gena (Kinzler i sur. 1987). Ubrzo nakon toga uslijedila je i identifikacija proteina GLI2 i GLI3 (Ruppert i sur. 1988), te najzad otkriće same funkcije tih proteina kao transkripcijskih faktora (Kinzler i sur. 1988).

Ranije spomenuti protein Hedgehog (Hh) postoji u tri izoformna oblika u sisavaca, a oni su: Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) i Indian Hedgehog (Ihh). Najčešći, ujedno i najbolje okarakteriziran je Sonic Hedgehog (Shh) (Murone i sur. 1999), kojeg odlikuju najjača aktivnost i prisutnost u najširem rasponu različitih tkiva. S druge pak strane, Dhh i Ihh specijalizirani su za samo određena tkiva (Pathi i sur. 2001).

Bitno je spomenuti da veliku ulogu igra i protein Dispatched (Disp) jer omogućava otpuštanje proteina Hh iz stanica koje ga proizvode (Burke i sur. 1999). Također, bitnim se smatra i protein Hip (eng. Hedgehog interacting protein) koji ima svojstvo vezanja proteina Hh čime ga odvlači od njegovog pravog receptora. Na taj se način sprječava aktivacija signalnog puta (Vogt i sur. 2004).

Protein Patched (Ptch) zapravo je ljudski homolog proteina Ptc koji potječe od vinske mušice, a do sada su kod čovjeka zabilježena dva homologa ovog proteina: Ptch1 i Ptch2 (Carpenter i sur. 1998). Prvi je otkriven Ptch1 i u literaturi ga se može naći samo kao Ptch, a razlog zašto je Ptch2 slabije opisan leži u tome što nije uključen u tako veliki broj različitih oboljenja kao što je to slučaj kod Ptch1 (Jögi i sur. 2000).

Za signalni put Hh-Gli važno je djelovanje proteina Ptch kao negativnog regulatora – zbog nemogućnosti vezanja proteina Hh blokira se daljnji prijenos signala jer Ptch blokira svoj koreceptor Smoothened. Međutim, kada se Hh veže na Ptch, otpušta se blokada proteina Smoothened i signal nastavlja s daljnjim prijenosom sve do svog cilja, a to je transkripcija ciljnih gena kojima pripada i sam protein Ptch. Tako se može reći da se ekspresija gena *PTCH* smatra univerzalnim markerom aktivnosti Hh-Gli signalnog puta (Murone i sur. 1999).

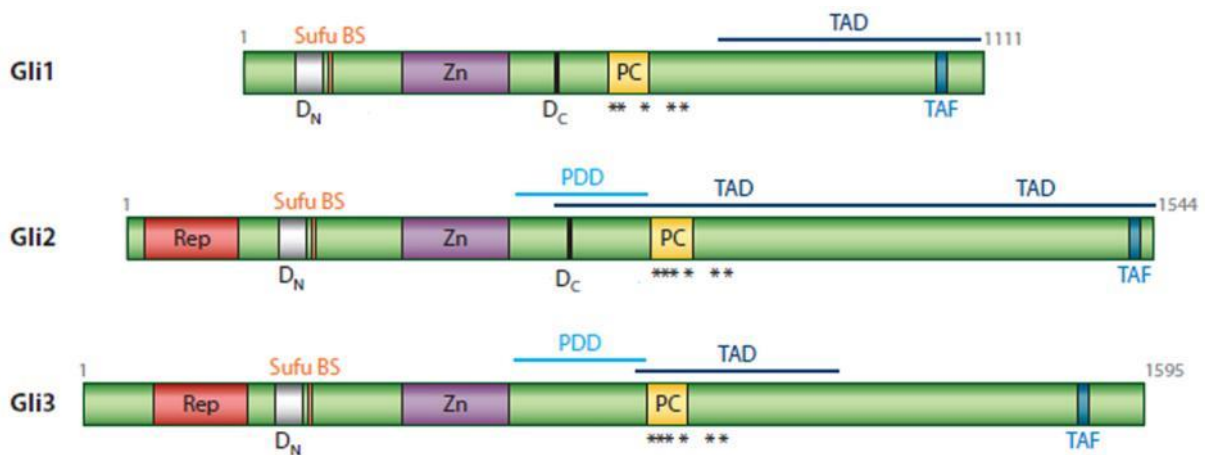
Protein Smoothened (Smo) ranije je spomenut kao koreceptor Hh-Gli signalnog puta. Uz to, smatra se i pozitivnim regulatorom puta – aktivan je i potiče prijenos signala kada u blizini nema inhibirajućeg proteina Ptch (Murone i sur. 1999). Kao i Ptch, transmembranski je protein, građen od 7 transmembranskih hidrofobnih domena (Alcedo i sur. 1996).

Ranije se smatralo da proteini Ptch i Smo reagiraju direktno, što bi drugim riječima značilo da Ptch inhibira aktivnost proteina Smo samo ako se fizički na njega veže (Alcedo i Noll 1997). Međutim, pokazano je da ipak nije tako (Stark 2002). Kako navode novija istraživanja, radi se o kompleksnom odnosu koji uključuje malu molekulu koja bi imala ulogu posrednika, iako ona u biti još nije niti dokazana. Međutim, ono što se zna jest da dolazi do promjene lokalizacije proteina. Naime, protein Ptch se nalazi na staničnoj membrani u

neaktivnom obliku, a protein Smo se nalazi unutar stanice, pretpostavlja se na membranama vezikula. Nakon što se aktivira signalni put, dolazi do internalizacije proteina Ptch kao i transporta proteina Smo na vanjsku membranu stanice (Incardona i sur. 2002).

Posljednja vrlo važna komponenta signalnog puta Hh-Gli jest protein Gli. On je zabilježen kod sisavaca u tri različite izoforme, a to su: Gli1, Gli2 i Gli3. Posebnost ovih izoformi jest da se njihove funkcije preklapaju, ali opet svaka od njih ima neku svoju karakteristiku. Tako je Gli1 aktivator, Gli2 aktivator/represor, dok je Gli3 represor (Sasaki i sur. 1999).

Proteini Gli građeni su od cinkovog prstena, kao što prikazuje slika 2. Također imaju N-terminalnu domenu koja ima dominantnu, odnosno represorsku aktivnost te C-terminalnu regiju koja se sastoji od dva dijela: aktivacijske domene i domene za smještaj u citoplazmi. Zanimljivo je kako je kod proteina Gli1 N-terminalna domena skraćena, zbog čega se izgubila represorska aktivnost pa se on smatra isključivo aktivatorom (Dai i sur. 1999). S druge pak strane, Gli2 i Gli3 imaju i aktivatorsku i represorsku ulogu, ali opet uz iznimku: Gli2 je primarno aktivator, a Gli3 je primarno represor.



Slika 2. Shematski prikaz regija i domena u proteinima Gli1, Gli2 i Gli3. Na slici se uočava motiv cinkovog prstena (Zn), koji je ujedno i područje vezanja molekule DNA; TAD = transaktivirajuća domena; TAF = vezno mjesto za protein TAF (protein vezan uz TATA-vezujući protein (TBP)); Rep = represorska domena; Sufu BS = vezno mjesto za protein SuFu; * = mjesto fosforilacije proteinske kinaze A (PKA); PC = fosforilacijski klaster; PDD = domena za određivanje procesiranja; DN, DC = N – i C- terminalni degroni (sljedovi aminokiselina koji određuju početno mjesto degradacije) (slika je preuzeta i prilagođena iz Hui i Angers 2011).

U neaktivnom obliku protein Gli nalazi se u citoplazmi gdje je vezan uz protein SuFu (eng. suppressor of fused homolog), a moguće da je vezan i na još neke proteine (Dunaeva i sur. 2003). Iako kompleks nije do kraja istražen kod sisavaca, zna se da SuFu predstavlja negativni regulator signalnog puta te da mijenja mjesto proteinu Gli1 u stanici (Kogerman i sur. 1999, Ding i sur. 1999).

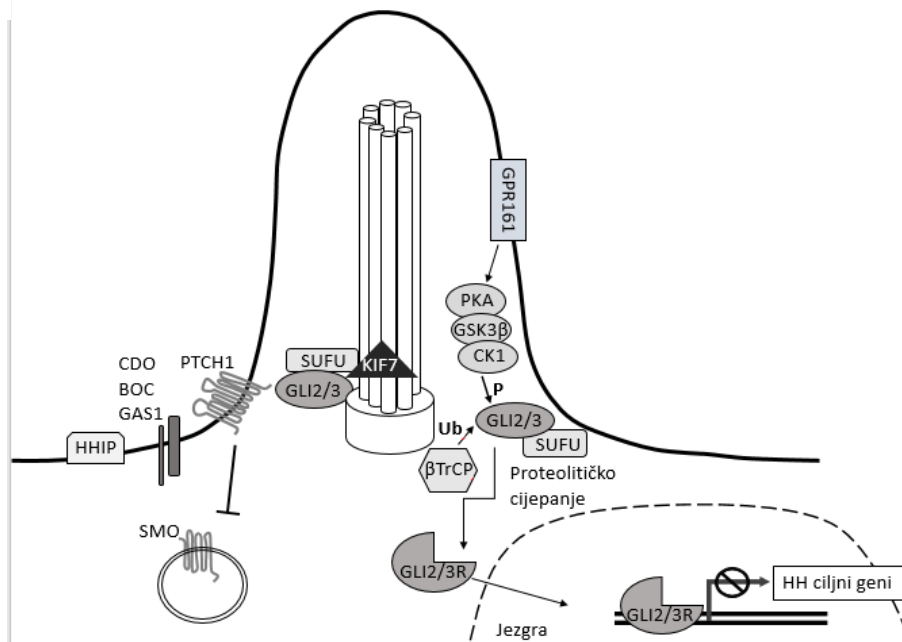
1.2.3. Prijenos signala u signalnom putu Hh-Gli

Prijenos signala putem signalnog puta Hh-Gli može se pratiti kada je on neaktivan te kada je aktivan.

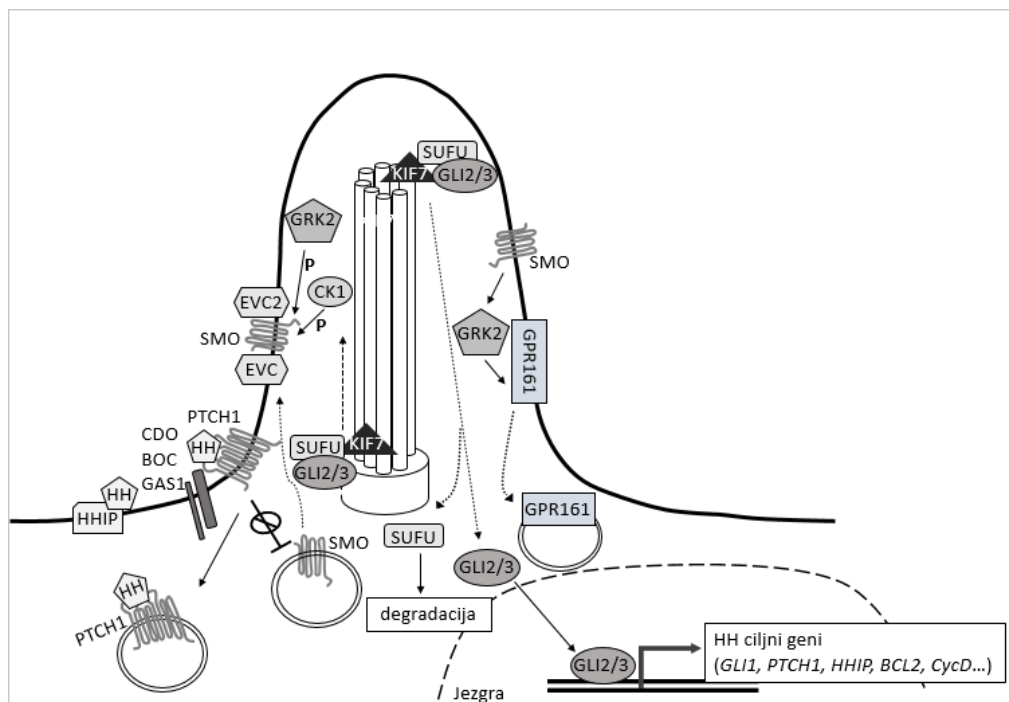
Takozvana kanonska aktivacija signalnog puta temelji se na vezanju jednog od tri liganda Hh na receptor Ptch, što prikazuje slika 3. Važno je napomenuti da je za biološku aktivnost liganda Hh iznimno važna post-translacijska modifikacija vezanja kolesterola i palmitinske kiseline (Peters i sur. 2004). Oni vezanjem za receptor Ptch mogu pokrenuti autokrinu aktivaciju samog signalnog puta, ali je potrebno istaknuti da stvaranjem koncentracijskog gradijenta oko tkiva izazivaju odgovore i okolnih stanica, što im daje karakteristike morfogena (Cross i Bury 2004). Glavni regulator sekrecije proteina Hh jest protein Dispatched (Disp) čija je uloga otpuštanje proteina Hh i djelovanje na okolne stanice (Burke i sur. 1999). Negativni regulator signalnog puta je receptor Ptch; on u odsustvu liganda Hh onemogućava prijenos signala tako što inhibira koreceptor Smoothened (Smo) (Ingham 1991). Poznata su dva homologa proteina Ptch u sisavaca: Ptch1 i Ptch2 (Zaphiropoulos i sur. 1999). Vezanjem liganda Hh događa se prestanak inhibicije koreceptora Smo od strane receptora Ptch. Karakteristika koreceptora Smo jest da je on pozitivan regulator Hh-Gli signalnog puta za razliku od receptora Ptch, a razlog tome je što je koreceptor Smo u odsustvu Ptch stalno aktivan i kao takav vrši transdukciju signala u stanicu (Murone i sur. 1999). Upravo je interakcija Ptch-Smo jedno od danas glavnih nerazjašnjenih pitanja kad se govori o signalnom putu Hedgehog-Gli. Poznato je da se vezanjem Hh na Ptch prekida inhibicija koreceptora Smo, što omogućava njegovu aktivaciju. Za nju je od iznimne važnosti fosforilacija koreceptora Smo uz pomoć kinaza PKA i CK1, kao i transport s unutarstaničnih vezikula na staničnu membranu (Jia i sur. 2004). Tako aktivirani koreceptor Smo uzrokuje kaskadni prijenos signala koji je uvjetovan fosforilacijom molekula. Naposljetku, fosforilacija proteina Gli predstavlja mogućnost ulaska u jezgu, vezanja za ciljne gene i transkripciju (Østerlund i Kogerman 2006).

To rezultira mogućnošću daljnjeg prijenosa signala i aktivacije transkripcijskih faktora Gli, što u konačnici dovodi do transkripcije ciljnih gena među kojima je i sam Ptch te Gli1 (Marigo i sur. 1996). Transkripcijski faktori Gli reguliraju transkripciju velikog broja gena koji sudjeluju u mnogo staničnih procesa povezanih s nastankom tumora: stanična diferencijacija (*INSM1*, *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*), stanična proliferacija (*MYCC*, *MYCN*), apoptoza (*BCL2*, *BAK*, *BAX*, *CASP3*, *CASP9*), stanični ciklus (*CCND1*, *CDKN1A*), oštećenja DNA (*RAD51*, *TP53*), angiogeneza (*MET*, *VEGFR2*) i stanična adhezija (*CDH1*, *CDH2*, *SNAI1*) (Katoh i Katoh 2009).

(a)



(b)

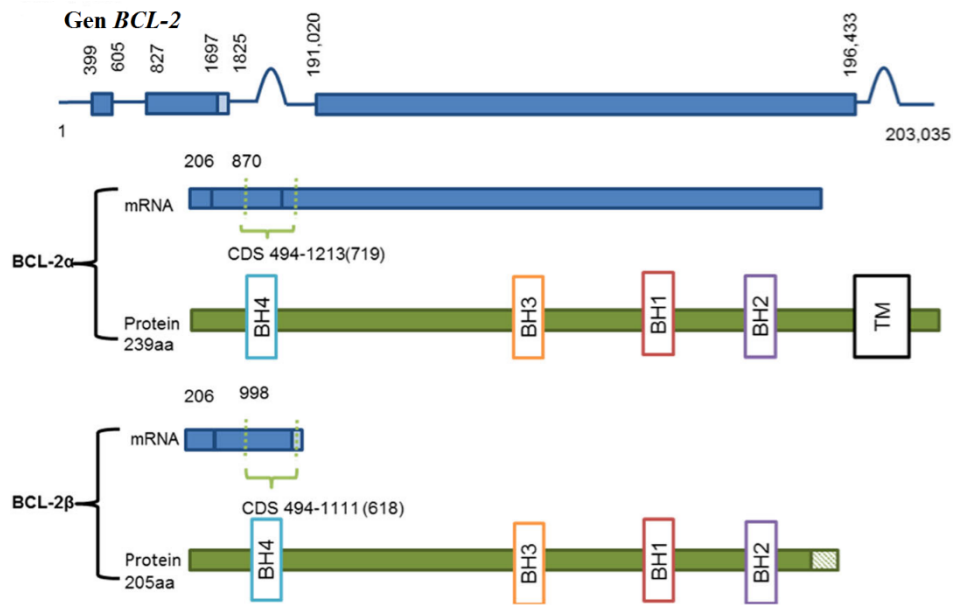


Slika 3. Prikaz signalnog puta Hh-Gli kod sisavaca. Slika (a) prikazuje neaktivan signalni put; u odsustvu liganda HH, receptor PTCH1 inhibira koreceptor SMO i time se blokira prijenos signala. Proteini GLI su vezani za represor SUFU koji sprječava njihovu translokaciju u jezgru te ih obilježava za razgradnju u proteasomu. Cijepanjem proteina GLI u proteasomu nastaje represorski oblik koji blokira transkripciju ciljnih gena. Slika (b) prikazuje kanonski prijenos signala koji se ostvaruje vezanjem liganda HH za receptor PTCH1. Na taj način prestaje inhibicija koreceptora SMO i dolazi do prijenosa signala. Proteini GLI se otpuštaju od represora SUFU i nepocijepani translociraju u jezgru gdje potiču transkripciju ciljnih gena (slika je preuzeta i prilagođena iz Sabol i sur. 2018).

1.3. Gen regulator apoptoze *BCL2*

Porodica proteina Bcl-2 poznata je po svojoj ulozi u programiranoj staničnoj smrti, apoptozi. Intenzivnija istraživanja započela su 1980.-ih godina kada se te porodica proteina proučavala u kontekstu B-staničnog limfoma. Od tada pa sve do danas, identificirano je mnogo homolognih proteina (Tsujimoto i sur. 1984, Tsujimoto i sur. 1985, Tsujimoto i sur. 1989). Svaki član porodice ima karakterističan naziv koji je dobio prema Bcl-2 homolognoj (BH) domeni te sudjelovanju u regulaciji apoptoze. Uloga domene BH je olakšavanje interakcija između članova porodice, ali bitna je i jer može ukazati na dvije vrste funkcija: pro-apoptotsku ili anti-apoptotsku (Petros i sur. 2001, Yin i sur. 1994).

Gen *BCL2* bio je prvi identificirani član porodice proteina Bcl-2 zahvaljujući svojoj ulozi u B-staničnom limfomu. Za tu bolest karakteristična je translokacija između kromosoma 14 i kromosoma 18, t(14:18), koja je rezultirala pojačanom transkripcijom gena *BCL2* što je dalo prednost opstanku stanica raka (Tsujimoto i sur. 1984, Tsujimoto i sur. 1985, Tsujimoto 1989). Gen je građen od tri eksona i svaki od njih ima specifičnu ulogu. Tako prva dva eksona kodiraju četiri domene BH, dok je zadaća trećeg ekson kodiranje transmembranske domene koja usidri protein na unutarstaničnu membranu (Seto i sur. 1988, Chen-Levy i sur. 1989). Postoje dva izoformna oblika ovog gena: *BCL2 α* i *BCL2 β* . Funkcija posljednjega još uvijek nije do kraja istražena, ali zato je poznato da je oblik *BCL2 α* anti-apoptotski (Tsujimoto 1989, Bissonnette i sur. 1992, Miyashita i Reed 1992, Katsumata i sur. 1992). Zanimljivo je spomenuti kako izoformi *BCL2 β* nedostaje treći ekson, što zapravo govori o nedostatku transmembranske domene za usidrenje. Bez obzira na to on i dalje dijeli domene BH i općenitu strukturu gena *BCL2* (slika 4).



Slika 4. Građa gena *BCL2* i njegova dva izoformna oblika: *BCL2α* i *BCL2β*. Na slici se uočava kako obliku gena *BCL2β* nedostaje transmembranska domena (slika preuzeta i prilagođena prema: Warren i sur. 2019).

Istraživanja provedena na temu mehanizama regulacije apoptoze pokazala su da porodica proteina Bcl-2 igra glavnu ulogu u tom putu (Solano-Gálvez i sur. 2018). Sudbina stanica je posredovana ravnotežom između proapoptotskih i antiapoptotskih članova porodice proteina Bcl-2 (Shamas-Din i sur. 2013). Takva osnovna interakcija sačuvana je od najjednostavnijih organizama kao što su spužve pa sve do čovjeka (Caria i sur. 2017, Kvansakul i Hinds 2015). Iako su specifični mehanizmi regulacije ovog apoptotskog signalnog puta različiti od organizma do organizma, svima njima je naposljetku zajednički gubitak anti-apoptotskih (proliferacijskih) aktivnosti te dobitak pro-apoptotskih aktivnosti. Upravo zbog toga se i dalje intenzivno istražuju interakcije ove porodice proteina te se razjašnjava njihova mreža regulatornih funkcija (Banjara i sur. 2020).

Još jedan od načina na koji gen *BCL2* regulira proces apoptoze jest preko gena za tumor-supresorski protein p53. Naime, izoformni oblik gena *BCL2*, *BCL2α*, može spriječiti gen *TP53* da regulira proapoptotične gene, ali u isto vrijeme gen *TP53* može negativno regulirati protein Bcl-2 (Beham i sur. 1997, Gibson i sur. 1996).

1.3.1. Gen *BCL2* i rak jajnika

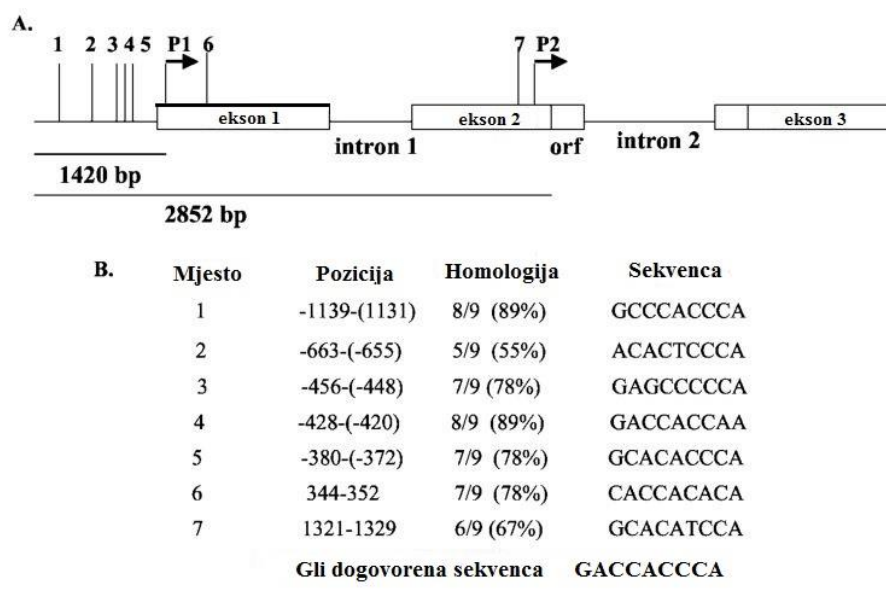
Gen *BCL2*, kao i većina ostalih članova porodice proteina Bcl-2, smješten je u jezgrinoj ovojnici, endoplazmatskom retikulumu te na vanjskoj membrani mitohondrija. Ta mjesta su u skladu s njegovim funkcijama, ali uloga koju ima smješten na vanjskoj membrani mitohondrija glavni je mehanizam unutarnje aktivacije apoptoze (Banjara i sur. 2020). Kako pokazuju istraživanja, mutirani proteini porodice Bcl-2 koji se ne mogu usidriti u membranu, manje su učinkoviti u prevenciji apoptoze (Estaquier i sur. 2012).

S obzirom da je indukcija stanične apoptoze završni događaj u kemoterapiji baziranoj na platini, rezistencija na apoptozu ukazuje na rezistenciju u kemoterapiji (Cardenas i sur. 2017). Zabilježene su brojne stanice raka koje imaju tendenciju izbjegavanja apoptoze, a upravo prevencija tih stanica da ju izbjegnu otvara nove obećavajuće mogućnosti kojima je u cilju preokrenuti rezistenciju na kemoterapiju. Naime, kao središnji dio apoptotskog signalnog puta, proteini porodice Bcl-2 imaju glavnu ulogu kada je riječ o rezistenciji raka jajnika na kemoterapiju. U početku se smatralo da imaju obilježja folikularnih limfoma (Adams i Cory 2007), ali sada se zna da između članova te porodice proteina postoji jedna profinjena mreža djelovanja koja nije do kraja razjašnjena (Leibowitz i Yu 2010). Primijećeno je da postoje brojne stanične linije raka u kojima je poremećena ekspresija članova porodice proteina Bcl-2 što se povezuje s preživljavanjem raka i kemorezistencijom. Zbog toga se smatra da interakcija članova porodice proteina Bcl-2 nije jednaka u stanicama raka i normalnim (zdravim) stanicama.

Brojni znanstvenici su u svojim istraživanjima uočili da se u raku jajnika, kao i u ostalim vrstama raka, pojavljuje prekomjerna ekspresija gena *BCL2* i ostalih članova te porodice proteina (Beale i sur. 2000, Marx i Meden 2001, Fauvet i sur. 2005, Palmer i sur. 2008). Dakle, iako je još uvijek nerazjašnjena ekspresija gena *BCL2* i ostalih članova te porodice proteina u stanicama i tkivu raka jajnika, istraživanja pokazuju da upravo ta porodica ima najvažniju ulogu u kemoterapiji raka jajnika (Chaudhry i sur. 2010, Binju i sur. 2019).

1.3.2. Regulacija ekspresije gena *BCL2* putem transkripcijskih faktora GLI

GLI1, GLI2 i GLI3 su transkripcijski faktori koji se vežu na isti nukleotidni slijed: 5'-GACCACCCA-3' (Kinzler i Vogelstein 1990, Ruppert i sur. 1990). Transkripcijski faktor GLI1 posjeduje samo transaktivacijsku domenu, dok GLI2 i GLI3 posjeduju dvije domene: transaktivacijsku i represijsku (Dai i sur. 1999, Sasaki i sur. 1999). Bigelow i sur. (2004) su u svojem istraživanju pokazali da su i *GLI1* i gen *BCL2* prekomjerno eksprimirani u karcinomu bazalnih stanica te su predložili model prema kojem je moguće utvrditi potencijalna vezna mjesta transkripcijskih faktora GLI na promotoru gena *BCL2* dugačkom 2,9 kilobaza (kb). Naime, potvrđeno je kako se faktori GLI1, GLI2 i GLI3 osim na ranije spomenutu sekvencu također mogu vezati i na još šest potencijalnih veznih mjesta (slika 5) (Kinzler i Vogelstein 1990, Ruppert i sur. 1990).



Slika 5. Potencijalna vezna mjesta za transkripcijske faktore GLI u promotoru gena *BCL2*. Slika (a) prikazuje lokacije sedam potencijalnih veznih mjesta (označenih 1-7) u ovisnosti o strukturi gena. P1 i P2 označavaju startna mjesta transkripcije; orf označava početak otvorenog okvira čitanja i počinje u eksonu 2, a završava u eksonu 3. Oznaka '1420 bp' označava udaljenost mjerenu u parovima baza između P1 i početka promotorske regije, a '2852 bp' označava udaljenost između početka otvorenog okvira čitanja (orf) i početka promotora, također mjerenu u parovima baza. Slika (b) prikazuje položaje mogućih veznih mjesta u promotoru gena *BCL2* u odnosu na startno mjesto transkripcije P1, kao i nukleotidne sekvence te stupanj njihove homologije s konsenzusnom GLI-vezujućom sekvencom (GACCACCCA) (slika je preuzeta i prilagođena iz Bigelow i sur. 2004).

Istraživanje koje su provodili Bigelow i sur. (2004) pokazalo je kako GLI1 pozitivno regulira transkripciju gena *BCL2* zbog toga što sadrži samo transaktivnu domenu, a ona se smatra primarnim regulatorom Shh-inducirane transaktivacije (za razliku od transkripcijskog faktora GLI3 koji je građen od dviju domena) (Dai i sur. 1999, Sasaki i sur. 1999).

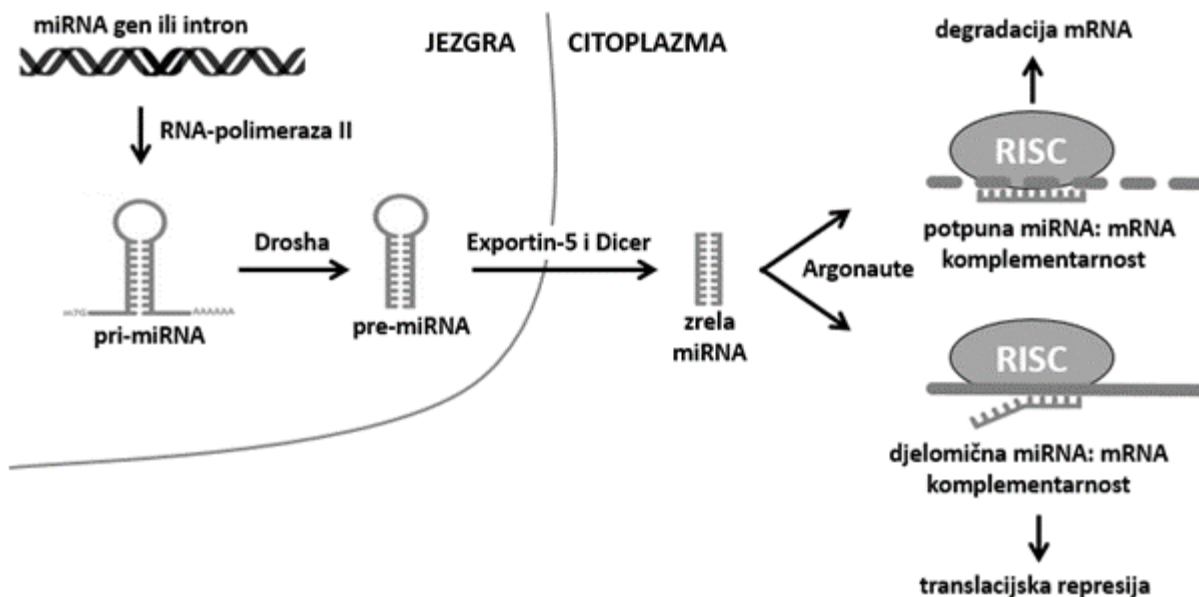
S druge pak strane, istraživanje koje su proveli Regl i sur. (2004) pokazalo je da je transkripcija gena *BCL2* pretežno inducirana transkripcijskim faktorom GLI2, dok su Bigelow i sur. (2004) u svom istraživanju uspostavili vezu između signalnog puta Hh-Gli i ekspresije gena *BCL2* pokazujući da je transkripcijski faktor GLI1, a ne GLI3, taj koji se veže na promotor gena *BCL2*. Dalje u svom istraživanju Regl i sur. (2004) pokazuju kako je GLI2, koji se smatra onkogenom, snažan aktivator ekspresije gena *BCL2* u ljudskim epidermalnim stanicama za razliku od transkripcijskog faktora GLI1. Također, zbog direktnog vezanja faktora GLI2 na promotor gena *GLI1* može se zaključiti kako je u ljudskim keratinocitima *GLI1* reguliran transkripcijskim faktorom GLI2 (Regl i sur. 2002, Ikram i sur. 2004). Kao zaključak, prema Regl i sur. (2004) postoji dokaz kako je u slučaju transkripcijskog faktora GLI2 mogućnost izazivanja visokih razina ekspresije gena *BCL2* veća nego u slučaju GLI1. S obzirom da GLI3 nije u mogućnosti aktivirati promotor gena *BCL2*, pretpostavlja se kako je GLI2 glavni faktor uključen u aktivaciju ekspresije gena *BCL2*.

1.4. Nekodirajuće molekule RNA (ncRNA)

Termin „nekodirajuće molekule RNA“ (eng. non-coding RNA, ncRNA) koristi se za molekule RNA koje ne kodiraju za proteine. Međutim, to ne znači da te molekule ne sadrže genetske informacije ili da ne posjeduju nikakvu funkciju. Naprotiv, iako se općenito smatra kako se većina genetskih informacija prenese putem proteina, nedavne studije pokazale su i suprotno – većina genoma sisavaca i drugih složenih organizama se prepisuje u nekodirajuće molekule RNA od kojih se mnoge nakon toga doraduju alternativnim prekrajanjem ili se prerađuju u manje krajnje produkte. Tom razredu nekodirajućih molekula RNA pripadaju npr. mikroRNA, male jezgričine RNA (eng. small nucleolar RNA, snoRNA), kao i druge klase malih regulatornih molekula RNA koje znanost tek treba otkriti, ali također i deseci tisuća dugačkih transkripata čije su funkcije i dalje nepoznanica. Smatra se da sve te molekule RNA (uključujući i one kodirane u intronima) posjeduju skriveni sloj unutarnjih signala koji su zaduženi za kontrolu različitih razina genske ekspresije u fiziologiji i razvoju, kao što su primjerice arhitektura kromatina, epigenetska memorija, transkripcija (prepisivanje) te prekrajanje, uređivanje i translacija (prevođenje) molekula RNA. Nameće se zaključak kako regulatorna mreža molekula RNA može odrediti većinu naših složenih karakteristika, odigrati značajnu ulogu u razvoju bolesti te sačiniti neistraženi svijet genetičkih varijacija unutar i između vrsta (Mattick i Makunin 2006).

1.4.1. Molekule mikroRNA

Molekule mikroRNA (miRNA) su male molekule RNA građene od 19 do 25 nukleotida koje ne kodiraju za proteine. Prepisuju se ili iz vlastitih gena ili iz introna kodirajućih i nekodirajućih gena uz pomoć enzima RNA-polimeraza II. Smatra se da postoji oko 1000 lokusa u ljudskom genomu koji kodiraju molekule miRNA i koji su sposobni regulirati čak 60% ljudskog transkriptoma (Bentwich i sur. 2005). Tako se primarni transkript miRNA (pri-miRNA) obrađuje u jezgri uz pomoć enzima ribonukleaze III imena Drosha u preteču miRNA (pre-miRNA) koja je dugačka oko 60 nukleotida i ima strukturu ukosnice (slika 6).



Slika 6. Biogeneza molekula mikroRNA kod sisavaca. U jezgri se primarni transkript mikroRNA (pri-miRNA) prepisuje i procesira u prekursor mikroRNA (pre-miRNA). Nakon ulaska u citoplazmu, pre-miRNA se dalje doraduje u zrele miRNA duplekse koji se ugrađuju u višeproteinski kompleks imena RISC (RNA-inducirani kompleks za utišavanje). Molekule mikroRNA reguliraju ciljne gene ili degradacijom mRNA (izravnim cijepanjem) ili inhibicijom sinteze proteina (slika je preuzeta i prilagođena iz Levanat i sur. 2017).

Nakon što protein Exportin-5 prebaci pre-miRNA u citoplazmu, enzim ribonukleaza III imena Dicer cijepa tu molekulu te se oslobađa zreli miRNA dupleks dugačak 22 nukleotida. Te doradene molekule miRNA spajaju se s proteinima Argonaut (Ago) te formiraju tzv. RNA-inducirani kompleks za utišavanje (eng. RNA-induced silencing complex, RISC) (Kim i sur. 2009). Nadalje, kompleks odmotava dvolančanu molekulu miRNA, razgrađuj se komplementarni lanac te se zrela molekula miRNA veže na 3' netranslatiranu regiju (3' UTR) ciljnih gena. Upravo na opisani način molekule miRNA reguliraju gensku ekspresiju na post-transkripcijskoj razini: preko sparivanja baza s djelomično komplementarnim mjestima na 3' UT regiji gena. S obzirom da molekule miRNA mogu prepoznati kratke sekvence komplementarne s njihova dva do osam nukleotida te ne zahtijevaju idealnu komplementarnost s ciljnim mjestima u genu, vrijedi da svaka miRNA može regulirati stotine drugih mRNA i više miRNA može regulirati istu mRNA (Brennecke i sur. 2005).

Zbog svega toga, one uzrokuju smanjenu ekspresiju gena tako što brzo inhibiraju translaciju ili degradaciju mRNA (Bartel 2009). Iako su molekule miRNA važne za regulaciju staničnog rasta, diferencijaciju, razvoj i apoptozu, ono što ih povezuje s razvojem raka je njihova pretjerana ili snižena ekspresija (takozvani onkomiR-evi) (Di Leva i sur. 2014).

1.4.1.1. Molekule mikroRNA i rak jajnika

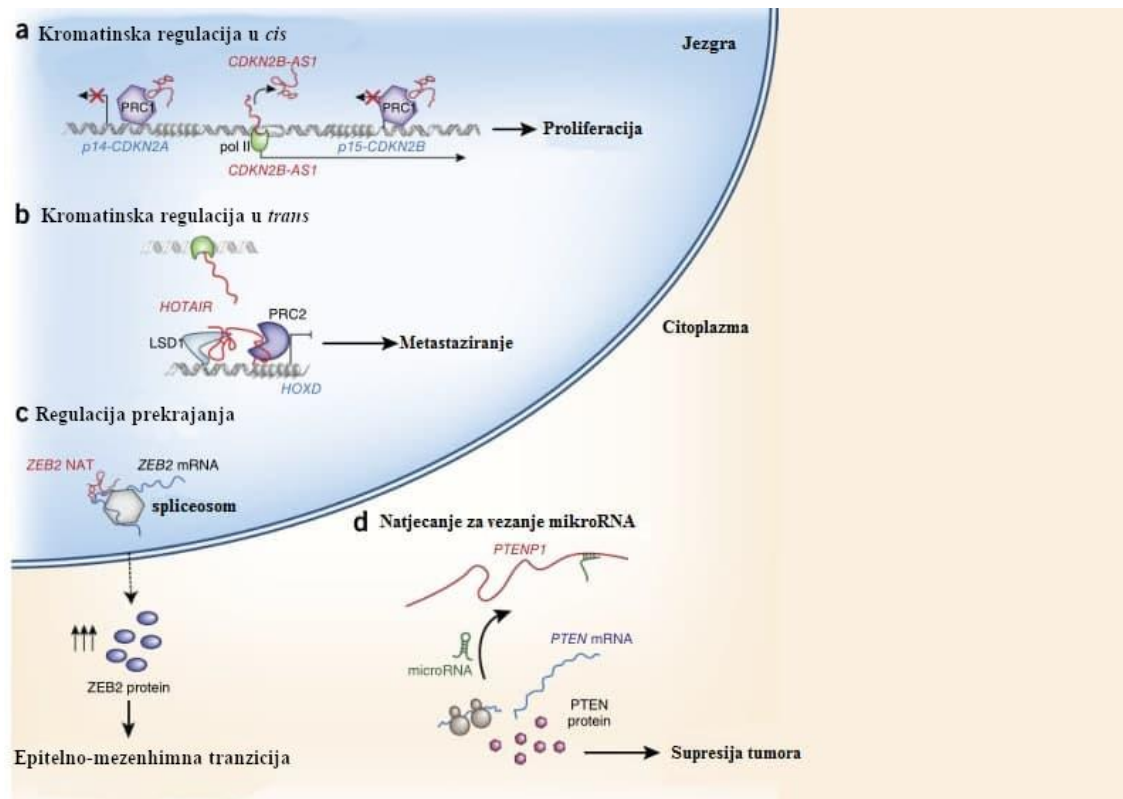
Uloga molekula mikroRNA u raku jajnika se posljednjih godina mnogo istraživala (Kinose i sur. 2014, Gadducci i sur. 2014). Te molekule se u raku jajnika mogu ponašati kao onkogeni ili kao tumor supresori. Molekule miRNA koje imaju ulogu tumor supresora mogu regulirati onkogene što pak može uzrokovati gubitak epitelnog u mezenhimalni prijelaz (eng. epithelial to mesenchymal transition, EMT), kao i povećanu kemosenzitivnost te tumorsku supresiju. S druge pak strane, miRNA koje imaju ulogu onkogenih inhibiraju tumor supresor gene te time uzrokuju kemorezistenciju i smanjeno preživljenje. Na kraju se dolazi do zaključka kako se profili molekula miRNA mogu povezati s podtipovima raka jajnika i njihovim kliničkim ishodima (Zaman i sur. 2012).

Ispostavilo se kako je porodica miR-200 najizraženije prekomjerno eksprimirana obitelji molekula miRNA u epitelnom raku jajnika i to na način da su miR-200a i miR-200c pojačano eksprimirane u seroznom, endometrioidnom te raku svijetlih stanica, a miR-200b i miR-141 su pojačano eksprimirane u endometrioidnim i seroznim podtipovima raka (Muralidhar i Barbolina 2015). Što se tiče regulacije gena koji kodiraju za miRNA, pokazalo se kako je poremećena obrada miRNA dvama enzimima – Dicer i Drosha – uključena u tumorigenezu raka jajnika, što je pak povezano s uznapredovalim stadijem raka jajnika te naposljetku dovodi do loših kliničkih ishoda (Merritt i sur. 2008).

1.4.2. Duge nekodirajuće molekule RNA (lncRNA)

Duge nekodirajuće molekule RNA (eng. long non-coding RNA, lncRNA) su molekule koje nisu veće od 200 nukleotida te se ne prevode u protein (Clark i sur. 2012). Ako se pogleda njihova uloga u razvoju raka, može se reći kako molekule lncRNA imaju tkivno-specifičnu ekspresiju koja je u korelaciji s različitim skupinama gena koji utječu na regulaciju staničnog ciklusa, preživljavanje, odgovor imunološkog sustava ili pluripotentnost između svih ostalih funkcija, što je od izuzetne važnosti jer determinira transformirani fenotip stanica raka (Guttman i sur. 2009). Također, nekoliko lncRNA je transkripcijski regulirano ključnim onkogenima ili tumor supresorima (Huarte i sur. 2010, Zheng i sur. 2014), a pored svega toga te molekule se smatraju i regulatorima inicijacije i progresije tumora (Gutschner i Diederichs 2012).

Skupina molekula lncRNA je vrlo heterogena skupina transkripata čija je uloga regulacija genske ekspresije različitim mehanizmima. Stoga se može reći kako su lncRNA funkcionalni transkripti koji doprinose obilježjima raka (slika 7) te zbog toga postaju atraktivne potencijalne mete u terapijama (Esteller 2011, Sánchez i Huarte 2013, Ling i sur. 2015).



Slika 7. Primjeri različitih mehanizma djelovanja lncRNA povezanih s rakom. Dio slike (a) prikazuje kako lncRNA u jezgri utječe na ekspresiju proksimalno smještenih gena epigenetskim utišavanjem njihove ekspresije, što u konačnici može dovesti do proliferacije stanica. Dio slike (b) prikazuje kako lncRNA remodeliranjem kromatina epigenetski utišava ekspresiju udaljenih gena, što može dovesti do metastaziranja. Na dijelu slike (c) je prikazano kako nuklearne lncRNA djeluju post-transkripcijski, blokirajući prekrajanje mRNA čime se promiču alternativni mehanizmi inicijacije translacije radi stvaranju visokih razina proteina što naposljetku inducira epitelno-mezenhimnu tranziciju (EMT). Dio slike (d) prikazuje kako citoplazmatske lncRNA mogu djelovati kao „mikroRNA spužve“, vežući na sebe molekule mikroRNA što uzrokuje pojačanu ekspresiju njihovih ciljnih gena te pojačano djelovanje proteinskih produkata tih gena. Crvenim slovima su označene molekule lncRNA, a plavim geni čiju ekspresiju te lncRNA reguliraju (slika je preuzeta i prilagođena iz Huarte 2015).

Smatra se, također, da neke molekule lncRNA mogu funkcionirati na razini molekula RNA kao primjerice ribozimi ili riboprekidači (eng. riboswitches) (Cech i Steitz 2014). Prema Longu i sur. (2017), postoji nekoliko načina na koje molekule lncRNA mogu regulirati gensku transkripciju. Jedan od njih naziva se *regrutiranje* u kojem molekula RNA može regrutirati regulatorni proteinski kompleks u gen ili cijeli kromosom u *cis* (u situaciji kada novonastala RNA i dalje zauzima svoje mjesto transkripcije) ili *trans* (primjerice, sparivanjem baza s nekom drugom molekulom RNA ili vezanjem RNA direktno na DNA ili pak interakcijama između RNA i proteina). Drugi način jest *inhibicija* – smatra se da molekula RNA može inhibirati vezanje regulatornog transkripcijskog faktora tako da se "ponaša" kao mamac ili pak može inhibirati njegovu aktivnost tzv. izravnom okluzijom aktivnog mjesta alosteričkim efektima ili posredno. Treći način na koji molekula RNA može regulirati transkripciju je posredno putem samog čina transkripcije. Naime, transkripcija lncRNA može regulirati transkripciju obližnjih gena ili pozitivno (održavanjem aktivne kromatinske strukture) ili negativno (primjer su tzv. sudarajuće polimeraze). Bitno je napomenuti kako u ovom slučaju produkt RNA ili nema važnosti uopće ili pak ima neku dodatnu funkciju. I naposljetku, četvrti način na koji molekule lncRNA mogu regulirati transkripciju jest također posredno, ali putem organizacije genoma te arhitekture jezgre. To konkretno znači da se organizacijom heterokromatinskih ili eukromatinskih regija u neposrednoj blizini mogu stabilizirati te domene i/ili kontrolirati širenje post-translacijskih modifikacija obližnjeg kromatina.

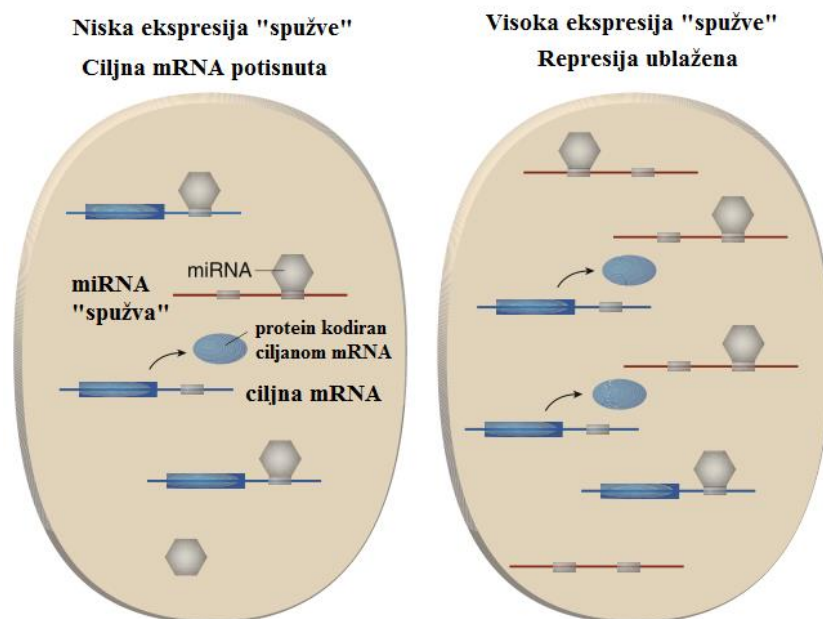
1.4.2.1. Molekule lncRNA i rak jajnika

Molekule lncRNA su predložene kao nova generacija kliničkih markera u procesu otkrivanja raka jajnika. Kod pacijentica kojima je dijagnosticirana bolest te molekule su proučavane raznim metodama, kao što su: reverzna transkripcija, kvantitativna lančana reakcija polimerazom, hibridizacija mikroreza te hibridizacija *in situ*. Molekule su se prvenstveno proučavale iz tkiva raka, a nakon toga uspoređivale sa susjednim zdravim tkivom ili uzorcima zdravih pacijentica. Gledano s kliničke strane, u kontekstu raka jajnika, molekule lncRNA su iznimno bitne zbog toga što mogu biti aktivne u razvijanju rezistencije na terapije, što dovodi do povratka bolesti te lošeg ishoda za pacijenta. Smatra se da je većina njih povezana s rezistencijom na kemoterapeutike (Cortez i sur. 2018).

Zasad je poznato šest molekula lncRNA koje su identificirane u uzorcima krvnog seruma pacijenata oboljelih od raka jajnika i to redom: *E2F4AS* (Park i sur. 2020), *FEZF1-ASI* (Sun i sur. 2020), *FLVCRI-ASI* (Chu i sur. 2018), *LINK-A* (Dou i sur. 2019), *MLK7-ASI* (Pan i sur. 2019) i aHIF (Yu i sur. 2018) koji je izoliran iz egzosoma u serumu. Čini se kako se ovoj listi pridružuju još i *MEG3* te *MALAT1* koji su identificirani u egzosomima koji potječu od staničnih linija raka jajnika (Dou i sur. 2019, Wambecke i sur. 2020). Istraživanje funkcije lncRNA provedeno na globalnoj razini pokazalo je da se 120 molekula smatra onkogenima (od toga 114 potvrđenih i 6 navodnih), dok ih se 29 smatra tumor supresor genima (od toga 25 potvrđenih i 4 navodna). Međutim, status molekula *SPRY-IT1* (Dou i sur. 2019), *MEG3* (Wang i sur. 2018, Ye i sur. 2019), *XIST* (Ding i sur. 2019, Zhu i sur. 2020) i *TTN-ASI* (Li i sur. 2019b, Miao i sur. 2020) zasada ostaje nejasan jer su komadići dosad prikupljenih dokaza dvosmisleni.

1.4.2.2. Kompetitivne endogene molekule RNA (ceRNA) – lncRNA kao „mikroRNA spužve“

Sve se više u eksperimentalnim istraživanjima javlja potreba za proučavanjem inhibicije aktivnosti molekula miRNA. Ona se može proučavati tzv. antisense oligonukleotidima ili pak antagomirima, međutim u novije vrijeme sve se više teži biološkom pristupu koji se zasniva na upotrebi tzv. „miRNA spužvi“ ili kako se još nazivaju – „oponašatelji ciljnih mRNA“. Radi se o kompetitivnim inhibitorima pomoću kojih se blokira aktivnost molekule miRNA od interesa (Ebert i Sharp 2010). Takve kompetitivne endogene molekule RNA (eng. competing endogenous RNA, ceRNA) posjeduju vezna mjesta za miRNA na nekodirajućem transkriptu ili na 3' UTR reporterskog gena (slika 8). Sve se više otkriva da mnoge molekule lncRNA mogu djelovati kao prirodne „miRNA spužve“, pozitivno regulirajući ekspresiju ciljnih mRNA koje vežu iste molekule miRNA. Disregulacija ekspresije molekula ceRNA dovodi do disregulacije ekspresije ciljnih mRNA, što u konačnici može dovesti do razvoja različitih bolesti (Sun i sur. 2020).



Slika 8. Natjecanje „RNA spužvi“ s ciljnim molekulama mRNA za vezanje istih molekula miRNA. Crveno su prikazane „RNA spužve“ koje sadrže vezna mjesta (prikazana sivim pravokutnikom) za miRNA od interesa (označene sivim šesterokutom). Lijevi dio slike: kada „miRNA spužve“ imaju nisku ekspresiju, ekspresija ciljnih mRNA (označene plavo) je post-transkripcijski potisnuta pomoću miRNA. Desni dio slike: kada je ekspresija „miRNA spužvi“ visoka, tada su ciljne mRNA oslobođene represije što rezultira većom količinom proteina (prikazani kao plavi oval) (slika je preuzeta i prilagođena iz Ebert i Sharp 2010).

2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

U Laboratoriju za nasljedni rak je pomoću metode mikročipova provedeno profiliranje molekula RNA na malom broju uzoraka seroznog raka jajnika visokog gradusa (HGSOC) i zdravih jajovoda, jednog od glavnih ishodišnih organa tog tipa raka jajnika. Rezultati su pokazali da je ekspresija gena regulatora apoptoze *BCL2*, jednog od ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli, bila statistički značajno snižena u uzorcima HGSOC.

Također, pretragom baza podataka eksperimentalno potvrđenih interakcija miRNA–mRNA TarBase v.8 (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8/index) i miRNA–lncRNA DIANA-LncBase v3 (<https://diana.e-ce.uth.gr/lncbasev3/interactions>), pokazalo se da je u uzorcima HGSOC značajno povišena bila ekspresija dviju molekula miRNA čiji je ciljni gen *BCL2*, miR-96-5p i miR-21-5p, dok je značajno snižena bila ekspresija dviju lncRNA koje također mogu vezati te miRNA, *MALAT1* i *XIST*.

Naša hipoteza je da bi jedan od epigenetskih uzroka snižene ekspresije gena *BCL2* u uzorcima HGSOC mogla biti pojačana ekspresija miR-21-5p i miR-96-5p, koje vezanjem za 3' UTR gena *BCL2* dovode do degradacije molekula mRNA, dok bi s druge strane pojačana ekspresija tih miRNA mogla biti uzorkovana sniženom ekspresijom lncRNA *MALAT1* i *XIST*, koje vezanjem tih miRNA djeluju kao „spužve“, smanjujući njihovu koncentraciju što ima učinak na ekspresiju njihovih ciljnih gena. Za provjeru ove hipoteze prvo je potrebno metodom qRT-PCR-a na većem broju uzoraka potvrditi rezultate dobivene pomoću mikročipova.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- 1) Na proširenom setu svježih uzoraka tkiva HGSOC i zdravih jajovoda metodom qRT-PCR-a provjeriti rezultate dobivene pomoću mikročipova, odnosno odrediti ekspresijski profil:
 - a) gena *BCL2* i njegovih transkripcijskih faktora *GLI1* i *GLI2*
 - b) molekula miRNA miR-21-5p i miR-96-5p, čiji je ciljni gen *BCL2*
 - c) molekula lncRNA *MALAT1* i *XIST*, koje na sebe također mogu vezati miR-21-5p i miR-96-5p.
- 2) Na osnovu korelacija između dobivenih ekspresija složiti mrežu odnosa mRNA–miRNA–lncRNA koja bi mogla objasniti epigenetsku regulaciju gena *BCL2* pomoću nekodirajućih molekula RNA u HGSOC.
- 3) Odrediti dijagnostičku vrijednost dobivenih ekspresija istraživanih RNA za razlikovanje tumorskog i zdravog tkiva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za potrebe ovog rada korišteni su svježi uzorci tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa i zdravih jajovoda, prikupljeni u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb u sklopu projekta HRZZ-a IP-2016-06-1268. Korišteno je 62 uzorka seroznog raka jajnika visokog gradusa i 19 zdravih jajovoda.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija molekula RNA

Nakon operacije, uzorak tumora ili zdravog jajovoda bio je pohranjen u plastičnu krioepruvetu u kojoj se nalazi otopina za stabilizaciju molekula RNA RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD). Radi što boljeg prožimanja tkiva otopinom za stabilizaciju, krioepruveta s tkivom je prvo držana minimalno jedan dan u hladnjaku na +4°C, a nakon toga su uzorci čuvani na -80°C te su odmrznuti neposredno prije izolacije nukleinskih kiselina. Izolaciju ukupnih molekula RNA provela sam na dva načina.

Prvi način na koji sam izolirala ukupne molekule RNA bilo je pomoću komercijalnog seta za izdvajanje RNA Absolutely RNA miRNA Kit (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Izvagala sam 25 mg tkiva i stavila u Petrijevu zdjelicu koja se nalazila na ledu. Na tkivo sam dodala 600 µl pufera za lizu i 4,2 µl β-merkaptetoetanol. Zatim sam pomoću škarica tkivo izrezala te zajedno s puferom za lizu stavila u plastičnu mikroeprevetu te dodala 600 µl 1:1 (v/v) mješavine neutralnog fenola i kloroforma. Mikroeprevetu sam kratko vorteksirala te centrifugirala 4 min na sobnoj temperaturi na maksimalnoj brzini od 16.000 RCF (eng. relative centrifugal force; hrv. relativna centrifugalna sila) u mikrocentrifugi 5415D (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Gornju vodenu fazu sam prebacila u novu mikroeprevetu i dodala 600 µl 21:1 (v/v) mješavine kloroforma i izoamilnog alkohola. Mikroeprevetu sam kratko vorteksirala te nakon toga centrifugirala 3 min na sobnoj temperaturi na maksimalnoj brzini. U sljedećem koraku sam prebacila 600 µL gornje vodene faze u kojoj je RNA na predfiltarsku kolonu koja se nalazila u mikroepreveti od 2 mL te sam centrifugirala 3 minute na maksimalnoj brzini. Filtrat sam prebacila u čistu mikroeprevetu, a predfiltarsku kolonu bacila. Na filtrat sam

dodala 1,5 volumena 100%-tnog etanola i vorteksirala 15 sekundi. Nakon toga sam 600 μ L smjese prebacila na RNA-vezujuću kolonu te centrifugirala 1 minutu na maksimalnoj brzini. Potom sam bacila filtrat, a sačuvala RNA-vezujuću kolonu koju sam vratila u mikroepruvetu. Ostatak smjese sam ponovno stavila na RNA-vezujuću kolonu te sam ponovila prethodno opisani postupak. Nakon bacanja zadnjeg filtrata, na RNA-vezujuću sam dodala 600 μ L nisko zasoljenog pufera za ispiranje te sam centrifugirala 1 minutu na maksimalnoj brzini. Završetkom tog postupka filtrat sam bacila, a sačuvala sam RNA-vezujuću kolonu koju sam vratila u mikroepruvetu. Tada sam kolonu centrifugirala 2 minute na maksimalnoj brzini kako bi se dodatno osušio njen matriks na kojem je vezana RNA. Za to vrijeme pripremila sam otopinu DNAze miješajući pipetiranjem 50 μ L pufera za digestiju DNAom s 5 μ L DNAze I. Zatim sam dodala 5 μ L otopine DNAze direktno na matriks u koloni te sam kolonu inkubirala 15 minuta na 37°C. Nakon toga sam dodala 600 μ L visoko zasoljenog pufera za ispiranje, centrifugirala 1 minutu na maksimalnoj brzini, nakon čega sam filtrat bacila, a RNA-vezujuću kolonu zadržala i vratila u mikroepruvetu. U sljedećem koraku sam dodala 600 μ L nisko zasoljenog pufera za ispiranje, centrifugirala 1 minutu na maksimalnoj brzini, a potom sam filtrat bacila te zadržala RNA-vezujuću kolonu. U idućem koraku ponovila sam centrifugiranje 2 minute na maksimalnoj brzini kako bi se etanol iz pufera za ispiranje u potpunosti odstranio iz kolone te sam nakon toga RNA-vezujuću kolonu premjestila u čistu mikroepruvetu od 1,5 mL. U zadnjem koraku dodala sam na matriks kolone 50 μ L pufera za eluiranje, inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi te sam nakon toga centrifugirala 1 minutu na maksimalnoj brzini. Izoliranoj RNA sam potom odredila koncentraciju, nakon čega je RNA pohranjena i čuvana na -80°C do daljnje upotrebe.

Ukoliko navedenim postupkom nije dobivena dovoljna količina RNA, postupak izolacije sam ponovila koristeći reagens za izolaciju nukleinskih kiselina i proteina TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) koji omogućava korištenje veće početne količine tkiva. Sve korake u ovom postupku izvodila sam na ledu, osim ako je drugačije bilo navedeno - to je bitno zbog očuvanja integriteta molekule RNA. Korake koji su zahtijevali centrifugiranje izvodila sam u centrifugi koja je bila ohlađena na +4°C. Na početku sam tkivo usitnila sterilnim škaricama u 1 mL reagensa TRIzol (Invitrogen Life Technologies, SAD). Homogenat sam potom inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. TRIzol reagens je po kemijskom sastavu monofazna otopina fenola i gvanidin izotiocijanata. Tijekom homogenizacije tkiva TRIzol djeluje tako da narušava integritet staničnih membrana te dovodi do rastvaranja staničnih komponenata. Nakon završenog inkubiranja tkiva, dodala sam 100 μ L kloroforma, sadržaj mikroepruvete sam dobro promiješala te sam ga ponovno inkubirala na

sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon toga sam mikroeprevetu centrifugirala 15 minuta na 16.100 RCF u centrifugi 5415R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) što je dovelo do razdvajanja otopine u tri faze: gornju vodenu fazu (u kojoj se nalaze molekule RNA), međufazu te donju organsku fazu. Gornju fazu sam potom prebacila u čistu mikroeprevetu. Nakon toga sam precipitirala RNA dodavanjem 250 μ L izopropanola, miješanjem i inkubacijom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom sam uzorak centrifugirala 15 minuta na 16.000 RCF, a nakon toga sam odlila supernatant, dok je RNA ostala u talogu koji sam potom isprala s 500 μ L 75%-tnog etanola te centrifugirala u ohlađenoj centrifugi 10 minuta na 16.000 RCF. Tada sam ponovno odlila supernatant, a mikroeprevetu ostavila otvorenu da se posuši talog, odnosno da višak etanola ishlapi. Na kraju cijelog postupka, izoliranu RNA sam otopila u 30 μ L sterilne vode i pohranila u ultrazamrzivaču na -80°C do daljnjeg korištenja.

3.2.2. Provjera kvalitete i određivanje koncentracije molekula RNA

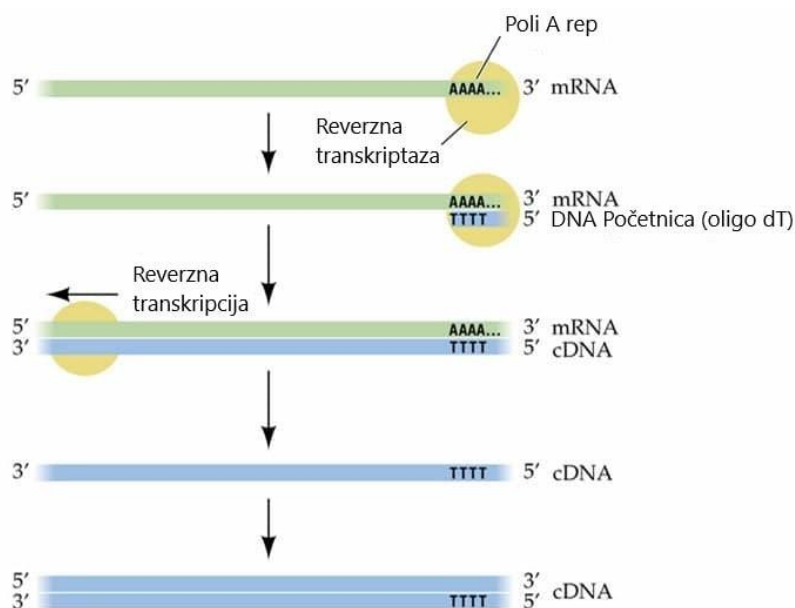
Kvalitetu, odnosno stupanj fragmentiranosti izolirane RNA provjerila sam pomoću elektroforeze na agaroznom gelu. Izvagala sam 0,6 g agaroze i otopila u 40 mL pufera TAE (eng. Tris-acetate-EDTA). Na taj način sam pripravila 1,5%-tnu otopinu agaroze koju sam zatim stavila u mikrovalnu pećnicu kako bi se agarozna otopila. Nakon što se tikvica ohladila, u smjesu sam dodala 2 μ L boje MIDORI^{Green} Advance (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Njemačka) čija je uloga vezanje za molekule RNA i njihovu vizualizaciju pod UV svjetlom. Tako pripremljenu otopinu izlila sam u kadicu za gel u koju sam prethodno stavila češljic kako bi se napravile jažice te se unutar nje 20 minuta otopina polimerizirala. Polimerizirani gel stavila sam u sustav za elektroforezu, na njega nanijela uzorke RNA te provela elektroforezu 20 min na 100 V. Gel sam vizualizirala na aparatu UVitec Alliance 4.7 (UVITEC, Cambridge, UK). Nefragmentirana RNA pokazuje dvije jasne vrpce koje odgovaraju 28S i 18S rRNA.

U svrhu određivanja koncentracije nukleinskih kiselina upotrebljava se niz različitih metoda. Najčešće je u upotrebi spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije UV svjetla (eng. ultraviolet light, hrv. ultraljubičasta svjetlost) pri valnoj duljini od 260 nm u purinskim i pirimidinskim bazama. Za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracija RNA otopljenih u puferu za eluciju ili vodi koristila sam uređaj NanoPhotometer N60/N50 (Implen, München, Njemačka). Mikropipetom sam prvo stavila 1 μ L pufera za eluiranje ili vode, što je služilo kao pozadinska korekcija na otapalo, a nakon toga sam dalje redom nanosila 1 μ L svakog uzorka RNA i određivala mu koncentraciju. Uređaj automatski izračunava koncentraciju RNA iz apsorbancije UV-svjetla pri valnoj duljini od 260 nm, a mjeri i čistoću uzorka računanjem

omjera apsorbancija na dvije dodatne valne duljine: 280 i 230 nm. Za otopinu s omjerom A260/A280 od 1,8 do 2,0 smatra se da sadrži čistu RNA, bez kontaminacije proteinima. Kod omjera A260/A230, uzorak se smatra čistim u rasponu od 2 do 2,2. Niži raspon ukazuje na potencijalnu kontaminiranost različitim kemikalijama (npr. solima) koje su korištene za izolaciju.

3.2.3. Reverzna transkripcija (RT)

Reverzna transkripcija (RT) je postupak prepisivanja molekule RNA u komplementarnu molekulu DNA (cDNA) pomoću enzima reverzne transkriptaze. Sintetizirana cDNA koristi se za određivanje ekspresije pomoću kvantitativne lančana reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR). Na slici 9 dan je prikaz koraka reakcije reverzne transkripcije kada je cDNA korištena za određivanje ekspresije mRNA i lncRNA.



Slika 9. Prikaz koraka reakcije prepisivanja molekula RNA u cDNA (reverzne transkripcije) (slika je preuzeta i prilagođena iz Maurac 2011, doktorska disertacija).

3.2.3.1. Reakcija RT za određivanje ekspresije mRNA i lncRNA

Reakciju reverzne transkripcije za mRNA i lncRNA radila sam s 1 μ g ukupne RNA. Iz koncentracije izolirane RNA prvo sam trebala izračunati koliki volumen uzorka trebam

odmjeriti da ukupna količina bude 1 µg. Nakon toga sam napravila reakcijsku smjesu svih komponenata, osim RNA i vode. Za ovu reakciju koristila sam set za reverznu transkripciju SuperScript III First-Strand (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) koji nije sadržavao inhibitor RNaza. U ukupni volumen od 50 µL ulazilo je 14,5 µL reakcijske smjese koja je sadržavala 5 µL 10x pufera (10x v/v), 2 µL dNTP, 5 µL nasumičnih heksamernih početnica (10x v/v), 2,5 µL enzima reverzne transkriptaze te 2,5 µL H₂O.

Do ukupnog volumena od 50 µl još nadopunila određenim volumenom RNA (kako bi u reakciji bio 1 µg RNA) i vodom (tablica 2).

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju molekula mRNA i lncRNA

KOMPONENTA	POČETNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN (za reakciju od 50 µL)
10x pufer	10x	1x	5
25x dNTP	100 mM	4 mM	2
10x nasumične početnice	10x	1x	5
MultiScribe™ reverzna transkriptaza	50 U/µL	2,5 U/µL	2,5

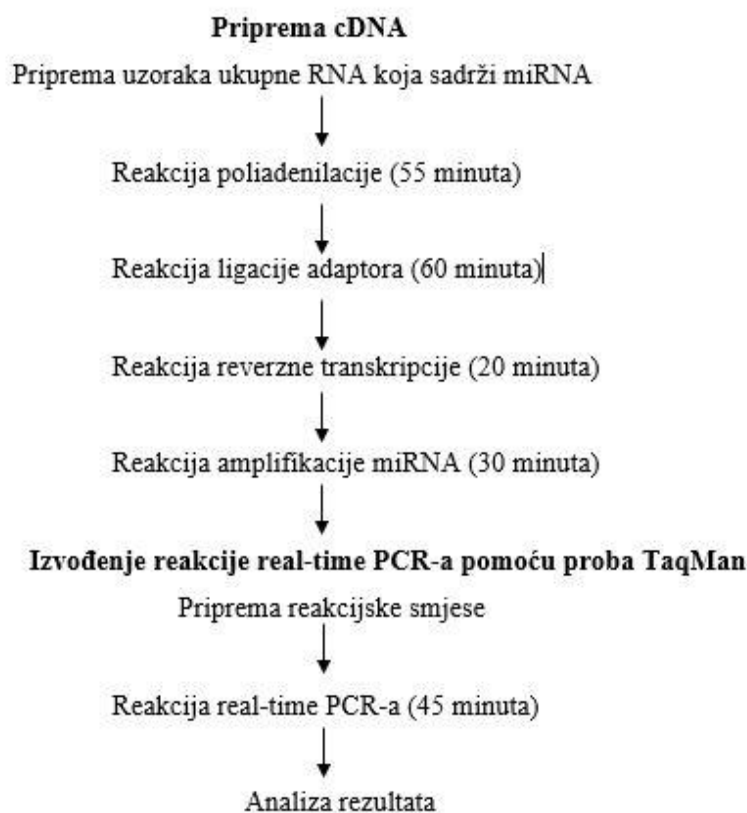
Reakcija reverzne transkripcije odvijala se u uređaju za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) prema programu navedenom u tablici 3.

Tablica 3. Program reverzne transkripcije

	KORAK 1	KORAK 2	KORAK 3	KORAK 4
TEMPERATURA (°C)	25	37	85	4
VRIJEME (min)	10	120	5	∞

3.2.3.2. Reakcija RT za određivanje ekspresije miRNA

Reakciju reverzne transkripcije za određivanje ekspresije zrelih molekula miRNA radila sam pomoću komercijalno dostupnog seta TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), dok sam ekspresiju zrelih molekula miRNA određivala pomoću proba TaqMan. Na shemi prikazanoj na slici 10 dan je kratki osnovni pregled dva glavna koraka u samom procesu: prvi je priprema cDNA predložaka, a drugi je izvođenje real-time PCR-a. U ovom odjeljku detaljno će se razraditi prvi korak procesa.



Slika 10. Glavni koraci kroz proces reverzne transkripcije i određivanja ekspresije pomoću proba TaqMan.

Prvi korak procesa, priprema kalupa cDNA, sastoji se od nekoliko dijelova. Prvi dio naziva se reakcija poliadenilacije i njezino trajanje je 55 minuta. Prvo sam otopila uzorke izoliranih RNA i pripremila radne otopine od 5 ng/ μ L. Otopila sam i reagense potrebne za reakciju poliadenilacije, kratko ih vorteksirala i centrifugirala kako bi se uklonili mjehurići

zraka i tekućina spustila na dno mikroperuveta. Potom sam u mikroperuveti od 1,5 mL pripremila reakcijsku smjesu za reakciju poliadenilacije (tablica 4).

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za reakciju poliadenilacije

KOMPONENTA	1 reakcija
10x Poly(A) pufer	0,5 μ L
ATP	0,5 μ L
Poly(A) enzim	0,3 μ L
H ₂ O bez RNaze	1,7 μ L
ukupni volumen	3,0 μ L

Pripremljenu reakcijsku smjesu sam vorteksirala i centrifugirala te sam u mikroperuvete od 0,2 mL prvo dodala 2 μ L radne otopine uzorka RNA (10 ng), a potom 3 μ L reakcijske smjese za poliadenilaciju, čime je ukupan volumen bio 5 μ L. Mikroperuvete sam stavila u uređaj za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) i inkubirala prema uputama navedenim u tablici 5. Potom sam izvela sljedeću reakciju, a to je ligacija adaptora kojoj je trajanje 60 minuta.

Tablica 5. Koraci prilikom inkubacije reakcijske pločice u termalnoj mašini u reakciji poliadenilacije

KORACI	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min)
poliadenilacija	37	45
zaustavljanje reakcija	65	10
zadržavanje	4	∞

Drugi dio je reakcija ligacije adaptora. Izvela sam je tako da sam prvo u mikroperuvetu od 1,5 mL prema tablici 6 pripremila reakcijsku smjesu za izvođenje reakcije ligacije adaptora. Reakcijsku smjesu sam potom vorteksirala, kratko centrifugirala te sam 10 μ L dodala u mikroperuvete koje su sadržavale prethodno dobivene produkte reakcije poliadenilacije. Pri tome sam dobila ukupan volumen od 15 μ L.

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za reakciju ligacije adaptora

KOMPONENTA	1 reakcija
5x DNA-ligazni pufer	3 μ L
50% PEG 8000	4,5 μ L
25x adaptor ligacije	0,6 μ L
RNA-ligaza	1,5 μ L
H ₂ O bez RNaze	0,4 μ L
ukupni volumen	10 μ L

Mikroepuvete sam stavila u uređaj za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) i inkubirala prema uputama navedenim u tablici 7. Potom sam izvela sljedeću reakciju, a to je reakcija reverzne transkripcije u trajanju od 20 minuta.

Tablica 7. Koraci prilikom inkubacije reakcijske pločice u termalnoj mašini u reakciji ligacije adaptora

KORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min)
ligacija	16	60
zadržavanje	4	∞

Treći dio obuhvaća reakciju reverzne transkripcije. I ovaj dio započela sam pripremom reakcijske smjese u mikroepuveti od 1,5 mL koja je sadržavala kemikalije navedene u tablici 8. Reakcijsku smjesu sam potom vorteksirala i centrifugirala te po 15 μ L dodala u svaku mikroepuvetu u kojoj se nalazio prethodni produkt reakcije ligacije adaptora. Ukupni volumen u ovom koraku bio je 30 μ L. Mikroepuvete sam stavila u uređaj za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) i inkubirala prema uputama navedenim u tablici 9.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za reakciju reverzne transkripcije

KOMPONENTA	1 reakcija
5x pufer za reverznu transkripciju	6 μL
dNTP mix (25 mM svaki)	1,2 μL
20x univerzalna početnica za reverznu transkripciju	1,5 μL
10x mix enzima za reverznu transkripciju	3 μL
H ₂ O bez RNaze	3,3 μL
ukupni volumen	15 μL

Tablica 9. Koraci prilikom inkubacije reakcijske pločice u termalnoj mašini u reakciji reverzne transkripcije

KORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min)
reverzna transkripcija	42	15
zaustavljanje reakcije	85	5
zadržavanje	4	∞

Reakcija koja slijedi prije izvođenja same reakcije real-time PCR-a nosi naziv miR-Amp, odnosno amplifikacija miRNA. Reakciju sam započela pripremom reakcijske smjese u mikroepreveti od 1,5 mL koja je sadržavala kemikalije navedene u tablici 10, nakon čega sam smjesu vorteksirala, centrifugirala te sam po 45 μL dodala u nove mikroeprevete od 0,2 mL. Zatim sam u njih dodala 5 μL produkta prethodne reakcije reverzne transkripcije, pri čemu je ukupni volumen bio 50 μL . Tako pripremljene mikroeprevete stavila sam u uređaj za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) te inkubirala prema uputama navedenim u tablici 11.

Tablica 10. Sastav reakcijske smjese za reakciju miR-Amp (amplifikaciju molekula miRNA)

KOMPONENTA	1 reakcija
2x miR-Amp master mix	25 μL
20x miR-Amp primer mix	2,5 μL
H ₂ O bez RNaze	17,5 μL
ukupni volumen	45 μL

Tablica 11. Koraci prilikom inkubacije reakcijske pločice u termalnoj mašini u reakciji miR-Amp

KORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
aktivacija enzima	95	5 min	1
denaturacija	95	3 sec	14
vezanje početnica	60	30 sec	
zaustavljanje	99	10 min	1
zadržavanje	4	∞	1

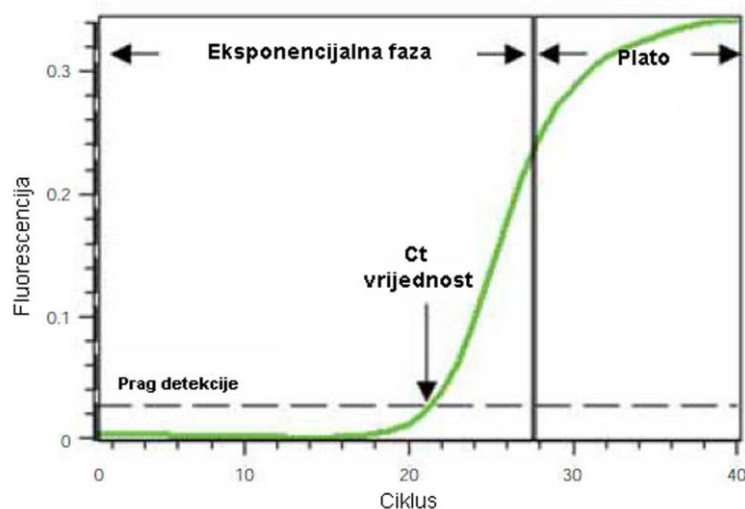
Nakon ovog dijela slijedi izvođenje kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) kako je opisano u poglavlju 3.2.4.2.

3.2.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) metoda je koja se koristi kako bi se odredila relativna ili apsolutna količina početne količine cDNA u uzorku te se na temelju tog podatka određuje koliko je pojedini gen eksprimiran. Postoje dva osnovna pristupa u određivanju ekspresije koji se razlikuju prema načinu, odnosno korištenoj kemiji za detekciju nosintetiziranih molekula dvolančane DNA iz cDNA: boja SYBR Green i probe TaqMan.

3.2.4.1. Određivanje relativne ekspresije mRNA i lncRNA

Postupak se sastoji od umnažanja molekula cDNA sa specifičnim početnicama za pojedinu mRNA ili lncRNA od interesa uz dodatak interkalirajuće fluorescentne boje. Boja se ugrađuje u nosintetiziranu dvolančanu DNA te se svakim ciklusom umnažanja intenzitet boje pojačava. Ciklus u kojem se ta fluorescencija može uočiti na kameri aparata naziva se Ct-vrijednost. Što je Ct-vrijednost za neki gen niža, to je gen jače eksprimiran (slika 11).



Slika 11. Izgled krivulje fluorescencije kod kvantitativne real-time PCR metode. Na slici se može vidjeti kako vrijednost fluorescencije svakim ciklusom eksponencijalno raste dok ne dosegne plato na kojem dolazi do zasićenja reakcije. Ct-vrijednost označava broj ciklusa u kojem vrijednost fluorescencije prelazi prag detekcije (shema preuzeta i prilagođena s www.bio-rad.com).

Za svaki uzorak tkiva raka jajnika i zdravih jajovoda analizirala sam ekspresiju pet različitih gena, tri koji kodiraju za mRNA: *BCL2*, *GLI1*, *GLI2*; i dva koji kodiraju za lncRNA: *XIST* i *MALAT1*, dok sam kao referentni gen koristila *ARP* koji kodira za ribosomalni fosfoprotein P0. Relativnu ekspresiju gena izrazila sam u odnosu na referentni gen *ARP* prema gore spomenutoj formuli $2^{-\Delta Ct}$ pri čemu je ΔCt razlika Ct-vrijednosti gena od interesa i referentnog gena *ARP* (Livak i Schmittgen 2001).

Prije samog izvođenja reakcije qRT-PCR-a napravila sam reakcijsku smjesu za svaki gen od interesa koja se po jednoj reakciji sastojala od Supermix IQ SYBR GREEN (Bio-Rad Laboratories, SAD) 2x (50% v/v), početnice F (0,3 mM), početnice R (0,3 mM) te vode do ukupnog volumena od 9 μ L po reakciji. Na kraju sam dodala 1 μ L cDNA (20 ng) koju sam pripremila kako je opisano u poglavlju 3.2.3.1. Tablica 12 prikazuje nukleotidne sljedove korištenih početnica te njihove pripadajuće reference.

Tablica 12. Sljedovi početnica korišteni u kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu

NAZIV POČETNICE	5'→3' NUKLEOTIDNI SLIJED	REFERENCA
<i>ARP_F</i>	GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG	(Eichberger i sur. 2006)
<i>ARP_R</i>	TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC	(Eichberger i sur. 2006)
<i>BCL2_F</i>	ATCGCCCTGTGGATGACTGAG	(Porichi i sur. 2009)
<i>BCL2_R</i>	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG	(Porichi i sur. 2009)
<i>GLI1_F</i>	GCCGTGTAAAGCTCCAGTGAACACA	(Regl i sur. 2002)
<i>GLI1_R</i>	TCCCACCTTTGAGAGGCCCATAGCAAG	(Regl i sur. 2002)
<i>GLI2_F</i>	GCCATCAAGACCGAGAGCTC	(Tojo i sur. 2003)
<i>GLI2_R</i>	CGGCCCATGAGCAGGAATCC	(Tojo i sur. 2003)
<i>XIST_F</i>	GCAGTTTGCCCTACTAGCTCCT	(Huang i sur. 2002)
<i>XIST_R</i>	TCCTCAGGTCTCACATGCTCA	(Huang i sur. 2002)
<i>MALAT1_F</i>	GTGTGCCAATGTTTCGTTTG	(Lin i sur. 2018)
<i>MALAT1_R</i>	AGGAGAAAGTGCCATGGTTG	(Lin i sur. 2018)

Svaku reakciju qRT-PCR-a izvela sam u duplikatu ili triplikatu, a za reakcijsku smjesu za svaki gen također sam napravila i jednu dodatnu negativnu kontrolu u koju se ne stavlja uzorak cDNA (eng. no template control, NTC).

Metodu qRT-PCR izvodila sam na aparatu CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD), a uvjeti koje sam koristila bili su sljedeći: početna denaturacija odvijala se tijekom 30 sekundi na 95°C nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa na 95°C tijekom 10 sekundi pa potom na 61°C tijekom 30 sekundi i naposljetku je uslijedila krivulja mekšanja sa 60°C na 95°C. Njezina je funkcija provjera specifičnosti produkta. Naime, za svaki set početnica poznat je oblik krivulje mekšanja za koji je nužno da bude specifičan. Bitno je napomenuti da su samo eksperimenti sa specifičnom krivuljom mekšanja uzeti u obzir prilikom statističke obrade podataka. Razine ekspresije izračunala sam korištenjem formule $2^{-\Delta C_t}$, koristeći ekspresiju referentnog gena *ARP*.

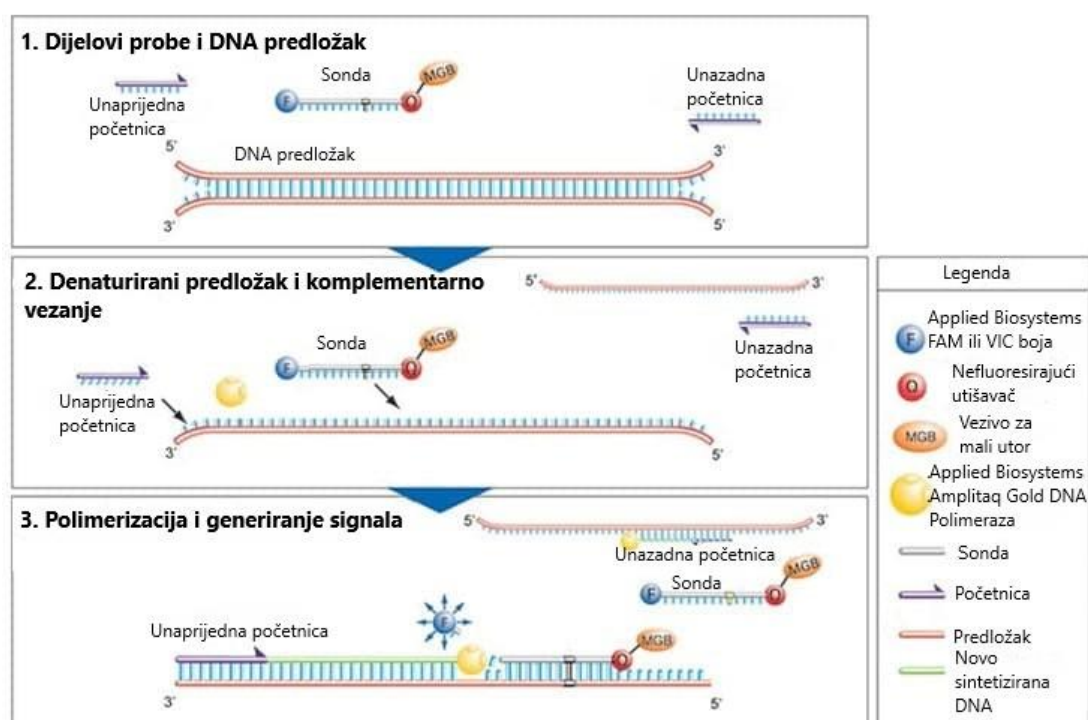
Za uzorke bez dobivenih Ct-vrijednosti nakon 40 ciklusa qRT-PCR-a, Ct vrijednost je postavljena na 40 kako bi se omogućila statistička analiza podataka (McCall i sur. 2014).

3.2.4.1.1. Uhodavanje početnica za određivanje ekspresije lncRNA

S obzirom da početnice za lncRNA *MALAT1* i *XIST* nisu još bile korištene u Laboratoriju za nasljedni rak, bilo je potrebno provjeriti njihovu specifičnost i učinkovitost pri temperaturi vezanja početnica od 61°C, na koliko su optimizirani svi ostali parovi početnica. Prije izvođenja same reakcije qRT-PCR-a, pripremila sam razrjeđenja cDNA od dva uzorka, jedan karcinom jajnika i jedan zdravi jajovod, u omjerima 1:1 (originalna cDNA), 1:5; 1:25; 1:125 i 1:625. Razrjeđenja služe za izradu standardne krivulja čija je osnovna funkcija provjera učinkovitosti početnica (kompletna duplikacija početne količine cDNA tijekom svakog ciklusa reakcije qRT-PCR-a) i općenito uvjeta reakcije qRT-PCR-a gdje se primarno misli na temperaturu vezanja početnica.

3.2.4.2. Određivanje relativne ekspresije miRNA

Ekspresiju zrelih molekula miRNA odredila sam reakcijom real-time PCR-a pomoću komercijalno dostupnih proba TaqMan. One se temelje na 5' nukleaznoj kemiji koja koristi fluorogenu sondu kako bi omogućila detekciju specifičnog produkta PCR-a koji se nakuplja u reakciji (slika 12). Svaki esej sadrži jedan par neobilježenih početnica te probu TaqMan koja je na 5' kraju obilježena fluorescentnom bojom FAM ili VIC, a na 3' kraju nefluorescirajućim utišavačem (eng. non-fluorescent quencher, NFQ).



Slika 12. Proces određivanja genske ekspresije pomoću proba TaqMan (slika je preuzeta i prilagođena s www.thermofisher.com)

Za svaki uzorak tkiva raka jajnika i zdravih jajovoda ekspresiju dviju molekula miRNA, miR-96-5p i miR-21-5p, odredila sam pomoću komercijalno dostupnih proba TaqMan Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD). Za određivanje ekspresije miR-96-5p koristila sam esej 478215_mir, za miR-21-5p 477975_mir, dok sam kao referentnu koristila ekspresiju miR-513a-5p (479483_mir).

Prvo sam pripravila razrjeđenja u omjeru 1:10 molekula cDNA koje sam dobila u reakciji miR-Amp, opisanoj u poglavlju 3.2.3.2. Zatim sam za svaku miRNA u mikroepreveti od 1,5 mL pripremila reakcijsku smjesu koja je sadržavala kemikalije navedene u tablici 13. Na

kraju sam za svaku reakciju dodala 2,5 μL razrijeđene cDNA, pri čemu sam dobila ukupni volumen od 10 μL .

Tablica 13. Sastav reakcijske smjese za PCR reakciju za određivanje relativne ekspresije miRNA

KOMPONENTA	1 reakcija
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x)	5 μL
TaqMan Advanced miRNA Assay (20x)	0,5 μL
H ₂ O bez RNaze	2 μL
ukupni volumen	7,5 μL

Svaku reakciju qRT-PCR-a izvela sam u duplikatu, a za reakcijsku smjesu za svaku miRNA također sam napravila i jednu dodatnu negativnu kontrolu u koju se ne stavlja uzorak cDNA (eng. no template control, NTC).

Metodu qRT-PCR izvodila sam na aparatu StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), a uvjeti koje sam koristila su navedeni u tablici 14.

Tablica 14. Uvjeti reakcije qRT-PCR-a korišteni na aparatu StepOnePlus za određivanje relativne ekspresije miRNA

KORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (sec)	CIKLUSI
aktivacija enzima	95	20	1
denaturacija	95	1	40
vezanje početnica	60	20	

Razine ekspresije miRNA izračunala sam korištenjem formule $2^{-\Delta\text{Ct}}$, koristeći ekspresiju referentne miRNA miR-513a-5p.

3.2.5. Statistička analiza

Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli (vrijednosti ekspresija) testirana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa. Sve vrijednosti ekspresija osim za lncRNA pokazale su normalnu distribuciju nakon logaritamske transformacije te je za testiranje razlika u ekspresiji između kontrolnih uzoraka zdravih jajovoda i karcinoma jajnika korišten parametrijski neparni t-test na logaritamski transformiranim vrijednostima, dok je za vrijednosti ekspresija lncRNA korišten neparametrijski Mann-Whitneyev test.

Korelacija (povezanost) između ekspresija istraživanih RNA određena je računanjem neparametrijskog Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova (ρ), zajedno za tumorsko i zdravo kontrolno tkivo. Za tumačenje jačine korelacije prema iznosu statistički značajnog koeficijenta korelacije ρ korištena je skala prema Schoberu i sur. (2018): 0,00–0,10 neznatna korelacija, 0,10–0,39 slaba korelacija, 0,40–0,69 umjerena korelacija, 0,70–0,89 jaka korelacija i 0,90–1,00 vrlo jaka korelacija.

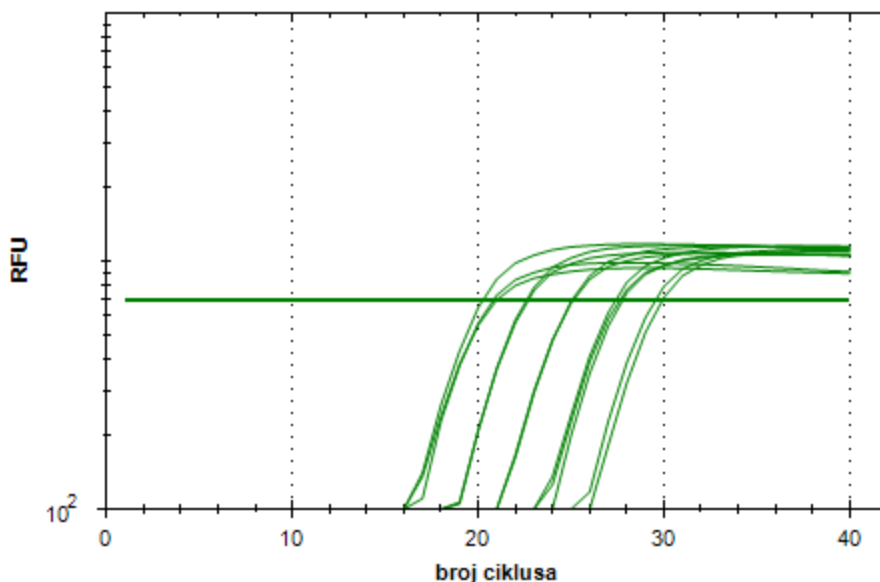
Dijagnostička vrijednost razina ekspresija istraživanih RNA, dakle, njihova potencijalna korisnost u dijagnostici seroznog karcinoma raka jajnika visokog gradusa, određena je analizom krivulje ROC (eng. receiver operating characteristic) (Fawcett 2006). Ta analiza omogućava pronalazak vrijednosti razine ekspresije pri kojoj se najbolje razlikuje tumorsko od zdravog tkiva. Glavna mjera dijagnostičke vrijednosti koja se dobije ROC-analizom je površina ispod krivulje (eng. area under curve, AUC), pri čemu viša AUC predstavlja biomarker s većom dijagnostičkom vrijednosti. Dijagnostički značaj, odn. snaga da se prema relativnoj ekspresiji istraživanih RNA može razlikovati (diskriminirati) tumorsko od zdravog tkiva, tumačen je prema iznosu dobivenih AUC-vrijednosti kako je opisano u Mandrekaru (2010): < 0,5 bez snage diskriminacije, 0,5–0,7 slaba snaga diskriminacije, 0,7–0,8 prihvatljiva snaga diskriminacije, 0,8–0,9 izvrsna snaga diskriminacije te iznad 0,9 izvanredna snaga diskriminacije

Sve dvosmjerne P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Statistička analiza je rađena pomoću programa Microsoft Excel for Microsoft 365 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD) i MedCalc v19.6.1 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

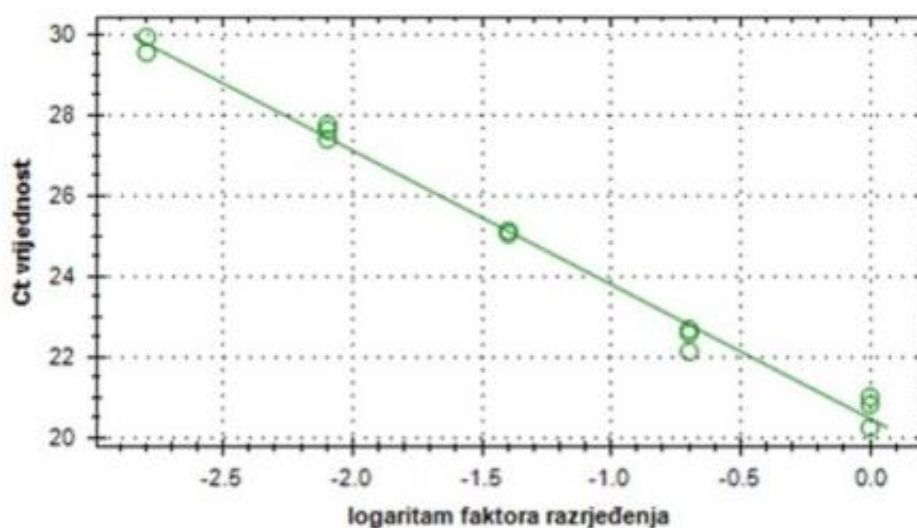
4. REZULTATI

4.1. Efikasnost početnica za određivanje ekspresije lncRNA

Izradom standardnih krivulja provjerila sam efikasnost parova početnica za određivanje ekspresije lncRNA *MALAT1* i *XIST* pri temperaturi vezanja početnica od 61°C. Krivulja razrjeđenja (slika 13) i standardna krivulja (slika 14) pokazale su da je par početnica za određivanje ekspresije *MALAT1* učinkovit u udvostručavanju početne količine DNA pri svakom ciklusu reakcije qRT-PCR-a. Efikasnost početnica je bila 100,1%, koeficijent determinacije (R^2) 0,992, nagib krivulje -3,320, a odsječak na y-osi 20,486.

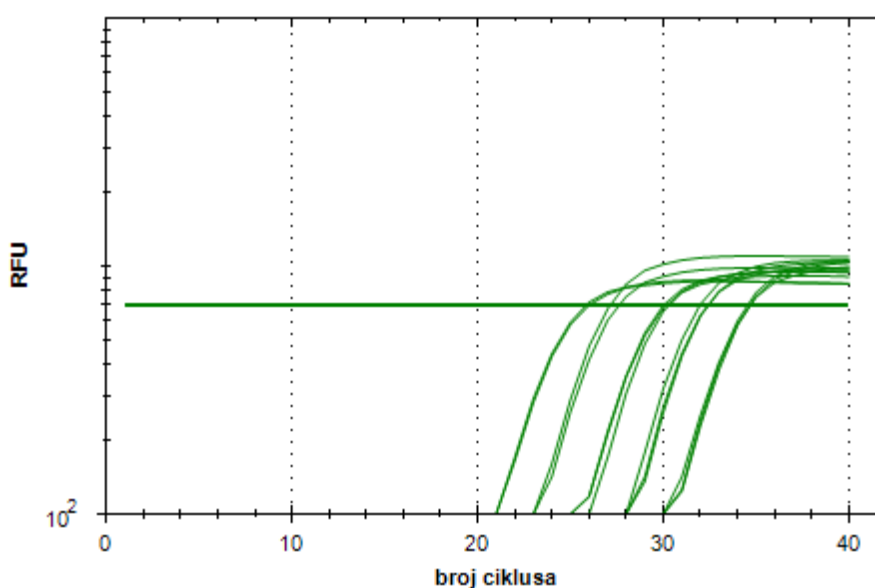


Slika 13. Krivulja razrjeđenja za određivanje efikasnosti početnica i uvjeta reakcije qRT-PCR reakcije za *MALAT1*.

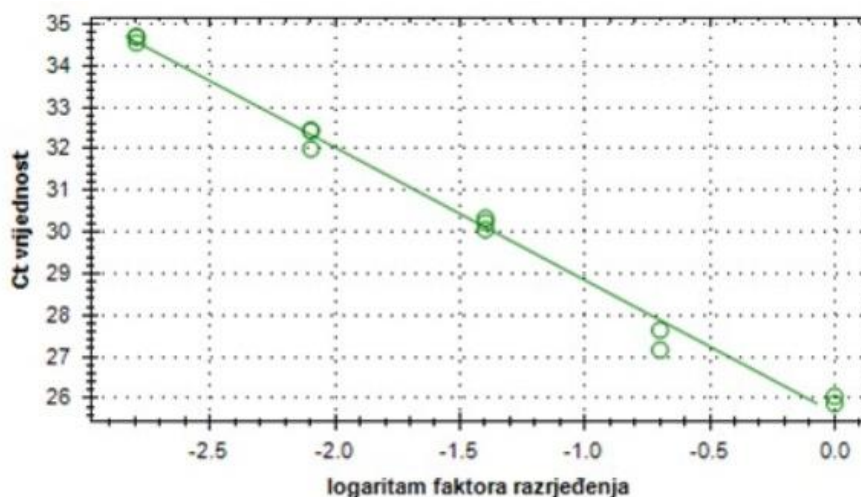


Slika 14. Standardna krivulja za određivanje efikasnosti početnica i uvjeta reakcije qRT-PCR za *MALAT1*. Efikasnost (E) = 100,1%; koeficijent determinacije (R^2) = 0,992; nagib krivulje = -3,320; odsječak na y-osi = 20,486

Krivulja razrjeđenja (slika 15) i standardna krivulja (slika 16) pokazale su da je par početnica za određivanje ekspresije *XIST* učinkovit u udvostručavanju početne količine DNA u svakom ciklusu reakcije qRT-PCR-a. Efikasnost je bila 105,8%, koeficijent determinacije (R^2) 0,992, nagib krivulje -3,191, a odsječak na y-osi 25,652.

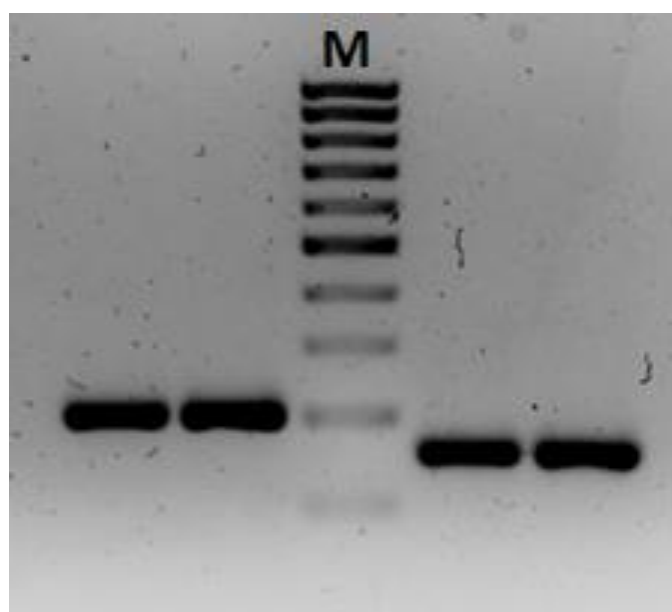


Slika 15. Krivulja razrjeđenja za određivanje efikasnosti početnica i uvjeta reakcije qRT-PCR za *XIST*.



Slika 16. Standardna krivulja za određivanje efikasnosti početnica i uvjeta reakcije qRT-PCR za *XIST*. Efikasnost (E) = 105,8%; koeficijent determinacije (R^2) = 0.992; nagib krivulje = -3,191; odsječak na y-osi = 25,652

Elektroforeza produkata reakcije qRT-PCR-a na 1,5%-tnom agaroznom gelu pokazala je specifičnost parova početnica za određivanje ekspresije lncRNA *MALAT1* i *XIST*. Na gelu su bili vidljivi jedan specifičan produkt za *MALAT1* veličine 199 parova baza (pb) (lijevo na slici 17) te jedan specifičan produkt od 155 pb za *XIST* (desno na slici 17).



Slika 17. Prikaz produkata reakcije qRT-PCR na 1,5%-tnom gelu agaroze. Lijevo od DNA standarda PCR Sizer 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp, Thorold, Kanada) (oznaka M na slici) su produkti za *MALAT1*, dok su desno od standarda produkti za *XIST*.

4.2. Ekspresija gena *BCL2*, *GLI1* i *GLI2* u seroznom raku jajnika visokog gradusa i zdravim jajovodima

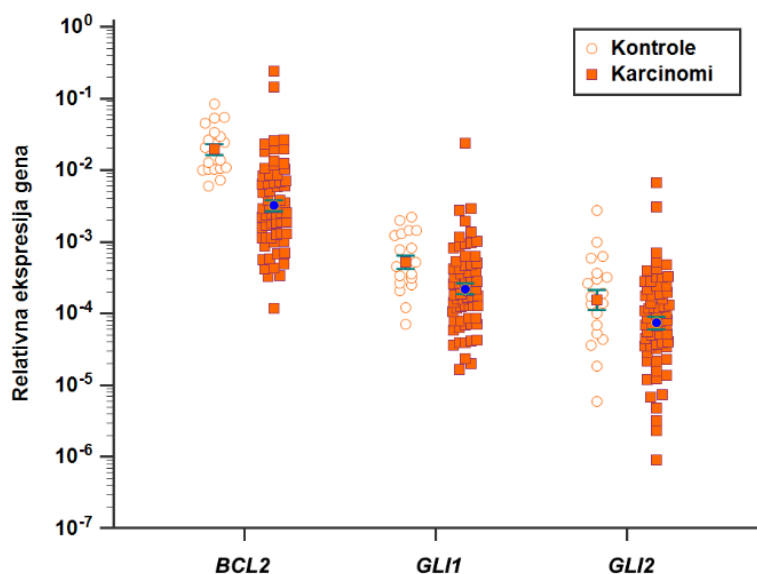
Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije gena (mRNA) *BCL2*, *GLI1* i *GLI2* u 62 uzorka tkiva raka jajnika visokog gradusa (u daljnjem tekstu *karcinomi*) i 19 uzoraka tkiva zdravih jajovoda (u daljnjem tekstu *kontrola*). Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti ΔC_t , odnosno C_t -vrijednosti za svaki gen normalizirane prema C_t -vrijednosti referentnog gena, *ARP*. Relativna razina ekspresije izražena je pomoću formule $2^{-\Delta C_t}$.

Gen *BCL2* je bio eksprimiran u 100% uzoraka kontrola i 100% uzoraka karcinoma, gen *GLI1* u 100% uzoraka kontrola i 98,4% (61/62) uzoraka karcinoma, a gen *GLI2* u 100% uzoraka kontrola i 95,2% (59/62) uzoraka karcinoma. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija pokazala je da je i u kontrolama i u karcinomima najjače eksprimirani gen bio *BCL2*, dok je gen *GLI1* oko duplo jače eksprimiran u odnosu na gen *GLI2*, što pokazuje tablica 15 i slika 18.

Tablica 15. Relativna razina ekspresije gena *BCL2*, *GLI1* i *GLI2* u kontrolnom tkivu i tkivu karcinoma

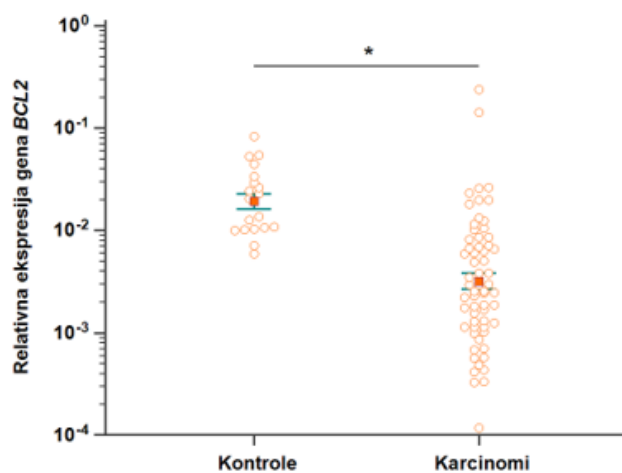
GEN	KONTROLE		KARCINOMI		P-vrijednost**
	srednja vrijednost	S.E.M.*	srednja vrijednost	S.E.M.*	
<i>BCL2</i>	0,0255	0,004702	0,0115	0,00441	< 0,0001
<i>GLI1</i>	0,000769	0,0001490	0,000793	0,0003877	0,011
<i>GLI2</i>	0,000380	0,0001448	0,000284	0,0001159	0,075

* S.E.M. - standardna pogreška srednje vrijednosti, ** - neparni t-test na logaritamski transformiranim vrijednostima



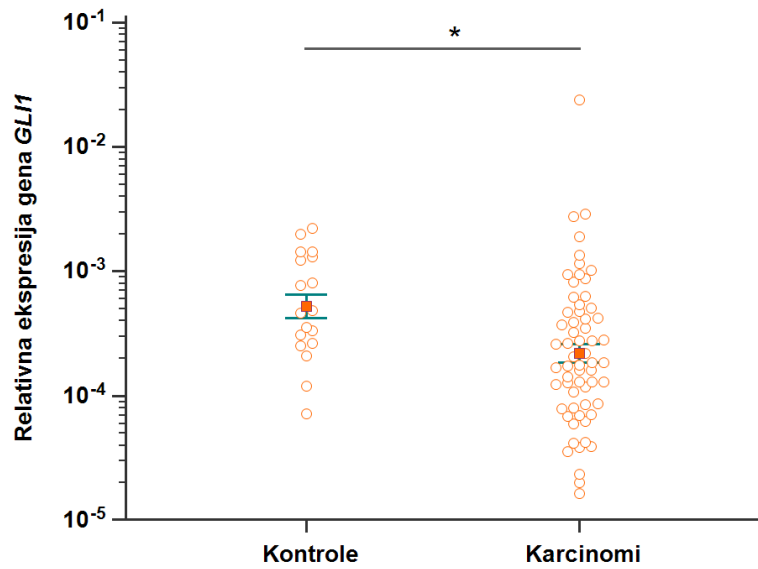
Slika 18. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija gena *BCL2*, *GLI1* i *GLI2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinoma jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm S.E.M.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je gen *BCL2* statistički značajno sniženo eksprimiran u karcinomima ($P < 0,0001$) (slika 19).



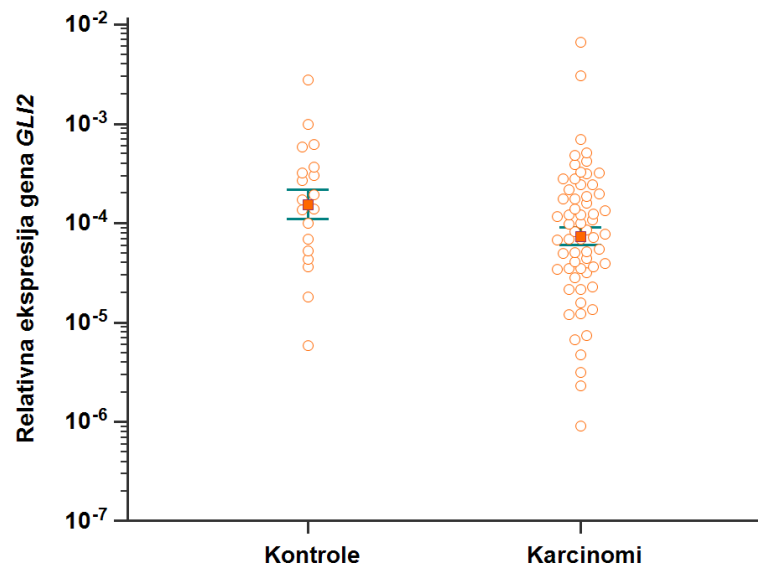
Slika 19. Usporedba relativne ekspresije gena *BCL2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm S.E.M. Zvezdica označava $P < 0,05$.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je gen *GLI1* statistički značajno sniženo eksprimiran u karcinomima ($P = 0,011$) (slika 20).



Slika 20. Usporedba relativne ekspresije gena *GLI1* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm S.E.M. Zvezdica označava $P < 0,05$.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji gena *GLI2* ($P = 0,075$) (slika 21).



Slika 21. Usporedba relativne ekspresije gena *GLI2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm S.E.M.

4.3. Ekspresija lncRNA *MALAT1* i *XIST* u seroznom raku jajnika visokog gradusa i zdravim jajovodima

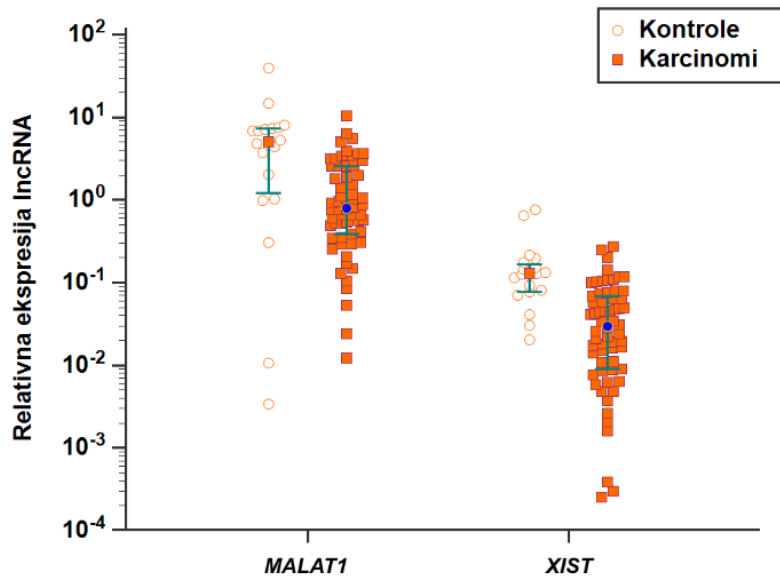
Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije dugih nekodirajućih molekula RNA (lncRNA) *MALAT1* i *XIST* u 62 uzorka tkiva raka jajnika visokog gradusa (*karcinomi*) i 19 uzoraka tkiva zdravih jajovoda (*kontrola*). Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti ΔCt , odnosno Ct-vrijednosti za svaki gen normalizirane prema Ct-vrijednosti referentnog gena *ARP*. Relativna razina ekspresije izražena je pomoću formule $2^{-\Delta Ct}$.

Molekule lncRNA *MALAT1* i *XIST* bile su eksprimirane u 100% uzoraka kontrola i 100% uzoraka karcinoma. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija pokazala je da je i u kontrolama i u karcinomima jače eksprimirana lncRNA *MALAT1*, što pokazuje tablica 16 i slika 22.

Tablica 16. Relativna razina ekspresije lncRNA *MALAT1* i *XIST* u kontrolnom tkivu i tkivu karcinoma

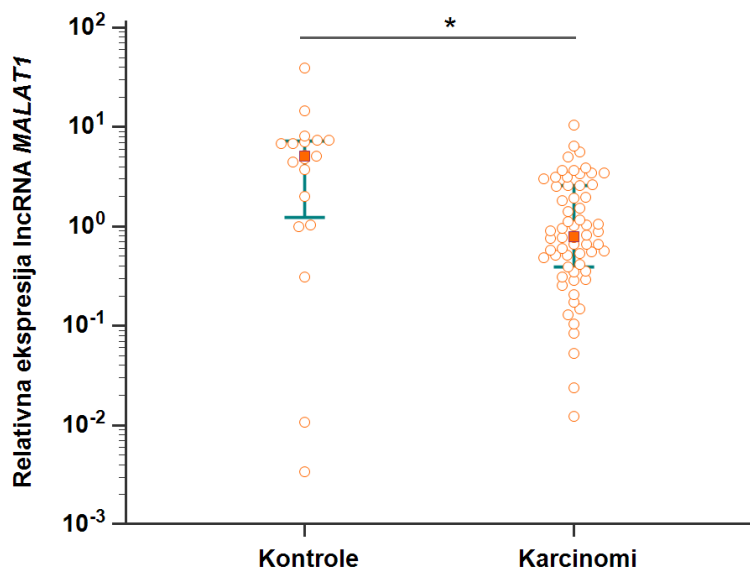
lncRNA	KONTROLE		KARCINOMI		P-vrijednost*
	medijan	raspon	medijan	raspon	
<i>MALAT1</i>	5,054	(0,00341 - 39,394)	0,795	(0,0123-10,499)	0,0003
<i>XIST</i>	0,129	(0,0206 - 0,770)	0,0297	(0,000252-0,274)	< 0,0001

* - Mann-Whitney test



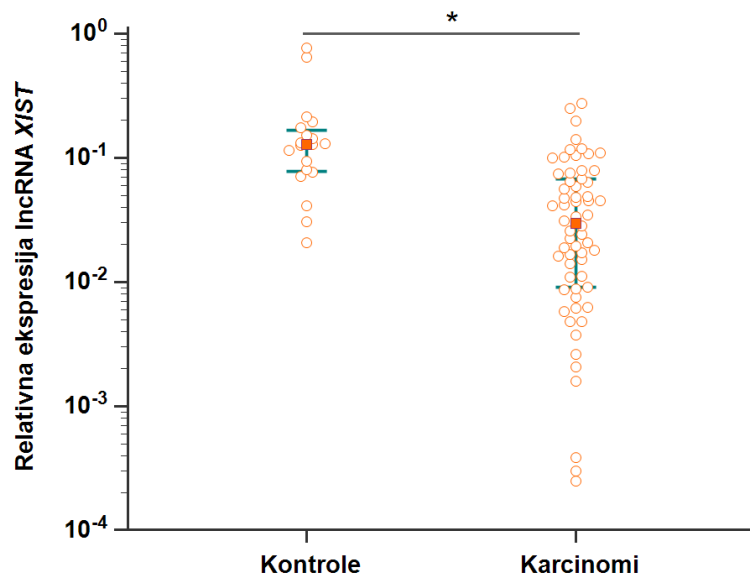
Slika 22. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija lncRNA *MALAT1* i *XIST* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinoma jajnika. Na grafu su označene medijalne vrijednosti i interkvartilni rasponi.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je lncRNA *MALAT1* statistički značajno sniženo ekspimirana u karcinomima ($P = 0,0003$) (slika 23).



Slika 23. Usporedba relativne ekspresije lncRNA *MALAT1* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima jajnika. Na grafu su označene medijalne vrijednosti i interkvartilni rasponi. Zvezdica označava $P < 0,05$.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je lncRNA *XIST* statistički značajno sniženo eksprimirana u karcinomima ($P < 0,0001$) (slika 24).



Slika 24. Usporedba relativne ekspresije lncRNA *XIST* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima jajnika. Na grafu su označene medijalne vrijednosti i interkvartilni rasponi. Zvezdica označava $P < 0,05$.

4.4. Ekspresija miRNA miR-21-5p i miR-96-5p u seroznom raku jajnika visokog gradusa i zdravim jajovodima

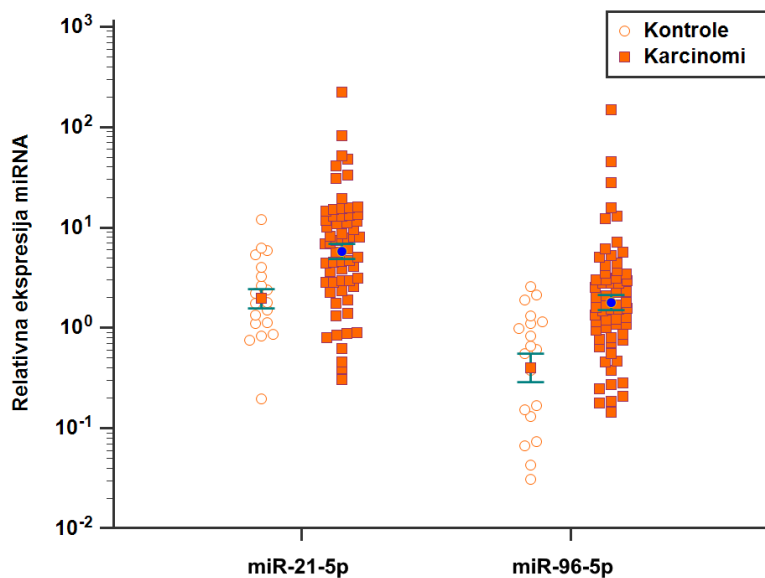
Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije molekula mikroRNA (miRNA) miR-21-5p i miR-96-5p u 62 uzorka tkiva raka jajnika visokog gradusa (*karcinomi*) i 19 uzoraka tkiva zdravih jajovoda (*kontrole*). Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti ΔCt , odnosno Ct-vrijednosti za svaku miRNA normalizirane prema Ct-vrijednosti referentne miRNA miR-513a-5p. Relativna razina ekspresije izražena je pomoću formule $2^{-\Delta Ct}$.

Molekule miRNA miR-21-5p i miR-96-5p bile su eksprimirane u 100% uzoraka kontrola i 100% uzoraka karcinoma. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija pokazala je da je i u kontrolama i u karcinomima jače eksprimirana miRNA miR-21-5p, što pokazuje tablica 17 i slika 25.

Tablica 17. Relativna razina ekspresije miR-21-5p i miR-96-5p u kontrolnom tkivu i tkivu karcinoma

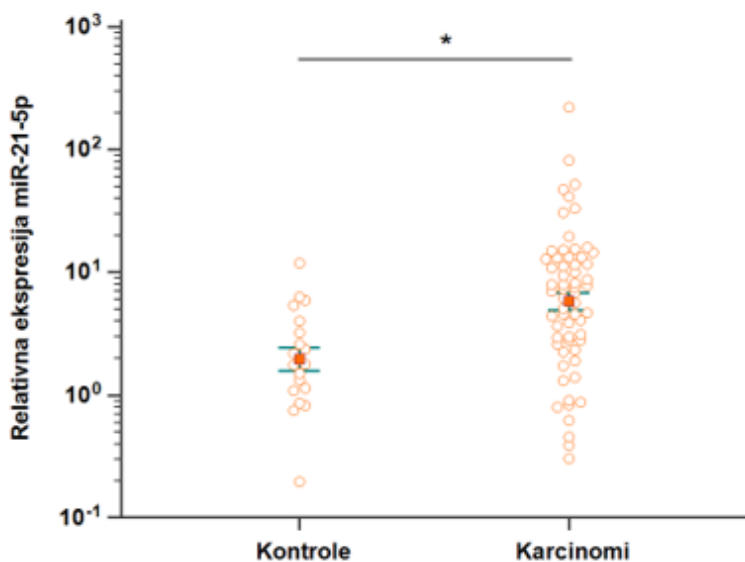
miRNA	KONTROLE		KARCINOMI		P-vrijednost**
	srednja vrijednost	S.E.M.*	srednja vrijednost	S.E.M.*	
miR-21-5p	2,912	0,6500	14,109	3,8673	0,001
miR-96-5p	0,785	0,1755	6,024	2,4886	0,0001

* S.E.M. - standardna pogreška srednje vrijednosti, ** - neparni t-test na logaritamski transformiranim vrijednostima



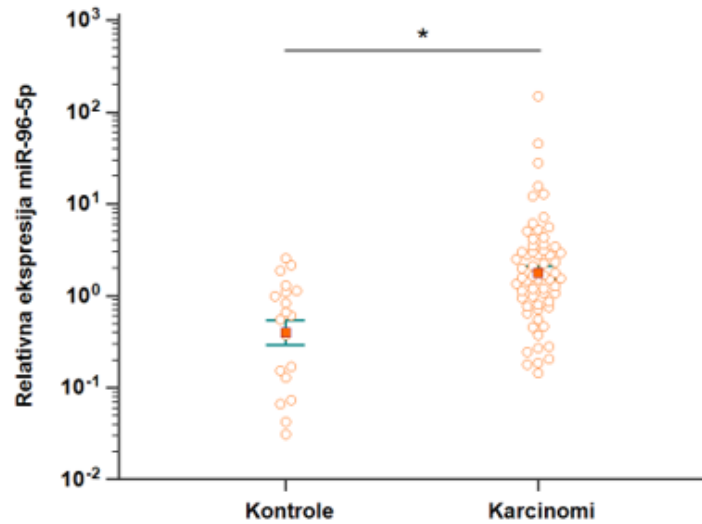
Slika 25. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija miRNA miR-21-5p i miR-96-5p u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinoma jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm S.E.M.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je miRNA miR-21-5p statistički značajno povišeno ekspimirana u karcinomima ($P = 0,001$) (slika 26).



Slika 26. Usporedba relativne ekspresije miRNA miR-21-5p u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm S.E.M. Zvezdica označava $P < 0,05$.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je miRNA miR-96-5p statistički značajno povišeno eksprimirana u karcinomima ($P = 0,0001$) (slika 27).



Slika 27. Usporedba relativne ekspresije miRNA miR-96-5p u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima jajnika. Na grafu su označene srednje vrijednosti \pm S.E.M. Zvezdica označava $P < 0,05$.

4.5. Korelacija između ekspresija istraživanih mRNA, lncRNA i miRNA

Korelacija (povezanost) između ekspresija mRNA *BCL2*, *GLI1* i *GLI2*; lncRNA *MALAT1* i *XIST* te miRNA miR-21-5p i miR-96-5p određena je računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova (ρ), zajedno za tumorsko i zdravo kontrolno tkivo. Prisutnost korelacije može ukazivati na povezanu regulaciju ekspresije, ali ne i direktnu uzročno-posljedičnu (kauzalnu) vezu. Tablica 18 prikazuje koeficijente korelacije i pripadajuće *P*-vrijednosti za međusobnu usporedbu ekspresija svake kombinacije RNA.

Tablica 18. Korelacija između ekspresije pojedinih mRNA, lncRNA i miRNA u uzorcima tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa i zdravih jajovoda. Masnim brojevima označeni su statistički značajni koeficijenti korelacije s pripadajućim *P*-vrijednostima.

<i>GLI1</i>	<i>GLI2</i>	<i>MALAT1</i>	<i>XIST</i>	miR-21-5p	miR-96-5p		
0.50 < 0.0001	0.37 0.001	0.24 0.028	0.56 < 0.0001	-0.28 0.013	-0.31 0.005	ρ <i>P</i>	<i>BCL2</i>
	0.45 < 0.0001	0.31 0.005	0.49 < 0.0001	-0.05 0.663	-0.28 0.012	ρ <i>P</i>	<i>GLI1</i>
		0.29 0.009	0.18 0.102	-0.24 0.032	-0.09 0.444	ρ <i>P</i>	<i>GLI2</i>
			0.51 < 0.0001	-0.11 0.324	-0.06 0.596	ρ <i>P</i>	<i>MALAT1</i>
				-0.13 0.252	-0.36 0.001	ρ <i>P</i>	<i>XIST</i>
					0.23 0.042	ρ <i>P</i>	miR-21-5p

ρ - Spearmanov koeficijent korelacije rangova

Analiza je pokazala da je ekspresija mRNA gena *BCL2* statistički značajno povezana sa ekspresijom svih ostalih istraživanih RNA. Pri tome se pokazalo da postoji pozitivna korelacija ($\rho > 0$) s ekspresijama transkripcijskih faktora *GLI1* i *GLI2*, za koje je poznato da reguliraju transkripciju gena *BCL2*. U našem istraživanju, jača, ali po vrijednosti koeficijenta korelacije umjerena, bila je povezanost s ekspresijom gena *GLI1* ($\rho = 0.50$, $P < 0.0001$), što može ukazivati na to da je taj transkripcijski faktor važniji regulator ekspresije gena *BCL2* u seroznom raku jajnika visokog gradusa. Pozitivna korelacija postoji i s ekspresijama obje istraživane lncRNA, pri čemu je jača, ali po vrijednosti koeficijenta korelacije samo umjerena, bila povezanost s ekspresijom lncRNA *XIST* ($\rho = 0.56$, $P < 0.0001$). S druge strane, bila je prisutna slaba, ali očekivana negativna korelacija ($\rho < 0$) s ekspresijama obje istraživane miRNA, za koje se zna da imaju vezna mjesta unutar 3' UTR gena *BCL2*: miR-21-5p ($\rho = -0.28$, $P = 0.013$) i miR-96-5p ($\rho = -0.31$, $P = 0.005$).

Što se tiče povezanosti ekspresija lncRNA i miRNA, nažalost, jedino je bila prisutna slaba, ali očekivana negativna korelacija između ekspresija lncRNA *XIST* i miRNA miR-96-5p ($\rho = -0.36$, $P = 0.001$), iako se zna da obje istraživane lncRNA mogu vezati obje istraživane miRNA.

Interesantan rezultat bila je pozitivna korelacija između ekspresija istraživanih transkripcijskih faktora *GLI* i lncRNA, pri čemu umjerena korelacija između ekspresije gena *GLI1* i lncRNA *XIST* ($\rho = 0.49$, $P < 0.0001$) ukazuje na potencijalnu ulogu tog transkripcijskog faktora u regulaciji transkripcije te lncRNA.

Također, pozitivna korelacija između parova istraživanih lncRNA *MALAT1* i *XIST* ($\rho = 0.51$, $P < 0.0001$) kao i para miRNA miR-21-5p i miR-96-5p ($\rho = 0.23$, $P = 0.042$) dodatno ukazuje na to da te lncRNA i miRNA vjerojatno često zajedno i istovremeno sudjeluju u regulaciji ekspresije ciljnih gena, što se može objasniti komplementarnošću veznih mjesta (eng. seed region) koje te miRNA imaju i koja se nalaze unutar tih dviju lncRNA.

4.6. Dijagnostička vrijednost ekspresija istraživanih mRNA, lncRNA i miRNA

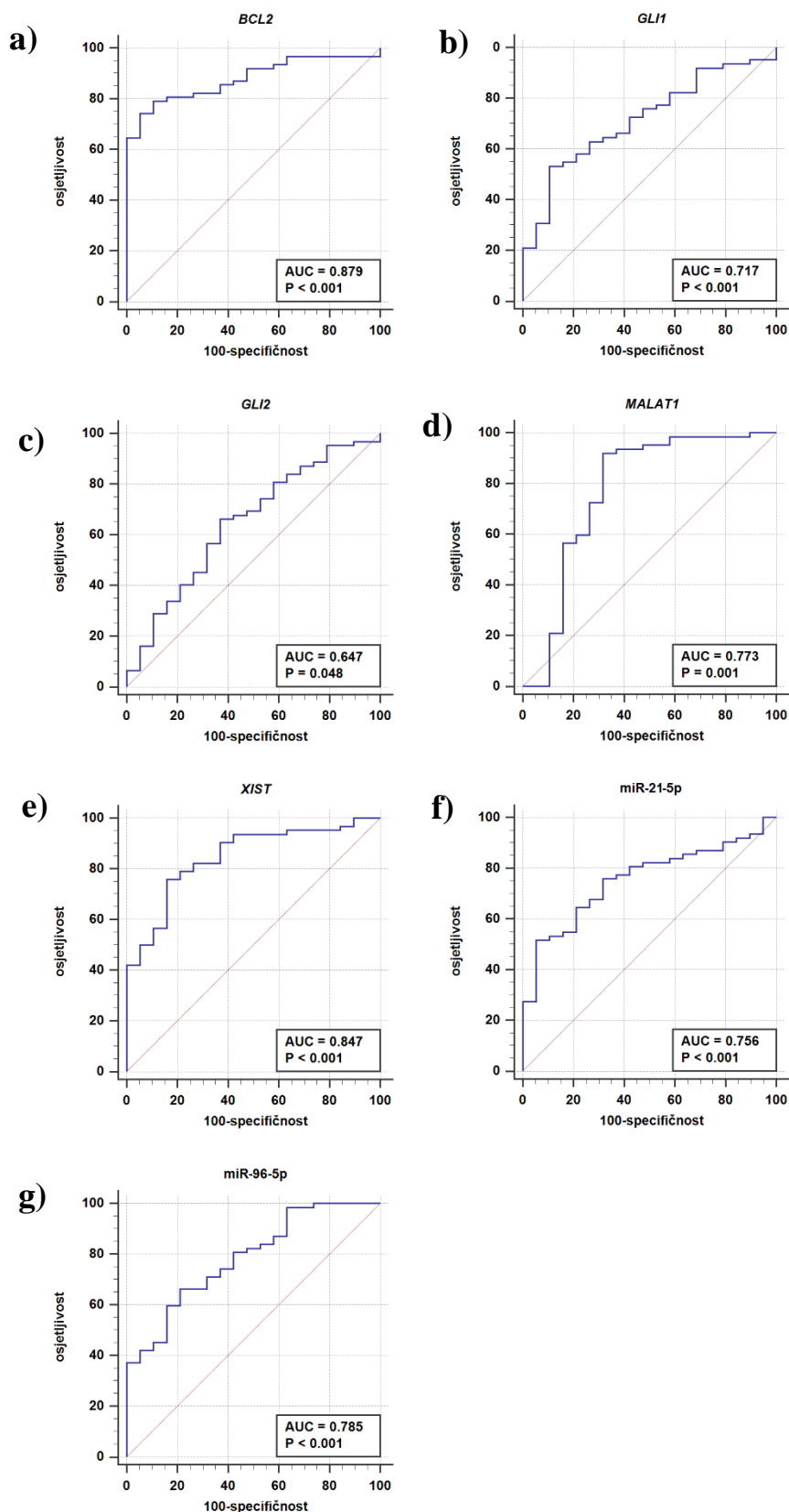
Dijagnostička vrijednost razine ekspresije pojedine mRNA, lncRNA i miRNA, dakle, njihovu potencijalnu korisnost u dijagnostici seroznog karcinoma raka jajnika visokog gradusa određena je analizom krivulje ROC. Takva analiza omogućava pronalazak vrijednosti ekspresije pri kojoj se najbolje razlikuje tumorsko od zdravog tkiva. Glavna mjera dijagnostičke vrijednosti nekog biomarkera, kao što je npr. ekspresija nekog gena ili proteina u tkivu ili serumu, je površina ispod krivulje (AUC), pri čemu viša AUC predstavlja marker s većom dijagnostičkom vrijednosti.

Analizom ROC krivulja određena je dijagnostička vrijednost ekspresije mRNA gena *BCL2*, *GLI1* i *GLI2*; lncRNA *MALAT1* i *XIST* te miRNA miR-21-5p i miR-96-5p. AUC-vrijednost svakog ispitivanog potencijalnog dijagnostičkog biomarkera (ekspresije) te njegova vrijednost (razina ekspresije) pri kojem se najbolje razlikuje tumorsko od zdravog tkiva prikazana je u tablici 19 dok su ROC krivulje prikazane na slici 28.

Tablica 19. Mjere dijagnostičkih vrijednosti ispitivanih biomarkera (razina ekspresija)

BIOMARKER	<i>BCL2</i>	<i>GLI1</i>	<i>GLI2</i>	<i>MALAT1</i>	<i>XIST</i>	miR-21-5p	miR-96-5p
AUC*	0,879	0,717	0,647	0,773	0,847	0,756	0,785
<i>P</i> -vrijednost	< 0,0001	0,001	0,048	0,001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
vrijednost ekspresije	≤ 0,00714	≤ 0,00021	≤ 0,00013	≤ 3,652	≤ 0,068	> 6,276	> 1,144
osjetljivost (%)	74,2	53,2	66,1	91,9	75,8	51,6	66,1
specifičnost (%)	94,7	89,5	63,2	68,4	84,2	94,7	79,0
snaga diskriminacije	izvrsna	prihvatljiva	slaba	prihvatljiva	izvrsna	prihvatljiva	prihvatljiva

* - površina ispod krivulje



Slika 28. Krivulje ROC i njima pridružene statistički značajne površine ispod krivulja (AUC) prikazuju dijagnostičku vrijednost dobivenih ekspresija za razlikovanje tumorskog od zdravog tkiva za (a) gen *BCL2*, (b) gen *GLI1*, (c) gen *GLI2*, (d) lncRNA *MALAT1*, (e) lncRNA *XIST*, (f) miR-21-5p i (g) miR-96-5p.

Analiza ROC krivulja pokazala je da ekspresije svih ispitivanih mRNA, lncRNA i miRNA imaju statistički značajnu dijagnostičku vrijednost za razlikovanje tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa od tkiva zdravih jajovoda ($P < 0,05$). Vrijednosti površina ispod ROC krivulja (AUC) pokazale su da relativne ekspresije gena *BCL2* ($\leq 0,00714$) i lncRNA *XIST* ($\leq 0,068$) imaju najveću, izvrsnu dijagnostičku vrijednost ($AUC > 0,8$), dok najslabiju dijagnostičku vrijednost ima određivanje ekspresije gena *GLI2* ($AUC = 0,647$). Određivanje relativnih ekspresija gena *GLI1*, lncRNA *MALAT1* te obje miRNA također ima prihvatljivu diskriminacijsku snagu za razlikovanje tumorskog od zdravog tkiva ($AUC 0,7-0,8$).

5. RASPRAVA

Signalni put Hedgehog-Gli (Hh-Gli) uključen je u embrionalni razvoj jajnika i poznato je da njegova netipična aktivacija može dovesti do nastanka različitih tipova tumora jajnika (Ozretić i sur. 2017). Laboratorij za nasljedni rak već se duži niz godina bavi otkrivanjem genetskih i epigenetskih uzročnika disregulacije tog signalnog puta (Levanat i sur. 2017). Nedavno je u tom laboratoriju pomoću tehnike mikročipova provedeno profiliranje molekula mRNA (genska ekspresija) u manjem broju svježih uzoraka tkiva HGSOE i zdravih jajovoda, koji su jedan od glavnih ishodišnih organa za nastanak tog tipa tumora jajnika (Reade i sur. 2014). Rezultati su pokazali da je ekspresija gena *BCL2*, jednog od ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli, bila statistički značajno snižena u uzorcima HGSOE.

Jedan od epigenetskih uzroka snižene ekspresije gena *BCL2* u uzorcima HGSOE mogla bi biti pojačana ekspresija malih nekodirajućih molekula mikroRNA koje vezanjem za 3' UTR ciljnog gena dovode do degradacije molekula mRNA (Finnegan i Pasquinelli 2013). Tako je profiliranje molekula mikroRNA provedeno na istom setu uzoraka pokazalo je da je ekspresija dviju molekula miRNA čiji je ciljni gen *BCL2*, miR-96-5p i miR-21-5p, značajno pojačana u uzorcima HGSOE. Također, pokazano je da je i ekspresija dviju dugih nekodirajućih molekula RNA (lncRNA) koje također mogu vezati miR-96-5p i miR-21-5p, *XIST* i *MALAT1*, značajno snižena u uzorcima HGSOE. Takve molekule nazivaju se i „mikroRNA spužve“ (Ebert i Sharp 2010) i sudjeluju u regulaciji ekspresije ciljnih gena natječući se međusobno za vezanje istih molekula miRNA (eng. competing endogenous RNAs, ceRNAs) (Sen i sur. 2014). Stoga je jedan od glavnih ciljeva mog istraživanja bio na proširenom setu uzoraka od 62 tkiva raka jajnika visokog gradusa (*karcinomi*) i 19 tkiva zdravih jajovoda (*kontrole*) odrediti metodom qRT-PCR-a relativnu ekspresiju prije spomenutih molekula mRNA, miRNA i lncRNA te ekspresiju gena *GLI1* i *GLI2* čiji proteinski produkti reguliraju transkripciju gena *BCL2* (Bigelow i sur. 2004). Moji rezultati potvrdili su rezultate dobivene pomoću tehnologije mikročipova, što je u skladu literaturnim podacima da postoji velika podudarnost između rezultata dobivenih pomoću te dvije tehnike (Morey i sur. 2006). S druge strane, analiza ekspresije na većem broju uzoraka pokazala je da je i gen *GLI1* također statistički značajno snižen u uzorcima HGSOE.

Gen regulator apoptoze *BCL2* bio je prvi identificirani član porodice proteina Bcl-2 zahvaljujući svojoj ulozi u B-staničnom limfomu (Yuan i sur. 2020). Produkt gena *BCL2*, protein regulator apoptoze Bcl-2, prototip je anti-apoptotskog proteina čija je jedna od uloga blokiranje programirane stanične smrti (apoptoze) (Warren i sur. 2019). Moji rezultati su

pokazali da je ekspresija gena *BCL2* bila značajno snižena u uzorcima raka jajnika visokog gradusa što je u skladu s literaturnim podacima. Tako su npr. Diebolda i sur. (1996) pokazali kako tumori niskog gradusa imaju izraženiju ekspresiju tog gena od tumora visokog gradusa, kakav je i rak jajnika koji sam ja istraživala. Moji rezultati su također u skladu sa sniženom ekspresijom gena *BCL2* opaženom u staničnoj liniji raka jajnika OVCAR3, koja je glavni stanični model za HGSOC (Placzek i sur. 2010). Na kliničkim uzorcima pokazano je da je i povišena ekspresija proteina Bcl-2 povezana s nižim gradusom kod seroznih tipova raka jajnika te s drugim manje malignim tipovima tumora jajnika, kao i s boljim preživljenjem pacijenata oboljelih od tumora jajnika (Henriksen i sur. 1995, Marx i sur. 1997). S obzirom da protein Bcl-2 ima anti-apoptotsku, odn. pro-proliferacijsku ulogu, na prvi pogled djeluje logično da bi povišena razina ekspresije trebala biti povezana s malignijim karakteristikama raka kakav je HGSOC, dok naše i mnoga druga istraživanja pokazuju suprotno – da povišena ekspresija ima zaštitni karakter. Isti zaštitni karakter primijećen je i kod raka dojke pri čemu je povišena razina ekspresije gena *BCL2* pronađena kod slabo-proliferirajućih, estrogen receptor-pozitivnih tumora dojke niskog gradusa (Dawson i sur. 2010).

Smatra se da je takav „paradoksalan“ povoljan efekt povišene ekspresije prisutan kod nekih tipova tumora povezan s post-transkripcijskom regulacijom ekspresije (Cui i Placzek 2018) i ne-apoptotskim funkcijama proteina Bcl-2 (Pietenpol i sur. 1994) te da je za određivanje stupnja stanične smrti kod tumora važna ekspresija i ostalih pro- i anti-apoptoskih gena (Cory i sur. 2003), pri čemu je kod tumora jajnika posebno važan omjer pro-apoptotskog proteina BAX i anti-apoptotskog Bcl-2 (Marx i Meden 2001).

Transkripcijski faktori GLI glavni su efektori signalnog puta Hh-Gli te reguliraju transkripciju gena *BCL2*. Moji rezultati pokazali su da je ekspresija gena *GLII* statistički značajno snižena u uzorcima HGSOC dok nema statistički značajne razlike u ekspresiji gena *GLI2*. Liao i sur. (2009) po prvi puta su pokazali kako je loš klinički ishod kod pacijentica oboljelih od raka jajnika povezan s povećanom ekspresijom gena *GLII* i *PTCH1*, što je bacilo novo svjetlo na mogućnost velike uloge signalnog puta Hh-Gli u raku jajnika (Liao i sur. 2009). Yang i sur. (2009) su, za razliku od ranijih studija, pokazali da samo mali udio raka jajnika pokazuje ekspresiju ciljnih gena signalnog puta Hh-Gli te su na temelju toga zaključili da aktivacija signalnog puta Hh-Gli u raku jajnika nije česta pojava. S druge strane, Schmid i sur. (2011) su otkrili da jedna podskupina pacijentica s rakom jajnika (njih 25%) ima povećanu ekspresiju signalnog puta Hh-Gli, kao i transkripcijskog faktora *GLI2* (Schmid i sur. 2011). Podaci koji su tada objavljeni dali su naslutiti kako se signalni put Hh-Gli u raku jajnika

„ponaša“ neobično, što je vrlo vjerojatno posljedica križanja signalnog puta Hh-Gli s nekim drugim signalnim putevima. (Chen i sur. 2013).

Prema rezultatima analize korelacije između ekspresija gena *BCL2*, *GLI1* i *GLI2*, čini se kako je *GLI1* glavni regulator gena *BCL2* u HGSOE. Proučavana literatura sugerira slične rezultate. Primjerice, Bigelow i sur. (2004) u svom su radu također pokazali kako *GLI1* pozitivno regulira transkripciju gena *BCL2*, a smatra se da je tako jer *GLI1* sadrži samo transaktivacijsku domenu. Osim toga, na primjeru transgenih miševa Bigelow i sur. (2004) su pokazali kako je *GLI1* u mogućnosti inducirati endogenu ekspresiju gena *BCL2*.

S druge strane, Regl i sur. (2004) u svom radu tvrde kako je gen *GLI2* taj koji aktivira ekspresiju gena *BCL2*. Kako bi to i dokazali, analizirali su ljudski promotor gena *BCL2 in silico* kojim su otkrili prisutnost tri usko poredana *GLI* vezna mjesta – bs1, bs2 i bs3, a koja su homologna dogovorenoj *GLI*-vezujućoj sekvenci nukleotidnog slijeda GACCACCCA (Kinzler i Vogelstein 1990). Potom su sve tri sekvence povezali s *GLI* cinkovim prstenom čime su htjeli pokazati kako i *GLI2*, baš kao i *GLI1* kod Bigelow i sur. (2004), regulira ekspresiju gena *BCL2* direktnim vezanjem na promotor tog gena. Kao jedno od mogućih rješenja nametnuo im se zaključak kako je aktivacija ekspresije gena *BCL2* kao odgovor na gen *GLI2* posredovana povećanjem endogenog proteina *GLI1*.

Usporedbom razina ekspresije u kontrolama i karcinomima primijetila sam da je miRNA miR-21-5p povišeno eksprimirana u karcinomima, što je otkriveno i u radu Oliveira i sur. (2019). Važno je spomenuti i kako se negativna korelacija između ekspresija gena *BCL2* i ispitivanih miRNA poklapa s općenito pretpostavljenom negativnom regulacijom ekspresije ciljnih gena pomoću miRNA. To dodatno potvrđuju i eksperimentalno dokazane interakcije 3' UTR gena *BCL2* s miR-96-5p (Hafner i sur. 2010, Karginov i Hannon 2013) i miR-21-5p (Skalsky i sur. 2012, Grosswendt i sur. 2014).

Objekti istraživane lncRNA u mojem istraživanju bile su statistički značajno sniženo eksprimirane u tkivu raka jajnika, dok je naša analiza potvrdila samo statistički značajnu negativnu korelaciju između ekspresija miR-96-5p i *XIST*. Iako su iz literature i baze podataka LncBase poznate sve četiri kombinacije interakcija istraživanih miRNA i lncRNA, uzrok tome mogao bi biti relativno mali broj analiziranih uzoraka. Huang i sur. (2002) su pokazali kako je *XIST* sniženo eksprimiran gen u recidivirajućem tumoru jajnika, što je u skladu s mojim rezultatima. S druge strane, Lin i sur. (2018) su utvrdili kako je *MALAT1* pojačano reguliran u tkivima i staničnim linijama ljudskog epitelnog raka jajnika te su pokazali da je razina njegove ekspresije bila značajno viša u malignim tumorima jajnika nego u benignim tumorima jajnika i zdravom tkivu jajnika. Također, pokazali su kako je *MALAT1* uključen u razvoj raka jajnika.

Moguće objašnjenje za moje, suprotne rezultate ekspresije *MALATI* je što sam ja kao kontrolno tkivo koristila zdrave jajovode. Salamini-Montemurri i sur. (2020) bavili su se istraživanjima lncRNA u raku jajnika pa su utvrdili važnost lncRNA *MALATI* i *XIST*. Štoviše, utvrđeno je kako *MALATI* ima ulogu u angiogenezi tako što inducira ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta *VEGF* kao i ekspresiju faktora rasta fibroblasta *FGF* u raku jajnika (Li i sur. 2019a). Međutim, u radu Salamini-Montemurri i sur. (2020) zaključuju kako se, iako ima mnogo molekula lncRNA povezanih s rakom jajnika, i dalje ne može sa sigurnošću reći koje su to točno molekule najkorisnije za upravljanje samom bolešću. Naposljetku, postoje istraživanja koja pokazuju da je *MALATI* prekomjerno eksprimiran i u drugim tipovima raka kao što su rak mokraćnog mjehura, rak dojke, rak prostate i rak jajnika (Gutschner i sur. 2013; Arun i sur. 2016).

Visoka stopa smrtnosti pacijentica s HGSOE rezultat je činjenice da se bolest većinom dijagnosticira u poodmakloj fazi (Lisio i sur. 2019). Razlog tome je izostanak ranih znakova bolesti te nepostojanje dijagnostičkih testova koji bi otkrili bolest u ranom stadiju razvoja. Stoga postoji potreba za novim saznanjima o biokemijskim i molekularno-biološkim mehanizmima nastanka raka jajnika koja bi mogla stvoriti nove i efikasnije dijagnostičke i terapijske pristupe. U tome nam uvelike mogu pomoći tumorski biljezi, od kojih je za rak jajnika najvažniji CA125. Povijesno gledano, CA125 otkriven je 1981. godine i tada je opisan kao transmembranski glikoprotein čija molekularna masa iznosi više od 200 kDa, a 24% njegove mase otpada na ugljikohidrate. Detekcija tumorskog biljega CA125 radi na principu njegovog prepoznavanja pomoću monoklonskog tijela OC125 (Li i sur. 2009, Burtis i sur. 2012). Kod odraslih žena može ga se pronaći u endometriju, vratu maternice, jajovodu, pleuri i peritoneumu, a granica koja razlikuje zdrave žene od bolesnih je 35 kIU/L (Šamija i sur. 2006). Posebno je važno naglasiti kako se taj biljeg ne može koristiti za probir, što znači da se njime ne mogu testirati osobe bez simptoma, već jedino ima vrijednost kod pacijentica s uznapredovalom bolesti.

Dijagnostička vrijednost ekspresija molekula RNA istraživanih u ovom radu određena je analizom ROC-krivulje. Po obliku same krivulje i površini ispod nje (AUC) može se procijeniti kolika je učinkovitost samog testa. Naime, što je krivulja bliža gornjem lijevom rubu grafa, a njena površina veća – to je dijagnostička točnost testa veća. Bitno je napomenuti da površina ispod krivulje može imati bilo koju vrijednost između 0 i 1, ali dijagnostički markeri s $AUC \leq 0,5$ nemaju nikakvu moć diskriminacije.

Rezultati mog istraživanja tumače kako vrijednosti površina ispod ROC krivulja (AUC) za relativne ekspresije gena *BCL2* ($\leq 0,00714$) i lncRNA *XIST* ($\leq 0,068$) imaju najveću, izvrsnu dijagnostičku vrijednost (AUC > 0,8), dok najslabiju dijagnostičku vrijednost ima određivanje ekspresije gena *GLI2* (AUC = 0,647) pa se može izvesti zaključak kako su *BCL2* i *XIST* markeri usporedivi s tumorskim biljekom CA125 čija osjetljivost i specifičnost dostiže 75–90% za pacijentice s uznapredovalom fazom bolesti (Moss i sur. 2005).

Također, s obzirom na to da je iz literature poznato da je ekspresija gena *BCL2* viša u raku jajnika nižeg gradusa, čini se da bi on mogao biti bolji marker za otkrivanje raka jajnika u ranijoj fazi razvoja bolesti. Posebno interesantno bilo bi istražiti i u kojoj mjeri se ekspresija istraživanih RNA, određena u uzorcima tkiva tumora, poklapa s ekspresijom tih RNA u krvi (plazmi ili serumu), što bi bio puno pristupačniji i manje invazivni izvor potencijalnih dijagnostičkih tumorskih biljega.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Analiza ekspresije pomoću metode qRT-PCR-a na proširenom setu uzoraka svježeg tkiva seroznog raka jajnika visokog gradusa (HGSOC) i kontrolnih uzoraka zdravih jajovoda potvrdila je rezultate dobivene profiliranjem ekspresije pomoću metode mikročipova na malom setu uzoraka.
- 2) Ekspresija gena *BCL2* statistički je značajno snižena, ekspresija molekula miRNA miR-21-5p i miR-96-5p, čiji je ciljani gen *BCL2*, značajno je povišena, a ekspresija molekula lncRNA *MALAT1* i *XIST*, koje na sebe također mogu vezati miRNA miR-21-5p i miR-96-5p, statistički je značajno snižena u HGSOC.
- 3) Pokazalo se da su ekspresije većine istraživanih RNA međusobno u korelaciji što ukazuje da je regulacija njihove ekspresije međusobno povezana, ali se ne na osnovu toga ne mogu utvrditi uzročno-posljedične veze.
- 4) Snažnija korelacija između ekspresije gena *BCL2* i *GLI1* u odnosu na *GLI2* ukazuje da bi transkripcijski faktor *GLI1* mogao imati važniju ulogu u regulaciji ekspresije gena *BCL2* od *GLI2* u HGSOC.
- 5) Negativna korelacija između ekspresije gena *BCL2* i miRNA miR-21-5p i miR-96-5p dodatno potvrđuje već poznati negativni učinak tih molekula miRNA na ekspresiju njihovog ciljnog gena *BCL2*.
- 6) Ekspresija gena *BCL2* i lncRNA *XIST* ima najvišu dijagnostičku vrijednost ($AUC > 0,8$) za razlikovanje tkiva HGSOC i tkiva zdravih jajovoda. Međutim, osjetljivost i specifičnost ta dva potencijalna dijagnostička biomarkera ipak nije dovoljno visoka pa bi se njihovom primjenom za dijagnosticiranje oboljelih od HGSOC dobilo dosta lažno pozitivnih kao i lažno negativnih dijagnoza.

S obzirom na to da je statistički značajna korelacija prisutna jedino između ekspresije lncRNA *XIST* i miRNA *miR-96-5p*, moje istraživanje jedino potvrđuje hipotezu da bi ôs *BCL2*–*miR-96-5p*–*XIST* mogla biti epigenetski uzrok snižene ekspresije gena *BCL2* u seroznom raku jajnika visokog gradusa, što bi trebalo potvrditi funkcionalnim *in vitro* testovima.

7. LITERATURA

- Adams, J. M., Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26(9): 1324–1337.
- Alcedo, J., Noll, M. (1997). Hedgehog and its patched-smoothened receptor complex: a novel signalling mechanism at the cell surface. *Biological chemistry*. 378(7): 583–590.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., Hooper, J. E. (1996). The Drosophila smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*. 86(2): 221–232.
- Arun, G., Diermeier, S., Akerman, M., Chang, K. C., Wilkinson, J. E., Hearn, S., i sur. (2016). Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes & development*. 30(1): 34–51.
- Auersperg, N. (2013). Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? *Gynecologic oncology*. 130(1): 246–251.
- Banjara, S., Suraweera, C. D., Hinds, M. G., Kvansakul, M. (2020). The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. *Biomolecules*. 10(1): 128.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136(2): 215–233.
- Bartonicek, N., Maag, J. L., Dinger, M. E. (2016). Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements. *Molecular cancer*. 15(1): 43.
- Beale, P. J., Rogers, P., Boxall, F., Sharp, S. Y., Kelland, L. R. (2000). BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *British journal of cancer*. 82(2): 436–440.
- Beham, A., Marin, M. C., Fernandez, A., Herrmann, J., Brisbay, S., Tari, A. M., i sur. (1997). Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene*. 15(23): 2767–2772.
- Bell, D. A., Scully, R. E. (1994). Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases. *Cancer*. 73(7): 1859–1864.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., i sur. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics*. 37(7): 766–770.
- Bigelow, R. L., Chari, N. S., Unden, A. B., Spurgers, K. B., Lee, S., Roop, D. R., i sur. (2004). Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *The Journal of biological chemistry*. 279(2): 1197–1205.

- Binju, M., Amaya-Padilla, M. A., Wan, G., Gunosewoyo, H., Suryo Rahmanto, Y., Yu, Y. (2019). Therapeutic Inducers of Apoptosis in Ovarian Cancer. *Cancers*. 11(11): 1786.
- Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A., Green, D. R. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. 359(6395): 552–554.
- Bowtell, D. D., Böhm, S., Ahmed, A. A., Aspuria, P. J., Bast, R. C., Beral, V., i sur. (2015). Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nature reviews. Cancer*. 15(11): 668–679.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*. 3(3): 85.
- Briscoe, J., Théron, P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14(7): 416–429.
- Bubendorf, L., Sauter, G., Moch, H., Jordan, P., Blöchliger, A., Gasser, T. C., Mihatsch, M. J. (1996). Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *The American journal of pathology*. 148(5): 1557–1565.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. A., Dickson, B. J., Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*. 99(7): 803–815.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. (2012). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic*. St. Louis, SAD, Elsevier.
- Cardenas, C., Montagna, M. K., Pitruzzello, M., Lima, E., Mor, G., Alvero, A. B. (2017). Adipocyte microenvironment promotes Bclxl expression and confers chemoresistance in ovarian cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 22(4): 558–569.
- Caria, S., Hinds, M. G., Kvensakul, M. (2017). Structural insight into an evolutionarily ancient programmed cell death regulator - the crystal structure of marine sponge BHP2 bound to LB-Bak-2. *Cell death & disease*. 8(1): 1-8
- Carpenter, D., Stone, D. M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., i sur. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(23): 13630–13634.
- Cech, T. R., Steitz, J. A. (2014). The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 157(1): 77-94.
- Charpin, C., Garcia, S., Bonnier, P., Martini, F., Andrac, L., Horschowski, N., i sur. (1998). bcl-2 automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas:

- correlation with 10-year follow-up. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 16(6): 2025–2031.
- Chaudhry, P., Srinivasan, R., Patel, F. D. (2010). Expression of the major fas family and Bcl-2 family of proteins in epithelial ovarian cancer (EOC) and their correlation to chemotherapeutic response and outcome. *Oncology research*. 18(11-12): 549–559.
- Chen, Q., Gao, G., Luo, S. (2013). Hedgehog signaling pathway and ovarian cancer. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*. 25(3): 346–353.
- Chen-Levy, Z., Nourse, J., Cleary, M. L. (1989). The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Molecular and cellular biology*. 9(2): 701–710.
- Chu, Z. P., Dai, J., Jia, L. G., Li, J., Zhang, Y., Zhang, Z. Y., Yan, P. (2018). Increased expression of long noncoding RNA HMMR-AS1 in epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor. *European review for medical and pharmacological sciences*. 22(23): 8145–8150.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(39): 13944–13949.
- Clark, M. B., Johnston, R. L., Inostroza-Ponta, M., Fox, A. H., Fortini, E., Moscato, P. (2012). Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome research*. 22(5): 885–898.
- Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A., Lisowska, K. M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 81(1): 17-38.
- Cory, S., Huang, D. C., Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 22(53): 8590–8607.
- Cramer, D. W. (2012). The epidemiology of endometrial and ovarian cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*. 26(1): 1–12.
- Cramer, D. W., Welch, W. R. (1983). Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 71(4): 717–721.
- Cross, S. S., Bury, J. P. (2004). The Hedgehog signaling pathways in human pathology. *Current diagnostic pathology*. 10(2): 157-168.
- Cui, J., Placzek, W. J. (2018). Post-Transcriptional Regulation of Anti-Apoptotic BCL2 Family Members. *International journal of molecular sciences*. 19(1): 308.

- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., Ishii, S. (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *The Journal of biological chemistry*. 274(12): 8143–8152.
- Dawson, S. J., Makretsov, N., Blows, F. M., Driver, K. E., Provenzano, E., Le Quesne, J., i sur. (2010). CL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British journal of cancer*. 103(5): 668–675.
- Devouassoux-Shisheboran, M., Genestie, C. (2015). Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chinese journal of cancer*. 34(1): 50–55.
- Di Leva, G., Garofalo, M., Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*. 9: 287–314.
- Diebold, J., Baretton, G., Felchner, M., Meier, W., Dopfer, K., Schmidt, M., Löhns, U. (1996). bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *American journal of clinical pathology*. 105(3): 341–349.
- Ding, C., Wei, R., Rodríguez, R. A., Del Mar Requena Mullor, M. (2019). LncRNA PCAT-1 plays an oncogenic role in epithelial ovarian cancer by modulating cyclinD1/CDK4 expression. *International journal of clinical and experimental pathology*. 12(6): 2148–2156.
- Ding, Q., Fukami, S. i., Meng, X., Nishizaki, Y., Zhang, X., Sasaki, H., i sur. (1999). Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Current biology : CB*. 9(19): 1119–1122.
- Dou, Q., Xu, Y., Zhu, Y., Hu, Y., Yan, Y., Yan, H. (2019). LncRNA FAM83H-AS1 contributes to the radioresistance, proliferation, and metastasis in ovarian cancer through stabilizing HuR protein. *European journal of pharmacology*. 852: 134–141.
- Dunaeva, M., Michelson, P., Kogerman, P., Toftgard, R. (2003). Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins. *The Journal of biological chemistry*. 278(7): 5116–5122.
- Ebert, M. S., Sharp, P. A. (2010). Emerging roles for natural microRNA sponges. *Current biology : CB*. 20(19): 858–861.
- Eichberger, T., Sander, V., Schnidar, H., Regl, G., Kasper, M., Schmid, C., i sur. (2006). Overlapping and distinct transcriptional regulator properties of the GLI1 and GLI2 oncogenes. *Genomics*. 87(5): 616–632.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J. L., Mignotte, B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology*. 942: 157–183.

- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews. Genetics*. 12(12): 861-874.
- Fathalla, M. F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet (London, England)*. 2(7716): 163.
- Fauvet, R., Dufournet, C., Poncelet, C., Uzan, C., Hugol, D., Daraï, E. (2005). Expression of pro-apoptotic (p53, p21, bax, bak and fas) and anti-apoptotic (bcl-2 and bcl-x) proteins in serous versus mucinous borderline ovarian tumours. *Journal of surgical oncology*. 92(4): 337–343.
- Finnegan, E. F., Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 48(1): 51-68.
- Gadducci, A., Sergiampietri, C., Lanfredini, N., Guiggi, I. (2014). Micro-RNAs and ovarian cancer: the state of art and perspectives of clinical research. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 30(4): 266–271.
- Gibson, L., Holmgren, S. P., Huang, D. C., Bernard, O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., i sur. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*. 13(4): 665–675.
- Grosswendt, S., Filipchuk, A., Manzano, M., Klironomos, F., Schilling, M., Herzog, M., i sur. (2014). Unambiguous identification of miRNA:target site interactions by different types of ligation reactions. *Molecular cell*. 54(6): 1042–1054.
- Güth, U., Huang, D. J., Bauer, G., Stieger, M., Wight, E., Singer, G. (2007). Metastatic patterns at autopsy in patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 110(6): 1272–1280.
- Gutschner, T., Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*. 9(6): 703–719.
- Gutschner, T., Hämmerle, M., Eissmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G., i sur. (2013). The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer research*. 73(3): 1180–1189.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., i sur. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 458(7235): 223–227.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., i sur. (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*. 141(1): 129–141.

- Hao, D., Li, J., Jia, S., Meng, Y., Zhang, C., Wang, L., Di, L. J. (2017). Integrated Analysis Reveals Tubal- and Ovarian-Originated Serous Ovarian Cancer and Predicts Differential Therapeutic Responses. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 23(23): 7400–7411.
- Heintz, A. P., Odicino, F., Maisonneuve, P., Beller, U., Benedet, J. L., Creasman, W. T., i sur. (2001). Carcinoma of the ovary. *Journal of epidemiology and biostatistics*. 6(1): 107–138.
- Henriksen, R., Wilander, E., Oberg, K. (1995). Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. *British journal of cancer*. 72(5): 1324–1329.
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 348(6299): 334–336.
- Huang, K. C., Rao, P. H., Lau, C. C., Heard, E., Ng, S. K., Brown, C., i sur. (2002). Relationship of XIST expression and responses of ovarian cancer to chemotherapy. *Molecular cancer therapeutics*. 1(10): 769–776.
- Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature medicine*. 21(11): 1253–1261.
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M. J., Kenzelmann-Broz, D., i sur. (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 142(3): 409–419.
- Hui, C. C., Angers, S. (2011). Gli proteins in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*. 27: 513–537.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell*. 88(3): 333–346.
- Ikram, M. S., Neill, G. W., Regl, G., Eichberger, T., Frischauf, A. M., Aberger, F., i sur. (2004). GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *The Journal of investigative dermatology*. 122(6): 1503–1509.
- Incardona, J. P., Gruenberg, J., Roelink, H. (2002). Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Current biology : CB*. 12(12): 983–995.
- Ingham, P. W. (1991). Segment polarity genes and cell patterning within the Drosophila body segment. *Current opinion in genetics & development*. 1(2): 261–267.
- Ingham, P. W. (2000). How cholesterol modulates the signal. *Current biology : CB*. 10(5): 180–183.

- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L., Jiang, J. (2004). Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature*. 432(7020): 1045–1050.
- Jögi, A., Abel, F., Sjöberg, R. M., Toftgård, R., Zaphiropoulos, P. G., Pahlman, S., i sur. (2000). Patched 2, located in 1p32-34, is not mutated in high stage neuroblastoma tumors. *International journal of oncology*. 16(5): 943–949.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., i sur. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 120(5): 635–647.
- Karakas, T., Maurer, U., Weidmann, E., Miething, C. C., Hoelzer, D., Bergmann, L. (1998). High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 9(2): 159–165.
- Karginov, F. V., Hannon, G. J. (2013). Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes & development*. 27(14): 1624–1632.
- Karreth, F. A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S. M., Rust, A. G., i sur. (2011). In vivo identification of tumor- suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*. 147(2): 382–395.
- Katoh, Y., Katoh, M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Current molecular medicine*. 9(7): 873–886.
- Katsumata, M., Siegel, R. M., Louie, D. C., Miyashita, T., Tsujimoto, Y., Nowell, P. C., i sur. (1992). Differential effects of Bcl-2 on T and B cells in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(23): 11376–11380.
- Ke, Z., Caiping, S., Qing, Z., Xiaojing, W. (2015). Sonic hedgehog-Gli1 signals promote epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/AKT pathway. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 32(1): 368.
- Kim, J., Coffey, D. M., Creighton, C. J., Yu, Z., Hawkins, S. M., Matzuk, M. M. (2012). High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(10): 3921–3926.
- Kim, V. N., Han, J., Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10(2): 126–139.

- Kinose, Y., Sawada, K., Nakamura, K., Kimura, T. (2014). The role of microRNAs in ovarian cancer. *BioMed research international*. 2014: 249-393.
- Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1990). The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Molecular and cellular biology*. 10(2): 634–642.
- Kinzler, K. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Trent, J. M., Law, M. L., O'Brien, S. J., i sur. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science (New York, N.Y.)*. 236(4797): 70–73.
- Klotz, D. M., Wimberger, P. (2017). Cells of origin of ovarian cancer: ovarian surface epithelium or fallopian tube? *Archives of gynecology and obstetrics*. 296(6): 1055–1062.
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Undén, A. B., Sandstedt, B., i sur. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nature cell biology*. 1(5): 312–319.
- Kohn, E. C., Ivy, S. P. (2017). Whence high-grade serous ovarian cancer. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 37: 443–448.
- Kornfeld, J. W., Brüning, J. C. (2014). Regulation of metabolism by long, non-coding RNAs. *Frontiers in genetics*. 5: 57.
- Kurman, R. J., Carcangiu, M. L., Herrington, C. S., Young, R. H. (2014). *World Health Organization classification of tumours of female reproductive organs*. Geneva: IARC Press.
- Kvansakul, M., Hinds, M. G. (2015). The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. 20(2): 136–150.
- Lawrenson, K., Fonseca, M., Liu, A. Y., Segato Dezem, F., Lee, J. M., Lin, X., i sur. (2019). A Study of High-Grade Serous Ovarian Cancer Origins Implicates the SOX18 Transcription Factor in Tumor Development. *Cell reports*. 29(11): 3726–3735.
- Leahy, D. T., Mulcahy, H. E., O'Donoghue, D. P., Parfrey, N. A. (1999). bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology*. 35(4): 360–367.
- Lee, K. R., Tavassoli, F. A., Prat, J., Dietel, M., Gersell, D. J., Karseladze, A. I. (2003). Tumours of the ovary and peritoneum: surface epithelial stromal tumours. U: F. A. Tavassoli,

- P. Devillee (ur.), Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press., str. 119-124.
- Lee, Y. S., Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & development*. 21(9): 1025–1030.
- Leibowitz, B., Yu, J. (2010). Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer biology & therapy*. 9(6): 417–422.
- Levanat, S., Sabol, M., Musani, V., Ozretic, P., Trnski, D. (2017). Hedgehog signaling pathway as genetic and epigenetic target in ovarian tumors. *Current pharmaceutical design*. 23(1): 73-94.
- Li, J., Dowdy, S., Tipton, T., Podratz, K., Lu, W. G., Xie, X., Jiang, S. W. (2009). HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. *Expert review of molecular diagnostics*. 9(6): 555–566.
- Li, J., Zhang, S., Wu, L., Pei, M. (2019). Interaction between LncRNA-ROR and miR-145 contributes to epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *General physiology and biophysics*. 38(6): 461–471.
- Li, W., Han, X., Pan, Y., Lan, Y., Ning, J., Zhao, Y., Zhang, L. (2019). Long non-coding RNA CCAT2 regulates proliferation, drug sensitivity and metastasis of ovarian cancer. *Archives of Medical Science*.
- Liao, X., Siu, M. K., Au, C. W., Wong, E. S., Chan, H. Y., Ip, P. P., i sur. (2009). Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis*. 30(1): 131-140.
- Lin, Q., Guan, W., Ren, W., Zhang, L., Zhang, J., Xu, G. (2018). MALAT1 affects ovarian cancer cell behavior and patient survival. *Oncology reports*. 39(6): 2644–2652.
- Ling, H., Vincent, K., Pichler, M., Fodde, R., Berindan-Neagoe, I., Slack, F. J., Calin, G. A. (2015). Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene*. 34(39): 5003–5011.
- Lisio, M. A., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z. H., Telleria, C. (2019). High-grade serous ovarian cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. *International journal of molecular sciences*. 20(4): 952.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*. 25(4): 402–408.
- Long, Y., Wang, X., Youmans, D. T., Cech, T. R. (2017). How do lncRNAs regulate transcription? *Science advances*. 3(9): 1-13.

- Mandrekar, J. N. (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 5(9): 1315–1316.
- Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., Tabin, C. J. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*. 384(6605): 176–179.
- Marx, D., Binder, C., Meden, H., Lenthe, T., Ziemek, T., Hiddemann, T., et al. (1997). Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer research*. 17(3C): 2233–2240.
- Mattick, J. S., Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human molecular genetics*. 15(1): 17-29.
- Maurac, I. (2011). Signalni put HH-GLI i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika. Zagreb: Medicinski fakultet, doktorska disertacija
- Mayr, C., Hemann, M. T., Bartel, D. P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, N.Y.)*. 315(5818): 1576–1579.
- Merritt, W. M., Lin, Y. G., Han, L. Y., Kamat, A. A., Spannuth, W. A., Schmandt, R., i sur. (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 359(25): 2641–2650.
- Miao, S., Wang, J., Xuan, L., Liu, X. (2020). LncRNA TTN-AS1 acts as sponge for miR-15b-5p to regulate FBXW7 expression in ovarian cancer. *BioFactors (Oxford, England)*. 46(4): 600-607.
- Miyashita, T., Reed, J. C. (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer research*. 52(19): 5407–5411.
- Morey, J. S., Ryan, J. C., Van Dolah, F. M. (2006). Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological procedures online*. 8: 175-193.
- Moss, E. L., Hollingworth, J., Reynolds, T. M. (2005). The role of CA125 in clinical practice. *Journal of clinical pathology*. 58(3): 308–312.
- Muralidhar, G. G., Barbolina, M. V. (2015). The miR-200 Family: versatile players in epithelial ovarian cancer. *International journal of molecular sciences*. 16(8): 16833–16847.
- Murone, M., Rosenthal, A., de Sauvage, F. J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Experimental cell research*. 253(1): 25–33.

- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287(5785): 795–801.
- Oliveira, D., Carlsen, A. L., Heegaard, N., Prahm, K. P., Christensen, I. J., Høgdall, C. K., Høgdall, E. V. (2019). Diagnostic plasma miRNA-profiles for ovarian cancer in patients with pelvic mass. *PloS one*. 14(11): 1-15.
- O'Neill, C. J., Deavers, M. T., Malpica, A., Foster, H., McCluggage, W. G. (2005). An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms. *The American journal of surgical pathology*. 29(8): 1034–1041.
- Østerlund, T., Kogerman, P. (2006). Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli. *Trends in cell biology*. 16(4): 176–180.
- Ozretić, P., Trnski, D., Musani, V., Maurac, I., Kalafatić, D., Orešković, S., i sur. (2017). Non-canonical Hedgehog signaling activation in ovarian borderline tumors and ovarian carcinomas. *International journal of oncology*. 51(6): 1869–1877.
- Palmer, J. E., Sant Cassia, L. J., Irwin, C. J., Morris, A. G., Rollason, T. P. (2008). P53 and bcl-2 assessment in serous ovarian carcinoma. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 18(2): 241–248.
- Pan, L., Meng, Q., Li, H., Liang, K., Li, B. (2019). LINC00339 promotes cell proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells via miR-148a-3p/ROCK1 axes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 120: 1-10.
- Park, S. A., Kim, L. K., Kim, Y. T., Heo, T. H., Kim, H. J. (2020). Long noncoding RNA E2F4as promotes progression and predicts patient prognosis in human ovarian cancer. *Cancers*. 12(12): 3626.
- Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D. P., Garber, E. A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., i sur. (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian and Desert hedgehog. *Mechanisms of development*. 106(1-2): 107–117.
- Peres, L. C., Cushing-Haugen, K. L., Köbel, M., Harris, H. R., Berchuck, A., Rossing, M. A., i sur. (2019). Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage. *Journal of the National Cancer Institute*. 111(1): 60–68.
- Peters, C., Wolf, A., Wagner, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H. (2004). The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to

- lipid-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(23): 8531–8536.
- Petros, A. M., Medek, A., Nettesheim, D. G., Kim, D. H., Yoon, H. S., Swift, K., i sur. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(6): 3012–3017.
- Pietenpol, J. A., Papadopoulos, N., Markowitz, S., Willson, J. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1994). Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2. *Cancer research*. 54(14): 3714–3717.
- Placzek, W. J., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J. C., Pellecchia, M. (2010). A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell death & disease*. 1(5): 1-9.
- Porichi, O., Nikolaidou, M. E., Apostolaki, A., Tserkezoglou, A., Arnogiannaki, N., Kassanos, D., i sur. (2009). BCL-2, BAX and P53 expression profiles in endometrial carcinoma as studied by real-time PCR and immunohistochemistry. *Anticancer research*. 29(10): 3977–3982.
- Purdie, D. M., Bain, C. J., Siskind, V., Webb, P. M., Green, A. C. (2003). Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *International journal of cancer*. 104(2): 228–232.
- Reade, C. J., McVey, R. M., Tone, A. A., Finlayson, S. J., McAlpine, J. N., Fung-Kee-Fung, M., Ferguson, S. E. (2014). The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada: JOGC*. 36(2): 133–140.
- Regl, G., Kasper, M., Schnidar, H., Eichberger, T., Neill, G. W., Philpott, M. P., i sur. (2004). Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer research*. 64(21): 7724–7731.
- Regl, G., Neill, G. W., Eichberger, T., Kasper, M., Ikram, M. S., Koller, J., i sur. (2002). Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene*. 21(36): 5529–5539.
- Ruppert, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bigner, S. H., Kao, F. T., Law, M. L., i sur. (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Molecular and cellular biology*. 8(8): 3104–3113.
- Ruppert, J. M., Vogelstein, B., Arheden, K., Kinzler, K. W. (1990). GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Molecular and cellular biology*. 10(10): 5408–5415.

- Sabol, M., Trnski, D., Musani, V., Ozretić, P., Levanat, S. (2018). Role of GLI Transcription Factors in Pathogenesis and Their Potential as New Therapeutic Targets. *International journal of molecular sciences*. 19(9): 2562.
- Salamini-Montemurri, M., Lamas-Maceiras, M., Barreiro-Alonso, A., Vizoso-Vázquez, Á., Rodríguez-Belmonte, E., Quindós-Varela, M., Cerdán, M. E. (2020). The Challenges and Opportunities of LncRNAs in Ovarian Cancer Research and Clinical Use. *Cancers*. 12(4): 1020.
- Sánchez, Y., Huarte, M. (2013). Long non-coding RNAs: challenges for diagnosis and therapies. *Nucleic acid therapeutics*. 23(1): 15-20.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development (Cambridge, England)*. 126(17): 3915–3924.
- Schmid, S., Bieber, M., Zhang, F., Zhang, M., He, B., Jablons, D., Teng, N. N. (2011). Wnt and hedgehog gene pathway expression in serous ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 21(6): 975–980.
- Schober, P., Boer, C., Schwarte, L. A. (2018). Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia and analgesia*. 126(5): 1763–1768.
- Scully, R. E. (1995). Pathology of ovarian cancer precursors. *Journal of cellular biochemistry*. Supplement. 23: 208–218.
- Sen, R., Ghosal, S., Das, S., Balti, S., Chakrabarti, J. (2014). Competing endogenous RNA: the key to posttranscriptional regulation. *TheScientificWorldJournal*. 2014: 1-6.
- Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R. D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P., Korsmeyer, S. J. (1988). Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *The EMBO journal*. 7(1): 123–131.
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5(4): 1-21.
- Shibata, Y., Hidaka, S., Tagawa, Y., Nagayasu, T. (2004). Bcl-2 protein expression correlates with better prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 24(3b): 1925–1928.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 63(1): 11–30.

- Skalsky, R. L., Corcoran, D. L., Gottwein, E., Frank, C. L., Kang, D., Hafner, M., i sur. (2012). The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS pathogens*. 8(1): 1-19.
- Solano-Gálvez, S. G., Abadi-Chiriti, J., Gutiérrez-Velez, L., Rodríguez-Puente, E., Konstat-Korzenny, E., Álvarez-Hernández, D. A., i sur. (2018). Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease. *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*. 6(3): 54.
- Stark, D. R. (2002). Hedgehog signalling: pulling apart patched and smoothed. *Current biology : CB*. 12(12): 437–439.
- Sun, B., Liu, C., Li, H., Zhang, L., Luo, G., Liang, S., Lü, M. (2020). Research progress on the interactions between long non-coding RNAs and microRNAs in human cancer. *Oncology letters*. 19(1): 595–605.
- Sun, Y., Wang, Y., Fan, C., Gao, P., Wang, X., Wei, G., Wei, J. (2014). Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Molecular cancer*. 13: 137.
- Sun, Z., Gao, S., Xuan, L., Liu, X. (2020). Long non-coding RNA FEZF1-AS1 induced progression of ovarian cancer via regulating miR-130a-5p/SOX4 axis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 24(7): 4275–4285.
- Šamija, M., Vrdoljak, E., Krajina, Z. (2006). *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada.
- Šekerija, M., Bubanović, L., Novak, P., Veltruski, J., Glibo, M., Stavinoha, M., Sarajlić, G. (2020). *Incidencija raka u Hrvatskoj 2017*. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske.
- Tojo, M., Kiyosawa, H., Iwatsuki, K., Nakamura, K., Kaneko, F. (2003). Expression of the GLI2 oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma. *The British journal of dermatology*. 148(5): 892–897.
- Tsujimoto, Y. (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene*. 4(11): 1331–1336.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science (New York, N.Y.)*. 228(4706): 1440–1443.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science (New York, N.Y.)*. 226(4678): 1097–1099.
- Vitiello, M., Tuccoli, A., Poliseno, L. (2015). Long non-coding RNAs in cancer: implications for personalized therapy. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 38(1): 17–28.

- Vogt, A., Chuang, P.T., Hebert, J., Hwang, J., Lu, Y., Kopelovich, L., i sur. (2004). Immunoprevention of basal cell carcinomas with recombinant hedgehog-interacting protein. *The Journal of experimental medicine*. 199(6): 753–761.
- Wambecke, A., Ahmad, M., Lambert, B., Joly, F., Poulain, L., Denoyelle, C., Meryet-Figuere, M. (2020). The influence of long non-coding RNAs on the response to chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 156(3): 726–733.
- Wang, J., Xu, W., He, Y., Xia, Q., Liu, S. (2018). LncRNA MEG3 impacts proliferation, invasion, and migration of ovarian cancer cells through regulating PTEN. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*. 67(11-12): 927–936.
- Warren, C., Wong-Brown, M. W., Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell death & disease*. 10(3): 177.
- Yang, L., He, J., Huang, S., Zhang, X., Bian, Y., He, N., i sur. (2009). Activation of hedgehog signaling is not a frequent event in ovarian cancers. *Molecular cancer*. 8: 112.
- Ye, W., Ni, Z., Yicheng, S., Pan, H., Huang, Y., Xiong, Y., Liu, T. (2019). Anisomycin inhibits angiogenesis in ovarian cancer by attenuating the molecular sponge effect of the lncRNA-Meg3/miR-421/PDGFRα axis. *International journal of oncology*. 55(6): 1296–1312.
- Yin, X., Oltvai, Z., Korsmeyer, S. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*. 369(6478): 321–323.
- Yu, H., Xu, Y., Zhang, D., Liu, G. (2018). Long noncoding RNA LUCAT1 promotes malignancy of ovarian cancer through regulation of miR-612/HOXA13 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 503(3): 2095–2100.
- Yuan, J., Lan, H., Jiang, X., Zeng, D., Xiao, S. (2020). Bcl-2 family: Novel insight into individualized therapy for ovarian cancer (Review). *International journal of molecular medicine*. 46(4): 1255–1265.
- Zaman, M. S., Maher, D. M., Khan, S., Jaggi, M., Chauhan, S. C. (2012). Current status and implications of microRNAs in ovarian cancer diagnosis and therapy. *Journal of ovarian research*. 5(1): 44.
- Zaphiropoulos, P.G., Undén, A.B., Rahnama, F., Hollingsworth, R.E., Toftgård, R. (1999). PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer research*. 59(4): 787–792.

- Zhang, S., Dolgalev, I., Zhang, T., Ran, H., Levine, D.A., Neel, B.G. (2019). Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma. *Nature communications*. 10(1): 5367.
- Zheng, G. X., Do, B. T., Webster, D. E., Khavari, P. A., Chang, H. Y. (2014). Dicer-microRNA-Myc circuit promotes transcription of hundreds of long noncoding RNAs. *Nature structural & molecular biology*. 21(7): 585–590.
- Zhu, D., Huang, X., Liang, F., Zhao, L. (2020). LncRNA miR503HG interacts with miR-31-5p through multiple ways to regulate cancer cell invasion and migration in ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 13(1): 3.

8. ŽIVOTOPIS

Lara Božičević rođena je 19.10.1994. godine u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu „Vrbani“ do 2009. godine nakon čega je upisala 1. gimnaziju. Tijekom srednje škole zavoljela je biologiju i kemiju, ponajviše zbog svojih dviju profesorica iz tih predmeta pa je logičan slijed bio da nastavi obrazovanje u tom području. 2013. godine upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer biologija i kemija. Tijekom fakultetskih dana najvažnije priznanje dobiva osvajanjem Rektorove nagrade za rad koji izrađuje s kolegom Markom Pavlovićem i izv. prof. dr. sc. Damjanom Franjevićem na temu „Flickr kao znanstvena baza: Upotreba mrežnog servisa za pohranu slika u istraživanju biogeografije i taksonomije trnovratki (Orthoptera: Tetrigidae).“ Nakon brojnih uspona i padova, suza i smijeha, dolazi do kraja – diplomski rad izrađuje na Institutu „Ruđer Bošković“ pod mentorskom palicom dr. sc. Petra Ozretića i uz suvoditeljstvo izv. prof. dr. sc. Inge Urlić.