

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Gregor BAJC

**ŠTUDIJE IZRAŽANJA 17β -HIDROKSISTEROID-
DEHIDROGENAZE AKR1C3 PRI RAKU
ENDOMETRIJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Gregor BAJC

**ŠTUDIJE IZRAŽANJA 17 β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE
AKR1C3 PRI RAKU ENDOMETRIJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EXPRESSION STUDIES OF 17 β -HYDROXYSTEROID-
DEHYDROGENASE AKR1C3 IN ENDOMETRIAL CANCER**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

Mojima dragima mami in tatu

Diplomsko delo je zaključek programa študija biologije, molekularno-biološkega bloka na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo sem opravljal na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Tee Lanišnik Rižner.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja imenovala prof. dr. Teo Lanišnik Rižner.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina SEPČIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član (recenzent): prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član (mentor): prof. dr. Tea LANIŠNIK RIŽNER
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 22. 6. 2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Gregor BAJC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 577.2:616.6(043.2)=863
KG rak endometrija/17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza/AKR1C3/estradiol
KK
AV BAJC, Gregor
SA LANIŠNIK RIŽNER, Tea (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2007
IN ŠTUDIJE IZRAŽANJA 17 β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE AKR1C3
PRI RAKU ENDOMETRIJA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP
IJ sl
JI sl/en
AI Rak endometrija je od hormonov odvisna oblika raka. Povišana koncentracija estrogenov ob hkratni znižani koncentraciji progestagenov vpliva na pospešeno delitev celic endometrija. Večje število delitev celic endometrija poveča možnost za nastanek in kopiranje naključnih genetskih napak in razvoj malignega fenotipa. Encimi, ki so pomembni pri biosintezi in uravnavanju aktivnosti estrogenov in progestagenov so 17 β - in 20 α - hidroksisteroid-dehidrogenaze (HSD). Med 17 β -HSD uvrščamo tudi AKR1C3 iz proteinske naddružine aldo/keto reduktaz. V okviru diplomske naloge smo ugotavljali prisotnost AKR1C3 v celičnih linijah ter vzorcih raka endometrija in okolnega normalnega endometrija 16 bolnic. Iz vzorcev celic in vzorcev tkiva smo po predhodni izolaciji RNA izolirali proteine. Določili smo optimalne pogoje za zaznavanje AKR1C3 v celičnih linijah in vzorcih tkiva. Z metodami SDS PAGE elektroforezo, prenosom Western in detekcijo z ojačano kemiluminiscenco smo ugotavljali prisotnost proteina AKR1C3 in hišnega proteina β -aktina. Protein AKR1C3 smo zasledili v kontrolnih celičnih linijah raka jeter in raka endometrija, ne pa v celičnih linijah raka placente in raka dojke. Pri 9 vzorcih rakavega tkiva in 4 vzorcih normalnega tkiva smo ugotovili višje razmerje AKR1C3/ β -aktin. Pri 3 vzorcih proteina AKR1C3 nismo zaznali. Da bi proučili prisotnost AKR1C3 na celični ravni, smo z imunohistološkim barvanjem parafinskih rezin normalnega in rakavega endometrijaobarvali vzorce 5 bolnic. Pri 4 vzorcih raka endometrija in pri 1 vzorcu normalnega tkiva smo zasledili AKR1C3 v citoplazmi žleznih celic. Čeprav naši rezultati nakazujejo vpletenost AKR1C3 v nastanek raka endometrija, bo potrebno hipotezo v prihodnje preveriti na večjem številu vzorcev. Rezultati diplomskega dela bodo prispevali k boljšemu razumevanju in opredelitevi pomena AKR1C3 pri nastanku raka endometrija.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.2:616.6(043.2)=863
CX endometrial cancer/17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/AKR1C3/estradiol
CC
AU BAJC, Gregor
AA LANIŠNIK RIŽNER, Tea (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2007
TI EXPRESSION STUDIES OF 17 β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE
AKR1C3 IN ENDOMETRIAL CANCER
DT Graduation Thesis (University studies)
NO
LA Sl
AL sl/en
AB Endometrial carcinoma is a hormone dependent form of cancer. Increased estrogen concentration, along with decreased progestagen concentration, leads to accelerated cell proliferation which results in a higher possibility of occurrence and accumulation of random genetic errors, and consequently the development of a malignant phenotype. 17 β - and 20 α - hydroxysteroid dehydrogenases (HSD) are a group of enzymes involved in the biosynthesis and regulation of estrogen and progestagen action. AKR1C3 is a 17 β -HSD that belongs to the aldo-keto reductase protein superfamily. In our study, we examined the expression of AKR1C3 and a housekeeping protein β -actin at the protein level in cell lines and samples of cancerous endometrium. We isolated proteins from different cell lines, and from samples of 16 endometrial cancer and adjacent normal endometrium. We determined optimal conditions for AKR1C3 detection and investigated the expression of AKR1C3 protein by SDS PAGE electrophoresis and Western blot analysis using enhanced chemiluminescence detection. AKR1C3 protein was detected in control malignant endometrioid and hepatic cell lines, but not in cell lines originating from placental and breast cancer. In 9 endometrial cancer samples and in 4 samples of normal endometrium we found a higher AKR1C3/ β -actin ratio than in the adjacent sample of each patient. AKR1C3 was not detected in 3 samples. Localisation of AKR1C3 was studied by immunohistological staining of paraffin-embedded slices of normal and malignant endometrium of 5 patients. AKR1C3 was detected in the cytoplasm of endometrial gland cells in 4 malignant tissue samples, and in 1 sample of normal tissue. These results indicate the possible involvement of AKR1C3 in development of endometrial cancer, however this hypothesis should still be tested in a larger number of samples. Our results will contribute to a better understanding and evaluation of the role of AKR1C3 in the development of endometrial cancer.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key Words Documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VIII
Kazalo slik.....	IX
Okrajšave in simboli.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OD HORMONOV ODDISNE OBLIKE RAKA.....	3
2.1.1 Rak endometrija	3
2.1.2 Vloga hormonov pri raku endometrija in potek kancerogeneze	4
2.1.2.1 Razvoj raka endometrija preko hiperplazije	5
2.1.2.2 Razvoj raka endometrija preko metaplasije	7
2.1.2.3 Nastanek raka endometrija <i>de novo</i>	7
2.1.2.4 Dejavniki tveganja in zaščite pri raku endometrija	7
2.2 STEROIDNI HORMONI.....	8
2.2.1 Spolni hormoni.....	9
2.2.2 Receptorji za spolne hormone	11
2.3 HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE	11
2.3.1 Naddružina aldo-keto reduktaz (AKR)	12
2.3.2 Poddružina AKR1C	13
2.3.2.1 AKR1C3	14
2.3.2.1.1 Delovanje in substratna specifičnost	15
2.3.2.1.2 Uravnavanje delovanja steroidnih hormonov na pred-receptorski ravni	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIAL	18
3.1.1 Kemikalije	18
3.1.2 Protitelesa in standardi	19
3.1.3 Laboratorijska oprema	19

3.2 METODE	20
3.2.1 Izolacija proteinov	20
3.2.2 Izolacija DNA	22
3.2.3 Določevanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo	23
3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS PAGE) ...	24
3.2.5 Prenos proteinov na membrano (prenos western)	25
3.2.6 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL)	27
3.2.7 Odstranjevanje protiteles in ponovna detekcija proteinov na membrani	28
3.2.8 Barvanje gela z barvilkom Coomassie Blue	29
3.2.9 Imunohistokemija	29
3.2.10 Računalniška obdelava podatkov	32
3.2.11 Statistična analiza	32
4 REZULTATI.....	33
4.1 IZOLACIJA PROTEINOV.....	33
4.2 IZBIRA USTREZNIH POGOJEV ZA ZAZNAVANJE PROTEINOV AKR1C3 IN B-AKTINA TER PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE	34
4.2.1 Preverjanje specifičnosti primarnih protiteles proti AKR1C3 in zaznavanja AKR1C3 in β -aktina pri različnih koncentracijah sekundarnih protiteles	34
4.2.2 Primerjava vpliva časa izpostavitve filma na membrani.....	34
4.2.3 Priprava umeritvene krivulje za oceno mase proteina AKR1C3 v vzorcih.....	36
4.3 ZAZNAVANJE PROTEINA AKR1C3 IN B-AKTINA V CELIČNIH LINIJAH	37
4.4 ZAZNAVANJE PROTEINA AKR1C3 V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA.....	38
4.4.1 Statistična obdelava rezultatov razmerja AKR1C3/ β -aktin.....	44
4.5 OCENA MASE PROTEINA AKR1C3 V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA	45
4.5.1 Ocena mase proteina AKR1C3 v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija	45
4.5.2 Ocena mase proteina AKR1C3 v 11 vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija z upoštevanjem referenčne vrednosti	46
4.6 IMUNOHISTOKEMIJA	48
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	51
5.1 RAZPRAVA	51
5.1.1 Izolacija proteinov	51
5.1.2 Izbira ustreznih pogojev za zaznavanje AKR1C3 in β -aktina	52
5.1.3 Zaznavanje proteina AKR1C3 v celičnih linijah	53
5.1.4 Zaznavanje proteina AKR1C3 v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija	53
5.1.5 Ocena mase proteina AKR1C3 v vzorcih raka endometrija in okolnega normalnega tkiva	54
5.1.6 Zaznavanje proteina AKR1C3 na ravni celic	55
5.2 SKLEPI.....	56

6	POVZETEK	57
7	VIRI	59

ZAHVALE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Primerjava glavnih genetskih sprememb med tipom I in tipom II raka endometrija.....	7
Preglednica 2: Klasifikacija vzorcev raka endometrija.....	21
Preglednica 3: Koncentracija in masa izoliranih proteinov v vzorcih rakavega in okolnega normalnega tkiva.....	33
Preglednica 4: Vrednosti za celokupno število točk in mase proteina AKR1C3 v normalnem (N) in tumorskem (T) tkivu vzorcev, izračunana iz vrednosti podatkov celokupnega števila točk vzorcev normiranih na 100 μ g.....	45
Preglednica 5: Vrednosti za celokupno število točk vzorcev, vrednosti za celokupno število točk za 0,1 μ g rekombinantnega AKR1C3 in ocena mase proteina AKR1C3 v normalnem (N) in tumorskem (T) tkivu vzorcev.....	46

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Tri poti kancerogeneze in genske spremembe značilne za posamezno pot.....	5
Slika 2: Steroidni skelet z oštevilčenimi ogljikovimi atomi in oznakami obročev.....	9
Slika 3: Strukturne formule glavnih predstavnikov androgenov, estrogenov in progestagenov.....	9
Slika 4: Struktura 17 β -HSD tip 5 (AKR1C3). a) Struktura (α/β) ₈ sodčka. b) Zanke A, B in C.....	13
Slika 5: Reakcije, ki jih katalizira AKR1C3.....	16
Slika 6: Shema naprave za prenos Western (Western Blot).....	26
Slika 7: Potek katalizirane reakcije med vodikovim peroksidom in luminolom.....	27
Slika 8: Shematski prikaz poteka odstranjevanja protiteles.....	28
Slika 9: a) Shema vezave primarnih protiteles (mišja protitelesa proti AKR1C3), sekundarnih protiteles (zajčja protitelesa proti mišjim) in PAP kompleksa (peroksidaza anti peroksidaza kompleks). b) Potek barvne reakcije z DAB (3,3'-diaminobenzidin tetra hidroksikloridom) in vodikovim peroksidom.....	31
Slika 10: Specifičnost protiteles proti AKR1C3. a) Slika gela SDS-PAGE po barvanju s Coomassie Brilliant Blue. b) Slika filma, AKR1C1 0,1 µg, AKR1C3 0,1 µg po prenosu proteinov z gela (slika 10 a)) na membrano in ECL reakciji.....	34
Slika 11: Odvisnost vrednosti za celokupno število točk od časa izpostavitve filma na membrani.....	35
Slika 12: a) Slika gela SDS-PAGE rekombinantnega proteina AKR1C3 in standardov (prvi vzorec z leve) po barvanju s Coomassie Brilliant Blue. b) Slika filma po prenosu proteinov z gela (slika 12 a)) po ECL reakciji.....	36

Slika 13: Celokupno število točk v odvisnosti od količine rekombinantnega proteina AKR1C3 po 180 sekundah izpostavitve filma.....	36
Slika 14: Slika gela SDS-PAGE celičnih linij po barvanju s Coomassie Brilliant Blue.....	37
Slika 15: Slika filma zaznavanja AKR1C3 po prenosu proteinov celičnih linij z gela (slika 14) po ECL reakciji.....	37
Slika 16: Slika filma zaznavanja proteina β -aktina po prenosu proteinov celičnih linij z gela (slika 14) po ECL.....	37
Slika 17: Zaznavanje AKR1C3 in β -aktina v 16 vzorcih tkiva tumorja endometrija (T) in okolnega normalnega tkiva (N).....	42
Slika 18: Razmerje AKR1C3/ β -aktin za 16 vzorcev (normalno tkivo, tkivo tumorja).....	42
Slika 19: Povprečne vrednosti razmerja AKR1C3/ β -aktin v vzorcih normalnega in rakavega tkiva, s prikazano standardno napako.....	43
Slika 20: Odstotek proteina AKR1C3 v normalnem in tumorskem tkivu vzorcev, izračunana iz vrednosti podatkov celokupnega števila točk vzorcev.....	44
Slika 21: Odstotek proteina AKR1C3 v normalnem in tumorskem tkivu vzorcev, ob upoštevanju referenčne vrednosti za 0,1 μ g rekombinantnega proteina AKR1C3.....	46
Slika 22: Histološki preparat, vzorec 10, obarvan z imunohistokemijsko metodo.	47
Slika 23: Histološki preparat, vzorec 11, obarvan z imunohistokemijsko metodo.....	48
Slika 24: Histološki preparat, vzorec 13, obarvan z imunohistokemijsko metodo.....	48
Slika 25: Histološki preparat, vzorec 24, obarvan z imunohistokemijsko metodo.....	48
Slika 26: Histološki preparat, vzorec 26, obarvan z imunohistokemijsko metodo.....	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

17 β -HSD	17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza
20 α -HSD	20 α -hidroksisteroid-dehidrogenaza
20 α -OHP	20 α -hidroksiprogesteron
AKR	aldo-keto reduktaza/e
AKR1C3	človeška 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza
APS	amonijev persulfat
BSA	goveji serumski albumin
CoA	koencim A
DAB	3, 3', 3`diaminobenzidin
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E	estrон
ECL	ojačana kemiluminiscenca
EGF-R	epidermijski rastni faktor (epidermal growth factor)
EoL	estradiol
ER	estrogenski receptor
Et-OH	etanol
FSH	folikel stimulirajoči hormon
G1	visoka stopnja histološke diferenciacije
G2	srednja stopnja histološke diferenciacije
G3	nizka stopnja histološke diferenciacije
GTBP	mismatch DNA popravljalni gen
Hep G-2	celična linija raka jeter (hepatocellular carcinoma)
Her-2/neu	onkogen
HRP	hrenova peroksidaza
HSD	hidroksisteroid-dehidrogenaza/e
JEG-3	celična linija raka horionskih resic (choriocarcinoma)
konc.	koncentracija
K-ras	onkogen
LH	luteinizirajoči hormon

λ	valovna dolžina
μ	mikro
MCF-7	celična linija raka dojke (mammary gland carcinoma)
Met-OH	metanol
MLH1	mismatch DNA popravljalni gen
MSH2	mismatch DNA popravljalni gen
Myb	onkogen
NAD ⁺	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
P	progesteron
PAP	peroksidaza anti peroksidaza kompleks
PBS	fosfatni pufer (phosphate-buffered saline)
pH	negativni logaritem koncentracije ionov
PPAR γ	peroksisom proliferator aktivirajoči receptor tip γ
PR	progesteronski receptor
PTEN	tumor-supresorski gen
PVDF	polivinilidin florid
p16	tumor-supresorski gen
p51	tumor-supresorski gen
SDR	kratko-verižne dehidrogenaze/reduktaze (short chain dehydrogenase/reductase)
SDS	natrijev dodecil sulfat
T	testosteron
TCA	tri klor ocetna kislina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TERT	telomeraza, celična reverzna transkriptaza
Tris	trishidroksietilaminometan

1 UVOD

Rak endometrija je najbolj pogosta oblika raka ženskih reproduktivnih organov. Ta oblika raka je odvisna od ravnoesja hormonov v telesu, saj so v njen razvoj vpleteni tako estrogeni kot tudi progestageni. Med menstrualnim ciklusom se izmenjuje delovanje estrogenov in progestagenov. Med proliferacijsko fazo so bolj dejavni estrogeni, ki vzpodbujujo deljenje celic žleznega epitelija. V sekrecijski fazi pa je močnejše delovanje progestagenov, ki preusmerjajo celice endometrija v diferenciacijo in s tem nasprotujejo mitogenemu delovanju estrogenov. Ob povečanju koncentracije endogenih ali eksogenih estrogenov in zmanjšanju koncentracije progestagenov prihaja do pospešenega deljenja celic žleznega epitelija in s tem do večje možnosti za pojav in kopičenje naključnih genetskih napak in pojav malignega fenotipa.

Delovanje estrogenov in progestagenov je uravnavano tako na predreceptorski kot tudi na receptorski ravni. Na predreceptorski ravni ga uravnavajo encimi, hidroksisteroid-dehidrogenaze, ki biološko neaktivni oblici omenjenih hormonov (20α -hidroksiprogesteron, estron) pretvorijo v biološko aktivni oblici (progesteron, estradiol) in obratno. Encimi, ki katalizirajo pretvorbo neaktivne oblike estrogenov (estrona) v aktivno obliko (estradiol) in s tem premikajo ravnotežje dogajanja v endometriju v smer proliferacije celic, bi bili lahko povezani z nastankom raka endometrija. Ti encimi so 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD). Uvrščamo jih v dve proteinski naddružini: kratko-verižne dehidrogenaze/reduktaze (SDR) in aldo-keto reduktaze (AKR).

Med AKR spada 17 β -HSD tip 5 ali AKR1C3. Ta izoblika 17 β -HSD deluje v celici kot reduktaza in katalizira aktivacijo estrona v estradiol. Poleg tega pretvarja progesteron v 20α -hidroksiprogesteron. Izoblike 17 β -HSD, ki sodelujejo pri aktivaciji estrogenov, so v rakavem endometriju verjetno prekomerno izražene in so tako zaradi svojega protostogenskega delovanja vpletene v razvoj te bolezni. Zato predstavljajo potencialno tarčo za razvoj novih zdravil.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil proučiti izražanje proteina 17 β -HSD AKR1C3 v rakavem tkivu endometrija v primerjavi z normalnim endometrijem in v celični liniji raka endometrija Ishikawa.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Postavili smo hipotezo, da se 17 β -HSD tip 5 (AKR1C3) različno izraža v rakavem endometriju v primerjavi z normalnim tkivom. Te razlike v izražanju lahko vodijo do prekomerne koncentracije estradiola v endometriju in s tem do razvoja te hormonsko odvisne oblike raka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OD HORMONOV ODVISNE OBLIKE RAKA

Nekatere oblike raka lahko na podlagi epidemioloških značilnosti in laboratorijskih analiz združimo v skupino od hormonov odvisnih oblik raka. V to skupino prištevamo rak dojke, prostate, endometrija, rak na modih, jajčnikih, rak ščitnice in osteosarkom (Henderson in sod., 2000).

Za razliko od drugih znanih vzročnih in prožilnih dejavnikov za nastanek rakavega obolenja, kot npr. določene kemikalije, virusi, sevanja, na razvoj naštetih oblik raka odločilno vplivajo hormoni. Vloga nekaterih hormonov v telesu je med drugimi tudi ta, da usmerjajo proliferacijo celic. S povečanjem števila celičnih delitev zaradi neravnovesja med hormoni, tako endogenimi kot tudi eksogenimi, se poveča število naključnih genetskih napak in se lahko razvije maligni fenotip (Henderson in sod., 2000).

2.1.1 Rak endometrija

Rak ali karcinom endometrija je primarni maligni epiteljski tumor, ki se pojavi v sluznici maternice. Od tu se lahko razširi tudi v miometrij in na okolne organe, npr. ovarij ali omentum (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004). V severni Evropi in severni Ameriki je rak endometrija najpogosteji rak reproduktivnih organov. V večini držav Evrope, tudi v Sloveniji, je rak endometrija v porastu (Bray in sod., 2005). V Sloveniji je rak endometrija po pogostosti na četrtem mestu za rakom dojke, kožnim rakom in rakom debelega črevesa. Pojavnost je najpogosteja pri ženskah po menopavzi. V letih 1999–2003 je bilo v Sloveniji odkritih 27,5 primerov na 100.000 ljudi, napovedi za leto 2006 so bile 29,4 primerov na 100.000 ljudi (Primic-Žakelj in sod., 2006). V Ameriki je bilo odkritih v letu 2005 27,4 primerov na 100.000 ljudi.

V grobem razlikujemo dva tipa raka endometrija. Večino tumorjev (70 – 80 %) uvrščamo v skupino rakov tipa I. Razvijejo se preko hiperplazij endometrija in pod vplivom estrogenov. Histološko je večina tumorjev tipa I endometroidnih adenokarcinomov z visoko (G1) in zmerno (G2) diferenciacijo. Zaradi nižje histološke stopnje (G1 ali G2) tudi redkejši mukozni karcinom endometrija uvrščamo v tip I. V 80 % primerov je karcinom omejen na maternico. Pojavnost je večja pri mlajših in težjih ženskah ter ženskah brez

otrok v pre- in peri- menopavzalnem obdobju. Tumor tipa I povezujemo z dobro prognozo (Inoue, 2001 in Shiozawa in Konishi, 2006).

10 – 20 % raka endometrija označujemo kot tip II. To je od estrogenov neodvisni tip, ki se razvije v atrofičnem endometriju. Pojavlja se v obliki seroznega, papilarnega in svetloceličnega adenokarcinoma. Bolj so ogrožene starejše ženske v post-menopavzalnem obdobju. Tumor je slabo diferenciran (G3) in agresiven. Pogosto se vrašča v miometrij in razširja v peritonealne metastaze. Zato ima ta tip slabšo napoved (Inoue, 2001 in Shiozawa in Konishi, 2006). Zadnje študije kažejo, da je tudi rak endometrija tipa II odvisen od estrogenov (Berstein in sod., 2003 in Berstein in sod., 2006).

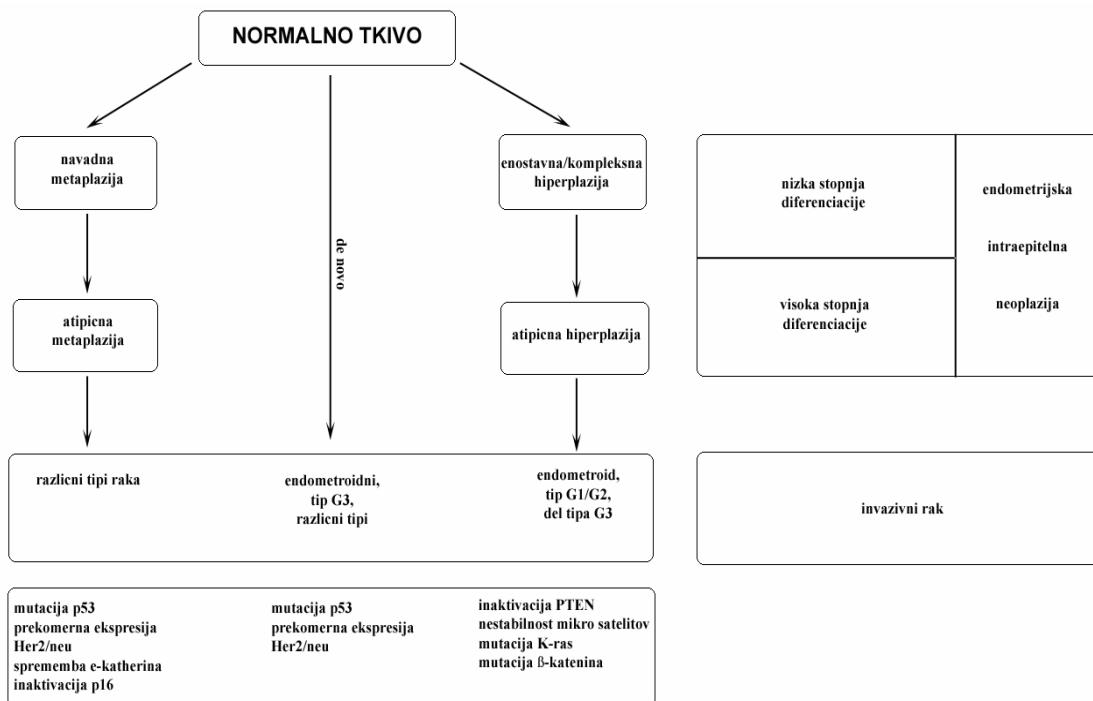
Z novimi raziskavami na molekularnem področju so dualistični model deljenja na dva tipa raka nekoliko razširili. Nekaterih rakov endometrija ni mogoče jasno opredeliti. Nahajajo se v sivem pasu med enim in drugim tipom, saj imajo klinične, morfološke, imunohistokemične in molekularne poteze tako tipa I, kot tudi tipa II raka endometrija (Liu, 2007).

2.1.2 Vloga hormonov pri raku endometrija in potek kancerogeneze

Ciklične spremembe koncentracije estrogenov in progestagenov med menstrualnim ciklom usmerjajo tkivo endometrija od proliferacije preko diferenciacije do degradacije. Estrogeni imajo vlogo spodbujevalcev proliferacije žlezognega epitelija endometrija. Progesteron pa nasprotuje delovanju estrogenov in preusmerja celice strome in žlezognega epitelija v diferenciacijo. V primeru, da se hormonsko ravnotežje poruši in se poveča koncentracija estrogenov v tkivu in s tem tudi njihovo delovanje, prihaja do večjega števila delitev endometrijskih celic in s tem do povečanja možnosti naključnih napak pri podvojevanju DNA. Tako stanje lahko vodi do hiperplazije endometrija in raka endometrija (Henderson in Feigelson, 2000).

Študije so pokazale značilno večje koncentracije estradiola v tumorskem tkivu kot pa v normalnem tkivu endometrija. To so pokazali tako pri vzorcih bolnic pred menopavzo kot tudi po menopavzi. Ker niso ugotovili signifikantnih razlik v koncentraciji estradiola med tipom I in tipom II raka endometrija, predvidevajo, da so mehanizmi odgovorni za nastanek raka povezani z uravnavanjem koncentracije estradiola (Berstein in sod., 2003).

Kancerogeneza je večstopenjski proces, ki vključuje začetno fazo, fazo napredovanja in fazo širjenja lezij od normalnega epitelija do benignega in malignega tumorja. Pri vsakem koraku se zgodijo značilne biokemijske, morfološke in citološke spremembe. Glede na molekularno-biološki profil so bile do sedaj opisane tri možne poti nastanka raka endometrija – razvoj rakavega tkiva preko hiperplazije, metaplazije ali *de novo* (*slika 1*) (Inoue, 2001).



Slika 1: Tri poti kancerogeneze in genske spremembe značilne za posamezno pot. (Prirejeno po Inoue, 2001: 345).

2.1.2.1 Razvoj raka endometrija preko hiperplazije

Za prvo fazo poti nastanka preko hiperplazije so značilne biološke in genske nepravilnosti, ki vplivajo na prenos signala na ravni receptorjev in molekulskih stikal ter na adhezijo celic. Značilne biološke spremembe so aktivacija rastnih faktorjev in delecija kromosoma 3p. Genske spremembe, v glavnem mutacije in delecije alelov, vključujejo aktivacijo onkogenov (npr. K-ras, Her-2/neu, Myb), utišanje tumor-supresorskih genov (p53, p16, PTEN) ter t.i. »mismatch« DNA popravljalnih genov (npr. MSH2, MLH1, PMS1, GTBP). V prvi fazi razvoja raka igra pomembno vlogo hipermetilacija slednjih, saj utišanje njihovega pravilnega delovanja pomeni kopiranje mutacij tudi drugih genov, ki so povezani z nastankom raka. Nepravilnosti v delovanju »mismatch« DNA popravljalnih

genov se izražajo kot nestabilnost mikrosatelitov v DNA (Inoue, 2001, Liu, 2007 in Shiozawa in Konishi, 2006).

Tumor-supresorski geni nosijo zapis za proteine, ki preprečujejo proliferacijo celic. Gena p53 ali p16 v normalnih pogojih preko transaktivacije regulatornih proteinov nadzorujeta potek in nadaljevanje celičnega cikla. Raziskane so bile tudi mutacije gena PTEN, ki kodira protein s tirozin-kinazno aktivnostjo. S svojim delovanjem vzdržuje celico v G1/S fazi celičnega cikla (Liu, 2007). Poleg tega ta protein negativno uravnava integrine, ki sodelujejo pri migraciji in invaziji celic ter nadzoruje organizacijo citoskeleta, rast in apoptozo celic (Liu, 2007).

Aktivacija onkogena Her-2/neu se odraža v sintezi receptorja, ki je po strukturi podoben receptorju za epidermijski rastni faktor (EGF-R). Posledica aktivacije Ras onkogena pa je sinteza proteina p21, ki posreduje signal za proliferacijo celic. Za ohranjanje stika med celicami in preko tega strukture tkiv sta odgovorna med drugimi tudi β -katenin in E-kadherin. Mutacije genov za ta proteina imajo za posledico izgubo pravilnega stika med celicami in so lahko ključne v razvoju celic z velikim potencialom za tvorbo metastaz.

V napredovanju karcinoma pridobijo celice nesmrtnost s pomočjo telomeraze, celične reverzne transkriptaze (TERT). Ta katalizira sintezo in podaljševanje telomerne DNA. Aktivnost telomeraze je višja med proliferativno fazo menstrualnega cikla. Estrogeni so vključeni v regulacijo TERT preko vezave na estrogenske receptorje, ki se vežejo na odzivno mesto na promotorju TERT za steroidne hormone. Celice dobijo tako maligni fenotip in nadaljujejo z rastjo. Daljše izpostavljanje progestagenom inhibira estrogensko aktivacijo TERT (Inoue, 2001).

Eden od možnih dejavnikov za napredovanje so tudi spremembe pri regulaciji naravne smrti celice, ali apoptoze. V takem primeru celica ne umre in nadaljuje z rastjo kot maligna celica. Apoptizo lahko preprečijo nekateri mutirani onkogenski proteini, npr. p53 in bcl-2 (Inoue, 2001). Sledi progresija celic raka in invazija, ki se pojavi ob razgradnji bazalne lamine in komponent ekstracelularnega matriksa. Za končni pojav metastaz pa je potrebna angiogeneza, ki jo sprožijo faktorji angiogeneze. Od te faze je odvisna rast in razpredanje tumorja (Inoue, 2001).

2.1.2.2 Razvoj raka endometrija preko metaplazije

Pri drugem načinu gre za slabo diferenciran (G3) od estrogenov neodvisen tip raka (Inoue, 2001). Pri tem tipu raka estrogenski (ER) in progesteronski (PR) receptorji običajno niso ali pa so zelo šibko izraženi (Shiozawa in Konishi, 2006). Rak se razvije iz atrofičnega endometrija in preko atipičnih metaplazij prehaja v invazivno obliko (spremembe tudi v mišičnem tkivu) (Inoue, 2001). Na molekularni ravni je najpogostejša sprememb p53 gena. Vzrok za to sprememb še ni jasen. Pri tem načinu se kaže tudi inaktivacija gena p16, sprememb E-kadherina in prekomerna ekspresija Her2/neu onkogena. Ostalih pri tipu I opisanih sprememb je pri tem tipu raka manj ali jih niso zasledili (Liu, 2007). Nove raziskave nakazujejo, da je tudi ta tip raka endometrija odvisen od estrogenov (Berstein in sod., 2003 in Berstein in sod., 2006).

Preglednica 1: Primerjava glavnih genetskih sprememb med tipom I in tipom II raka endometrija. (Povzeto po Liu, 2007.)

GENETSKE SPREMEMBE	RAK TIPA I (%)	RAK TIPA II (%)
inaktivacija PTEN	50-80	10
mikrosatelitska nestabilnost	20-45	0-5
K-ras mutacija	10-30	0-5
β -katelin mutacija	20	0-5
mutacija p53	10-20	90
povečana ekspresija Her2/neu	10-30	45-80
inaktivacija p16	10	40
spremembe E-kadherina	10-20	80-90

2.1.2.3 Nastanek raka endometrija *de novo*

Tretji način nastanka raka endometrija, *de novo*, se pojavlja pri starejših ženskah, kjer normalne celice neposredno preidejo v maligni fenotip (Inoue, 2001). Predvideva se, da je tudi pri tem načinu v zgodnji fazni odgovorna mutacija gena p53 in prekomerna ekspresija Her2/neu onkogena (Liu, 2007).

2.1.2.4 Dejavniki tveganja in zaščite pri raku endometrija

Glavni dejavnik tveganja za nastanek raka endometrija je prekomerna izpostavljenost delovanju endogenih in eksogenih estrogenov brez nasprotnega delovanja progestagenov.

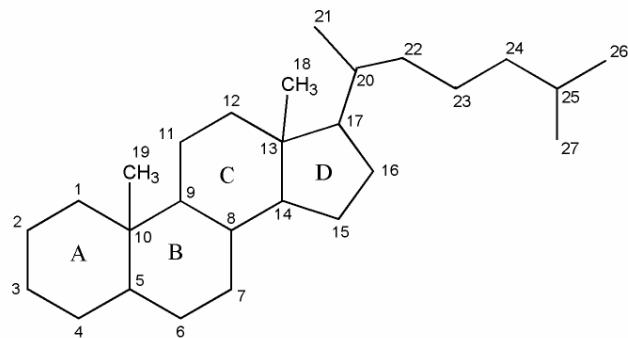
V obdobju pred menopavzo so takšne razmere naravno prisotne v prvi fazi menstrualnega cikla, ko je raven estrogena visoka, raven progesterona pa nizka. Zato je tveganje večje pri ženskah z zgodnjo prvo menstruacijo in/ali pozno menopavzo, pri ženskah s krajšimi menstrualnimi ciklusi in ženskah brez otrok (neplodnost, nerodnost), saj je pri njih celokupno število ciklov med menarho in menopavzo večje. S številom nosečnosti se zmanjšuje tveganje za pojav raka endometrija (Henderson in Feigelson., 2000).

Med dejavnike tveganja prištevamo tudi debelost. Pred menopavzo je tveganje povezano z večjim številom anovulatornih ciklusov in nezadostnim delovanjem progesterona. Pri ženskah po menopavzi pa se v maščobnem tkivu androstendion pretvarja v estron (Henderson in Feigelson., 2000).

Eksogeni dejavniki tveganja so predvsem dolgotrajno jemanje oralnih kontracepcijskih sredstev z visoko ravnijo estrogena, ki so bila na tržišču do leta 1976, ter nadomestna estrogenska terapija brez dodatka progesterona. Raziskave so pokazale, da kombinirana kontracepcija na podlagi estrogenov in progesterona, kajenje ter fizična aktivnost, znižujejo tveganje za nastanek karcinoma endometrija (Henderson in Feigelson., 2000).

2.2 STEROIDNI HORMONI

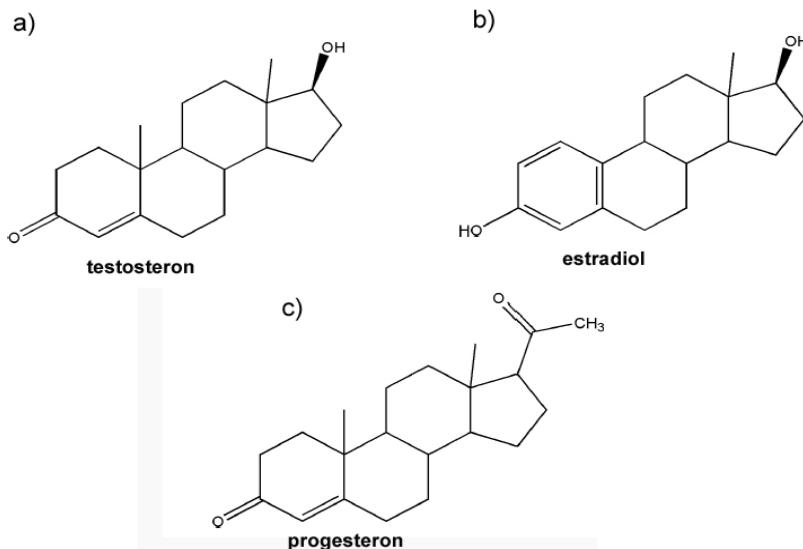
Steroidi so velika skupina organskih spojin med katere uvrščamo rastlinske in živalske sterole, steroidne alkaloide, steroidne hormone, žolčne kisline, provitamin D itd. Imajo značilno steroidno strukturo iz treh šestčlenskih (A, B, C obroči) in enega petčlenskega obroča (D obroč). Steroidi nastajajo iz acetil koencima A (acetil CoA). Ogljikovi atomi v steroidnem skeletu so oštrevljeni od 1 do 27 (*slika 2*). Šestčlenski obroč iz ogljikovih atomov zavzema konformacijo stola, ki je za to strukturo najugodnejša. Vezava obročev A in B je lahko *trans* (5α derivati) ali *cis* (5β derivati). Vodikovi atomi se lahko vežejo na ogljikov atom pod ravno obroča, takrat govorimo o α konfiguraciji, ali nad ravnino obroča, takrat govorimo o β konfiguraciji. Med steroidne hormone uvrščamo estrogene, progestagene, androgene, mineralokortikoide in glukokortikoide. Sintetizirajo se v številnih organih. So hidrofobni hormoni zato lahko prehajajo preko plazmatske membrane z difuzijo in se vežejo na znotraj celične receptorje.



Slika 2: Steroidni skelet z oštevilčenimi ogljikovimi atomi in oznakami obročev.

2.2.1 Spolni hormoni

Spolni hormoni so ojza skupina steroidnih hormonov in kot ostali steroidni hormoni nastanejo iz holesterola. Tvorijo se v moških in ženskih spolnih žlezah, skorji nadledvične žleze in posteljici. Ti hormoni so posredno ali neposredno povezani z reprodukcijo, preko vpliva na razvoj in vzdrževanje tkivnih struktur. Poznamo tri glavne skupine steroidnih spolnih hormonov: androgene, estrogene in progestagene (*slika 3*). Estrogeni in androgeni so pomembni za oba spola z vidika rasti, razvoja in morfološke diferenciacije, kot tudi za razvoj in regulacijo spolnega in reproduktivnega obnašanja in ciklov. Producija in izločanje spolnih hormonov uravnava folikel stimulirajoči hormon (FSH) in luteinizirajoči hormon (LH).



Slika 3: Strukturne formule glavnih predstavnikov androgenov, estrogenov in progestagenov. a) (T) androgeni spolni hormon, b) (EoI) estrogeni spolni hormon in c) (P) progestageni spolni hormon.

Estrogenov je več pri ženskah in so odgovorni za razvoj ženskih spolnih organov, sekundarnih spolnih znakov, potek menstrualnega cikla in nosečnosti. Glavna vloga estrogenov je uravnavanje rasti in funkcije maternice, vplivajo pa tudi na razvoj jajčnikov, dojk, vagine itd. Pospešujejo proliferacijo endometrija.

Androgeni prevladujejo pri moških in so odgovorni za ohranjanje sekundarnih moških znakov. Odgovorni so za razvoj primarnih moških spolnih znakov že v embriju. Prav tako pa so na splošno udeleženi pri rasti in sintezi proteinov, predvsem v mišicah in kosteh.

Progesteron je predstavnik progestagenov. Deluje v povezavi z estrogeni, vendar je njegovo delovanje v posameznih tkivih različno, v določenih tkivih deluje antagonistično, v drugih sinergistično z estrogenom. Glavno tarčno tkivo progesterona je endometrij, kjer vzpodbuja diferenciacijo celic endometrija, ter sekrecijo žlez, kar omogoča normalen potek menstrualnega ciklusa. Ob zanositvi progesteron vzdržuje nosečnost.

Spolni hormoni delujejo na tarčne celice z vezavo na jedrne in membranske receptorje. Biološka aktivnost je odvisna od zmožnosti interakcije s specifičnim vezavnim mestom na receptorju in je neposredno odvisna od afinitete vezave. Afiniteta vezave je odvisna od prisotnosti ali odsotnosti funkcionalnih skupin in pa tridimenzionalne zgradbe molekule liganda. Spolni hormoni nastopajo v aktivni in manj aktivni obliki. V aktivni obliki (estradiol (E₂), testosteron (T), progesteron (P)) se vežejo na receptor z višjo afiniteto kot v neaktivni obliki (estrон (E), androstendion (A), 20 α -hidroksiprogesteron (20 α OHP)). Aktivacija in inaktivacija spolnih hormonov je uravnavana že na predreceptorski ravni z od NAD(P)H odvisnimi hidroksisteroid-dehidrogenazami, pa tudi z aromatazo in sulfotransferazo. Ti encimi se izražajo tkivno in celično specifično. Intrakrino pretvarjajo aktivne oblike estrogenov in androgenov v neaktivne oblike in obratno. Pri človeku se velik del estrogenov in androgenov v starejšem obdobju sintetizira lokalno v perifernih tkivih (maščobno tkivo, koža, nadledvična žleza). Ključno vlogo pri biosintezi imajo prav hidroksisteroid-dehidrogenaze, ki v perifernih tkivih delujejo kot stikala, ki pretvorijo hormon v aktivno ali neaktivno obliko (Penning, 2003 in Labrie in sod., 2000).

2.2.2 Receptorji za spolne hormone

Estrogeni in progestageni delujejo na tarčne celice preko jedrnih receptorjev, ki so od ligandov (spolni hormoni) odvisni transkripciji faktorji in preko membranskih receptorjev, ki so sklopljeni s citosolnimi signalnimi potmi in omogočajo učinkovanje v nekaj sekundah (Flötotto in sod., 2001). V večini primerov delujejo estrogeni in progestageni preko znotrajceličnih receptorjev na ravni prepisovanja genov. Vezavi aktivnih oblik estrogenov in progestagenov na ustrezne receptorje sledi dimerizacija receptorja. Nastanejo homo ali heterodimeri, ki se fosforilirajo in vežejo na odzivno mesto za steroide na promotorju. S tem se prepišejo tarčni geni in sintetizirajo proteini. Estrogeni delujejo preko estrogenskih ER α in ER β receptorjev, progestageni pa preko progesteronskih receptorjev, PRa in PRb.

Zaradi različnega izražanja ER α in ER β v različnih tkivih, spreminjanja količine ER α /ER β med samim menstrualnim ciklom in spreminjanja koncentracije EoL in P, je vpliv estrogenov različen v določenem tkivu in v določenem času. Receptorja za progestagene PRa in PRb se lahko izražata v istih tarčnih tkivih, s tem da je njuno razmerje odvisno od trenutnega fiziološkega stanja. E lahko preko ER α inducira izražanje PR med menstrualnim ciklom. PRa nasprotuje vezavi PRb na ustrezen promotor. Vezava P na PRb v endometriju povzroči diferenciacijo tkiva, medtem ko sam receptor brez liganda lahko vpliva na proliferacijo tkiva endometrija (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004 in Ballare, 2006).

Tudi med različnimi tipi raka endometrija so ugotovili različno izražanje ER in PR receptorjev in s tem različen vpliv hormonov na razvoj raka (Shiozawa in Konishi, 2006 in Liu, 2007). Znižanje ravni PR bi v tem primeru lahko zmanjšalo zaščitno vlogo P.

2.3 HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE

Hidroksisteroid-dehidrogenaze (HSD) so encimi, ki se nahajajo v različnih tkivih in lokalno uravnavajo koncentracijo vseh skupin steroidnih hormonov v teh tkivih. S tem uravnavajo količino hormonov, ki se lahko vežejo na znotrajcelične receptorje. Prav tako pa v steroidogenih tkivih katalizirajo zadnji korak pri biosintezi androgenov, estrogenov in progestagenov. HSD delujejo na pred-receptorski ravni, saj z redukcijo ketosteroidov ali oksidacijo hidroksisteroidov določen spolni hormon spremenijo v aktivno ali manj aktivno obliko. Tako delujejo kot molekularna stikala. Zaradi tkivno specifičnega izražanja teh

encimov se različna tkiva različno odzovejo na spolne hormone. HSD so od NAD $^+$ (H)/NADP $^+$ (H) odvisne oksidoreduktaze. Katalizirajo stereo selektivne reakcije na specifičnih mestih steroidne molekule.

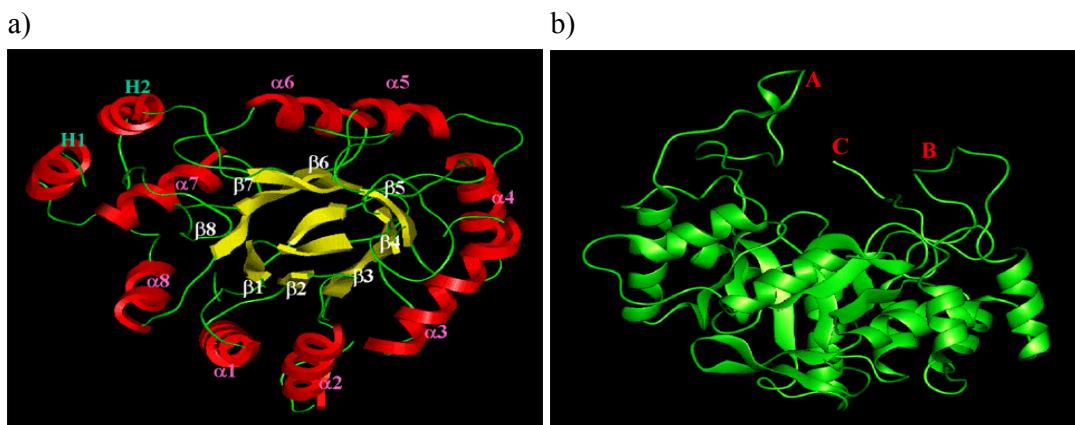
HSD uvrščamo v dve proteinski naddružini: v naddružino kratko-verižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR) in naddružino aldo-keto reduktaz (AKR). Med SDR uvrščamo 3 β -HSD/ketosteroid-izomeraze (3 β - HSD/KI), 11 β -HSD in različne izoblike 17 β -HSD, razen tipa 5. Med AKR pa uvrščamo 3 α -HSD, 20 α -HSD in 17 β -HSD tip 5 (AKR1C3). Nenormalno izražanje HSD v tkivih lahko pomeni lokalno neravnovesje med aktivnimi in neaktivnimi oblikami steroidnih hormonov, kar ima lahko za posledico nastanek hormonsko odvisnih oblik raka. Zato so HSD zanimive tarče za načrtovanje novih zdravil za zdravljenje nekaterih vrst raka (Peltoketo in sod., 1999 in Penning, 2003).

2.3.1 Naddružina aldo-keto reduktaz (AKR)

Aldo-keto reduktaze (AKR) so večinoma monomerni od NAD(P)(H) odvisni proteini z molsko maso okrog 37 kDa in zaporedjem približno 320 amino kislin. V to naddružino so dosedaj vključili 114 proteinov razvrščenih v 14 družin (AKR1-AKR14). V bioloških sistemih so široko razširjene, saj so jih našli pri vretenčarjih, nevretenčarjih, rastlinah, glivah, protozojih, eubakterijah in arhebakterijah (Jez in Penning, 2001). Izbor substratov encimov naddružine AKR je zelo velik. Tudi spekter njihovih fizioloških vlog je zelo obširen – katalizirajo redukcije aldehydov in ketonov, monosaharidov, ketosteroidov in prostaglandina. Med člani pa najdemo tudi katalizatorje oksidacije hidroksisteroidov in trans-dihidrodiolov policikličnih aromatskih ogljikovodikov (Hyndman in sod., 2003).

Dejstvo, da so aldo-keto reduktaze razširjene v vseh bioloških kraljestvih ter, da imajo vse izredno ohranjeno enotno osnovno zgadbo, z veliko verjetnostjo nakazuje, da so AKR stara naddružina s skupnim prednikom (Hyndman in sod., 2003)

Vsi proteini te naddružine imajo značilno strukturo (α/β ₈- ali TIM- sodčka, v katerem si osemkrat izmenično sledita α -vijačnica in β -ravnina. Jedro sodčka sestavljajo β -ravnine. Znotraj sodčka je katalitična tetrada sestavljena iz Asp 50, Tyr 55, Lys 84 in His 117. Strukturo dopolnjujejo tri variabilne zanke (A, B in C), ki določajo substratno specifičnost (*slika 4*) (Penning in sod. 2003).



Slika 4: Struktura 17 β -HSD tip 5 (AKR1C3). a) Struktura (α/β)₈ sodčka in b) zanke A, B in C (Povzeto po www.med.upenn.edu/akr/).

Pogoj za uvrstitev encima v družino je več kot 40 % identičnega zaporedja aminokislin, za uvrstitev v poddružino pa mora biti zadoščeno pogoju, da imata proteina več kot 60 % identičnega aminokislinskega zaporedja. Kadar je več kot 97 % aminokislinskega zaporedja identičnega, je 3'-neprepisani del enak, izhajata proteina z enakih lokacij v genomu in je encimska aktivnost enaka, govorimo o alelih. Nomenklatura naddružine temelji na korenju AKR, ki predstavlja aldo-keto reduktaze. Številka za korenom označuje družino (AKR1), črka, ki ji sledi opisuje poddružino (AKR1C) in številka na koncu označuje posamezen protein (AKR1C3) (Jez in Penning, 2001 in Hyndman in sod., 2003).

2.3.2 Poddružina AKR1C

V poddružino AKR1C uvrščamo 24 izoencimskih oblik. Tudi štiri človeške izoencimskie oblike HSD, AKR1C1 do AKR1C4, uvrščamo v to poddružino (Hyndman in sod. 2003, Penning in sod. 2003, Drury in sod., 2006). Izoencimi AKR1C1-AKR1C4 imajo skupnega vsaj 84 % aminokislinskega zaporedja (Penning in sod. 2000).

Specifična zastopanost teh encimov v določenih tkivih je povezana z njihovo središčno vlogo v metabolizmu in pri uravnavanju aktivnosti steroidnih hormonov. Nahajajo se v številnih tkivih. V jetrih so vse izooblike izražene v približno enakih količinah. Sicer pa je za jetra specifična izooblika AKR1C4, v drugih organih je zastopana v majhnih količinah. V pljučih so močno izražene vse izooblike razen AKR1C4. V prostati sta dominantni izoobliki AKR1C2 in AKR1C3. V testisih prevladuje AKR1C1, v dojkah pa AKR1C3.

V maternici sta bolj izraženi AKR1C2 in AKR1C3. V možganih so ti encimi manj izraženi, vendar prevladujeta AKR1C1 in AKR1C2 (Penning in sod. 2000).

HSD poddružine AKR1C imajo 3-, 17- in 20- ketosteroid redukcijsko in 3 α -, 3 β -, 17 β - in 20 α - hidroksisteroid oksidacijsko aktivnost. *In vivo* vse izooblike delujejo kot reduktaze. Specifika njihovega delovanja temelji na razlikah v zankah A, B in C, ki sodelujejo pri vezavi in stabilizaciji substrata (Couture in sod. 2003).

2.3.2.1 AKR1C3

AKR1C3 imenujemo tudi 3 α -HSD tip 2, 17 β -HSD tip 5, dihidrodiol-dehidrogenaza tip X in prostaglandin F sintaza ali prostaglandin 11-ketoreduktaza. Različna imena izhajajo iz poimenovanja encima po substratni specifičnosti v obdobju preden je bila nomenklatura poenotena na podlagi strukturnih značilnosti (Jez in sod. 2001).

Na podlagi imunohistokemijskih metod in detekcije mRNA AKR1C3 so ta encim lokalizirali v jetrih, nadledvični žlezi, prostatih, debelem in tankem črevesu, endometriju, v jajčnikih, testisih, v rakastih celicah prostate in dojke ter v celicah osteosarkoma (Lin in sod., 1997, Pelletier in sod. 1999, Labrie in sod. 2000, Pelletier in sod. 2001, Vihko in sod. 2004, Lin in sod. 2004, Lanišnik Rižner in sod. 2006).

Kristalna struktura AKR1C3 je bila določena v kompleksu z več ligandi (flufenaminsko kislino, indometacinom, testosteronom, androstendionom in prostaglandinom H₂). AKR1C3 ima značilno strukturo AKR naddružine. Ima obliko (α/β)₈-sodčka, ki ga na N-terminalnem delu zaključuje antiparalelna zanka. Jedro sodčka sestavlja β-ravnine, obdajajo pa ga α-vijačnice. Aminokislinska zaporedja, ki povezujejo vsako β-ravnino s sosednjim α-heliksom prispevajo k zgradbi aktivnega mesta proteina. Dve od teh zank sta izrazito podaljšani; zaporedje aminokislin 116 – 143 tvori zanko A, aminokisline 217 – 238 pa zanko B. Ob strani sodčka se ob α-vijačnicah 7 in 8 nahajata še dve dodatni vijačnici, H1 in H2. C-terminalni del je oblikovan v zanko, t.i. zanko C (**slika 4**) (Nahoum in sod., 2001, Hyndman in sod., 2003, Lovering in sod. 2004 in Komoto in sod., 2004).

2.3.2.1.1 Delovanje in substratna specifičnost

AKR1C3 ima 3 α -HSD, 17 β -HSD, 20 α -HSD in prostaglandin F sintazno aktivnost in katalizira metabolizem androgenov, estrogenov, progestagenov in prostaglandinov (*slika 5*). Zato ima AKR1C3 vlogo pri uravnavanju vezave ligandov na številne znotrajcelične receptorje, vključno z androgenskimi receptorji (AR), estrogenimi receptorji (ER), progesteronskimi receptorji (PR) in peroksisom proliferator aktivirajočimi receptorji tipa gama (PPAR γ).

Zaradi svoje 3 α -HSD aktivnosti katalizira redukcijo 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) v 3 α -androstandiol z manjo afiniteto vezave, ne katalizira pa obratne reakcije. Takšno aktivnost AKR1C3 so zasledili v prostati, centralnem živčnem sistemu in v dojki (Lin in sod., 1997). V prostati AKR1C3 uravnava zasedenost AR in tako vpliva na normalno oziroma nenormalno rast prostate.

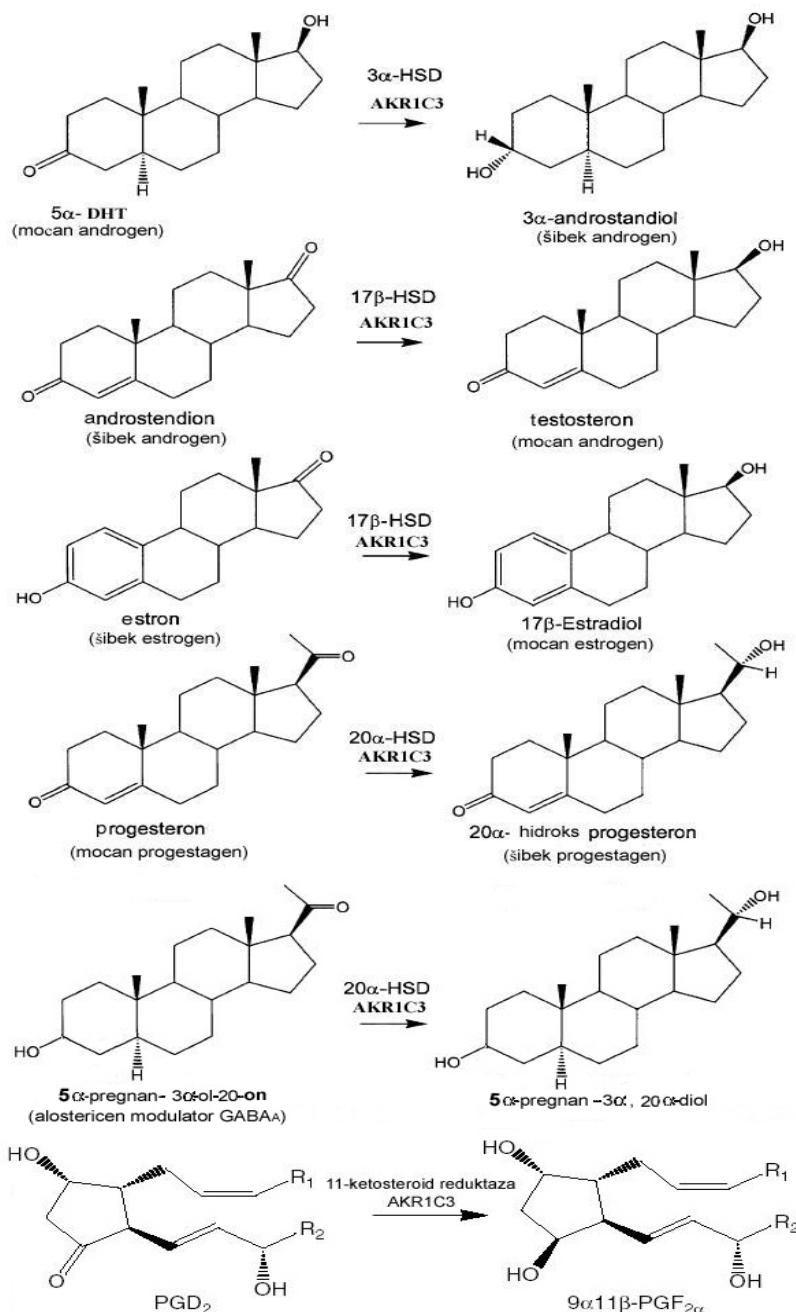
S 17 β -HSD aktivnostjo katalizira pretvorbo A v T. T se lahko naprej aromatizira v Eol. 5 α -DHT in T sta aktivna androgena v prostati in sta odgovorna za njen fiziološki in patološki razvoj (Labrie in sod., 2000). Zaradi 17 β -HSD aktivnosti AKR1C3 pretvarja tudi neaktivno obliko estrogena, E, v aktivno obliko Eol.

Kot 20 α -HSD vodi redukcijo aktivnega P v manj aktivno obliko 20 α OHP. AKR1C3 pretvarja tudi nevrosteroide, alosterični modulator GABA_A 5 α -pregnan-3 α -ol-20on (3 α 5 α THP) v 20 α OHP in 5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol. V centralnem živčnem sistemu tako uravnava koncentracijo alosteričnega modulatorja GABA_A in s tem zasedenost GABA_A receptorja, ki ima na ta način anksiolitični, antikonvulzivni in anestetični učinek.

AKR1C3 lahko pretvarja tudi PGD₂ v 9 α ,11 β -PGF₂. Tako onemogoči pretvorbo PGD₂ v naravni ligand za peroksisom proliferator aktivirajoči receptor tip gama (PPAR γ), kar vpliva na proliferacijo mieloidnih celic pri levkemiji in zavira celično diferenciacijo. (Desmond in sod., 2003).

V endometriju in dojki sta bili dokazani tako 17 β -HSD kot tudi 20 α -HSD aktivnost AKR1C3. Ker je posledica prvega načina delovanja večanje koncentracije aktivnega Eol, posledica drugega pa nižanje ravni aktivnega P, ki nasprotuje estrogenkemu proliferativnemu vplivu, AKR1C3 v dojki in endometriju najverjetneje odločilno prispeva k proestrogenkemu stanju in k večji možnosti za razvoj karcinoma (Penning in sod. 2003,

Ito in sod., 2006, Lanišnik Rižner in sod. 2006). Inhibicija AKR1C3 bi lahko preprečila lokalno biosintezo T v prostati in pojav proestrogenskega stanja v dojki in endometriju.



Slika 5: Reakcije, ki jih katalizira AKR1C3. AKR1C3 kot 3α-HSD, pri pretvorbi 5α-DHT v 3α-androstendion. AKR1C3 kot 17β-HSD, pri pretvorbi A v T in pri pretvorbi E v Eol. AKR1C3 kot 20α-HSD, pri redukciji P v 20αOHP. AKR1C3 kot 20α-HSD, pri redukciji 3α5αTHP v 5α-pregnан-3α,20α-diol. AKR1C3 kot 11-keto-reduktaza, pri pretvorbi PGD₂ v 9α,11β-PGF_{2α}. (Povzeto po Penning, 2003 in Fung in sod., 2006.)

2.3.2.1.2 Uravnavanje delovanja steroidnih hormonov na pred-receptorski ravni

Opisanih je šest kriterijev, ki naj bi jih izpolnjevale HSD, da lahko sodelujejo pri pred-receptorskem uravnavanju. In sicer (1) morajo znotraj celice delovati enosmerno kot oksidaze ali reduktaze. (2) Izražati se morajo skupaj s steroidnim receptorjem, ki ga uravnavajo. Prav tako je pomembno tudi (3) usklajeno izražanje z uravnanim steroidnim receptorjem znotraj istega celičnega tipa. (4) HSD morajo uravnavati trans-aktivacijo steroidnih receptorjev preko njihovih ligandov. (5) Kazati morajo različno izražanje v hormonsko odvisnih tipih raka ter (6) inaktivacija določene izoblike se mora izraziti kot spremenjen odgovor steroidov na receptorski ravni (Penning, 2003). AKR1C3 izpolnjuje vse naštete pogoje in na pred-receptorski ravni deluje kot molekularno stikalo za uravnavanje delovanja androgenov, estrogenov, progestagenov in prostaglandinov.

V endometriju AKR1C3 uravnava zasedenost ER in PR ter poveča trans-aktivacijo ER. To omogoča neovirano delovanje estrogenov. AKR1C3 uravnava tudi zasedenost PPAR γ in s tem deluje kot zaviralec celične diferenciacije. Prekomerna količina AKR1C3 v žleznem epiteliju endometrija bi lahko prispevala k zvišanju koncentracije EoL in 9 α ,11 β -PGF₂ kar bi lahko sprožilo proliferacijo endometrija (Lanišnik Rižner in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

TRI-reagent	Sigma
Bradfordov reagent	Carl-Roth
varekina	Šampionka Renče
DAB (3,3'-diaminobenzidin tetra hidroksi klorid)	Sigma
Na-citrat	Kemika
vodikov peroksid 30 %	Carl-Roth
Tris-HCl	Acros Organics
glicin	Carl-Roth
SDS	Carl-Roth
NaCl	Merck
2-propanol (izopropanol)	Merck
gvanidin-hidroklorid	Sigma
HCl	Merck
metanol	Carl-Roth
etanol	Carl-Roth
APS	SERVA, SIGMA
kloroform	Merck
ocetna kislina	Merck
TEMED	Sigma
ampicilin	Sigma
KCl	Merck
Na ₂ HPO ₄	Kemika
K ₂ HPO ₄	Kemika
MgCl ₂	Kemika
SDS	Serva
akrilamid	Sigma
glicerol	Merck
NaOH	Merck
mleko v prahu	Pomurske mlekarne
Tween 20	Sigma

Coomassie Brilliant Blue	
PVDF membrana	Roth
razvijalec	Hazardous
fiksir	Ilford
»stripping pufer«	Pierce
»West pico reagent«	Pierce
ECL reagent	Amersham

3.1.2 Protitelesa in standardi

monoklonska mišja protitelesa proti AKR1C3	Sigma
monoklonska mišja protitelesa proti β -aktinu	Sigma
zajčja protitelesa proti mišjim označena s hrenovo peroksidazo	Daku
mišja protitelesa »peroksidaza anti peroksidaza kompleks« (PAP)	Jackson
proteinski standard	Immuno Research
proteinski standard	Fluka
	Fermentes

3.1.3 Laboratorijska oprema

spektrofotometer	UV 1101, Biotech Photometer
zamrzovalnik ($T = -70^{\circ}\text{C}$)	ScienTemp, Adrian
zamrzovalnik ($T = -20^{\circ}\text{C}$)	Gorenje
pipete	Gilson, Pipetman
hladilnik ($T = +4^{\circ}\text{C}$)	Gorenje
stresalnik	CAT ST 5
sterilizator	Sutjeska
tehnica	SARTORIUS Basic BL 1500s
analitska tehnica	E. Mettler, B5, 226645
magnetna mešala	Tehnica Železniki
pH meter	HANNA Instruments
centrifugi	SIGMA Sigma 2K15 (hlajena) rotor 12145, 12141; EPPENDORF 5415 D
avtoklav	MEDICO TEHNIKA
»vortex« stresalnik	Tehnica Železniki EV-202
usmernik	PS 250-2 , SIGMA Techware

termo blok	neo Block 1 , 2-2503, Neolab
vodna kopel	WB 13 Termo medicinski aparat TKS-1
digestorij	SIEMENS MICROMASTER
destilator	Destillo Ionenaustouscher, HERCO
mikrovalovna pečica	SHARP R-220A
mikroskop	CARL ZEISS, JENA ; OPTI-COM

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija proteinov

Reagenti:

• 100 % Et-OH	
• izopropanol	
• 0,3 M gvanidinijev-hidroklorid v 95 % Et-OH	2,865 g gvanidinijev-hidroklorid (95,33 g/mol) 100 ml 95 % Et-OH
• 1 % SDS	
• 65 % TCA	5 g TCA 2,7 ml destilirane vode
• 0,1 M fosfatni pufer (pH 8,0)	5,3 ml raztopina A: 2,76 g NaH ₂ PO ₄ /100 ml vode (0,230 M) 94,7 ml raztopina B: 2,84 g Na ₂ HPO ₄ /100 ml vode (0,200 M) do 200 ml destilirana voda

Postopek:

Proteine smo izolirali iz vzorcev tkiva endometrija, ki smo jih dobili na Ginekološki kliniki Kliničnega centra v Ljubljani. Razpolagali smo z vzorci normalnega in rakastega tkiva 16 bolnic z rakom endometrija, iz katerih je bila predhodno že izolirana RNA. Vzorci so bili vzeti ob histerektoniji ob soglasju pacientk in Komisije RS za medicinsko etiko. Potopljeni so bili v raztopino za stabilizacijo RNA (RNA-later, Qiagene) in shranjeni pri temperaturi - 20°C. Histopatološka klasifikacija posameznega vzorca raka endometrija je bila narejena na ginekološki kliniki v skladu s histološkim razvrstitvenim sistemom za adenokarcinom endometrija SZO (*preglednica 2*).

Preglednica 2: Klasifikacija vzorcev raka endometrija. G1-G3: razvrstitev glede na histološko diferenciacijo tkiva, S: serozni adenokarcinom, CC: svetlocelični, *: atipična hiperplazija. Leta: starost bolnic ob histerektomiji.

Številka vzorca	5	6	8	11	13	14	19	20	21	22	23	24	26	27	30	33
Diagnoza	G 2/3	G 1	G 2/3	G 1	G 2/S	G 2	G 1/2*	G 2/3	G 2	G 1/2*	G 1/2*	G 2/3*	G 1/2	S *	G 1	G 3
Leta	41	80	85	62	56	76	75	55	54	37	46	69	72	62	56	79

Vzorci so bili homogenizirani in obdelani s Tri reagentom. Z dodajanjem kloroformu in centrifugiranjem se mešanica loči v tri faze: vodna faza vsebuje RNA, interfaza DNA in organska faza proteine. Vsaka faza se v nadaljevanju lahko posebej izolira. V naših vzorcih je bila izolacija RNA že izvedena. Nadaljevali smo z izolacijo DNA in proteinov.

Vzorce smo odtalili in centrifugirali 15 minut pri 12000 g in 4°C. V digestoriju smo previdno odstranili vodno fazo. K preostali interfazi in organski fazi smo dodali absolutni etanol (0,3 ml Et-OH /1 ml Tri reagenta). Mešanico smo pustili 2-3 minute pri sobni temperaturi in jo nato centrifugirali 5 minut pri 2000 g in 4°C. Tako smo precipitirali DNA. Usedlino s precipitirano DNA smo shranili pri -20°C za kasnejšo dokončno izolacijo.

Supernatant s proteini smo odpipetirali v večje centrifugirke. Dodali smo izopropanol (1,5 ml izopropanola/1 ml Tri reagenta) in tako 10 minut precipitirali proteine na stresalniku pri sobni temperaturi. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 12000 g in 4°C. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli. Usedlino smo trikrat spirali z 0,3 M gvanidinijevim hidrokloridom v 95 % etanolu (2 ml 0,3 M gvanidinijevega hidroklorida v 95 % Et-OH/1 ml Tri reagenta). Spirali smo na stresalniku po 20 minut pri sobni temperaturi. Po spiranju smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 7500 g in 4°C. Supernatant smo zavrgli. V vsako centrifugirko smo dodali 2 ml 100 % etanola in z vrtinčastim stresanjem zmešali usedlino proteinov. Nato smo vzorce stresali 20 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri 7500 g in 4°C. Če se supernatant ni zbistril, smo centrifugiranje ponovili pri večjem številu obratov. Nato smo supernatant odpipetirali in postavili centrifugirke v eksikator. Usedlino smo pod vakuumom osušili. Za tem smo usedlino resuspendirali v 1 % SDS. Volumen 1 % SDS smo prilagodili količini usedline. Vzorce smo čez noč shranili pri -20°C.

Vzorce smo odtalili in centrifugirali 10 minut pri 10000 g in 4°C. Supernatant smo prenesli v nove mikrocentrifugirke (1,5 ml), netopen ostanek pa shranili pri -20°C. Če je bila

končna količina izoliranih proteinov majhna, smo ponovili izolacijo proteinov iz tega ostanka po sledečem postopku.

Ob prenosu supernatanta v nove mikrocentrifugirke smo izmerili volumen le-tega. Proteine v supernatantu smo v nadaljevanju precipitirali z 65 % TCA 40 minut na ledu. Količino TCA smo prilagodili izmerjenemu volumnu supernatanta, in sicer 1 volumen TCA na 10 volumnov supernatanta. Suspenzijo smo centrifugirali 20 minut pri maksimalnih obratih. Supernatant smo v celoti odstranili, da v nadaljevanju nismo imeli težav z nizkim pH. Usedlino smo resuspendirali v 0,1 M fosfatnem pufru s pH 8,0. Izmerili smo pH vzorcev. Če je bil pH prenizek (pH < 6,0), smo ga zvišali z NaOH na okoli 7,0. Vzorce izoliranih proteinov smo shranili pri -20°C.

3.2.2 Izolacija DNA

Reagenti:

• 0,1 M Na-citrat v 10 % Et-OH	2,94 g Na-citrat (294,10 g/mol) 100 ml 10 % Et-OH
• 75 % Et-OH	
• 8 mM NaOH	

Postopek:

DNA usedlino shranjeno iz začetnih korakov izolacije proteinov smo odtalili in spirali z 0,1 M Na-citratom v 10 % Et-OH (1 ml 1 M Na-citrata v 10 % Et-OH/1 ml Tri reagenta) po 30 minut pri sobni temperaturi. Mikrocentrifugirke smo občasno premešali s stresanjem. Temu je sledilo 5 minutno centrifugiranje pri 7000 g in 4°C. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli. Spiranje usedline smo ponovili trikrat. DNA usedlino smo po spiranju resuspendirali v 75 % Et-OH, 2 ml na vsako mikrocentrifugirko, pri sobni temperaturi 10-20 minut. Za tem smo centrifugirali 5 minut pri maksimalnih obratih in 4°C. Et-OH smo odpipetirali in zavrgli, usedlino pa sušili v eksikatorju do suhega (10 minut). Sušino smo resuspendirali v primernem volumnu 8 mM NaOH (150 μ l – 300 μ l NaOH na mikrocentrifugirko), tako da je bila končna koncentracija DNA med 0,2 in 0,3 μ g/ μ l. Izolirano DNA smo shranili pri -20°C.

3.2.3 Določevanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo

Reagenti:

• Bradfordov reagent (BioRad)	
• standardna raztopina BSA (goveji serumski albumin)	$\gamma=1 \text{ mg/ml}$
• PBS (pH 7,3)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄

Koncentracijo proteinov smo določali po Bradfordovi metodi. Metoda temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein v kislem. Povezava proteina in barvila v anionski obliki je lahko elektrostatska (predvsem preko arginina, tudi lizina in histidina) ali hidrofobna (vezava preko fenilalanina, triptofana, tirozina). Absorpcijski maksimum kompleksa protein-barvilo je pri 595 nm, barvila pa pri 465 nm. Metoda je relativna, zato potrebujemo umeritveno krivuljo oz. vsaj tri standardne vzorce. V območju nizkih koncentracij proteina (1-10 μg) je intenziteta barve kompleksa protein-barvilo linearno odvisna od koncentracije proteinov v vzorcu.

Postopek:

Pripravili smo PBS pufer, standardno raztopino BSA in kivete.

Pripravili smo dve seriji kivet. V prvo serijo smo odpipetirali različne volumne standardne raztopine (1 μl , 2 μl , 5 μl , 10 μl). V drugo serijo smo odpipetirali po 2 μl od vsakega vzorca proteinov. Pripravili smo tudi kiveto za slepi vzorec. V vse kivete smo dodali 900 μl PBS in 100 μl Bradfordovega reagenta. Vsebino kivet smo dobro premešali. S slepim vzorcem smo umerili spektrofotometer in izmerili absorbanco ostalih vzorcev pri 600 nm. Iz izmerjenih vrednosti standardov smo določili umeritveno krivuljo. Na podlagi umeritvene krivulje in izmerjenih vrednosti absorbance posameznih vzorcev smo izračunali koncentracijo proteinov v določenem vzorcu.

3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS PAGE)

Reagenti:

• 12 % ločitveni gel	3,35 ml H ₂ O 2,5 ml Tris-HCl (1,5 M), pH 8,8 100 µl 10 % SDS 4,0 ml 30 % akrilamid/bis akrilamid 50 µl 10 % amonijev persulfat 5 µl TEMED
• 4 % koncentrirni gel	6,1 ml dH ₂ O 2,5 ml Tris-HCl (0,5 M), pH 6,8 100 µl 10 % (w/v) SDS 1,3 ml 30 % akrilamid/bis akrilamid 50 µl 10 % amonijev persulfat (100 mg APS/1 ml destilirane vode) 10 µl TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)
• pufer za pripravo vzorcev	1,0 ml Tris-HCl (0,5 M), pH 6,8 0,80 ml glicerol 1,6 ml 10 % SDS 0,4 ml 2-β-merkaptetoanol 4,0 ml destilirane vode 0,2 ml 0,05 % bromfenol modro
• 5X elektroforezni pufer, pH 8,3	12 g Tris 57,6 g glicin 4 g SDS 0,8 l destilirane vode
• 30 % Et-OH	

Za SDS PAGE smo uporabili Mini-Protean II elektroforezno aparaturo proizvajalca BioRad (ZDA). Postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Postopek:

Sestavili smo aparaturo in pripravili 12 % ločilni gel po protokolu. Gel smo nalili v aparaturo do določene višine, nad gel pa še 30 % Et-OH, da se le-ta ne bi izsušil. Med strjevanjem ločilnega gela (približno 45 minut) smo pripravili 4 % koncentrirni gel po protokolu. Ko se je ločilni gel strdil, smo odlili 30 % Et-OH, ga sprali z destilirano vodo in gel osušili s filter papirjem. Dolili smo koncentrirni gel ter vstavili glavnice. Koncentrirni

gel smo pustili stati 30 do 40 minut, da se je strdil. Nato smo odstranili glavnice. Nosilec z gelom smo vstavili v posodo za pufer in ga prelili z elektroforeznim pufrom. Aparatura je bila pripravljena za nanos vzorcev.

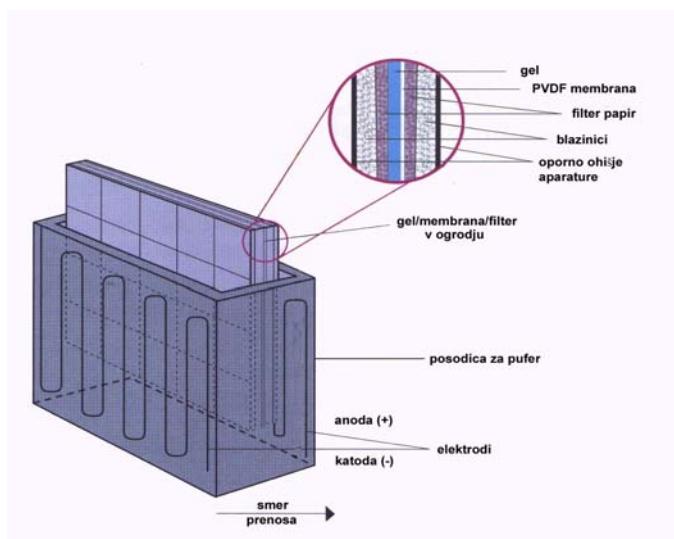
Vzorcem smo dodali pufer za pripravo vzorcev v razmerju vzorec proti pufru 1:5 in vzorce segrevali 10 min pri 105°C v termo bloku. Tako smo denaturirali proteine. Nato smo vzorce centrifugirali 1 minuto pri 8000 g in nanesli na gel. Poleg vzorcev smo nanesli tudi proteinske standarde (Fluka, Fermentas). Elektroforeza je potekala 45 minut pri napetosti 170 V v pufru za elektroforezo.

3.2.5 Prenos proteinov na membrano (prenos Western)

Reagenti za prenos Western:

• pufer za prenos (pH 8,3)	25 mM Tris, 3,03 g 192 mM glicin, 14,4 g 20 % Met-OH, 200 ml do 1000 ml mili Q
• 5x TBS (pH 7,5)	20 mM Tris, 24,2 g 500 mM NaCl, 292,2 g na 2 l destilirane vode
• 1x T-TBS	160 ml 5x TBS 640 ml destilirane vode 800 µl Tween 20 (0,05 %)
• 100 % Met-OH	
• raztopina za blokiranje nespecifične vezave	5 % raztopina posnetega mleka v T-TBS-u
• membrana	Roth, PVDF, 0,45 µm
• primarna protitelesa	mišja monoklonska protitelesa proti AKR1C3, redčena 1:1000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS, mišja monoklonska protitelesa proti β -aktinu, redčena 1:3000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS
• sekundarna protitelesa	kozja protitelesa proti mišjim protitelesom označena s hrenovo peroksidazo (HRP), redčena 1:3000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS

Za prenos proteinov na membrano smo uporabljali Mini Trans Blot aparaturo (Bio-Rad) po navodilih proizvajalca (BioRad, ZDA).



Slika 6: Shema naprave za prenos Western (Western Blot) (prir. po Pierce Biotechnology, Inc., 2005. Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide).

Postopek:

Po končani poliakrilramidni gelski elektroforezi smo pripravili PVDF membrano in filter papir primerne velikosti. Membrano smo najprej potopili za nekaj sekund v Met-OH in takoj za tem v pufer za prenos. V pufer za prenos smo položili tudi filter papirja, gel in blazinici, ki sta priloženi aparaturi. Gel smo označili in sestavili aparaturo. To smo naredili tako, da smo v smeri od negativnega pola proti pozitivnemu v ogrodje aparature v pravilnem vrstnem redu in pravilno obrnjeno vstavili najprej blazinico, filter papir, gel, PVDF membrano, še en filter papir in še eno blazinico. Pazili smo, da med plastmi ni bilo zračnih mehurčkov. Ogrodje smo zaprli in pravilno glede na smer toka vstavili v Mini Trans Blot aparaturo. Vse to smo prelili s puffrom za prenos. Dodali smo mešalo in led za hlajenje aparature med prenosom. Prenos na membrano je potekal 45 minut pri 100 V in 150 mA. Po končanem prenosu je sledilo blokiranje membrane. Le-to smo položili v posodico, jo prelili z raztopino za blokiranje nespecifične vezave (5 % mleko v T-TBS) in pustili čez noč v hladilniku pri 4°C. Sledilo je spiranje v 1x T-TBS, štirikrat po 5 minut na stresalniku pri sobni temperaturi.

Membrano smo inkubirali s primarnimi protitelesi v 1 % mleku v T-TBS 2 uri na stresalniku pri sobni temperaturi ali preko noči v hladilniku pri 4°C. Nato smo protitelesa odlili in spirali membrano s T-TBS trikrat po 15 minut na stresalniku pri sobni temperaturi.

Sledila je inkubacija s sekundarnimi protitelesi 1-2 uri na stresalniku pri sobni temperaturi. Nato smo membrano spirali s T-TBS štirikrat po 5 minut na stresalniku pri sobni temperaturi.

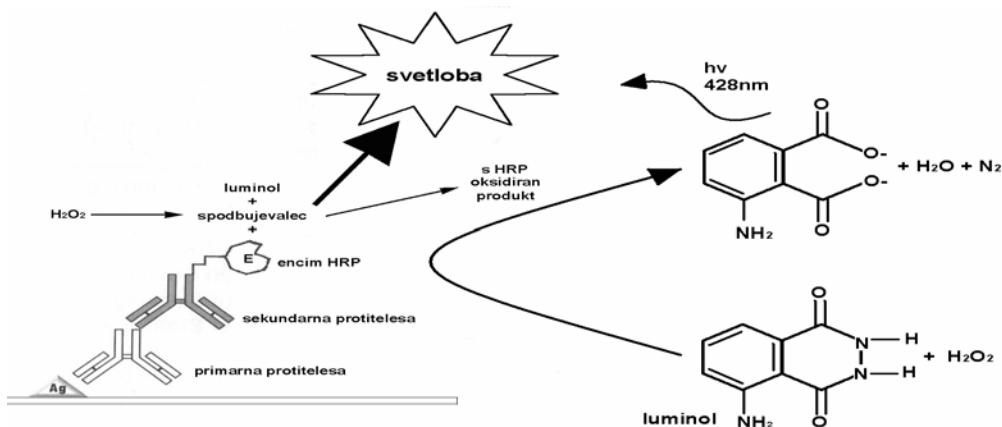
3.2.6 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL)

Reagenti:

- »Enhancer/Luminol Solution« (SuperSignal West Pico)
- »Stable Peroxide Solution« (SuperSignal West Pico)
- film (Amersham)
- razvijalec
- utrjevalec

Postopek:

Membrano smo vzeli iz pufra, s katerim smo jo spirali in položili na čisto podlago. Pripravili smo 1 ml raztopine iz reagentov A (vodikovega peroksida) in B (luminol/spodbujevalec) v razmerju 1:1. Tako pripravljeno raztopino smo enakomerno nanesli na membrano in pustili 5 minut pri sobni temperaturi. V tem času je hrenova peroksidaza (vezana na sekundarnih protitelesih) katalizirala reakcijo med vodikovim peroksidom in luminolom v raztopinah A in B. Luminol je po oksidaciji razpadel in pri tem oddal svetlobo, ki smo jo zaznali na filmu kot temno liso (*slika 7*).



Slika 7: Potek katalizirane reakcije med vodikovim peroksidom in luminolom (prir. po Pierce Chemical Company, 2000. Western Blotting with Chemiluminiscent Substrates A Handbook for Beginners A Troubleshooting Guide for Pros).

Nato smo membrano zavili v prozorno folijo in pazili, da ni bilo zračnih mehurčkov med folijo in membrano. Membrano smo prilepili v kaseto za razvijanje. V temnici smo

pripravili kadičke z razvijalcem in utrjevalcem ter narezali film na primerno velikost. Na membrano v kaseti smo položili film in ga izpostavili kemiluminiscentni svetlobi za 30 s do 20 minut. Čas izpostavitve smo prilagajali intenziteti lis in tako optimizirali razločnost lis. Film smo potopili v razvijalec dokler nismo opazili lis. Nato smo ga potopili v vodo in končno v utrjevalec. Film smo ponovno sprali z vodo in ga posušili.

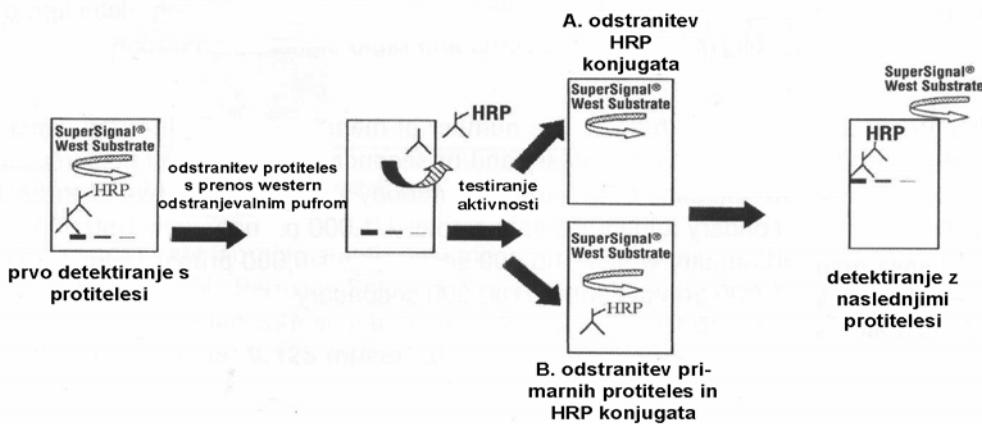
3.2.7 Odstranjevanje protiteles in ponovna detekcija proteinov na membrani

Reagenti:

- pufer za odstranjevanje protiteles pri prenosu Western (Pierce)
- T-TBS

Postopek:

Odstranjevalni pufer za protitelesa smo v vodni kopeli segreli na 37°C. Membrano smo položili v kadičko in jo prekrili z 10 ml prej segretega pufra ter položili na stresalnik za 15-20 minut pri sobni temperaturi. Nato smo pufer za odstranjevanje protiteles odlili in membrano spirali s T-TBS na stresalniku štirikrat po 5 minut. Uspešnost odstranitve protiteles smo preverili tako, da smo membrano inkubirali 1-2 uri s sekundarnimi protitelesi in nato izpostavili film kemiluminiscentni svetlobi za 5 minut (po postopku opisanem pod točko 3.2.6). Če smo dobili signal, je to pomenilo, da nismo odstranili vseh primarnih protiteles in smo postopek ponovili. Če signala ni bilo, smo lahko nadaljevali z zaznavanjem proteinov z novimi protitelesi (*slika 8*).



Slika 8: Shematski prikaz poteka odstranjevanja protiteles. (prir. po Pierce Chemical Company, 2000. Western Blotting with Chemiluminiscent Substrates A Handbook for Beginners A Troubleshooting Guide for Pros).

3.2.8 Barvanje gela z barvilo Coomassie Blue

Reagenti:

• Coomassie Brilliant Blue	0,1 % Coomassie Blue R-250 40 % metanol 10 % ocetna kislina
• 7 % ocetna kislina za razbarvanje	

Postopek:

Po prenosu proteinov na membrano (prenos Western) smo gel položili v čašo, ga prelili z barvilo Coomassie Brilliant Blue in pustili čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo barvilo odlili in gel sprali s hladno vodo. Gel smo nato v čaši prelili s 7 % ocetno kislino in s segrevanjem razbarvali ozadje. To smo ponovili 2-3 krat. Razbarvan gel smo poskenirali in ga nato na belem papirju za ozadje osušili s pomočjo vodne črpalke in grelca.

3.2.9 Imunohistokemija

Reagenti:

• 30 % H ₂ O ₂	
• 100 % Et-OH	
• 96 % Et-OH	
• 70 % Et-OH	
• 20 krat PBS	
• 0,01 M Na-citrat (pH 6,0)	
• zajčji serum	
• mišji serum	
• primarna protitelesa (1:200)	mišja protitelesa proti AKR1C3
• sekundarna protitelesa (1:100)	zajčja protitelesa proti mišjim
• 0,5 M Tris HCl	
• 0,05 M Tris HCl (pH 7,4)	
• DAB (3,3'-diaminobenzidin tetra hidroksi klorid)	
• hematoksilin	
• ksilen	
• PAP	peroksidaza anti peroksidaza kompleks
• Pertex®	

Postopek:

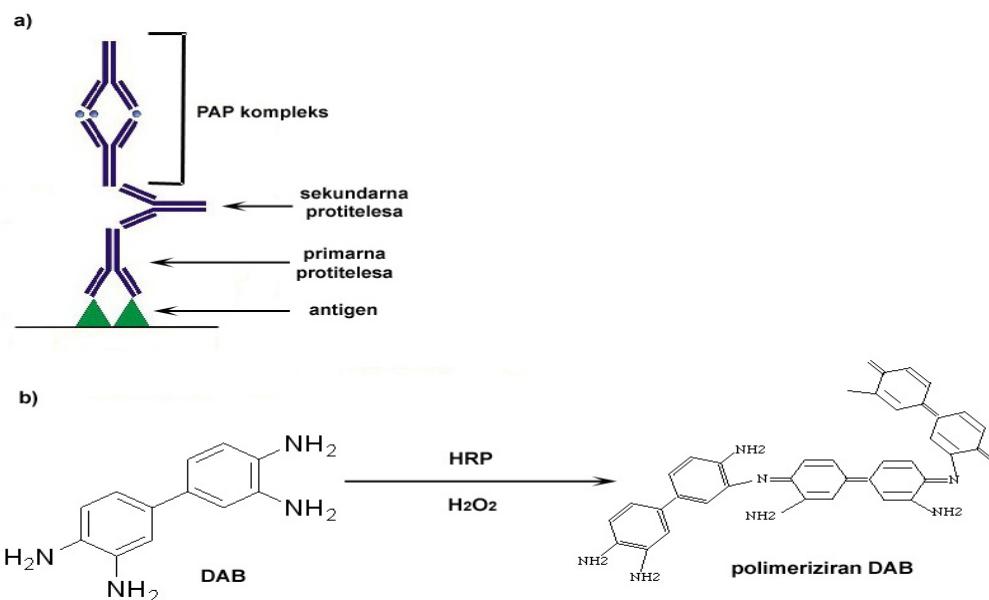
Vzorce smo dobili z Ginekološke klinike Kliničnega centra v Ljubljani. Parafinske rezine tkiva ($5\text{ }\mu\text{m}$) so bile posušene na pozitivno nabitem predmetnem stekelcu pri 50°C preko noči. Tako pripravljene vzorce smo postavili v stojalo in inkubirali v kadički s ksilenom 5 minut oziroma toliko časa, da se je odstranil parafin. Sledila je rehidracija v padajočih koncentracijah alkoholov (100 % Et-OH, 96 % Et-OH, 70 % Et-OH in destilirana voda). Inkubacija v posameznem alkoholu in vodi je potekala 1-5 minut. Nato smo vzorce spirali v TBS na stresalniku 5 minut pri sobni temperaturi. Z raztopino T-PBS in H_2O_2 (3 ml 30 % H_2O_2 v 97 ml T-PBS) smo 20 minut blokirali vse endogene peroksidaze, da nas v nadaljevanju ne bi ovirale. Sledilo je 5 minutno spiranje v T-PBS.

Z naslednjim postopkom smo z denaturacijo proteinov izpostavili antigene. Vzorce smo 20 minut inkubirali v mikrovalovni pečici z 0,01 M Na-citratom (pH 6,0). Kadičke z vzorci in 0,01 M Na-citratom smo zaprli s plastično folijo, ki smo jo preluknjali, da je para lahko izhajala. Po potrebi smo med inkubacijo dolivali toplo destilirano vodo, tako da se vzorci niso osušili.

Po segrevanju smo vzorce pustili 20 minut pri sobni temperaturi, da so se ohladili. Sledilo je spiranje v T-PBS 5 minut na stresalniku. Pred vsakim v nadaljevanju opisanim nanosom določene raztopine smo predmetno stekelce obrisali po robu, da je celoten volumen raztopine ostal na predmetnem stekelcu. Pripravili smo razredčino zajčjega seruma s TBS v razmerju 1:5. Na predmetno stekelce smo nanesli 200 μl raztopine seruma in vzorce blokirali 20 minut. Tako smo preprečili nespecifično vezavo sekundarnih protiteles. Zajčji serum smo odlili.

Pripravili smo raztopino primarnih protiteles, tako da smo primarna protitelesa redčili z razredčenim (1:5) zajčjim serumom v razmerju 1:200. Na predmetno stekelce z vzorcem smo nanesli 200 μl raztopine primarnih protiteles. Predmetnik smo pokrili s krovnim stekelcem. Pazili smo, da ni bilo mehurčkov med predmetnikom in krovnim stekelcem, ker na območju mehurčkov ne pride do vezave protiteles. Inkubacija s primarnimi protitelesi je potekala preko noči pri 4°C . Ker so bila primarna protitelesa mišja, smo za kontrolo specifičnosti vezave namesto protiteles redčili mišji serum z zajčjim serumom v razmerju 1:200.

Naslednji dan smo vzorce spirali v T-PBS dvakrat po 5 minut. Krovna stekelca so sama odpadla med spiranjem. Sekundarna protitelesa (zajčja protitelesa proti mišjim) smo redčili v T-PBS v razmerju 1:100. Na predmetno stekelce z vzorcem smo odpipetirali po 100 μ l raztopine protiteles. Sledila je 30 minutna inkubacija s sekundarnimi protitelesi. Nato smo vzorce spirali v T-PBS dvakrat po 5 minut. Sledila je inkubacija vzorcev s PAP (Mouse-Peroxidase-Anti-Peroxidase). Na predmetno stekelce smo nanesli 100 μ l PAP 500-krat redčen v 0,5 M Tris/HCl. Vzorce smo inkubirali 30 minut – 2 uri na sobni temperaturi in nato ponovno spirali v T-PBS dvakrat po 5 minut. Po spiranju smo na vzorce nakapali po 200 μ l raztopine DAB, Tris/HCl in H₂O₂ (0,0025 g DAB; 5 ml 0,05 M Tris/HCl, pH 7,4; 1,5 μ l 30 % H₂O₂) (*slika 9*). Pod mikroskopom smo opazovali razvijanje barve in v pravem trenutku (5-30 minut) ustavili reakcijo. To smo storili tako, da smo raztopino DAB, Tris/HCl, H₂O₂ odlili in vzorce inkubirali v destilirani vodi dvakrat 1-5 minut brez stresanja.



Slika 9: a) Shema vezave primarnih protiteles (mišja protitelesa proti AKR1C3), sekundarnih protiteles (zajčja protitelesa proti mišjim) in PAP kompleksa (peroksidaza anti peroksidaza kompleks); b) Potek barvne reakcije z DAB (3,3'-diaminobenzidin tetra hidrokloridom) in vodikovim peroksidom. (Prirejeno po W. T. Lee, www.anapath.necker.fr/.)

Nato smo v digestoriju s hematoksilinom obarvali ozadje, kar poveča prepoznavnost in omogoča števnost celic. Vzorce smo inkubirali v kadički s hematoksilinom. Po 45 sekundah smo vzorce sprali z vodo. Sledila je dehidracija v naraščajočih koncentracijah alkohola (70 % Et-OH, 96 % Et-OH, 100 % Et-OH) in v ksilenu v posameznem mediju 1-5 minut. Krovna stekelca smo na predmetnik prilepili z medijem Pertex® in pustili čez noč,

da se je medij posušil. Preparate smo opazovali pod mikroskopom in na podlagi različne obarvanosti ocenili delež celic z večjo vsebnostjo proteina AKR1C3.

3.2.10 Računalniška obdelava podatkov

Po ECL reakciji smo filme skenirali. Signale proteinov, ki smo jih zaznali na filmu, smo ovrednotili s programom UN-SCAN-IT (Silk Scientific Inc USA). S tem programom smo izračunali celokupno število točk za posamezen vzorec. Program ovrednoti na izbranem območju na filmu posamezne točke (pike) glede na barvo od bele do črne in na koncu sešteje te vrednosti. Tako dobimo celokupno število točk za posamezno izbrano območje na filmu.

3.2.11 Statistična analiza

Statistično smo obdelali rezultate raziskave količine proteina AKR1C3 v različnih vzorcih na osnovi postopka SDS PAGE, prenosa Western in detekcije s kemiluminiscenco. Za statistično analizo rezultatov smo uporabili računalniški program SPSS. Izračunali smo povprečje celokupnega števila točk AKR1C3 normirano na β -aktin za normalno tkivo in za rakovo tkivo endometrija ter standardno napako povprečij. Statistično značilne razlike med normalnim in rakavim tkivom vzorcev smo preverili z Wilcoxonovim neparametričnim testom za pare s stopnjo zaupanja (p) 0,05.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA PROTEINOV

Izolirali smo proteine iz vzorcev raka endometrija in vzorcev okolnega normalnega endometrija bolnic z rakiom endometrija po histerektomiji. Prav tako smo izolirali proteinsko frakcijo iz štirih celičnih linij (Hep G-2, Ishikawa, MCF7 in JEG-3). Z Bradfordovo metodo smo določili koncentracijo in izračunali maso proteinov v vzorcih. Podatki za posamezne vzorce so podani v tabeli 3.

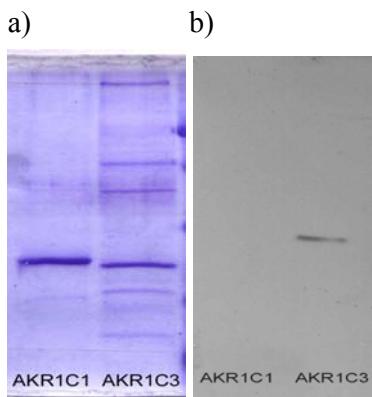
Preglednica 3: Koncentracija in masa izoliranih proteinov v vzorcih rakavega in okolnega normalnega tkiva, določena po Bradfordovi metodi.

VZOREC	KONC. IZOL. PROTEINOV ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		MASA IZOL. PROTEINOV (μg)	
	NORMALNO	TUMOR	NORMALNO	TUMOR
E5	4,1	5,6	1430	3660
E6	4,6	6,7	366	1350
E8	4,7	4,6	469	914
E11	3,7	6,9	1210	3860
E13	6,1	5,4	1410	1990
E14	3,8	5,8	1340	1570
E19	2,8	3,1	283	465
E20	2,8	3,7	2240	1110
E21	5,9	6,1	1180	1890
E22	5,2	3,7	624	813
E23	5,1	6,1	1020	1960
E24	4,5	6,3	581	2260
E26	7,2	5,3	1660	1590
E27	3,2	4,3	443	1160
E30	4,1	5,1	495	868
E33	3,3	4,0	665	998
JEG-3	6,3		1630	
MCF-7	5,7		1310	
Hep G-2	5,9		1360	
Ishikawa	2,4		614	

4.2 IZBIRA USTREZNIH POGOJEV ZA ZAZNAVANJE PROTEINOV AKR1C3 IN β -AKTINA TER PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE

4.2.1 Preverjanje specifičnosti primarnih protiteles proti AKR1C3 in zaznavanja AKR1C3 in β -aktina pri različnih koncentracijah sekundarnih protiteles

Redčenje primarnih mišjih monoklonskih protiteles proti AKR1C3 1:1000 smo povzeli po objavljeni študiji (Lin in sod., 2004), redčenje primarnih mišjih monoklonskih protiteles proti β -aktinu (1:3000) pa na podlagi predhodne neobjavljene raziskovalne študije (Šmuc in sod.), ki je bila izvedena s temi protitelesi. Primarna protitelesa smo uporabili v enaki koncentraciji pri vseh poizkusih. Specifičnost primarnih mišjih protiteles proti AKR1C3 smo preverili z rekombinantnima proteinoma AKR1C1 in AKR1C3 (*slika 10*).



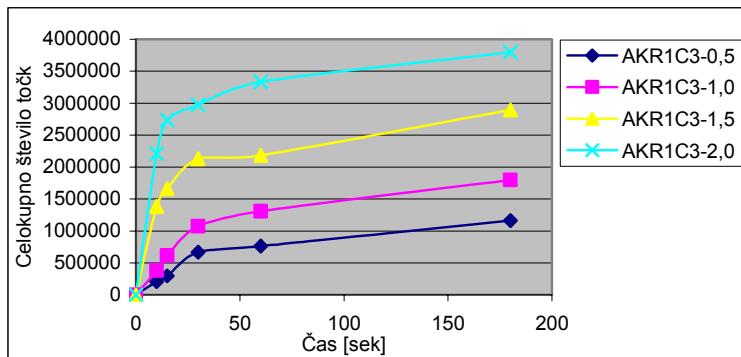
Slika 10: Specifičnost protiteles proti AKR1C3. a) Slika gela SDS-PAGE po barvanju s Coomassie Brilliant Blue. b) Slika filma, AKR1C1 0,1 μ g, AKR1C3 0,1 μ g po prenosu proteinov z gela (slika 10 a)) na membrano in ECL reakciji.

Preizkusili smo detekcijo proteinov AKR1C3 in β -aktina z različnimi redčenji sekundarnih protiteles (kozja protitelesa proti mišjim protitelesom označena s hrenovo peroksidazo (HRP)) in sicer v razmerju 1:30000, 1:5000, 1:3000, 1:2500 in 1:1000. Najbolj primerne signale smo dobili z razmerjem 1:3000.

4.2.2 Primerjava vpliva časa izpostavitve filma na membrani

Na membrani z nanešenimi različnimi količinami (0,5 μ g, 1,0 μ g, 1,5 μ g in 2,0 μ g) rekombinantnega proteina AKR1C3 smo razvili filme po različnih časih izpostavitve filma na membrani. Jakost signala v prvih 30 sekundah strmo narašča pri vseh količinah proteina, po tem času pa je naraščanje bolj položno in enakomerno (*slika 11*). Ker se jakost

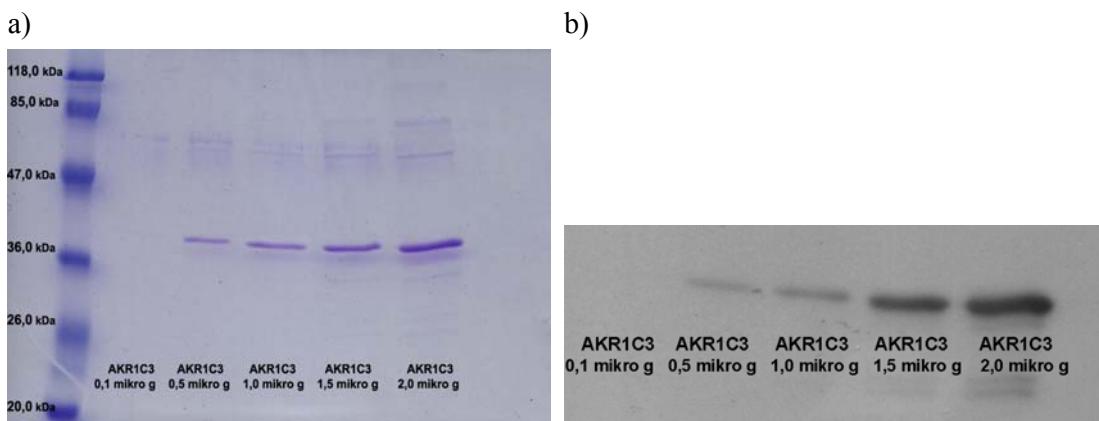
signalov v intervalu od 30 sekund naprej manj spreminja, smo se odločili za izpostavitev filma na membrani 1 minutno ali več.



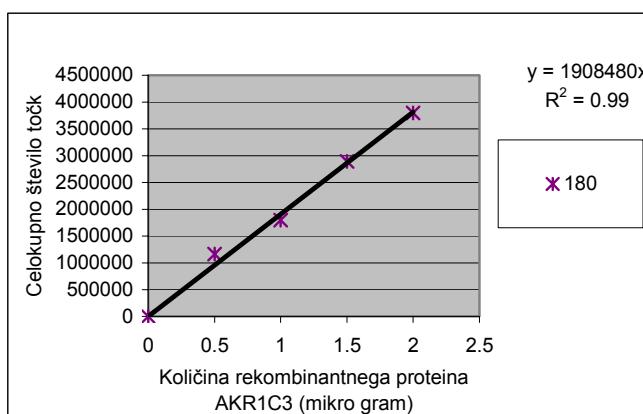
Slika 11: Odvisnost vrednosti za celokupno število točk od časa izpostavitve filma na membrani. Graf prikazuje vpliv časa izpostavitve filma na membrano na vrednosti celokupno število točk vzorcev z različnimi količinami rekombinantnega proteina AKR1C3 (temno modra barva 0,5 μ g, vijolična barva 1,0 μ g, rumena barva 1,5 μ g in svetlo modra 2,0 μ g).

4.2.3 Priprava umeritvene krivulje za oceno mase proteina AKR1C3 v vzorcih

Za izdelavo umeritvene krivulje smo uporabili različne količine rekombinantnega proteina AKR1C3 (0,1 μ g, 0,5 μ g, 1,0 μ g, 1,5 μ g in 2,0 μ g) (*slika 12*). S pomočjo programa UN-SCAN-IT smo izmerili vrednosti celokupnega števila točk. Izrisali smo graf celokupnega števila točk v odvisnosti od količine rekombinantnega proteina AKR1C3. Krivulji smo dodali trendno črto (*slika 13*). Izračunali smo enačbo premice $Y=1908480X$.



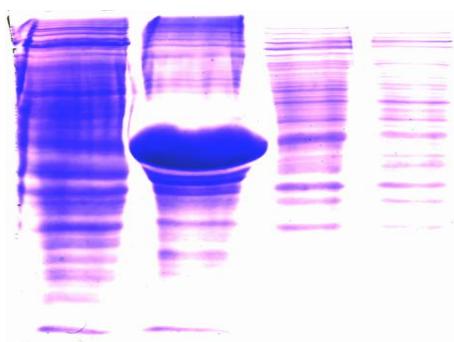
Slika 12: a) Slika gela SDS-PAGE rekombinantnega proteina AKR1C3 in standardov (prvi vzorec z leve) po barvanju s Coomassie Brilliant Blue. b) Slika filma po prenosu proteinov z gela (slika 12 a)) po ECL reakciji.



Slika 13: Celokupno število točk v odvisnosti od količine rekombinantnega proteina AKR1C3 po 180 sekundah izpostavitve filma.

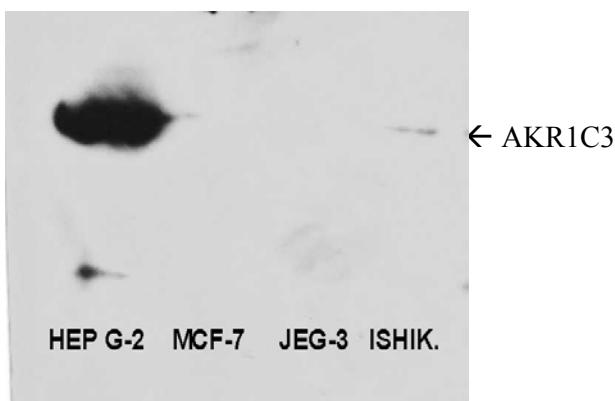
4.3 ZAZNAVANJE PROTEINA AKR1C3 IN β -AKTINA V CELIČNIH LINIJAH

Najprej smo prisotnost proteina AKR1C3 proučevali v vzorcih celičnih linij (*slika 14*). Uporabili smo: celično linijo raka jeter Hep G-2, celično linijo raka endometrija Ishikawa, celično linijo raka dojke MCF-7 in celično linijo raka horionskih resic JEG-3. Za protein AKR1C3 smo pri celični liniji raka jeter (Hep G-2) zaznali močan signal (*slika 15*). Prav tako smo zaznali signal za protein AKR1C3 pri celični liniji raka endometrija (Ishikawa), vendar veliko šibkejši (*slika 15*). Za β -aktin smo zaznali močan signal pri vseh celičnih linijah (*slika 16*).



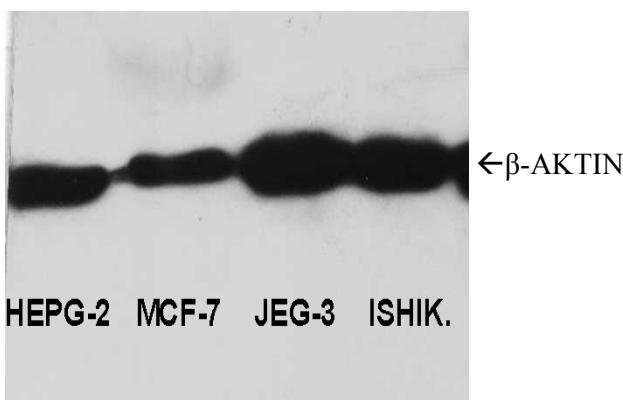
HEP G-2 MCF-7 JEG-3 ISHIK.

Slika 14: Slika gela SDS-PAGE celičnih linij po barvanju s Coomassie Brilliant Blue.



HEP G-2 MCF-7 JEG-3 ISHIK.

Slika 15: Slika filma zaznavanja AKR1C3 po prenosu proteinov celičnih linij z gela (slika 14) po ECL reakciji.

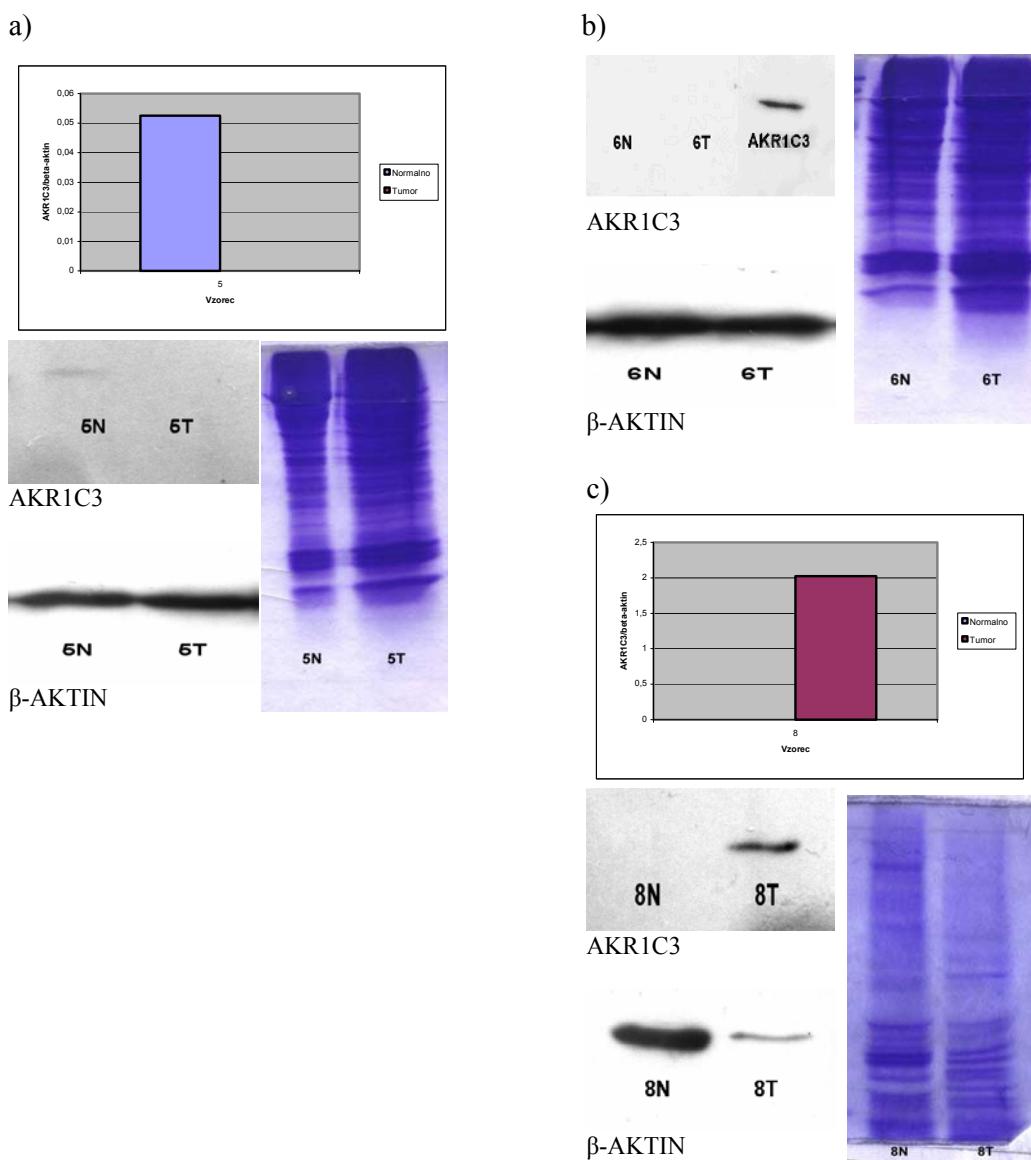


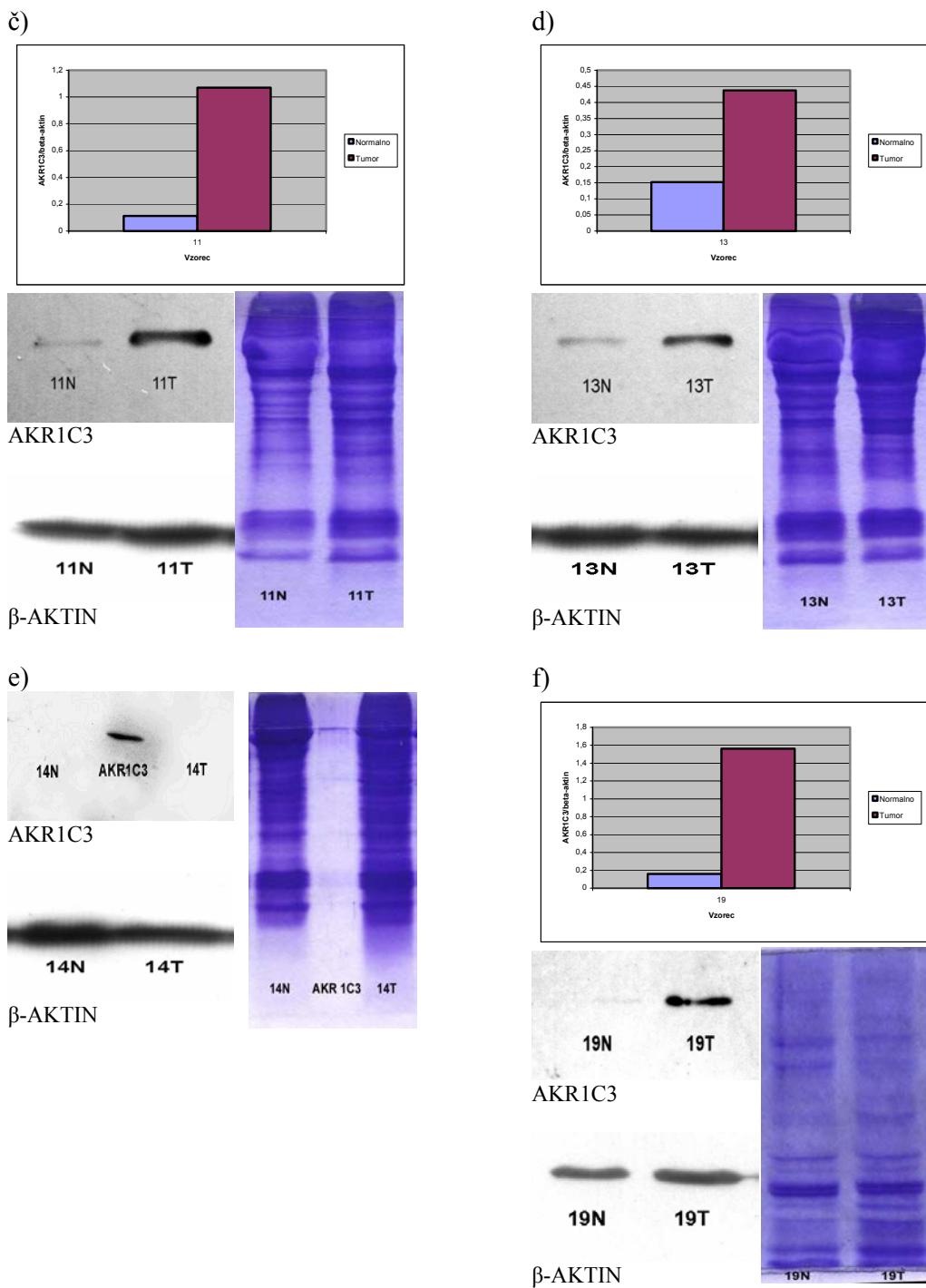
HEPG-2 MCF-7 JEG-3 ISHIK.

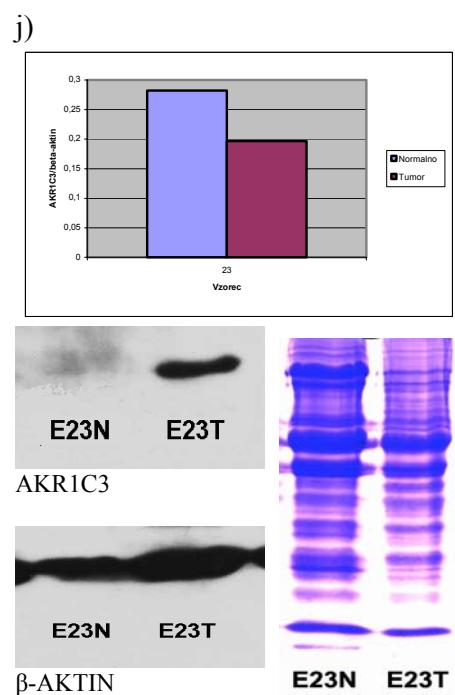
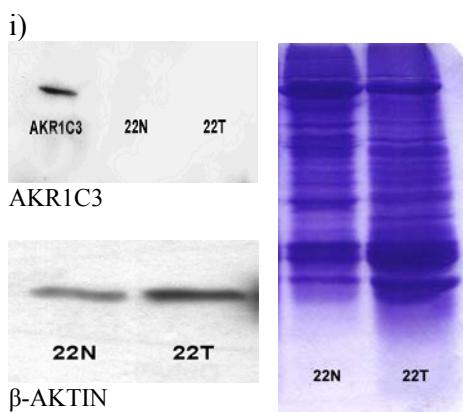
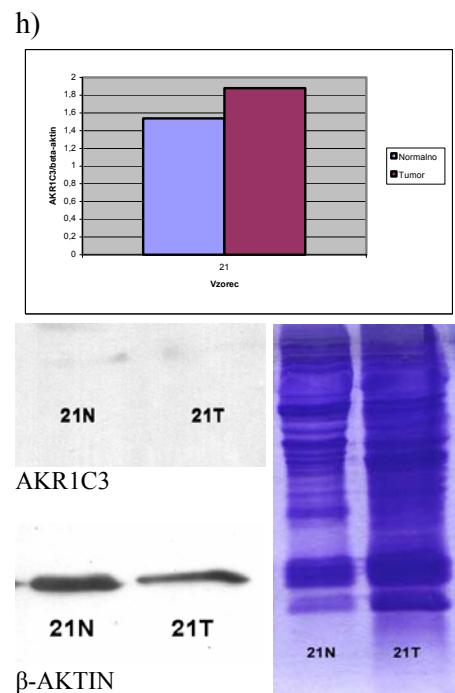
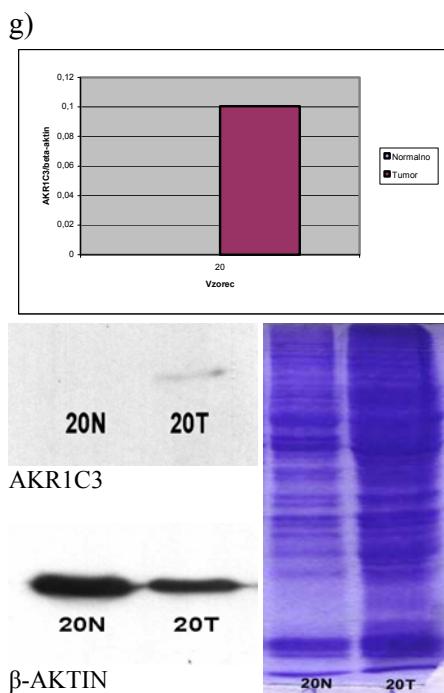
Slika 16: Slika filma zaznavanja proteina β -aktina po prenosu proteinov celičnih linij z gela (slika 14) po ECL.

4.4 ZAZNAVANJE PROTEINA AKR1C3 V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA

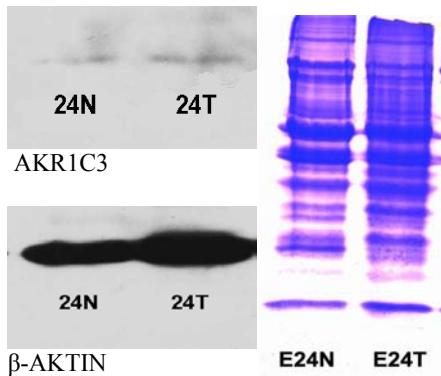
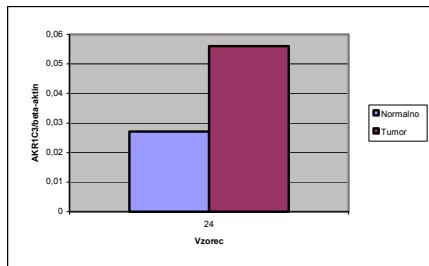
Prisotnost proteina AKR1C3 smo proučevali tudi v 16 parih vzorcev raka endometrija in okolnega normalnega endometrija. Poleg AKR1C3 smo preučili prisotnost hišnega proteina β -aktina. Oba proteina smo ovrednotili s programom UN-SCAN-IT (Silk Scientific Inc., USA). Količino proteina AKR1C3, ki smo ga zaznali, smo normirali z β -aktinom za vsak vzorec posebej. Celokupno število točk za AKR1C3 smo delili s celokupnim številom točk za β -aktin. Relativno razmerje med količino proteina AKR1C3 v normalnem tkivu in rakavem tkivu smo predstavili z grafi (*slike 17 a)-o*, *slika 18*).



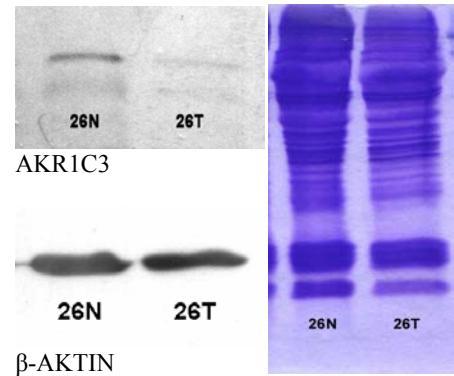
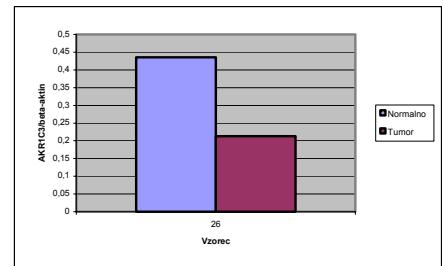




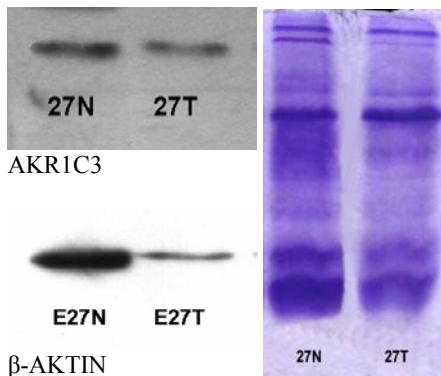
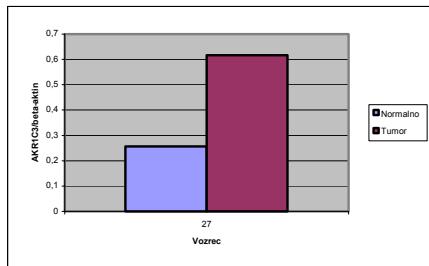
k)



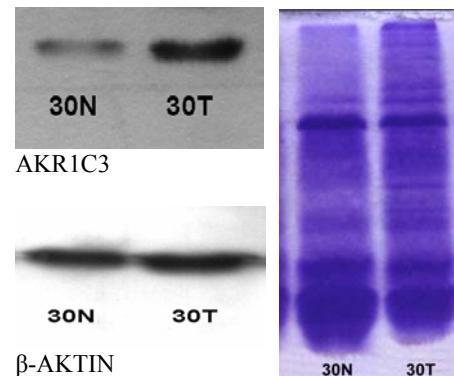
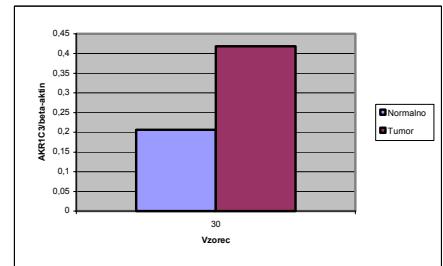
l)



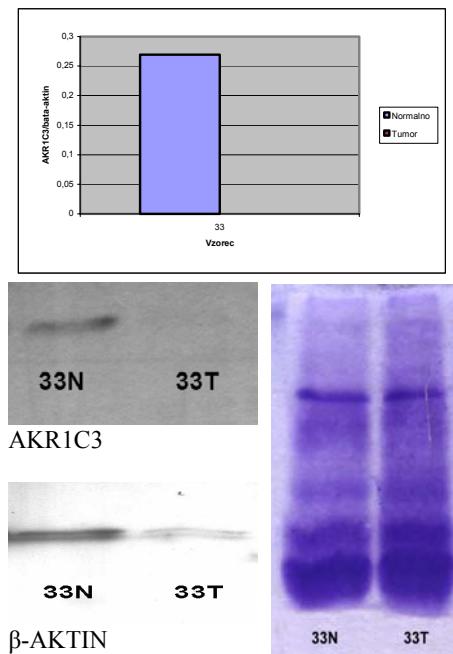
m)



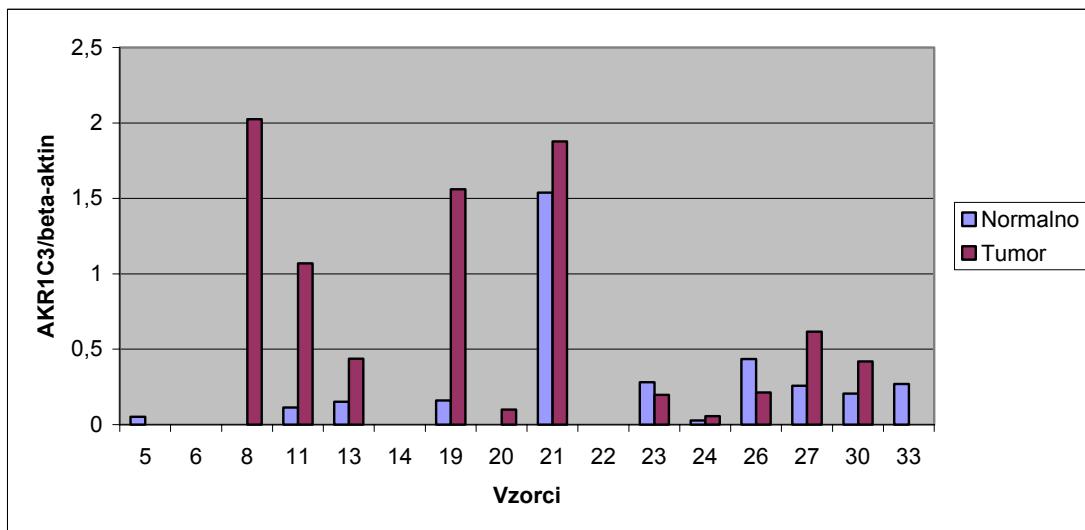
n)



o)



Slika 17: Zaznavanje AKR1C3 in β -aktina v 16 vzorcih tkiva tumorja endometrija (T) in okolnega normalnega tkiva (N). Grafi na vrhu kažejo kvantificirane podatke celokupnega števila točk: AKR1C3/ β -aktin (normalno tkivo, tkivo tumorja endometrija). Slika SDS-PAGE gela (desno spodaj) prikazuje nanose vzorcev proteinov normalnega (N) in tumorskega (T) tkiva, slika filma zaznavanja AKR1C3 po prenosu proteinov na membrano in po ECL reakciji (na sredini), slika filma zaznavanja β -aktina po prenosu proteinov na membrano in po ECL reakciji (levo spodaj): a) vzorec 5, b) vzorec 6, c) vzorec 8, č) vzorec 11, d) vzorec 13, e) vzorec 14, f) vzorec 19, g) vzorec 20, h) vzorec 21, i) vzorec 22, j) vzorec 23, k) vzorec 24, l) vzorec 26, m) vzorec 27, n) vzorec 30, o) vzorec 33.

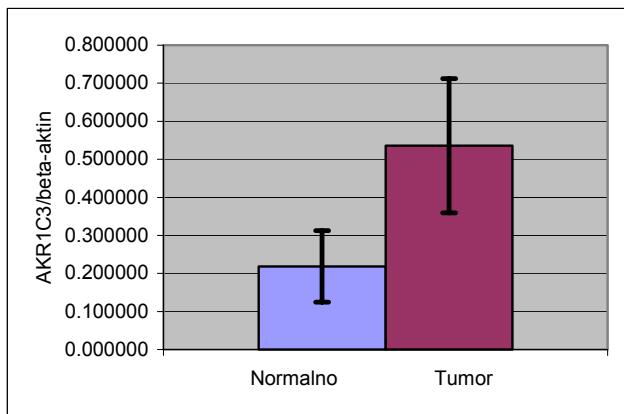


Slika 18: Razmerje AKR1C3/ β -aktin za 16 vzorcev (normalno tkivo, tkivo tumorja).

Razmerje AKR1C3/ β -aktin je bilo višje v 9 vzorcih pri rakavem tkivu, v 4 vzorcih je bilo pri rakavem tkivu manjše, pri 3 vzorcih pa nismo zaznali AKR1C3. Normirane vrednosti so predstavljene v grafu (*slika 18*).

4.4.1 Statistična obdelava rezultatov razmerja AKR1C3/ β -aktin

Statistično značilnost razlik med normalnim in rakavim tkivom smo ocenjevali z Wilcoxonovim neparametričnim testom za pare (Wilcoxon Signed Ranks Test) s stopnjo zaupanja (p) 0,05. Postavili smo hipotezo (H_0), da je količina AKR1C3 v normalnem in rakavem tkivu enaka. Uporabili smo normirane vrednosti vzorcev AKR1C3/ β -aktin. Razlika ni bila statistično značilna, p je bil 0,055 ($>0,05$). Izračunali smo povprečno vrednost razmerja celokupno število točk za AKR1C3 proti celokupnemu številu točk za β -aktin, ločeno za normalno in rakavo tkivo in rezultat predstavili v obliki grafa (*slika 19*). Povprečje količine AKR1C3 v rakavem tkivu vzorcev je 2,5 krat večje kot v normalnem tkivu.

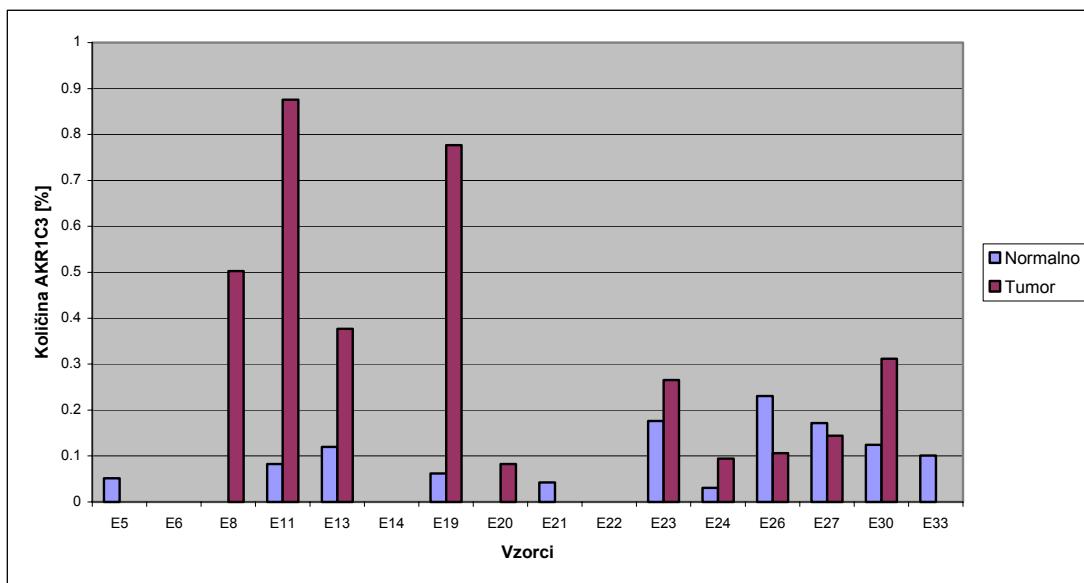


Slika 19: Povprečne vrednosti razmerja AKR1C3/ β -aktin v vzorcih normalnega in rakavega tkiva, s prikazano standardno napako.

4.5 OCENA MASE PROTEINA AKR1C3 V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA

4.5.1 Ocena mase proteina AKR1C3 v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija

Celokupno število točk za posamezen vzorec smo določili s programom UN-SCAN-IT (Silk Scientific Inc., USA). S pomočjo umeritvene krivulje in enačbe trendne črte ($Y=1908480X$) smo izračunali maso proteina AKR1C3 v vzorcih rakavega in okolnega normalnega tkiva. Izračunane vrednosti mase proteina AKR1C3 v μg smo delili z maso na gel nanešenega vzorca in dobili maso proteina AKR1C3 na 1 μg vzorca. V grafu smo predstavili odstotek AKR1C3 v izoliranih proteinih (*slika 20*). Izračunane mase se gibljejo od 0 μg do 0,88 μg proteina AKR1C3 na 100 μg nanešenih proteinov.



Slika 20: Odstotek proteina AKR1C3 v normalnem in tumorskem tkivu vzorcev, izračunana iz vrednosti podatkov celokupnega števila točk vzorcev.

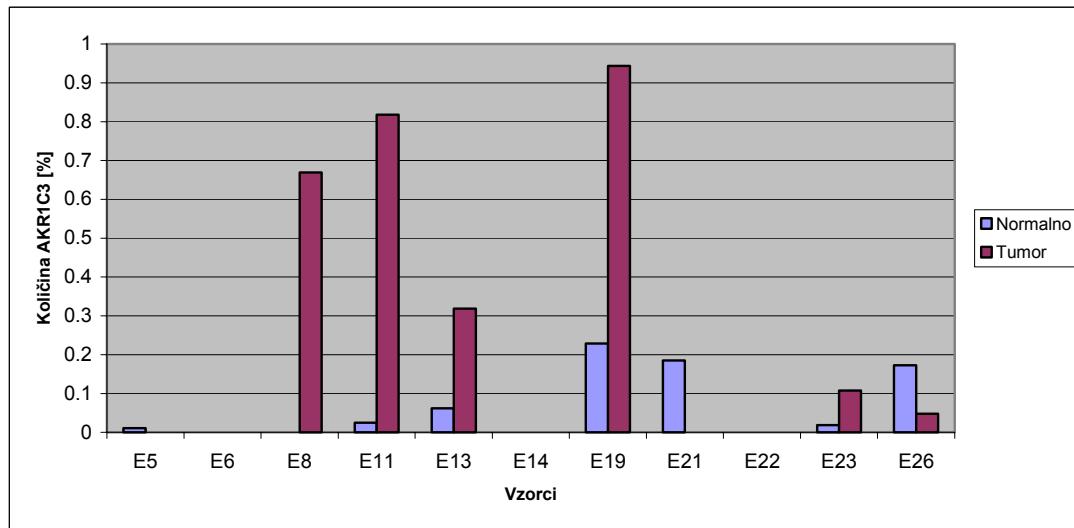
Preglednica 4: Vrednosti za celokupno število točk in mase proteina AKR1C3 v normalnem (N) in tumorskem (T) tkivu vzorcev, izračunana iz vrednosti podatkov celokupnega števila točk vzorcev normiranih na 100 μg .

VZORCI:	Celokupno število točk	masa prot. AKR1C3 (μg) na 100 μg vzorca
E5N	69392	0,05
E5T	0	0
E6N	0	0
E6T	0	0
E8N	0	0
E8T	575259	0,50
E11N	110105	0,08
E11T	1169596	0,88
E13N	159963,5	0,12
E13T	503174	0,38
E14N	0	0
E14T	0	0
E19N	71188	0,06
E19T	889355	0,78
E20N	0	0
E20T	94661	0,08
E21N	56476	0,04
E21T	0	0
E22N	0	0
E22T	0	0
E23N	0	0,18
E23T	576457	0,27
E24N	230380,5	0,03
E24T	0	0,09
E26N	308004,5	0,23
E26T	141844	0,11
E27N	196810	0,17
E27T	165178	0,14
E30N	142546	0,13
E30T	357241	0,31
E33N	115588	0,10
E33T	0	0

4.5.2 Ocena mase proteina AKR1C3 v 11 vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija z upoštevanjem referenčne vrednosti

Za primerjavo smo maso proteina AKR1C3 v vzorcih ocenili tudi z upoštevanjem referenčne vrednosti izračunane za 0,1 μg rekombinantnega proteina AKR1C3. Za izračun mase smo uporabili enačbo trendne črte $Y=1908480X$ (glej 4.2.3). V nadaljevanju smo enačbo trendne črte umeritvene krivulje umerili na posamezno vrednost celokupnega števila točk izmerjeno za 0,1 μg rekombinantnega proteina AKR1C3, ki smo ga za

kontrolo nanesli ob večino vzorcev (z izjemo vzorcev E20, E24, E27, E30 in E33). Iz nove enačbe za posamezen vzorec smo izračunali maso proteina AKR1C3 v 11 vzorcih. Odstotek proteina AKR1C3 v normalnem in tumorskem tkivu vzorcev smo prikazali z grafom (*slika 21*). Izračunane vrednosti se gibljejo od 0 μg do 0,94 μg proteina AKR1C3 na 100 μg nanešenih proteinov.



Slika 21: Odstotek proteina AKR1C3 v normalnem in tumorskem tkivu vzorcev, ob upoštevanju referenčne vrednosti za 0,1 μg rekombinantnega proteina AKR1C3.

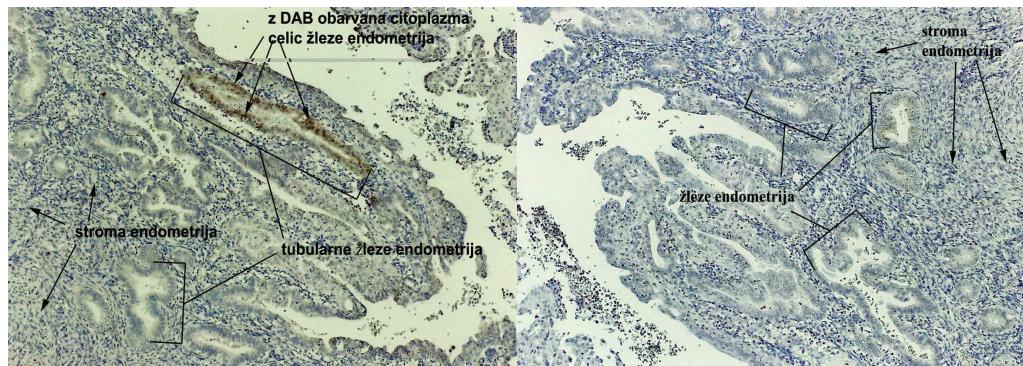
Preglednica 5: Vrednosti za celokupno število točk vzorcev, vrednosti za celokupno število točk za 0,1 μg rekombinantnega proteina AKR1C3 in ocena mase proteina AKR1C3 v normalnem (N) in tumorskem (T) tkivu vzorcev.

VZORCI:	Celokupno število točk za vzorce	Celokupno število točk za rekombinanten protein AKR1C3 (0,1 μg)	masa proteina AKR1C3 v 100 μg vzorca
E5N	69392	245384	0,11
E5T	0	245384	0
E6N	0	523584	0
E6T	0	523584	0
E8N	0	0	0
E8T	575259	0	0,67
E11N	110105	268198	0,03
E11T	1169596	268198	0,82
E13N	159963,5	268198	0,06
E13T	503174	268198	0,32
E14N	0	523584	0
E14T	0	523584	0
E19N	71188	0	0,23

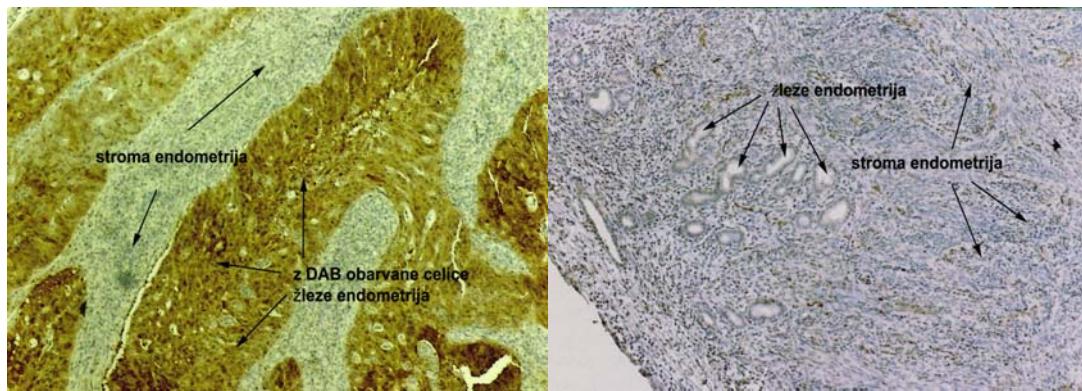
E19T	889355	0	0,94
E21N	56476	0	0,19
E21T	0	0	0
E22N	0	523584	0
E22T	0	523584	0
E23N	0	268198	0,02
E23T	576457	268198	0,11
E26N	308004,5	268198	0,17
E26T	141844	268198	0,05

4.6 IMUNOHISTOKEMIJA

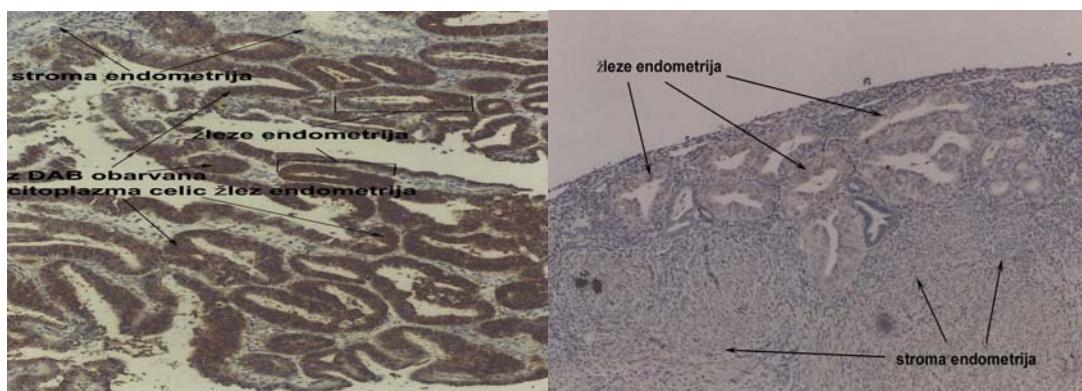
Prisotnost in lokacijo proteina AKR1C3 smo želeli potrditi tudi na celični ravni. S protitelesi proti AKR1C3 smo obarvali parafinske rezine raka endometrija in okolnega normalnega endometrija. Prisotnost AKR1C3 smo preučevali v petih vzorcih (10, 11, 13, 24, 26). Po barvanju smo vzorce fotografirali pod mikroskopom pri 100x povečavi (*slike 22-27*). AKR1C3 smo zaznali v citoplazmi celic tubularnih endometrijskih žlez. Nismo ga zasledili v celicah strome. Protitelesa so zaznala protein AKR1C3 pri 4 vzorcih v celicah raka endometrija (10, 11, 13 in 24) in pri 1 vzorcu (26) v celicah normalnega tkiva.



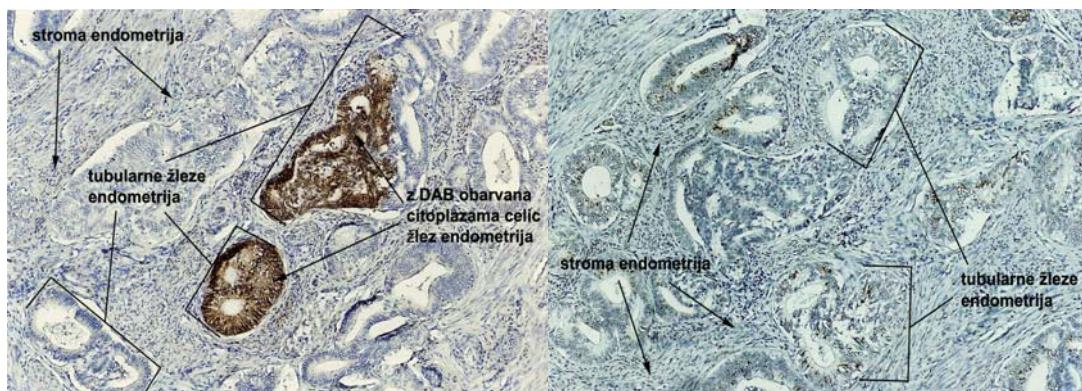
Slika 22: Histološki preparat, vzorec 10, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakovo tkivo endometrija z obarvanimi citoplazmami celic žlez, desno kontrola rakovo tkivo endometrija.



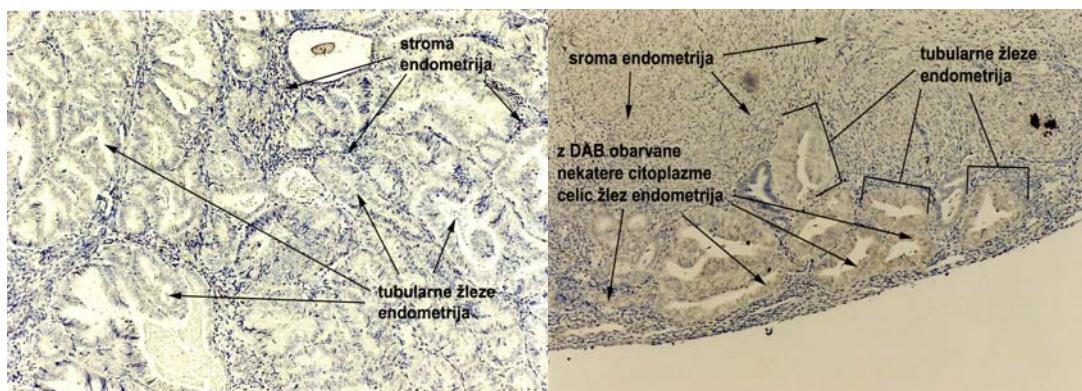
Slika 23: Histološki preparat, vzorec 11, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakovo tkivo endometrija z obarvanimi citoplazmami celic žlez, desno normalno tkivo endometrija.



Slika 24: Histološki preparat, vzorec 13, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakovo tkivo endometrija z obarvanimi citoplazmami celic žlez, desno normalno tkivo endometrija.



Slika 25: Histološki preparat, vzorec 24, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakovo tkivo endometrija z obarvanimi citoplazmami celic tubularnih žlez, desno kontrola rakovo tkivo endometrija.



Slika 26: Histološki preparat, vzorec 26, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakovo tkivo endometrija, desno normalno tkivo z obarvanimi citoplazmami nekaterih celic tubularnih žlez endometrija.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rak endometrija je od hormonov odvisna oblika raka. Če se ravnovesje med estrogeni in progestageni spremeni v smeri povečane koncentracije aktivnih oblik estrogenov in/ali zmanjšane koncentracije aktivnih oblik progestagenov, to vpliva na pospešeno deljenje celic endometrija. Z večjim številom celičnih delitev se poveča možnost za nastanek naključnih genskih napak in razvoj raka. Berstein in sod., 2003 so zaznali višje koncentracije aktivnega estrogena, E₁, v vzorcih rakavega tkiva endometrija kot v vzorcih normalnega endometrija. Koncentraciji E₁ in P na pred-receptorski ravni uravnava encim AKR1C3 (17 β -HSD tip 5), ki neaktivno obliko estrogenov (E) pretvori v aktivno obliko, E₁, in aktivno obliko P v neaktivno obliko 20 α OHP. Na ta način je AKR1C3 lahko povezan z razvojem raka endometrija. V okviru diplomske naloge smo želeli preučiti izražanje AKR1C3 v rakavem in normalnem tkivu endometrija iste osebe. Predvidevali smo, da se 17 β -HSD tip 5 različno izraža v rakavem endometriju v primerjavi z normalnim tkivom.

5.1.1 Izolacija proteinov

Proteine smo izolirali iz vzorcev raka endometrija in okolnega normalnega endometrija bolnic po predhodni izolaciji RNA. Za primerjavo smo proteine izolirali tudi iz celičnih linij (Hep G-2, Ishikawa, MCF-7 in JEG-3). Določili smo koncentracijo in maso izoliranih proteinov. Iz posameznih vzorcev smo skupno izolirali od 283 µg do 3660 µg proteinov. Količina izoliranih proteinov v posameznem vzorcu je bila odvisna od začetne količine vzorca in uspešnosti postopka izolacije. Izračunane koncentracije za posamezen vzorec so nam služile za določitev mase vzorca za nanos na gel. Proteine smo izolirali po postopku, ki temelji na uporabi TRI reagenta. TRI reagent je primeren za sočasno izolacijo RNA, DNA in proteinov. Ta metoda je zelo uporabna, saj lahko iz manjše količine istega vzorca pridobimo več informacij. Zasledujemo lahko izražanje genov na ravni mRNA kot tudi na proteinski ravni, na ravni DNA pa npr. prisotnost somatskih mutacij, polimorfizmov.

5.1.2 Izbira ustreznih pogojev za zaznavanje AKR1C3 in β -aktina

Za zaznavanje proteina AKR1C3 smo uporabili mišja monoklonska protitelesa proti AKR1C3. Ta protitelesa so dobro okarakterizirali Lin in sod. 2004. Pokazali so, da so zelo specifična, saj prepoznajo izmed vseh štirih AKR1C izooblik (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 in AKR1C4), ki imajo več kot 86 % identičnih aminokislin, le epitop na AKR1C3. Prav tako ne prepoznajo človeške aldehid reduktaze AKR1A1 in pa podganje 3 α -HSD (AKR1C9). Tudi sami smo preverili specifičnost protiteles z dvema rekombinantnima proteinoma AKR1C1 in AKR1C3. Kot pričakovano, smo detektirali le AKR1C3. Primerno redčenje protiteles (1:1000) smo izbrali po objavljeni študiji »Karakterizacija monoklonskih protiteles proti človeški aldo-keto reduktazi AKR1C3« (Lin in sod., 2004).

Za normiranje vzorcev smo izbrali hišni protein β -aktin, ki smo ga uporabili kot interni standard. Predvideva se, da se izražanje hišnih genov v celicah različnih tkiv ne spreminja veliko, ne glede na vplive fizioloških in patoloških faktorjev (Ferguson in sod., 2005). Za koncentracijo primarnih mišjih monoklonskih protiteles proti β -aktinu smo se odločili na podlagi neobjavljenih rezultatov predhodnih študij (Šmuc in sod.). Redčenje 1:3000 smo uporabili pri vseh poizkusih.

Za določitev primerne koncentracije sekundarnih protiteles (kozja protitelesa proti mišjim protitelesom označena s hrenovo peroksidazo (HRP)) smo preizkusili različna redčenja letih (1:30000, 1:5000, 1:3000, 1:2500 in 1:1000). Pri majhnih koncentracijah sekundarnih protiteles je bila zaznava manjša ali je ni bilo, pri večjih koncentracijah pa je prišlo do prehitre porabe substrata za kemiluminiscenco in je bilo zaznavanje ravno tako slabše. Pri večjih koncentracijah sekundarnih protiteles se je pojavil problem ozadja. Zato smo se v obeh primerih odločili za razmerje sekundarnih protiteles 1:3000.

Optimizirali smo tudi zaznavanje proteinov glede na čas izpostavitve filma na membrani. Različne količine nanešenega rekombinantnega proteina AKR1C3 smo detektirali po različnih časih izpostavitve filma na membrani. Čas izpostavitve filma na membrani vpliva na število izmerjenih točk (celokupno število točk). Moč signala v prvih 30 sekundah strmo narašča, po tem času pa je naraščanje položno in enakomerno. To pomeni, da že majhna časovna razlika (nekaj sekund) pri izpostavitvi filma na membrani v intervalu prvih 30 sekund, pomeni veliko razliko v intenziteti signala. V intervalu od 30 sekund naprej pa

je intenziteta signala manj spremenljiva, zato smo se odločili za čas izpostavitve filma na membrani 1 minuto in več.

5.1.3 Zaznavanje proteina AKR1C3 v celičnih linijah

Prisotnost proteina AKR1C3 smo preučevali v štirih celičnih linijah (Hep G-2, celična linija raka jeter; Ishikawa, celična linija raka endometrija; MCF-7, celična linija raka dojke in JEG-3, celična linija raka horionskih resic). Celična linija Hep G-2 nam je služila kot kontrola, saj so v tej celični liniji prisotne vse izoblike AKR1C (Penning in sod., 2000). Celično linijo raka endometrija Ishikawa smo uporabili za primerjavo z vzorci raka endometrija in okolnega endometrija. Celični liniji MCF-7 in JEG-3 smo vključili, ker gre v obeh primerih za od hormonov odvisno obliko raka. Poleg tega so o prisotnosti AKR1C3 v dojkah in placenti poročali številni raziskovalci (Lin in sod., 1997, Dufort in sod., 1999, Pelletier in sod. 1999, Labrie in sod. 2000, Pelletier in sod. 2001, Vihko in sod. 2004, Lin in sod. 2004).

Prisotnost AKR1C3 smo pričakovali pri vseh celičnih linijah, vendar smo AKR1C3 zaznali le v celičnih linijah Hep G-2 in Ishikawa, pri celičnih linijah MCF-7 in JEG-3 pa ne. Predvsem je zanimiva odsotnost AKR1C3 v celični liniji MCF-7, saj v strokovni literaturi opisujejo AKR1C3 kot enega izmed dejavnikov pri nastanku raka dojke (Pelletier in sod., 2001, Lin in sod., 2004). Vzrok za odsotnost AKR1C3 pri celičnih linijah MCF-7 in JEG-3 bi lahko bili pogoji gojenja celične linije, pri katerih se gen *AKR1C3* ni izrazil.

5.1.4 Zaznavanje proteina AKR1C3 v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija

V 16 parih vzorcev raka endometrija in normalnega endometrija smo preučevali prisotnost AKR1C3. Za kontrolo nanašanja smo uporabili protein β -aktin. Po kvantifikaciji s programom UN-SCAN-IT smo AKR1C3 normirali z β -aktinom in relativno razmerje predstavili z grafi. Zaznali smo povisane vrednosti AKR1C3 v 9 vzorcih rakavega tkiva v primerjavi z normalnim in v 4 vzorcih normalnega endometrija v primerjavi z rakavim. Pri treh vzorcih bolnic pa AKR1C3 nismo zaznali ne v rakavem ne v normalnem tkivu. Da bi dokazali statistično značilnost razlik med normalnim in rakavim tkivom, smo uporabili Wilcoxonov neparametrični test za pare s stopnjo zaupanja 0,05. Ta test smo izbrali, ker je primeren tudi za manjše število vzorcev. Poskušali smo ovreči hipotezo (H_0), da je količina AKR1C3 v normalnem in rakavem tkivu enaka. Po tem izračunu razlika med normalnim in

rakovim tkivom s 95 % stopnjo zaupanja ni bila statistično značilna saj smo dobili vrednost p 0,055 ($>0,05$). Izračunali smo tudi povprečje razmerja vrednosti celokupnega števila točk med AKR1C3 in β -aktinom vseh vzorcev ločeno za normalno in rakavo tkivo. Iz izračuna smo opazili, da je povprečje količine AKR1C3 v rakavem tkivu vzorcev 2,5 krat večje kot v normalnemu tkivu.

V primeru 12 vključenih vzorcev smo razpolagali z rezultati študije o izražanju AKR1C3 na mRNA ravni (Lanišnik Rižner in sod., 2006). S primerjanjem izražanja AKR1C3 na mRNA ravni in na ravni proteinov smo ugotovili skladnost pri 4 vzorcih. Vzroke za neskladja v 8 vzorcih bi lahko iskali v samih mehanizmih nastanka proteina in pa v nestabilnosti in hitri razgradljivosti mRNA. Možen je tudi vpliv razgradnje proteinov s proteazami. Tudi zaznava samega proteina v tkivu še ne pomeni njegove aktivnosti v celici oziroma tkivu. Le-to bi morali preveriti z encimskim testom.

Na osnovi večje količine AKR1C3 v večini vzorcev raka endometrija (9 od 16), lahko sklepamo, da AKR1C3 vpliva na razvoj raka endometrija. Verjetno AKR1C3 v endometriju povzroča povečanje koncentracije aktivnega EoL in znižanje koncentracije aktivnega P, ki nasprotuje estrogenkemu proliferativnemu vplivu in tako najverjetneje odločilno prispeva k pro-estrogenkemu stanju in k večji verjetnosti za razvoj raka (Penning in sod. 2003, Ito in sod., 2006, Lanišnik Rižner in sod. 2006).

5.1.5 Ocena mase proteina AKR1C3 v vzorcih raka endometrija in okolnega normalnega tkiva

Po izbiri ustreznih pogojev za zaznavanje proteinov AKR1C3 in β -aktina smo pripravili umeritveno krivuljo za oceno mase AKR1C3 v vzorcih. Krivulji smo dodali trendno črto. Zaradi možnosti napak pri neenotnih pogojih med detektiranjem proteinov na različnih membranah (majhne razlike v časih izpostavitve filmov na membrani in različen čas razvijanja filma v razvijalcu), smo količino AKR1C3 zgolj ocenili.

S pomočjo enačbe trendne črte smo iz celokupnega števila točk za posamezen vzorec ocenili maso proteina AKR1C3. Oceno mase AKR1C3 smo podali na podlagi dveh izračunov. Pri prvem izračunu nismo upoštevali referenčne vrednosti za 0,1 μ g rekombinantnega AKR1C3 nanašenega na istem gelu, oziroma membrani, pri drugem izračunu pa smo to referenčno vrednost upoštevali. Glede na to, da nismo imeli podatkov za referenčno vrednost za vseh 16 vzorcev ampak le za 11, smo v drugem primeru

upoštevali le 11 vzorcev. Ocena mase na podlagi prvega izračuna se giblje od 0 µg do 0,88 µg proteina AKR1C3 na 100 µg nanešenega vzorca proteinov, ocena mase na podlagi drugega izračuna pa od 0 µg do 0,94 µg proteina AKR1C3 na 100 µg nanešenega vzorca proteinov.

Zaradi nekoliko različnih pogojev med posameznimi poskusi zaznavanja proteina AKR1C3 (različen čas izpostavitve filma na membrani in razvijanja filma, enakomernost nanosa vzorcev), je ocena mase proteina AKR1C3 z upoštevanjem referenčnih vrednosti bolj zanesljiva. Z upoštevanjem referenčnih vrednosti se nekatere razlike v pogojih izničijo. Največje razlike med obema ocenama so pri vzorcih 11N, 23N, 23T in 26T. Obe oceni mase proteinov sta primerljivi med seboj. Količina proteina AKR1C3 v tkivu se giblje med 0 in 1 % celotne količine proteinov. V večini vzorcev je masa proteina AKR1C3 večja v rakavem tkivu kot v normalnem tkivu.

S primerjanjem normiranih vrednosti AKR1C3 na β -aktin in ocene mase AKR1C3 v tkivih opazimo, da se pri vzorcih 21, 23 in 27 razmerje med normalnim tkivom in tkivom tumorja obrne. V tem primeru so normirane vrednosti bolj zanesljive, saj z normalizacijo na β -aktin izničimo morebitne razlike v nanosu proteinov. Primerjava rezultatov razmerja AKR1C3/ β -aktin ali rezultatov ocene mase proteina AKR1C3 v vzorcih s kliničnimi podatki bolnic ne pokaže nobene povezave med pojavnostjo AKR1C3 v tkivu in pa stopnjo diferenciacije tkiva raka endometrija ali starostjo bolnic. Za ugotavljanje povezave med kliničnimi podatki bolnic in izražanjem AKR1C3 bi potrebovali večje število vzorcev.

5.1.6 Zaznavanje proteina AKR1C3 na ravni celic

Prisotnost AKR1C3 smo želeli potrditi tudi na celični ravni. Parafinske rezine petih vzorcev (10, 11, 13, 24, 26) raka endometrija in okolnega normalnega endometrija smoobarvali s protitelesi proti AKR1C3. Protein AKR1C3 je lepo viden v citoplazmi celic tubularnih endometrialnih žlez. Nismo pa ga zasledili v celicah strome. AKR1C3 je bil prisoten pri 4 vzorcih v celicah raka endometrija (10, 11, 13 in 24) in pri 1 vzorcu (26) v celicah normalnega tkiva. Pri vzorcu 26 ne gre v celoti za normalno tkivo ampak je delno že hiperplazija in meji na rakavo tkivo. Pri treh vzorcih (11, 13 in 26) se rezultati imunohistološkega barvanja ujemajo z rezultati prenosa Western. Vzorca številka 10 ne moremo primerjati z rezultati prenosa Western, ker ga nismo vključili v sklop 16 vzorcev. Pri vzorcu 24 pa smo imeli le rakavo tkivo.

5.2 SKLEPI

Izolirali smo proteine iz vzorcev rakavega in normalnega tkiva 16 bolnic in iz 4 celičnih linij. Za zaznavanje proteina AKR1C3 smo izbrali ustrezone pogoje. Določili smo količino izoliranih proteinov za nanos na gel in izbrali ustrezeno redčenje primarnih in sekundarnih protiteles. Preverili smo specifičnost protiteles proti AKR1C3 z dvema rekombinantnima proteinoma. Na podlagi predhodnih študij smo izbrali β -aktin kot interni standard in tudi v tem primeru določili redčenje primarnih in sekundarnih protiteles.

Proučili smo vpliv časa izpostavitve filma na membrani na število izmerjenih točk (celokupno število točk). Opazili smo, da moč signala v prvih 30 sekundah strmo narašča, po tem času pa je naraščanje položno in enakomerno. Optimizirali smo zaznavanje proteinov glede na čas izpostavitve filma na membrani. Za oceno mase proteina AKR1C3 v vzorcih smo pripravili umeritveno krivuljo in iz trendne črte izračunali enačbo premice. Ocenili smo maso proteinov v 16 vzorcih.

Za primerjavo in kontrolo smo uporabili štiri celične linije: Hep G-2, ker so v tej celični liniji prisotne vse izooblike AKR1C, Ishikawa, ker je celična linija raka endometrija, MCF-7 in JEG-3, ker sta celični liniji dveh od hormonov odvisnih oblik raka. Predvsem nas je zanimala prisotnost proteina AKR1C3 v celični liniji Ishikawa, kjer smo jo tudi potrdili.

V večini vzorcev (9 od 16) izoliranih proteinov smo zasledili povisane vrednosti proteina AKR1C3 v rakavem tkivu endometrija v primerjavi z normalnim tkivom. AKR1C3 torej lahko vpliva na razvoj raka endometrija. Prisotnost proteina AKR1C3 smo dokazali tudi z imunohistokemijo. Protein AKR1C3 smo zaznali v žleznih celicah endometrija 4 od 5 vzorcev rakavega tkiva in v 1 vzorcu normalnega, delno rakavega tkiva.

Rezultati nakazujejo vpletenost AKR1C3 v razvoj raka endometrija, vendar bo potrebno hipotezo preveriti še na večjem številu vzorcev. Boljše razumevanje in opredelitev pomena AKR1C3 pri nastanku raka endometrija bi lahko pripomoglo tudi k razvoju novih potencialnih zdravil za to bolezen.

6 POVZETEK

Rak endometrija je od hormonov odvisna oblika raka. Je najpogostejsa oblika raka reproduktivnih organov in četrta najpogostejsa oblika raka pri ženskah v Sloveniji. Število novih primerov raka endometrija v Sloveniji še vedno narašča. Pojavnost je najpogostejsa pri ženskah po menopavzi. Tveganje za nastanek raka je večje pri ženskah z zgodnjo prvo menstruacijo in/ali pozno menopavzo ter pri ženskah brez otrok. Med dejavnike tveganja prištevamo tudi nadomestno estrogenско terapijo brez dodatka P, kontracepcijjska sredstva z visoko ravnjo estrogena in debelost. Tveganje za nastanek te bolezni zmanjšujejo fizična aktivnost, nosečnost in kombinirana kontracepcija.

Poznane so tri poti razvoja raka endometrija, preko hiperplazije, metaplasije ali *de novo*. Vse tri poti vključujejo začetno fazo, kjer se pojavi genske in biološke nepravilnosti, fazo napredovanja s serijo celičnih in tkivnih sprememb in fazo širjenja lezij od normalnega epitelija do benignega in malignega tumorja. Znano je, da so v razvoju te bolezni vključeni estrogeni in progestageni, ki med menstrualnim ciklusom izmenično delujejo preko ustreznih znotrajceličnih receptorjev ER α in ER β oziroma PRa in PRb. Med proliferacijsko fazo so bolj dejavni estrogeni, ki spodbujajo deljenje celic žleznega epitelija. V sekrecijski fazi je močnejše delovanje progestagenov, ki vodijo celice endometrija v diferenciacijo in tako nasprotujejo mitogenemu delovanju estrogenov. Povišana koncentracija estrogenov ob hkratni znižani koncentraciji progestagenov vpliva na pospešeno delitev celic endometrija, z večjim številom celičnih delitev pa je povečana možnost za nastanek in kopiranje naključnih genetskih napak in razvoj raka.

Na predreceptorski ravni imajo središčno vlogo v metabolizmu in pri uravnavanju aktivnosti steroidnih hormonov HSD. Med HSD uvrščamo tudi AKR1C3 iz proteinske nadržine AKR. AKR1C3 je encim, ki s svojo 17 β -HSD in 20 α -HSD aktivnostjo pretvori neaktivno obliko E v aktivno E₀ in aktivno obliko P v neaktivni 20 α OHP. Možno je, da AKR1C3 s svojo aktivnostjo ključno vpliva na nastanek raka endometrija in tako predstavlja potencialno tarčo za razvoj novih zdravil.

Namen diplomske naloge je bil preučiti izražanje proteina 17 β -HSD AKR1C3 v rakavem tkivu in okolnem normalnem tkivu endometrija. Iz vzorcev 16 bolnic in štirih celičnih linij, ki so nam služile za primerjavo, smo izolirali proteine in določili njihovo koncentracijo in maso. Prisotnost proteina AKR1C3 smo proučevali v primerjavi s hišnim proteinom β -aktinom. Količina izoliranih proteinov v vzorcih bolnic in celičnih linij je bila od 283 μ g

do 3660 μ g, odvisno od začetne količine vzorca in uspešnosti izolacije. Z metodami SDS PAGE elektroforezo, prenosom Western in detekcijo z ojačano kemiluminiscenco smo ugotavljali prisotnost proteina AKR1C3 in hišnega proteina β -aktina. Določili smo ustrezne pogoje za detekcijo, ustrezne koncentracije primarnih in sekundarnih protiteles proti AKR1C3 in β -aktinu in ustrezen čas izpostavitve filma na membrani. Dobljene rezultate na filmu smo ovrednotili z računalniškim programom.

Izmed štirih celičnih linij smo zaznali AKR1C3 pri Hep G-2, celični liniji raka jeter, kjer so izražane vse izoblike AKR1C in nam je služila kot kontrola, ter pri celični liniji raka endometrija, Ishikawa, ki nam je služila za primerjavo z vzorci raka endometrija in okolnega endometrija. Pri celičnih linijah raka dojke, MCF-7, in raka horionskih resic, JEG-3, AKR1C3 nismo zaznali. Ti dve celični liniji smo vključili, ker gre v obih primerih za od hormonov odvisne oblike raka in bi na podlagi literature tudi pričakovali prisotnost AKR1C3. Vzrok za odsotnost AKR1C3 pri teh dveh celičnih linijah so lahko v pogojih gojenja obeh celičnih linij.

Povišane vrednosti AKR1C3 normirane na β -aktin smo zaznali v 9 vzorcih rakavega tkiva in v 4 vzorcih normalnega endometrija. Pri 3 vzorcih proteina AKR1C3 nismo zaznali ne v rakavem ne v normalnem tkivu. Povprečje razmerja vrednosti celokupnega števila točk med AKR1C3 in β -aktinom vseh vzorcev, posebej za normalno in rakavo tkivo, nam je pokazalo, da je povprečna količina AKR1C3 2,5 krat večja v rakavem kot v normalnem tkivu. S primerjanjem izražanja AKR1C3 na mRNA in na ravni proteinov pri 12 vzorcih, smo ugotovili skladnost pri 4 vzorcih in obratno izražanje pri 8 vzorcih. Na neskladja v 8 vzorcih je poleg nestabilnosti in hitre razgradljivosti mRNA lahko vplivala tudi razgradnja proteinov s proteazami. Naši rezultati govorijo v prid hipotezi, da AKR1C3 svojim delovanjem odločilno prispeva k pro-estrogenskemu stanju v endometriju in tako verjetno vpliva na razvoj raka endometrija.

Prisotnost AKR1C3 smo potrdili tudi na celični ravni z imunohistološkim barvanjem. Izmed petih vzorcev smo AKR1C3 zasledili pri 4 vzorcih v tubularnih žlezah raka endometrija in pri enem vzorcu v tubularnih žlezah normalnega tkiva. Pri 3 vzorcih se rezultati imunohistološkega barvanja ujemajo z rezultati analize prenosa Western. Čeprav naši rezultati nakazujojo, da AKR1C3 lahko vpliva na razvoj raka endometrija, bo potrebno hipotezo preveriti na večjem številu vzorcev. Rezultati diplomskega dela prispevajo k boljšemu razumevanju in opredelitvi pomena AKR1C3 pri nastanku raka endometrija.

7 VIRI

Baker M.E. 2001. Evolution of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action. Molecular and Cellular Endocrinology, 171: 211-215

Ballaré C., Vallejo G., Vicent G.P., Saragüeta P., Beato M. 2006. Progesterone signaling in breast and endometrium. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 102 (1-5): 2-10

Bauman D.R., Rudnick S.I., Szewczuk L.M., Jin Y., Gopishetty S., Penning T.M. 2005. Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human aldo-keto reductase isoforms: Potential antineoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes. Molecular Pharmacology, 67: 60-68

Berstein L.M., Tchernobrovkina A.E., Gamajunova V.B., Kovalevskij A.J., Vasilyev D.A., Chepik O.F., Turkevitch E.A., Tsyrllina E.V., Maximov S.J., Ashrafian L.A., Thijssen J.H.H. 2003. Tumor estrogen content and clinico-morphological and endocrine features of endometrial cancer. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 129: 245-249

Berstein L., Zimarina T., Imyanitov E., Kovalevskij A., Maximov S., Pujol P., Thijssen J. 2006. Hormonal imbalance in two types of endometrial cancer and genetic polymorphism of steroidogenic enzymes. Maturitas, 54 (4): 352-355

Bray F., Silva I.S., Moller H., Weiderpass E. 2005. Endometrial cancer incidence trends in Europe: Underlying determinants and prospects for prevention. Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention, 14(5): 1132-42

Desmond J.C., Mountford J.C., Drayson M.T., Walker E.A., Hewison M., Ride J.P., Luong Q.T., Hayden R.E., Vanin E.F., Bunce C.M. 2003. The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Cancer Research, 63: 505-512

Dufort I., Rheault P., Huang X.F., Soucy P., Luu-The V. 1999. Characteristics of a highly labile human type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Endocrinology, 140:568-574

- El-Alfy M., Luu-The V., Huang X.F., Berger L., Labrie F., Pelletier G. 1999. Localization of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology*, 140: 1481-1491
- Ferguson R.E., Carroll H.P., Harris A., Maher E.R., Selby P.J., Banks R.E. 2005. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*, 5: 566-571
- Flötotto T., Djahansouzi S., Gläser M., Hanstein B., Niederacher D., Brumm C., Beckmann M.W. 2001. Hormones and hormone antagonists: mechanisms of action in carcinogenesis of endometrial and breast cancer. *Horm Metab Res*, 33: 451-457
- Fung K.M., Samara E.N.S., Wong C., Metwalli A., Krlin R., Bane B., Liu C.Z., Yang J.T., Pitha J.V., Culkin D.J., Kropp B.P., Penning T.M., Lin H.K. 2006. Increased expression of type 2 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) and its relationship with androgen receptor in prostate carcinoma. *Endocrine-Related Cancer*, 13: 169-180
- Henderson B.E., Feigelson H.S. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3): 427-433
- Hyndman D., Bauman D.R., Heredia V.V., Penning T.M. 2003. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144: 621-631
- Inoue M. 2001. Current molecular aspects of the carcinogenesis of the uterine endometrium. *International Journal of Gynecological Cancer*, 11: 339-348
- Ito K., Utsunomiya H., Suzuki T., Saitou S., Akahira J.I., Okamura K., Yaegashi N., Sasano H. 2006. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases in human endometrium and its disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248: 136-140
- Jez J.M., Penning T.M. 2001. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: An update. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132: 499-525

Komoto J., Yamada T., Watanabe K., Takusagawa F. 2004. Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry*, 43: 2188-2198

Krazeisen A., Breitling R., Möller G., Adamski J. 2001. Phytoestrogens inhibit human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171:151-162

Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Simard J., Labrie C., El-Alfy M., Pelletier G., Bélanger A. 2000. Introcrinology: Role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Endocrinology*, 25: 1-16

Lanišnik Rižner T., Šinkovec J. 2004. Vloga hidroksisteroid-dehidrogenaz pri uravnavanju aktivnosti estrogenov in progestagenov: primer raka endometrija in endometrioze. *Medicinski razgledi*, 43: 419-428

Lanišnik Rižner T., Šmuc T., Rupreht R., Šinkovec J., Penning T.M. 2006. AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248: 126-135

Lin H.K., Jez J.M., Schlegel B.P., Peehl D.M., Pachter J.A., Penning T.M. 1997. Expression and characterization of recombinant type 2 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: Demonstration of bifunctional 3 α /17 β -HSD activity and cellular distribution. *Molecular Endocrinology*, 11: 1971-1984

Lin H.K., Steckelbroeck S., Fung K.M., Jones A.N., Penning T.M. 2004. Characterization of a monoclonal antibody for human aldo-keto reductase AKR1C3 (type 2 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase); immunohistochemical detection in breast and prostate. *Steroids*, 69:795-801

Liu F.S. 2007. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 46(1): 26-32

Lovering A.L., Ride J.P., Bunce C.M., Desmond J.C., Cummings S.M., White S.A. 2004. Crystal Structures of Prostaglandin D₂ 11-Ketoreductase (AKR1C3) in Complex with the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Flufenamic Acid and Indomethacin. *Cancer Research*, 64: 1802-1810

Nahoum V., Gangloff A., Legrand P., Zhu D.W., Cantin L., Zhorov B.S., Luu-The V., Labrie F., Breton R., Lin S.X. 2001. Structure of the human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in complex with testosterone and NADP at 1.25-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (45): 42091–42098

Nobel S., Abrahmsen L., Opperman U. 2001. Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *European Journal of Biochemistry*, 268: 4113-4125

Pelletier G., Luu-The V., Têtu B., Labrie F. 1999. Immunocytochemical localization of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human reproductive tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47(6): 731-737

Pelletier G., Luu-The V., El-Alfy m., Li S., Labrie F. 2001. Immunoelectron microscopic localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland. *Journal of Molecular Endocrinology*, 26: 11-19

Peltoketo H., Luu-The V., Simard J., Adamski J. 1999. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 23: 1-11

Penning T.M. 2003. Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Human Reproduction Update*, 9(3): 193-205

Penning T.M., Burczynski M.E., Jez J.M., Hung C., Lin H., Ma H., Moore M., Palackal N., Ratnam K. 2000. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: Functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *The Biochemical Journal*, 351: 67-77

Incidenca raka v Sloveniji 2003. 2006. Primic-Žakelj M.(ur.), Bračko M., Hočevar M., Pompe-Kirn V., Strojan P., Zadnik V., Zakotnik B., Žagar T. Ljubljana, Register raka za Slovenijo, Onkološki inštitut Ljubljana. Poročilo RR št.45.

Shiozawa T., Konishi I. 2006. Early endometrial carcinoma: Clinicopathology, hormonal aspects, molecular genetics, diagnosis, and treatment. *The International Journal of Clinical Oncology*, 11: 13-21

Steckelbroeck S., Jin Y., Gopishetty S., Oyesanmi B., Penning T.M. 2003. Human cytosolic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 10784-10795

Utsunomiya H., Ito K., Suzuki T., Kitamura T., Kaneko C., Nakata T., Niikura H., Okamura K., Yaegashi N., Sasano H. 2004. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human endometrial carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10: 5850-5856

Vihko P., Häkkinen P., Soronen P., Törn S., Herrala A., Kurkela R., Pulkka A., Oduwole O., Isomaa V. 2004. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases – their role in pathophysiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215: 83-88

Tri reagentTM Product Information – Technical bulletin. 1999. Sigma®; 6 strani

Western blotting with chemoluminescent substrates: A handbook for beginners, A troubleshooting guide for pros - Featuring the SuperSignal® West Family of Products. 2000. Pierce Chemical Company; 33 strani

Western blotting handbook and troubleshooting guide – Featuring the SuperSignal® West Family of Products. 2005. Pierce Biotechnology, Inc.; 60 strani

ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Tei Lanišnik Rižner za mentorstvo. Hvala za budno spremljanje mojega dela, za pripravljenost vedno prisluhniti in pomagati ter za strokovne nasvete pri praktičnem delu in pisanju naloge.

Posebna zahvala gre Tini Šmuc, ki mi je z nasveti in pomočjo v laboratoriju pomagala pri praktičnem delu, pisanju naloge ter za vzpodbudne besede.

Zahvaljujem se tudi Katji Kristan in Evi Lozič za pomoč v laboratoriju, nasvete in dobro voljo, ter vsem ostalim, ki ste mi kakorkoli pomagali pri študiju in izdelavi diplomske naloge.

Prisrčna hvala tudi tatu, mami ter sestrama, da ste me med časom študija podpirali in spremljali s potrpežljivostjo, prijateljstvom, zgledom in ljubeznijo.

Prav posebej pa se zahvaljujem tudi moji ženi Tini za potrpežljivost in konkretno pomoč pri študiju in diplomi. Hvala, da mi stojiš ob strani tudi takrat, ko ne gre vse gladko.

Hvala vsem!