

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva LOZIČ

**ŠTUDIJE IZRAŽANJA ESTROGENSKIH IN
PROGESTERONSKIH RECEPTORJEV PRI RAKU
ENDOMETRIJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva Ložič

**ŠTUDIJE IZRAŽANJA ESTROGENSKIH IN PROGESTERONSKIH
RECEPTORJEV PRI RAKU ENDOMETRIJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EXPRESSION STUDIES OF ESTROGEN AND PROGESTERONE
RECEPTORS IN ENDOMETRIAL CANCER**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2008

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

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

Datum zagovora: 6.3.2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Eva LOZIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 577.2:616.6(043.2)=163.6
KG rak endometrija / receptorji / ER α / ER β / PR-A/ PR-B /
KK
AV LOZIČ, Eva
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 ESTROGENSKIH IN PROGESTERONSKIH RECEPTORJEV PRI RAKU ENDOMETRIJA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP
IJ sl
JI sl/en
AI Rak endometrija je od hormonov odvisna oblika raka. 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 celic endometrija, kar poveča možnost nastanka in kopičenja naključnih genetskih napak in razvoj malignega fenotipa. Progestageni delovanju estrogenov nasprotujejo in usmerjajo celice v diferenciacijo. Uravnavanje delovanja estrogenov in progestagenov poteka na ravni izražanja receptorjev, pa tudi na predreceptorski ravni. V okviru diplomske naloge smo ugotavljali prisotnost in količino estrogenskih receptorjev ER α in ER β ter progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B v celičnih linijah JEG-3, MCF-7, HepG2 in Ishikawa ter vzorcih raka endometrija in okolnega normalnega endometrija 16 bolnic. Iz vzorcev smo izolirali proteine ter z metodami SDS PAGE elektroforezo, prenosom western in detekcijo z ojačano kemiluminiscenco ugotavljali prisotnost receptorjev in hišnega proteina β -aktina. ER β smo potrdili v vseh celičnih linijah, za PR-B signala nismo zaznali le pri celični liniji raka endometrija Ishikawa. Za ER α in PR-A signala v nobenem od vzorcev kot tudi v celičnih linijah nismo zaznali, verjetno zaradi nedelovanja primarnih protiteles proti ER α in PR-A. V 12 vzorcih rakavega tkiva smo dokazali povišane vrednosti ER β in PR-B, normirane na β -aktin. Statistično značilno razliko smo potrdili za PR-B. Z imunohistološkim barvanjem smo potrdili prisotnost PR-B v celicah žlez endometrija v vzorcih 3 bolnic, nismo pa ga zasledili v celicah strome. Naši rezultati nakazujejo vpletenost estrogenskih in progesteronskih receptorjev v nastanek raka endometrija. Hipotezo bo potreba v prihodnje preveriti na večjem številu vzorcev, proučiti bi bilo treba tudi pomen izooblik in polimorfizmov receptorjev pri razvoju kancerogeneze. Rezultati diplomskega dela bodo prispevali k boljšemu razumevanju in opredelitvi pomena receptorjev pri nastanku raka endometrija.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.2:616.6(043.2)=163.6
CX endometrial cancer/ receptors / ER α / ER β / PR-A/ PR-B /
CC
AU LOZIČ, Eva
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 ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTORS
IN ENDOMETRIAL CANCER
DT Graduation Thesis (University studies)
NO
LA Sl
AL sl/en
AB Endometrial carcinoma is a hormone dependent form of cancer. Hormonal unbalance triggers an increased estrogen production in the tissue that leads to accelerated cell proliferation which results in a higher possibility of occurrence and accumulation of random genetic errors and the development of the malignant phenotype. Progestagens oppose the action of estrogens and lead the cells into the differentiation. Estrogen and progesterone action can be regulated at the pre-receptor and the receptor levels. In our study we examined the presence and the quantity of the estrogen receptors ER α and ER β and the progesterone receptors PR-A and PR-B in cell lines JEG-3, MCF-7, HepG2 and Ishikawa and the samples of endometrial cancer and adjacent normal endometrium from 16 female patients. We isolated the proteins from the samples and by SDS PAGE electrophoresis, Western blot analysis and enhanced chemiluminescence detection analyzed the expression of receptors and housekeeping protein β -actin. We detected ER β in all cell lines, while PR-B was not detected only in the Ishikawa cell line. ER α and PR-A were not detected in all of the tissue samples as well as in all cell lines, probably because of malfunction of primary antibodies. We found a higher ER β / β -actin and PR-B/ β -actin ratio in 12 samples of cancerous tissue compared to adjacent samples. Statistically characteristic difference was determined only for PR-B. The expression of PR-B was confirmed by immunohistological staining at the cellular level, PR-B was observed in endometrial gland cells in samples of 3 patients; however, it was not found in stromal cells. The results indicate the possible involvement of receptors in development of endometrial cancer. The hypothesis should in future be confirmed also on a larger number of samples. Furthermore, the effect of isoforms and polymorphisms of estrogen and progesterone receptors on development of endometrial cancer should also be examined. Our results will contribute to a better understanding and evaluation of receptors' effect on cancerogenesis.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key Words Documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VIII
Kazalo slik.....	IX
Okrajšave in simboli.....	XI
Trivialna imena steroidov.....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 HORMONSKO ODVISNE OBLIKE RAKA.....	3
2.1.1 Endometriji in rak endometrija.....	3
2.1.1.1 Tipi raka endometrija.....	4
2.1.2 Potek kancerogeneze pri raku endometrija na molekularni ravni.....	6
2.1.2.1 Molekularne spremembe pri razvoju raka endometrija preko hiperplazije (tip I).....	7
2.1.2.2 Molekularne spremembe pri razvoju raka endometrija preko metaplazije (tip II).....	8
2.1.2.3 Nastanek raka endometrija <i>de novo</i>	8
2.1.3 Dejavniki tveganja in zaščite pri raku endometrija.....	9
2.1.4 Zdravljenje raka endometrija.....	11
2.2 STEROIDNI HORMONI.....	12
2.2.1 Spolni hormoni.....	14
2.2.2 Delovanje spolnih hormonov.....	16
2.3 URAVNAVANJE DELOVANJA HORMONOV NA RECEPTORSKI RAVNI.....	18
2.3.1 Struktura steroidnih receptorjev ter uravnavanje prepisovanja genov.....	18
2.3.2 Estrogenski receptorji.....	20
2.3.2.1 Aktivnost estrogenskih receptorjev.....	22
2.3.2.2 Izražanje estrogenskih receptorjev.....	22
2.3.3 Progesteronski receptorji.....	23
2.3.3.1 Aktivnost progesteronskih receptorjev.....	24
2.3.3.2 Izražanje progesteronskih receptorjev.....	25
2.3.4 Vloga steroidnih receptorjev pri kancerogenezi.....	26
2.3.4.1 Vloga estrogenskih receptorjev ER α in ER β pri kancerogenezi.....	26
2.3.4.2 Vloga progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B pri kancerogenezi..	27

3 MATERIAL IN METODE	29
3.1 MATERIAL.....	29
3.1.1 Kemikalije	29
3.1.2 Laboratorijska oprema	30
3.1.3 Protitelesa, serumi in standardi	32
3.2 METODE.....	33
3.2.1 Izolacija proteinov	33
3.2.2 Izolacija DNA	36
3.2.3 Določevanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo	37
3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS PAGE) ..	38
3.2.5 Prenos proteinov na membrano (prenos western)	41
3.2.6 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL)	44
3.2.7 Odstranjevanje protiteles (»Stripping«) in ponovna detekcija proteinov na membrani	45
3.2.8 Barvanje gela z barvilom Coomassie Brilliant Blue	47
3.2.9 Imunohistokemijsko barvanje	48
3.2.10 Računalniška obdelava podatkov	51
3.2.11 Statistična analiza	51
4 REZULTATI	52
4.1 IZOLACIJA PROTEINOV.....	52
4.2 ZAZNAVANJE ER β , PR-B TER β -AKTINA V CELIČNIH LINIJAH.....	53
4.3 ZAZNAVANJE ER β IN PR-B V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA.....	55
4.3.1 Statistična obdelava rezultatov razmerja ER BETA / BETA AKTIN in PR-B / BETA AKTIN	66
4.4 ZAZNAVANJE RECEPTORJEV ER α IN PR-A V CELIČNIH LINIJAH IN V VZORCIH RAKA ENDO METRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA.....	68
4.4.1 Zaznavanje receptorja ERα v celičnih linijah in v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija	68
4.4.2 Zaznavanje receptorja PR-A v celičnih linijah in v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija	69
4.5 IMUNOHISTOKEMIJA.....	71
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	73
5.1 RAZPRAVA.....	73
5.1.1 Vzorci tkiva endometrija	74
5.1.2 Izolacija proteinov	74
5.1.3 Izbira ustreznih pogojev za zaznavanje ERβ in PR-B ter izbira ustreznega hišnega proteina	75
5.1.3.1 Izbira ustreznih primarnih in sekundarnih protiteles za zaznavanje ER β in PR-B.....	75
5.1.3.2 Izbira ustreznega hišnega proteina.....	75
5.1.4 Zaznavanje ERβ, PR-B ter hišnega proteina β-aktina v celičnih linijah	76

5.1.5 Zaznavanje ERβ ter PR-B v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija.....	77
5.1.6 Zaznavanje PR-B na ravni celic.....	79
5.1.7 Nezaznavanje ERα ter PR-A v celičnih linijah in v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija.....	79
5.2 SKLEPI.....	82
6 POVZETEK.....	84
7 VIRI.....	87

ZAHVALE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1	Histološka klasifikacija raka endometrija.....	5
Preglednica 2	Klasifikacija dejavnikov tveganja za nastanek raka endometrija ter zaščitnih dejavnikov.....	9
Preglednica 3	Klasifikacija vzorcev raka endometrija.....	34
Preglednica 4	Koncentracija in masa izoliranih proteinov iz vzorcev rakavega in okolnega normalnega endometrija in celičnih linij.....	52
Preglednica 5	Vrednosti za celotno število točk za ER β , PR-B in β -aktin v normalnem (N) in tumorskem (T) tkivu vzorcev.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1	Tri poti kancerogeneze in molekularne spremembe, značilne za posamezno pot.....	6
Slika 2	Steroidni skelet z oštevilčenimi ogljikovimi atomi in oznakami obročev.....	12
Slika 3	Prikaz sinteze steroidnih hormonov iz holesterola.....	13
Slika 4	Strukturne formule glavnih predstavnikov androgenov, estrogenov in progestagenov. a) testosteron, b) estradiol in c) progesteron.....	14
Slika 5	Strukturne formule aktivne oblike estradiola, neaktivnih oblik estrona in estriola ter nekaterih drugih hidroksi oblik estrona, s prikazom pretvarjanja ene oblike v drugo..	15
Slika 6	Strukturni formuli aktivne oblike progesterona in manj aktivne oblike 20 α - hidroksiprogesterona ter prikaz pretvarjanja ene oblike v drugo s pomočjo encima 20 α -HSD	16
Slika 7	Prikaz strukturnih domen molekule jedrnega receptorja.....	18
Slika 8	Shematski prikaz delovanja steroidnega receptorja. 1) vezava hormona na receptor, 2) dimerizacija aktiviranega receptorja, 3) vezava dimera na HRE vezavno mesto na molekuli DNA, 4) vezava ustreznih koregulatorjev in prepisovanje tarčnih genov....	19
Slika 9	Primerjava strukture in homologije med estrogenskima receptorjema ER α in ER β . Prikazan je procent identičnosti med posameznimi domenami na aminokislinski ravni.....	20
Slika 10	Shemi 3D strukture dimera estrogenskega receptorja α z vezanim ligandom in dimera estrogenskega receptorja β z vezanim analogom estrogena	21
Slika 11	Shemi klasične in alternativne poti delovanja estrogenskih receptorjev.....	22
Slika 12	Slika A prikazuje 3D strukture dimera progesteronskega receptorja z vezanim ligandom, slika B prikazuje primerjavo strukture med progesteronskima receptorjema PR-A in PR-B.....	24
Slika 13	Shema naprave za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti SDS (SDS PAGE).....	39
Slika 14	Shema naprave za prenos western (Western Blot).....	42
Slika 15	Potek katalizirane reakcije med vodikovim peroksidom in luminolom.....	44
Slika 16	Shematski prikaz poteka odstranjevanja protiteles.....	46
Slika 17	Shema vezave primarnih protiteles, sekundarnih protiteles in PAP kompleksa (peroksidaza anti peroksidaza kompleks).....	48
Slika 18	SDS-PAGE gel celičnih linij po barvanju s Coomassie Brilliant Blue.....	53
Slika 19	Film po zaznavanju ER β v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.....	54
Slika 20	Film po zaznavanju PR-B v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.....	54

Slika 21	Film po zaznavanju β -aktina v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.....	54
Slika 22	Zaznavanje ER β , PR-B in hišnega proteina β -aktina v 16 vzorcih rakavega tkiva endometrija (T) in okolnega normalnega tkiva (N).....	64
Slika 23	Razmerje ER β / β -AKTIN za 16 vzorcev (normalno tkivo, tkivo tumorja).....	65
Slika 24	Razmerje PR-B / β -AKTIN za 16 vzorcev (normalno tkivo, tkivo tumorja).....	65
Slika 25	Povprečne vrednosti razmerja ER β / β -AKTIN v vzorcih normalnega in rakavega tkiva, s prikazano standardno napako.....	66
Slika 26	Povprečne vrednosti razmerja PR-B / β -AKTIN v vzorcih normalnega in rakavega tkiva, s prikazano standardno napako.....	67
Slika 27	Film po zaznavanju estrogenskega receptorja ER α v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.....	68
Slika 28	Film po zaznavanju progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.....	69
Slika 29	Zaznavanje progesteronskega receptorja PR-B po prenosu western in ECL reakciji v devetih vzorcih rakavega tkiva endometrija (T) in okolnega normalnega tkiva (N) ter pri pozitivni kontroli JEG-3.....	70
Slika 30	Histološki preparat, vzorec 10, obarvan z imunohistokemijsko metodo.....	71
Slika 31	Histološki preparat, vzorec 13, obarvan z imunohistokemijsko metodo.....	71
Slika 32	Histološki preparat, vzorec 24, obarvan z imunohistokemijsko metodo.....	72

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

c	koncentracija
Da	dalton
ER α	estrogenski receptor alfa
ER β	estrogenski receptor beta
PR-A	progesteronski receptor A
PR-B	progesteronski receptor B
MCF-7	celična linija raka dojke
Hep G-2	celična linija raka jeter
Ishikawa	celična linija raka endometrija
JEG-3	celična linija raka horionskih resic
FIGO	Mednarodna organizacija za ginekologijo in porodništvo (International Federation of Gynecology and Obstetrics)
G1 , G2 , G3	stopnja diferenciacije tkiva
S	serozni karcinom
CC	svetlocelični karcinom
EIC	intraepitelijski karcinom endometrija
K-ras , HER-2/neu	onkogeni
PTEN , p53	tumor-supresorski geni
MSH 2 , MLH 1	»mismatch« DNA popravilni geni
TERT	telomeraza, celična reverzna transkriptaza
EGF-R	receptor za epidermalni rastni faktor
SRM	selektivni modulatorji receptorjev
SERM	selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev
SPRM	selektivni modulatorji progesteronskih receptorjev
AP	aktivatorski protein
SNP	polimorfizem enega nukleotida
FSH	folikel stimulirajoči hormon
LH	luteinizirajoči hormon
HSD	hidroksisteroid-dehidrogenaze
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
SDR	naddružina kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz

NADP ⁺ /H	oksidirana/reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NAD ⁺ /H	oksidirana/reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
AKR	aldo-keto-reduktaze
JLS	jedrni lokalizacijski signal
HRE	od hormonov odzivna regija
SRC	koaktivatorji steroidnih receptorjev
AF	transaktivacijska domena na receptorski molekuli
ERE	od estrogenov odzivna regija
PRE	od progesterona odzivna regija
TRIS	trihidroksietil-aminometan
SDS	natrijev dodecil sulfat
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
APS	amonijev persulfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (C ₆ H ₁₆ N ₂)
Tri reagent	monofazna raztopina gvanidin tiocianata in fenola
DAB	3,3`- diaminobenzidin tetra -hidroklorid
mišja PAP	mišja peroksidaza-anti-peroksidaza
BSA	goveji serumski albumin
TCA	trikloroocetna kislina
PBS	fosfatni pufer (phosphate-buffered saline)
PVDF	poliviniliden difluorid
HRP	hrenova peroksidaza
DMSO	dimetilsulfoksid
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
HPRT	hipoksantin fosforiboziltransferaza
PLA2	fosfolipaza-A2
(p)	stopnja zaupanja
H ₀	hipoteza
UN-SCAN-IT	računalniški program
EGFR	epidermalni rastni faktor

TRIVIALNA IMENA STEROIDOV

ime sterola

4-androsten-17 β -ol-3-on

1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol

1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-on

4-pregnen-3,20-dion

4-pregnen-20 α -ol-3-on

trivialno ime

testosteron

estradiol

estron

progesteron

20 α -hidroksiprogesteron

1 UVOD

Rak endometrija (maternične sluznice) je od hormonov odvisna oblika raka. V primeru, da se ravnotežje med estrogeni in progestageni poruši, prihaja zaradi povečane koncentracije estrogenov v tkivu do stimulacije proliferacije celic in s tem do povečanja možnosti naključnih genetskih napak. Tako stanje lahko vodi do hiperplazije endometrija in raka endometrija. Znanstveniki so dokazali višje koncentracije aktivnega estrogena v vzorcih rakavega tkiva endometrija v primerjavi z vzorci normalnega endometrija tako pri pacientkah v pre- kot tudi v pomenopavzni dobi. Uravnavanje delovanja estrogenov in progestagenov poteka na ravni izražanja receptorjev, pa tudi na predreceptorski ravni. Najpogosteje delujejo estrogeni in progestageni preko ustreznih znotrajceličnih estrogenskih in progesteronskih receptorjev (od ligandov odvisnih transkripcijskih faktorjev) na ravni prepisovanja genov. Poznani sta dve ločeni obliki estrogenskih receptorjev, ER α in ER β ter dve obliki progesteronskih receptorjev, PR-A in PR-B.

Za razvoj raka endometrija so poleg višje koncentracije aktivnega estrogena v tkivu pomembne tudi specifična razporeditev receptorjev znotraj celice, spremembe v razmerju ER α / ER β ter PR-A / PR-B, tvorba heterodimerov receptorjev, pojav različnih izooblik ER α , ER β , PR-A in PR-B ter funkcionalni polimorfizmi posameznih receptorjev. Pri raku endometrija ima pomembno vlogo tudi spremenjeno izražanje genov za estrogenske in progesteronske receptorje.

Prisotnost estrogenskih in progesteronskih receptorjev v endometriju je odvisna od tipa celic ter tudi od faze menstruacijskega ciklusa. V zadnjem času proučujejo, ali se geni za receptorje v rakavem tkivu endometrija izražajo drugače ter tako zaradi svoje fiziološke vloge vplivajo na razvoj bolezni. Tovrstne raziskave so ključnega pomena, ker predstavljajo jedrni receptorji za spolne hormone potencialno tarčo za razvoj novih zdravil.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil proučiti prisotnost in količino estrogenskih receptorjev ER α in ER β ter progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B v vzorcih rakavega tkiva endometrija v primerjavi z normalnim endometrijem, pa tudi v izbranih celičnih linijah (MCF-7, HepG2, Ishikawa in JEG-3), ter ugotoviti, kakšne so razlike v prisotnosti / količini receptorjev in kakšen pomen bi te razlike lahko imele za razvoj raka endometrija.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da se geni, ki kodirajo za estrogenska receptorja ER α in ER β ter progesteronska receptorja PR-A in PR-B, različno izražajo v rakavem endometriju v primerjavi z okolnim normalnim tkivom, kar se odraža v različnih količinah proteinov ER α , ER β , PR-A in PR-B.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HORMONSKO ODVISNE OBLIKE RAKA

Med hormonsko odvisne oblike raka prištevamo rak dojke, prostate, endometrija, testisov, jajčnikov, ščitnice ter osteosarkom. Skupno vsem tem oblikam raka je, da na njihov razvoj, za razliko od rakavih obolenj, ki nastanejo pod vplivom drugih dejavnikov (fizikalnih in kemijskih mutagenov ter virusov), odločilno vplivajo hormoni. Tako endogeni kot eksogeni hormoni sprožijo proliferacijo celic. S povečanjem števila celičnih delitev se poveča tudi možnost nastanka naključnih genetskih napak, pri čemer se lahko razvije maligni fenotip (Henderson in sod., 2000).

2.1.1 Endometrij in rak endometrija

Pred puberteto je tkivo endometrija sestavljeno iz tubularnih žlez ter kompaktne strome iz fibroblastov. Kasneje se pod vplivom hormonov v endometriju pričnejo dogajati strukturne in morfološke spremembe, karakteristične za vsak del menstruacijskega ciklusa posebej. Proliferacijski fazi endometrija pod vplivom estrogenov na začetku cikla sledi sekrecijska faza pod vplivom progesterona (Deligdisch, 2000). Ciklične spremembe koncentracije estrogenov in progestagenov med menstruacijskim ciklusom usmerjajo tkivo endometrija od proliferacije preko diferenciacije do degradacije.

V primeru, da se hormonsko ravnotežje poruši in se poveča koncentracija estrogenov v tkivu in s tem tudi njihovo delovanje, prihaja zaradi večje proliferacije do povečanja možnosti naključnih genetskih napak, tako stanje pa lahko vodi do hiperplazije endometrija in raka endometrija (Henderson in Feigelson, 2000). Zaradi povečane koncentracije estrogenov nastaja več metabolitev estrona, ki lahko poškodujejo DNA, prav tako pa lahko kateholi, ki nastanejo iz estradiola s pomočjo citokromov P450, poškodujejo DNA in vplivajo na nastanek raka endometrija. Visoka koncentracija estrogenov v tkivu lahko sproži nastanek raka endometrija torej preko dveh mehanizmov: preko direktnih poškodb DNA z metabolnimi produkti estrogenov ter delovanjem kateholov in s stimulacijo proliferacije (Sherman, 2000).

Rak endometrija je primarni maligni epiteljski tumor, ki se pojavi v endometriju (sluznici maternice). Od tu se lahko razširi tudi v miometrij in na bližnje organe, npr. ovarij ali omentum (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004). Rak endometrija je najpogostejši maligni tumor ženskega genitalnega trakta v razvitem svetu ter četrto najpogostejše maligno obolenje pri ženskah na splošno, za rakom dojk, pljučnim rakom ter rakom debelega črevesa (Prat, 2004 in Ryan in sod., 2005). Vsako leto zbolijo za rakom endometrija okoli 142 000 žensk po vsem svetu, od tega je za okoli 42 000 žensk ta oblika raka smrtna. V svetovnem merilu je rak endometrija sedma najpogostejša oblika raka (Amant in sod., 2005). 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 pa je najpogostejša pri ženskah po menopavzi. V letih 1999–2003 je bilo v Sloveniji odkritih 27,5 primerov na 100.000 ljudi, napovedi za leto 2007 so bile 31 primerov na 100.000 ljudi (Primic-Žakelj in sod., 2006).

2.1.1.1 Tipi raka endometrija

Približno 10 % raka endometrija je dedno pogojenega, večja verjetnost je, da se taka oblika raka pojavi v zgodnejši dobi, najpogosteje v povezavi z dedno obliko nepolipoznega raka debelega črevesa, pri katerem se pojavijo nepravilnosti v genih za popravljanje neujemanja DNA baznih parov v zarodni liniji, katerih posledica je nestabilnost mikrosatelitov v DNA. Večina primerov raka endometrija (90 %) pa je sporadičnih in te lahko razdelimo na podlagi klinično-patoloških in molekularnih karakteristik v dve kategoriji (*preglednica 1*) (Ryan in sod., 2005):

V prvo skupino spadajo od estrogenov odvisni (prisotni so estrogenski in progesteronski receptorji) primeri raka endometrija (tip I), ki se pojavijo pri mlajših in močnejših ženskah ter ženskah brez otrok v pre- in po- menopavzni dobi. Morfološko gledano je večina tumorjev iz te skupine endometrioidnih adenokarcinomov, ki se razvijejo preko kompleksnih hiperplazij endometrija (Shiozawa in Konishi, 2006). Atipična hiperplazija endometrija je nedvomno prekurzor večine endometrioidnih karcinomov (Sherman, 2000). Ta tip tumorjev lahko po FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) sistemu razdelimo v več razredov glede na stopnjo diferenciacije. Za G1 razred je značilna visoka diferenciacija z dobro razvitimi žlezami in manj kot 5 % slabše diferenciranih predelov, za G2 razred pa je

značilna zmerna diferenciacija, kjer 6-50 % površine zajemajo slabše diferencirani predeli. Tumorji tipa I imajo dobro prognozo. Mednje spada 80 % vseh sporadičnih primerov raka endometrija (Ryan in sod., 2005 in Shiozawa in Konishi, 2006 in Amant in sod., 2005).

Od vseh sporadičnih primerov 20 % raka endometrija označujemo kot tip II. To je od estrogenov neodvisni tip, ki se razvije v atrofičnem endometriju, večinoma iz razločnih lezij, metaplazij, označenih kot intraepitelijski karcinom endometrija (EIC). Pojavlja se v morfološko značilni obliki seroznega, papilarnega in svetlo-celičnega adenokarcinoma. Za te primere raka endometrija je značilna slabša diferenciacija z več kot 50 % slabše diferenciranih predelov. Ta oblika raka je agresivna in se pogosto vrašča v miometrij ter se razširja v peritonealne metastaze. Tip II tumorjev ima slabšo prognozo (Inoue, 2001 in Ryan in sod., 2005 in Shiozawa in Konishi, 2006, Sherman, 2000). Zadnje študije pa nakazujejo, da naj bi bil tudi rak endometrija tipa II odvisen od estrogenov (Berstein in sod., 2003 in Berstein in sod., 2006).

Številne druge morfološke oblike raka endometrija, ki se pojavljajo v manjši meri, lahko tudi uvrstimo v eno od dveh kategorij (Ryan in sod., 2005)

Preglednica 1: Histološka klasifikacija raka endometrija (Prirejeno po Amant in sod., 2005)

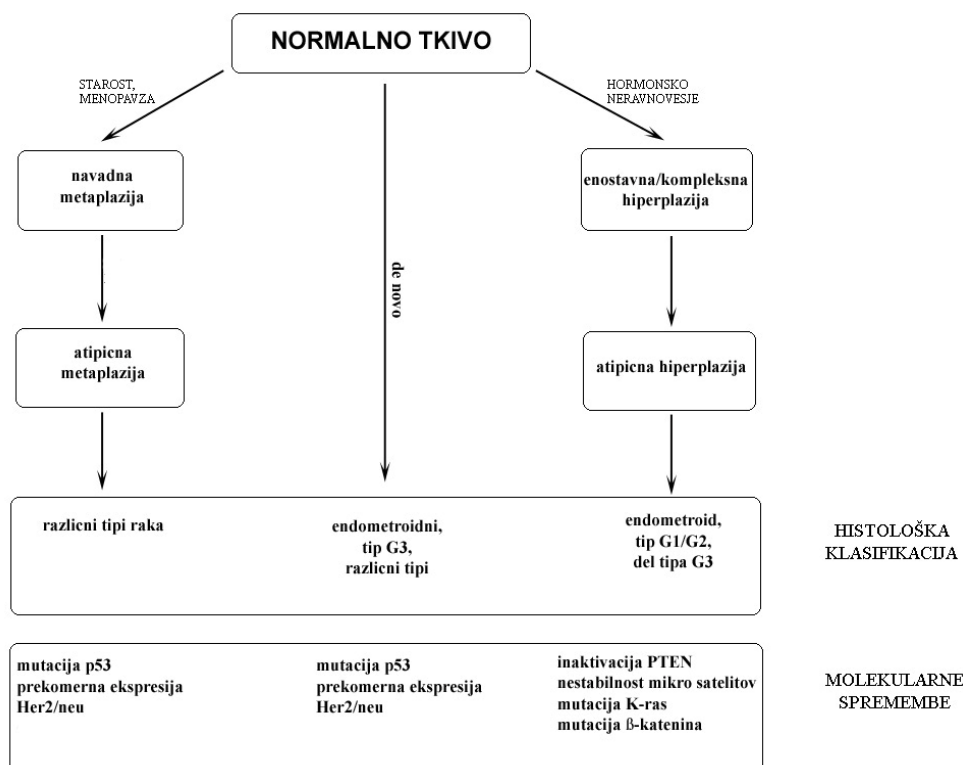
Endometrioidni adenokarcinomi (tip I)	
Drugi adenokarcinomi (tip II)	serozni karcinom svetlo-celični karcinom nediferencirani karcinom drobnocelični karcinom mešani karcinom mukozni karcinom prehodno-celični karcinom skvamozno-celični karcinom

Z novimi raziskavami na molekularno-biološkem področju so dualistični model deljenja na dva tipa raka nekoliko razširili, saj nekaterih vrst raka endometrija ni mogoče jasno opredeliti. Nahajajo se v sivem pasu med enim in drugim tipom, saj imajo klinične, morfološke, imunohistokemijske in molekularne karakteristike tako raka endometrija tipa I kot tudi tipa II (Liu, 2007).

2.1.2 Potek kancerogeneze pri raku endometrija na molekularni ravni

Klasifikacijo na podlagi klinično-patoloških in morfoloških karakteristik lahko potrdimo na molekularni ravni (Ryan in sod., 2005). Študije kažejo, da je karcinogeneza endometrija večstopenjski proces, ki vključuje inicijacijo, promocijo in progresijo lezij iz normalnega epitelijskega tkiva do benignih in malignih tumorjev. Vsako stopnjo spremlja serija biokemijskih in morfoloških sprememb, ki nastanejo zaradi okvar onkogenov, tumor zavirajočih genov, genov za popraviljanje neujemanja DNA baznih parov ter efektorskih genov, odgovornih za apoptozo celic.

Kancerogeneza endometrija poteka na več načinov. 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 molekularne spremembe, značilne za posamezno pot (Prirejeno po Inoue, 2001: 345 in Sherman, 2000: 304, 305).

2.1.2.1 Molekularne spremembe pri razvoju raka endometrija preko hiperplazije (tip I)

Pri razvoju raka endometrija preko hiperplazije so značilne biološke in genske nepravilnosti, ki vplivajo na prenos signalov na ravni receptorjev in molekularnih stikal (majhne citosolne GTPaze) ter na adhezijo celic (Shiozawa in Konishi, 2006). Rak endometrija tip I v splošnem povezujemo z nepravilnostmi v genih za popravljanje neujemanja DNA baznih parov (npr. MSH2, MLH1, ...) in v β -kateninu, z aktivacijo onkogenega *K-ras* in utišanjem tumor zavirajočega gena PTEN (Liu, 2007 in Ryan in sod., 2005 in Inoue, 2001 in Shiozawa in Konishi, 2006). Možni dejavniki za nastanek raka endometrija tipa I so tudi spremembe pri regulaciji apoptoze, pri vzdrževanju malignega stanja pa ima pomembno vlogo tudi spremenjena aktivnost telomeraze (Inoue, 2001).

Hipermetilacija promotorja MLH1 naj bi bila začetna genetska sprememba pri kancerogenezi endometrija, ki ji sledijo mutacije v genih za popravljanje neujemanja DNA baznih parov. To še dodatno poveča genetsko nestabilnost mikrosatelitov v DNA ter akumulacijo dodatnih mutacij v genih, ki so vključeni v zgodnjo kancerogenezo (Inoue, 2001).

Za ohranjanje stika med celicami in preko tega strukture tkiv sta odgovorna med drugim tudi proteina β -katenin in E-kadherin (Shiozawa in Konishi, 2006). Mutacije genov za ta proteina imajo za posledico napake v stikih med celicami in so lahko ključne v razvoju celic z velikim potencialom za tvorbo metastaz (Inoue, 2001).

Mutacije in s tem aktivacija *K-ras* onkogenega se pojavljajo tako pri atipičnih hiperplazijah kot tudi kasneje pri endometrioidnih karcinomih, kar nakazuje, da je tudi aktivacija onkogenov eden od inicijacijskih dogodkov pri nastanku raka endometrija (Inoue, 2001).

Tumor zavirajoči geni nosijo zapis za proteine, ki inhibirajo proliferacijo celic (Inoue, 2001). V kar 50-80 % primerov endometrioidnega adenokarcinoma se pojavljajo napake in mutacije tumor zavirajočega gena PTEN, ki kodira protein s tirozin-kinazno aktivnostjo in s svojim delovanjem vzdržuje celico v G1/S fazi celičnega cikla, negativno uravnava integrine, ki sodelujejo pri migraciji in invaziji celic ter nadzoruje organizacijo citoskeleta, rast in apoptozo celic (Liu, 2007 in Shiozawa in Konishi, 2006). Mutacije v genu PTEN preprečujejo apoptozo celic (Shiozawa in Konishi, 2006).

Telomeraza je močno aktivna pri raku endometrija tipa I. Telomerazna aktivnost je povezana s proliferacijo celic in igra ključno vlogo pri napredovanju in pri vzdrževanju malignega stanja. Med napredovanjem karcinoma pridobijo celice nesmrtnost s pomočjo telomeraze celične reverzne transkriptaze (TERT). Estrogeni uravnavajo izražanje telomeraze v endometriju, tako da aktivirajo prepis gena za telomerazo preko direktne vezave estrogenskih receptorjev na ustrezno odzivno mesto na promotorju (Inoue, 2001).

2.1.2.2 Molekularne spremembe pri razvoju raka endometrija preko metaplazije (tip II)

V tem primeru gre za slabo diferenciran tip raka. Rak se razvije iz atrofičnega endometrija in preko atipičnih metaplazij prehaja v invazivno obliko. Do sprememb prihaja tudi v mišičnem tkivu (Inoue, 2001). Na molekularni ravni rak endometrija tip II v splošnem povežujemo z nepravilnostmi v genih p53 in HER/*neu* (Ryan in sod., 2005). Ostalih sprememb, opisanih pri tipu I, je pri tem tipu raka manj ali niso bile opažene (Liu, 2007).

Tumor zavirajoči gen p53 v normalnih pogojih preko transaktivacije regulatornih proteinov nadzoruje potek celičnega cikla in proliferacije celic (Liu, 2007 in Inoue, 2001). Mutacije v p53 genu se pojavljajo v 70-85 % primerov seroznega karcinoma (Inoue, 2001 in Ryan in sod., 2005). Mutiran, inaktiviran tumor supresorski gen p53 proliferacije celic s poškodovano DNA ne inhibira več (Inoue, 2001).

Aktivacija onkogene Her-2/*neu*, ki je prisotna pri 40-70 % primerov seroznega karcinoma, se odraža v sintezi receptorja, ki je po strukturi podoben receptorju za epidermalni rastni faktor (EGF-R). Prekomerna ekspresija Her-2/*neu* vodi v povečano proliferacijo celic (Inoue, 2001 in Ryan in sod., 2005).

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 fazi odgovorna mutacija gena p53 in prekomerna ekspresija Her2/*neu* onkogene (Liu, 2007).

2.1.3 Dejavniki tveganja in zaščite pri raku endometrija

Večina dejavnikov tveganja je posredno ali neposredno povezana s prekomerno količino ali izpostavljenostjo estrogenom, zaščitni dejavniki pa so vsi tisti, ki v splošnem zmanjšujejo vplive estrogenov (*preglednica 2*).

Preglednica 2: Klasifikacija dejavnikov tveganja za nastanek raka endometrija ter zaščitnih dejavnikov
(Prirejeno po Sonoda in Barakat, 2005 in Persson, 2000)

Dejavniki tveganja	Zaščitni dejavniki
pozna menopavza	nosečnost
zgodnja prva menstruacija	kombinirana kontracepcija
neploidnost	kajenje
ne-rodnost	fizična aktivnost
debelost	
izpostavljanje estrogenom (hormonska nadomestna terapija)	
starost	
tamoxifen (prototip SRM)	
genetske predispozicije	
diabetes	
SNP (polimorfizem enega nukleotida)	

Gre za prekomerno izpostavljenost delovanju endogenih in eksogenih estrogenov brez nasprotnega delovanja progestagenov. V obdobju pred menopavzo so takšne razmere naravno prisotne v prvi fazi menstruacijskega ciklusa, ko je raven estrogenov visoka, raven progesterona pa nizka. Zato je tveganje večje pri ženskah z zgodnjo prvo menstruacijo in/ali pozno menopavzo, pri ženskah s krajšimi menstruacijskimi cikli in ženskah brez otrok (neploidnost, nerodnost), saj je pri njih skupno število ciklusov večje. S številom nosečnosti se zmanjšuje tveganje za pojav raka endometrija (Henderson in Feigelson., 2000). Eksogeni dejavniki tveganja so predvsem dolgotrajno jemanje oralnih kontracepcijskih sredstev z visoko ravni estradiola, ki so bila na tržišču do leta 1976, ter nadomestna estrogenska terapija brez dodatka progesterona (Henderson in Feigelson., 2000). Tamoxifen (primer SRM-selektivnega modulatorja receptorjev) kot sintetični estrogenski agonist pri zdravljenju raka dojk, ima poleg tega tudi negativni estrogenski učinek na endometriju (Sonoda in Barakat, 2005 in Flötotto in

sod., 2001 in Podczaski in Mortel, 2001). Raziskave so pokazale, da tamoxifen zavira razvoj raka dojk, s tem da preprečuje vezavo estrogenov na estrogenske receptorje, hkrati pa stimulira razvoj raka endometrija preko AP-1 alternativne poti prepisovanja tarčnih genov (Akhmedkhanov in sod., 2001 in Gustafsson, 1999).

Dejavnik tveganja pred in po menopavzi je tudi debelost (Akhmedkhanov in sod., 2001). Pred menopavzo je tveganje povezano z večjim številom anovulatornih ciklusov in nezadostnim delovanjem progesterona (Henderson in Feigelson., 2000). Po menopavzi je tveganje večje, ker aromataza v maščobnem tkivu pretvarja androstendion v estron. Raziskave so pri močnejših pacientkah pokazale tudi nižjo vsebnost globulinov v krvi, ki vežejo spolne hormone, kar ima za posledico večjo vsebnost prostega aktivnega estradiola. Tudi diabetes, v povezavi z debelostjo, se povezuje z rakom endometrija (Sonoda in Barakat, 2005).

Številne študije so pokazale, da obstaja povečano tveganje za nastanek raka endometrija pri posameznikih iz družin, kjer so te oblike raka že diagnosticirali (Sonoda in Barakat, 2005). Prav tako je večja verjetnost, da se taka oblika raka pojavi v zgodnejši dobi, najpogosteje v povezavi s podedovanim nepolipoznim rakom debelega črevesa (Ryan in sod., 2005).

V zadnjem času znanstveniki uvrščajo med dejavnike tveganja za nastanek raka endometrija tudi SNP (polimorfizem enega nukleotida). Z njimi lahko razložimo individualne razlike v dovzetnosti za specifična rakava obolenja. SNP ne povzročajo bolezni, a pomagajo določiti, s kakšno verjetnostjo lahko posameznik, zaradi določene genetske predispozicije in součinkovanja več genov, razvije določeno kompleksno bolezen. Raziskave so pokazale, da nekateri polimorfizmi estrogenskih in progesteronskih receptorjev tveganje za nastanek raka povečajo (Kang in sod., 2005).

Med zaščitne dejavnike sodijo kombinirana kontracepcija na podlagi estrogenov in progestagenov, kajenje, fizična aktivnost ter število nosečnosti (Persson, 2000 in Henderson in Feigelson., 2000). Epidemiološke raziskave so pokazale, da kajenje pospešuje metabolizem v jetrih in s tem znižuje raven estrogena. Kajenje naj bi tudi vplivalo na zgodnejšo menopavzo in tako zmanjševalo možnost nastanka raka endometrija (Sonoda in Barakat, 2005). Raziskave so tudi potrdile, da se med nosečnostjo vzdržuje visoka raven progesterona, ki nasprotuje učinkom estrogenov, poleg tega pa se s številom nosečnosti skupno število ovulatornih ciklusov zmanjša, zato obstaja obratno sorazmerje med številom nosečnosti ter tveganjem za

nastanek raka endometrija (Persson, 2000 in Akhmedkhanov, 2001). S fizično aktivnostjo se vzdržuje ustrezna telesna teža, zmanjša se tudi število ovulatornih ciklov, s čimer se zmanjša izpostavljenost estrogenom in zniža možnost za nastanek raka endometrija (Akhmedkhanov, 2001).

2.1.4 Zdravljenje raka endometrija

Način zdravljenja raka endometrija je odvisen od tega, s kakšno obliko in stopnjo razvoja raka endometrija imamo opraviti. Glede na klinično-patološke karakteristike lahko rak endometrija, ki se še ni vrasel v miometrijo maternice, razvrstimo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo primere z nizkim tveganjem (dobro diferencirani endometrioidni karcinomi), v drugo skupino pa visoko-rizične primere raka endometrija (zmerno ali slabše diferencirani endometrioidni karcinomi) (Shiozawa in Konishi, 2006).

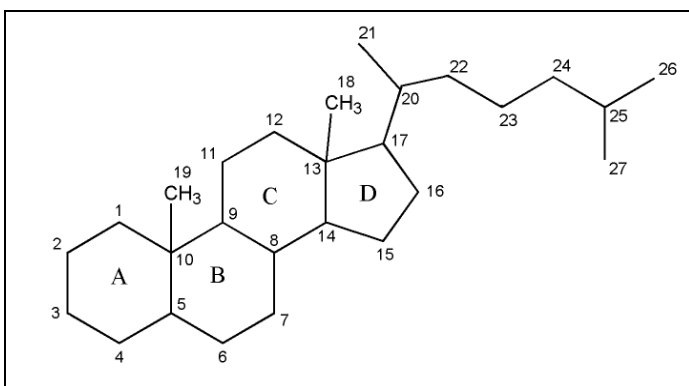
Najprimernejša načina zdravljenja za rakave primere, ki sodijo v prvo skupino, sta operacija (npr.: histerektomija) in progestinska terapija. Pri dobro diferenciranih endometrioidnih karcinomih prve skupine se pogosto izražajo progesteronski receptorji. Progestin z vezavo na te receptorje zavira rast celic, saj uravnava količino estrogenskih receptorjev ter povečuje metabolizem steroidnih hormonov (Shiozawa in Konishi, 2006).

Visoko-rizični primeri raka endometrija iz druge skupine zahtevajo histerektomijo s postoperativno kemoterapijo (Shiozawa in Konishi, 2006). Za zdravljenje takih primerov se uporablja tudi radioterapija (Amant in sod., 2005)

2.2 STEROIDNI HORMONI

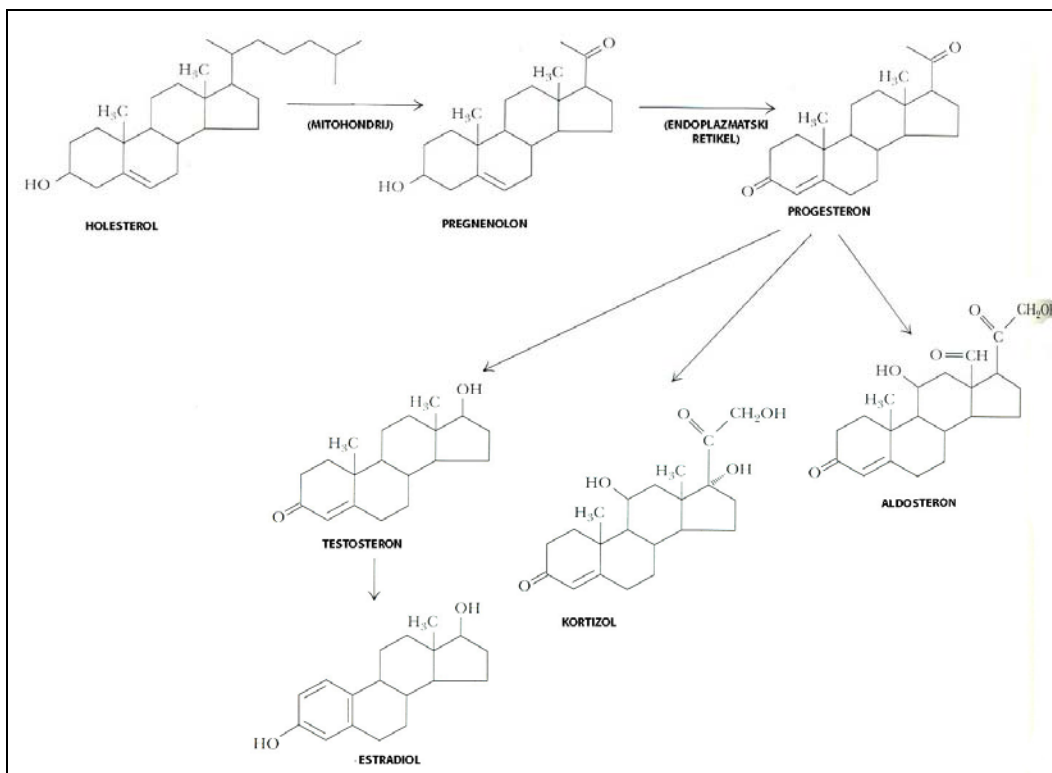
Hormoni so ena izmed glavnih oblik komunikacije med različnimi tkivi in organi. Z njihovo pomočjo se specializirane celice pri kompleksnih organizmih odzivajo in koordinirajo svoje funkcije glede na spremembe v zunanjem in notranjem okolju (Lazar, 2006).

Steroidi so skupina organskih spojin, med katere uvrščamo rastlinske in živalske sterole, steroidne alkaloidne, steroidne hormone, žolčne kisline, provitamin D itd. Vsi imajo značilen sistem kondenziranih obročev, sestavljenih iz treh šestčlenskih obročev, označenih z A, B, C, in enega petčlenskega obroča, ki je označen z D. Ogljikovi atomi v steroidnem skeletu so oštevilčeni od 1 do 27 (*slika 2*). Pri različnih steroidih se sistemi obročev razlikujejo po številu in položaju dvojnih vezi, stranski verigi in številu ter vrsti funkcionalnih skupin (Boyer, 2005).



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

Med steroidne hormone, derivate holesterola, uvrščamo glukokortikoide (kortizol, kortikosteron), mineralokortikoide (aldosteron), vitamin D ter spolne hormone (estrogene, progestagene, androgene) (Garrett in Grisham, 1999). Sintetizirajo se v celicah številnih organov. Reakcija, ki jo katalizira desmolaza, pretvori holesterol v pregnenolon. V endoplazmatskem retikulumu se z oksidacijo hidroksi skupine in spremembo položaja dvojne vezi pregnenolon pretvori v progesteron, ki je prekurzor sinteze aldosterona, kortizola, testosterona in preko njega estradiola (*slika 3*) (Garrett in Grisham, 1999).



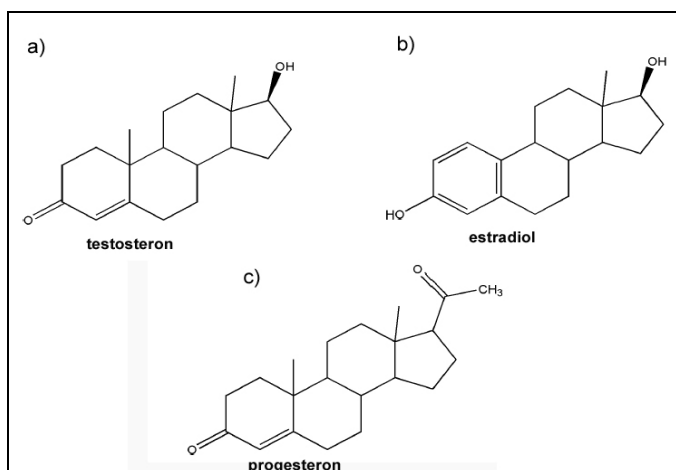
Slika 3: Prikaz sinteze steroidnih hormonov iz holesterola (Prirejeno po Garrett in Grisham, 1999: 848)

Steroidni hormoni so hidrofobne molekule. Preko plazemske membrane prehajajo v celico z difuzijo ali s prenašalci. V celici z vezavo na jedrne ali citosolne receptorje uravnavajo izražanje ustreznih genov, lahko pa delujejo negenomsko, z vezavo na membransko vezane receptorje, preko interakcij z receptorji za rastne dejavnike (EGFR,...), interakcij z ionskimi kanalčki ali z G proteini vezanimi receptorji.

Negenomsko delovanje steroidnih hormonov je povezano s spremembo celične signalizacije. Steroidni hormoni lahko preko sekundarnih sporočevalcev (cAMP, proteinske kinaze) aktivirajo MAP kinaze, le-te pa nato fosforilirajo in s tem aktivirajo receptorje za steroidne hormone (Garrett in Grisham, 1999 in Falkenstein in sod., 2000).

2.2.1 Spolni hormoni

Spolni hormoni so ožja skupina steroidnih hormonov. Tako 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 4*).

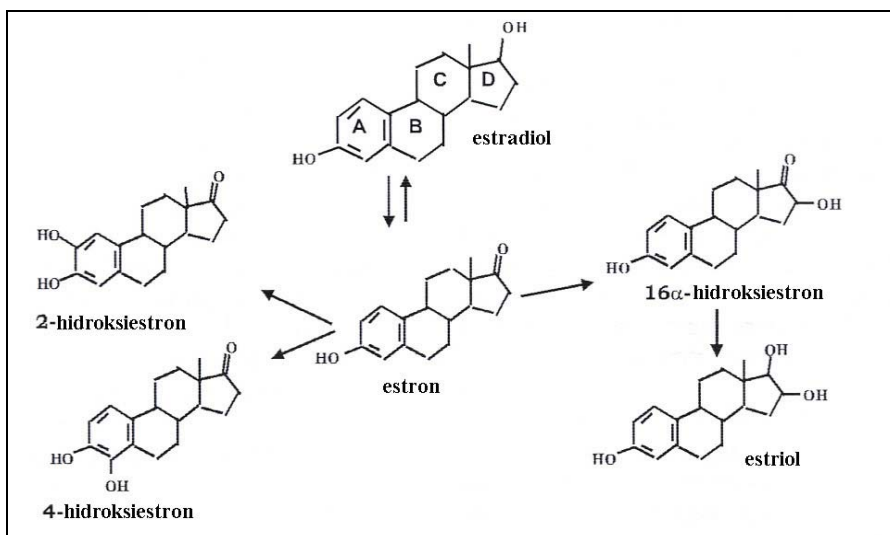


Slika 4: Strukturne formule glavnih predstavnikov androgenov, estrogenov in progestagenov. a) testosteron, b) estradiol in c) progesteron (Prirejeno po Garrett in Grisham, 1999: 255)

Estrogeni in androgeni so pomembni za oba spola, tako z vidika rasti, razvoja in morfološke diferenciacije, kot tudi za razvoj in regulacijo spolnega in reproduktivnega obnašanja in ciklusov. Produkcijo in izločanje spolnih hormonov uravnava v največji meri folikel stimulirajoči hormon (FSH) in luteinizirajoči hormon (LH), sodelujejo pa tudi prostaglandini ter β -adrenergične snovi (Graham in Clarke, 1997).

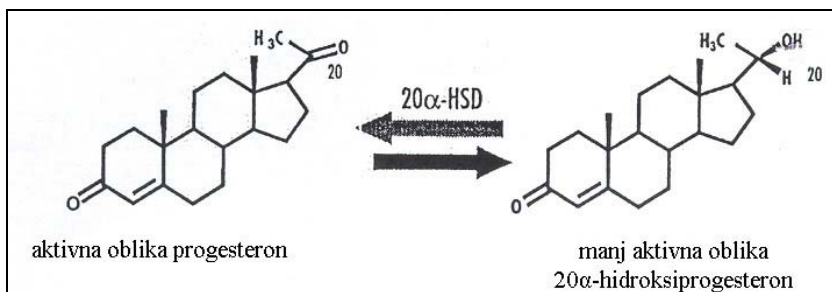
Estrogenov je več pri ženskah in so odgovorni za razvoj ženskih spolnih organov, sekundarnih spolnih znakov, potek menstruacijskega ciklusa in nosečnosti. Sintetizirajo se v jajčnikih, med nosečnostjo, pa tudi v placenti. Glavna vloga estrogenov je pospeševanje proliferacije endometrija, vplivajo pa tudi na razvoj jajčnikov, dojk, vagine itd. (Koolman in Roehm, 2005:374). Estrogeni obstajajo v več oblikah. V biološko aktivni obliki estradiol, ki ima hidroksilni skupini na C3 in C17, v obliki estron, ki predstavlja oksidirano in s tem manj

aktivno obliko estradiola, in v neaktivnih oblikah estriol in estron-sulfat (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004) ter nekaterih drugih oblikah (2-hidroksiestron, 4-hidroksiestron, 16 α -hidroksiestron), katerih funkcije v organizmu niso še povsem pojasnjene (*slika 5*) (Mueck in sod., 2002).



Slika 5: Strukturne formule aktivne oblike estradiola, manj aktivne oblike estrona in estriola ter nekaterih drugih hidroksi oblik estrona, s prikazom pretvarjanja ene oblike v drugo (Prirejeno po Mueck in sod., 2002)

Progestageni se v organizmu nahajajo v več oblikah. Biološko aktiven je le progesteron, reducirana oblika 20 α -hidroksiprogesterona je manj aktivna (*slika 6*). V organizmu se progestageni nahajajo tudi kot 5 α -dihidroprogesteron in alopregnanolon, ki sta pomembna nevrosteroida (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004). Progesteron se sintetizira v rumenem telescu (*corpus luteum*) jajčnikov v poznejši fazi menstruacijskega ciklusa. Glavno tarčno tkivo progesterona je endometrij, kjer vzpodbuja diferenciacijo celic endometrija ter sekrecijo žlez, kar omogoča normalen potek menstruacijskega ciklusa. Ob zanositvi progesteron vzdržuje nosečnost (Koolman in Roehm, 2005:374). Progesteron kot mediator signalov v možganih uravnava spolno obnašanje osebe (Graham in Clarke, 1997).



Slika 6: Strukturni formuli aktivne oblike progesterona in manj aktivne oblike 20α-hidroksiprogesterona ter prikaz pretvarjanja ene oblike v drugo s pomočjo encima 20α-HSD (Prirejeno po Lanišnik Rižner in Šinkovec., 2004).

Androgeni prevladujejo pri moških. Najpomembnejši predstavnik je testosteron. Sintetizirajo se v Leydigovih celicah testisov. Odgovorni so za razvoj primarnih in sekundarnih moških spolnih znakov, prav tako pa so na splošno udeleženi pri rasti in pri sintezi proteinov, predvsem v mišicah in kosteh (Koolman in Roehm, 2005).

2.2.2 Delovanje spolnih hormonov

V endometriju se med proliferacijsko in sekrecijsko fazo menstruacijskega ciklusa izmenjuje delovanje estrogenov in pregestagenov. Estrogeni spodbujajo proliferacijo žleznega epitelijskega tkiva, medtem ko progesteron nasprotuje delovanju estrogenov in preusmerja celice strome in žleznega epitelijskega tkiva v diferenciacijo. Uravnavanje delovanja estrogenov in pregestagenov poteka na ravni izražanja receptorjev, pa tudi na predreceptorski ravni (Penning, 2003 in Labrie in sod., 2000 in Šmuc in sod., 2006). Na različno delovanje estrogenov in pregestagenov vpliva tkivno specifično izražanje encimov (hidroksisteroid-dehidrogenaz in drugih), vključenih v metabolizem steroidnih hormonov ter receptorjev za spolne hormone (Flötotto in sod., 2001).

Študije so pokazale značilno večje koncentracije estradiola v tumorskem tkivu kot pa v normalnem tkivu endometrija, tako pri vzorcih bolnic pred menopavzo kot tudi po menopavzi, kar znanstveniki razlagajo s povečano lokalno sintezo (Berstein in sod., 2003). Povečana koncentracija estradiola vpliva na povečano proliferacijo celic, s čimer se poveča verjetnost napak pri podvajanju DNA ter razvoja raka endometrija. Zaradi povečane koncentracije estrogenov nastajajo tudi več metabolitov estrona, kot sta 2-hidroksiestron ter 4-hidroksiestron,

ki preko oksidacije do kinonov lahko poškodujejo DNA. Kateholi, ki nastanejo iz estradiola s pomočjo citokromov P450 (CYP1B1, CYP1A1, CYP3A4), lahko nadalje poškodujejo DNA (Sherman, 2000 in Mueck in sod., 2002). Tveganje za razvoj kancerogeneze znanstveniki povezujejo tudi s prekomernim izražanjem citokroma P450 CYP1B1 ter s funkcionalnim polimorfizmom v genu, ki kodira ta encim. Zaradi polimorfizma v eksonih 2 in 3 CYP1B1 se spremeni delovanje encima, prihaja do večje hidroksilacije estrogenov, s čimer se poveča tveganje za nastanek raka endometrija (Sasaki in sod., 2003).

Encimi, ki uravnavajo aktivnost in s tem delovanje estrogenov na predreceptorski ravni, so 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17β -HSD), aromataza, sulfotransferaza in sulfataza; encimi, ki uravnavajo aktivnost progestagenov, pa so 20α -hidroksisteroid-dehidrogenaze (20α -HSD) (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004). HSD spadajo v beljakovinski naddružini kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR) in aldo-keto-reduktaz (AKR). Večina 17β -HSD spada v SDR-naddružino, 20α -HSD pa uvrščamo v naddružino AKR. Hidroksisteroid-dehidrogenaze (HSD) z redukcijo ketosteroidov ali oksidacijo hidroksisteroidov določeni spolni hormon spremenijo iz aktivne v manj aktivno oziroma neaktivno obliko in obratno. S tem uravnavajo količino hormonov, ki se lahko vežejo na znotrajcelične receptorje. Zaradi tkivno in celično specifičnega izražanja teh encimov se različna tkiva različno odzovejo na spolne hormone. Nenormalno izražanje HSD v tkivih lahko vodi v lokalno neravnovesje med aktivnimi in neaktivnimi oblikami steroidnih hormonov, kar ima 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 URAVNAVANJE DELOVANJA HORMONOV NA RECEPTORSKI RAVNI

Estrogeni in progestageni delujejo na ravni prepisovanja tarčnih genov preko ustreznih znotrajceličnih receptorjev (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004). V aktivni obliki se z višjo afiniteto vežejo na ustrezni receptor v primerjavi z manj oziroma neaktivno obliko (Penning, 2003 in Labrie in sod., 2000).

2.3.1 Struktura steroidnih receptorjev ter uravnavanje prepisovanja genov

Jedrni receptorji so od ligandov odvisni transkripcijski faktorji, ki uravnavajo specifično izražanje tarčnih genov, vključenih v metabolizem, razvoj in reprodukcijo. Filogenetske analize so dokazale obstoj številnih poddružin znotraj naddružine jedrnih steroidnih receptorjev. V prvo poddružino spadajo steroidni receptorji, v drugo receptorji za tiroidne hormone, nekateri receptorji za retinojsko kislino in za vitamin D₃. Tretja poddružina zajema receptorje, pri katerih ligandi še niso povsem okarakterizirani (McKenna in sod., 2006).

Estrogenski in progesteronski steroidni receptorji spadajo v prvo poddružino jedrnih receptorjev, od ligandov odvisnih transkripcijskih faktorjev, ki se ob aktivaciji vežejo na DNA in uravnavajo izražanje specifičnih genov (Ryan in sod., 2005). Vsebujejo za jedrne receptorje karakteristične regije s točno določenimi funkcijami (*slika 7*) (Moutsatsou in Sekeris, 2003).

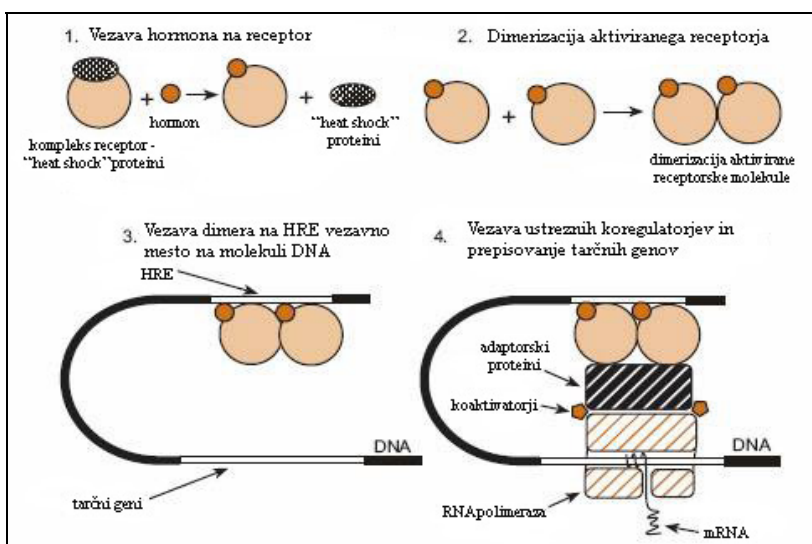


Slika 7: Prikaz strukturnih domen molekule jedrnega receptorja (Povzeto po Podczaski in Mortel, 2001).

Gre za konzervativna področja, označena od A do F. Na najbolj variabilni A/B regiji na amino-terminalnem koncu receptorja najdemo regulatorno domeno s transkripcijsko

aktivnostjo, sledita C regija, s katero se receptor veže na DNA molekulo, ter E regija, ki ima prav tako transkripcijsko aktivnost in ki je odgovorna za vezavo hormona in za dimerizacijo receptorske molekule (Podczaski in Mortel, 2001 in Moutsatsou in Sekeris, 2003). E regija poskrbi tudi za pravilno lokalizacijo receptorske molekule v jedru celice (McKenna in sod., 2006). Med C in E regijo je zglobna D regija, ki omogoča rotacijo DNA-vezavne domene (Aranda in Pascual, 2001). Na meji med C in D regijo se nahaja jedrni lokalizacijski signal (JLS), s pomočjo katerega se v jedro po sintezi na ribosomih prenesejo jedrni receptorji (Lazar, 2006). Estrogenski receptorji vsebujejo tudi F regijo s še ne pojasnjeno funkcijo (Aranda in Pascual, 2001).

Učinke jedrnih receptorjev na prepisovanje genov uravnava koregulatorji (Aranda in Pascual, 2001 in Vienonen in sod., 2004). Ob odsotnosti hormonov je transkripcijsko neaktiven steroidni receptor v jedru povezan s številnimi »heat shock« proteini, ki imajo funkcijo korepresorjev. Po vezavi hormona se receptorska molekula konformacijsko spremeni, inhibitorni proteini se sprostijo, aktivna receptorska molekula z vezanim ligandom nato spontano dimerizira ter se veže na od hormonov odzivno regijo na DNA molekuli (HRE regija). Hkrati s tem se na dimer veže ustrezni koaktivatorski kompleks ter drugi adaptorski proteini. Poteče prepisovanje tarčnih genov in sinteze proteinov (*slika 8*) (Podczaski in Mortel, 2001 in Aranda in Pascual, 2001).



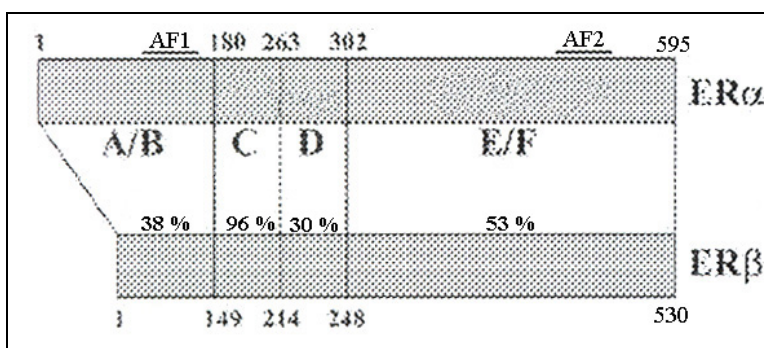
Slika 8: Shematski prikaz delovanja steroidnega receptorja. 1) vezava hormona na receptor, 2) dimerizacija aktiviranega receptorja, 3) vezava dimera na HRE vezavno mesto na molekuli DNA, 4) vezava ustreznih koregulatorjev in prepisovanje tarčnih genov (Povzeto po Podczaski in Mortel, 2001).

Koaktivatorji se vežejo samo na receptor, ki je že povezan z ligandom in že vezan na HRE mesto na molekuli DNA. Koaktivatorji, specifični za vezavo na steroidne receptorje, spadajo v posebno SRC (koaktivatorji steroidnih receptorjev) družino. Pospešijo transkripcijo ustreznih genov, s tem da z acetilacijo lizinskih repov histonov razvijajo kromatinsko molekulo. Poleg tega privabljajo druge koaktivatorje (Lazar, 2006 in Flötotto in sod., 2001).

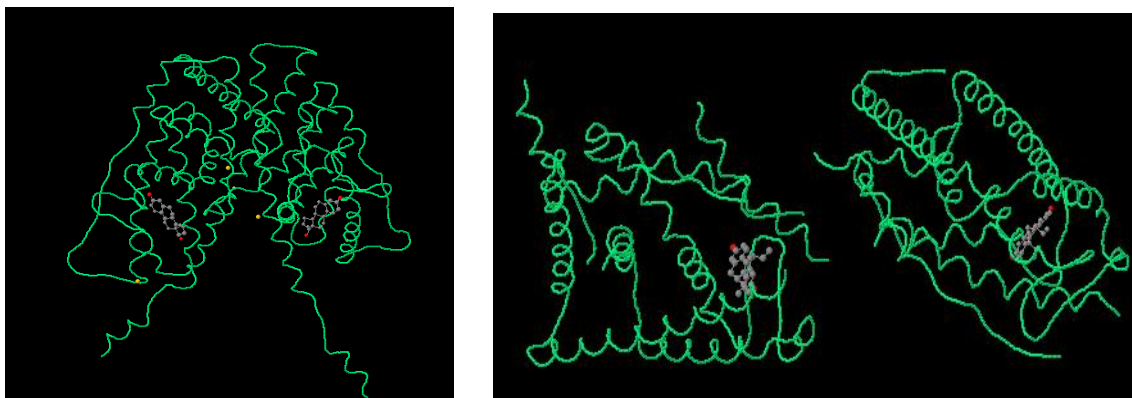
Korepresorji prepoznajo konformacijsko strukturo prostega receptorja ter se vežejo nanj. Sami nimajo encimske aktivnosti. Prepisovanje genov lahko direktno inhibirajo z vezavo na osnovne transkripcijske faktorje, ali pa z vezavo histonskih deacetilaz, ki omogočijo zvijanje kromatinske molekule (Lazar, 2006).

2.3.2 Estrogenski receptorji

Poznana sta dva ločena tipa estrogenskih receptorjev: ER α iz 595 aminokislin ter z molekulsko maso 66 kDa, in ER β iz 530 aminokislin ter z molekulsko maso 56 kDa. Gen za ER α se nahaja na kromosomu 6, gen za ER β pa na kromosomu 14, kar dokazuje, da gre za dve ločeni receptorski molekuli, ki ju kodirajo različni geni (Pearce in Jordan, 2004). Primerjava obeh estrogenskih receptorjev je pokazala veliko konzervativnost v DNA-vezavni regiji (96% identičnosti) in regiji, ki je odgovorna za vezavo hormona (53-55% identičnosti). Zelo variabilne so A/B, D in F regije (*sliki 9 in 10*) (Podczaski in Mortel, 2001 in Mylonas in sod., 2005).



Slika 9: Primerjava strukture in homologije med estrogenskima receptorjema ER α in ER β . Prikazan je procent identičnosti med posameznimi domenami na aminokislinski ravni (Povzeto po Pearce in Jordan, 2004).



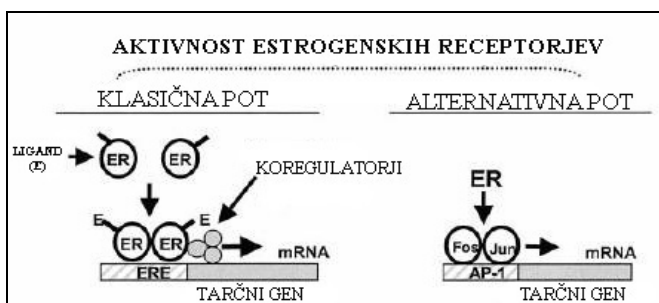
Slika 10: Shema 3D struktur dimera estrogenskega receptorja α z vezanim ligandom (PDB oznaka: 1a52) in dimera estrogenskega receptorja β z vezanim analogom estrogena (PDB oznaka: 1L2J).

Estrogenska receptorja ER α in ER β obstajata pri človeku v več izooblikah, ki nastanejo zaradi delecije ali podvojevanja eksonov, odkritja eksonov v predhodno določeni intronski regiji, ipd. (Hirata in sod., 2003). Zaradi razlike v transaktivacijskih domenah AF-1 na A/B regiji in AF-2 na E regiji, kamor se veže ligand, so izooblike ER α in ER β odgovorne za različne biološke funkcije. Namesto vezave liganda se AF-1 domena lahko aktivira s fosforilacijo (cAMP, dopamin, epidermalni rastni faktor ter nekatere druge molekule) (Herynk in Fuqua, 2004). Nekatere izooblike ER β nimajo vezavnega mesta za ligand, druge raje tvorijo heterodimere z ER α , s tem preprečijo njihovo vezavo na DNA ter tako delujejo kot selektivni inhibitorji estrogenske aktivnosti. Znanstveniki sklepajo, da nekatere izooblike ER β nimajo transkripcijske aktivnosti, temveč zavirajo prepisovanje genov tako prek ER α kot tudi ER β (Lewandowski in sod., 2002 in Šmuc in sod., 2007). Transkripcijske aktivnosti nimajo tudi nekatere izooblike ER α , ki so sposobne vezati ligand, a so brez A/B regije, DNA vezavne regije ali obeh.

Znanstveniki so dokazali prisotnost ER α izooblik v rakavem tkivu endometrija, niso pa ugotovili signifikantnih razlik v izražanju v primerjavi z normalnim tkivom, iz česar se da sklepati, da imajo izooblike določeno vlogo pri fizioloških procesih v normalnem tkivu (Hirata in sod., 2003 in Herynk in Fuqua, 2004). Do sprememb v rakavem tkivu prihaja pri ER β ter njegovih izooblikah. Te spremembe kot tudi sama raznolikost izooblik imajo pomembno vlogo pri diagnozi, prognozi in zdravljenju raka endometrija (Skrzypczak in sod., 2004 in Lewandowski in sod., 2002).

2.3.2.1 Aktivnost estrogenskih receptorjev

Aktivnost estrogenskih receptorjev kot transkripcijskih faktorjev uravnavajo številni dejavniki: vezava liganda, fosforilacija in vezava koregulatorjev (Pearce in Jordan, 2004). Estrogenski receptor z vezanim ligandom se lahko direktno veže na ERE (od estrogenov odzivna regija) mesto na molekuli DNA, čemur sledi prepisovanje ustreznih genov, ali indirektno preko vezave na fos in jun transkripcijska faktorja, s katerima se nato veže na AP-1 aktivatorsko mesto na molekuli DNA. Alternativna pot prepisovanja genov vključuje torej medsebojno sodelovanje proteinov (*slika 11*) (Deroo in Korach, 2006 in Podczaski in Mortel, 2001 in Flötotto in sod., 2001).



Slika 11: Shemi klasične in alternativne poti delovanja estrogenskih receptorjev (Prirejeno po Flötotto in sod., 2001).

Uravnavanje prepisovanja genov preko ERE promotorskega mesta na molekuli DNA je za ER α in ER β povsem enaka, aktivnost obeh estrogenskih receptorjev se razlikuje pri alternativni poti prepisovanja genov preko AP-1 vezavnega mesta za receptor na molekuli DNA (Flötotto in sod., 2001). Estrogeni zavirajo prepisovanje genov preko AP-1 v primeru ER β , pri ER α receptorjih pa spodbujajo prepisovanje genov preko AP-1 (Herynk in Fuqua, 2004).

2.3.2.2 Izražanje estrogenskih receptorjev

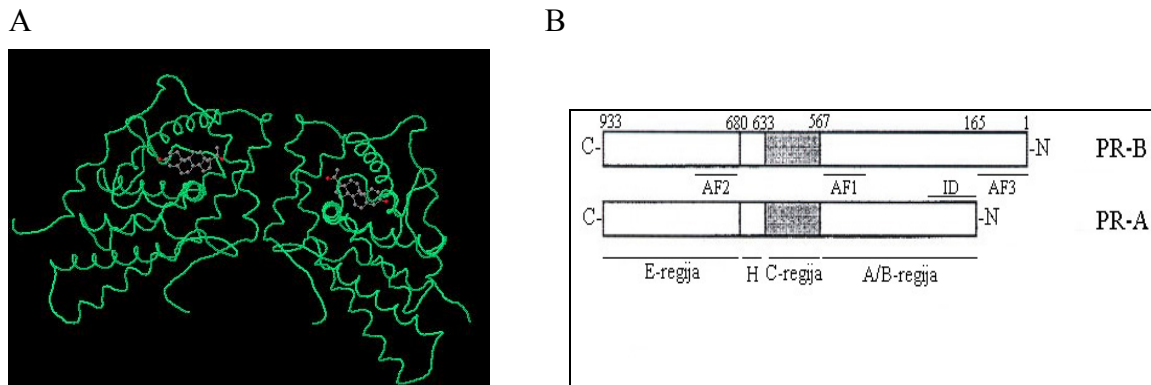
ER α se nahaja v jajčnikih, maternici, vagini, hipotalamusu ter mlečnih žlezah, ER β pa v endometriju in miometriju, ovarijih ter centralnem živčnem sistemu. Zaradi različne razporeditve in različnega izražanja ER α in ER β v celicah in tkivih, spreminjanja razmerja ER α / ER β med samim menstruacijskim ciklusom in spreminjanja koncentracije estradiola in

progesterona, je vpliv estrogenov v določenem tkivu in v določenem času različen (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004 in Ballare, 2006 in Moutsatsou in Sekeris, 2003). Do spreminjanja koncentracij estradiola in progesterona prihaja v pre- in po- menopavznem obdobju. Za razumevanje celično specifičnih učinkov estrogenov na endometriji je treba analizirati izražanje ER α in ER β v različnih fazah menstruacijskega ciklusa. V proliferativni fazi, še posebej v periovulatornem obdobju, se istočasno izražata oba tipa receptorjev, s tem da se ER α receptorji izražajo bolj intenzivno. Do istočasnega izražanja prihaja tudi med sekretorno fazo, le da je intenziteta izražanja obeh nižja. Proti koncu sekretorne faze se količina ER β v nekaterih stromalnih in žleznih celicah poveča (Lecce in sod., 2006).

Celično specifični učinki estrogenov so odvisni tudi od tvorbe homodimerov vsakega estrogenskega receptorja posebej ali ER α / ER β heterodimerov (Lecce in sod., 2006). Ker ER β receptorji uravnavajo delovanje ER α receptorjev, je prisotnost heterodimera najverjetneje razlog za inhibitorni vpliv ER β na z ER α inducirano prepisovanje genov (Moutsatsou in Sekeris, 2003 in Ryan in sod., 2005).

2.3.3 Progesteronski receptorji

Progesteronski receptor se pojavlja v dveh velikostih. PR-B receptor z molekulsko maso 116 kDa ima 933 aminokislin, PR-A receptor z molekulsko maso 81 kDa pa je pri človeku za 164 aminokislinski fragment na amino-terminalnem koncu krajši (*sliki 13*). Obe obliki progesteronskih receptorjev, PR-A in PR-B, kodira isti gen (Podczaski in Mortel, 2001). Obliki progesteronskega receptorja nastaneta zaradi različnega začetka translacije iz iste molekule mRNA, lahko pa pride do prepisovanja na različnih promotorjih istega gena (Sasaki in sod., 2001 in Hanekamp in sod., 2003). Progesteronska receptorja PR-A in PR-B se funkcionalno razlikujeta (Graham in Clarke, 1997). Poznane so tudi druge izooblike progesteronskega receptorja, pri katerih biološke funkcije niso še povsem pojasnjene (Hirata in sod., 2003).



Sliki 12: Slika A prikazuje 3D strukturo dimera progesteronskega receptorja z vezanim ligandom (PDB oznaka: 1A28), slika B prikazuje primerjavo strukture med progesteronskima receptorjema PR-A in PR-B (Povzeto po Graham in Clarke, 1997).

Jedrna lokalizacijska signalna sekvenca (JLS) se pri progesteronskih receptorjih nahaja na dveh mestih na proteinu. Prva sekvenca se nahaja na zgibni regiji, druga pa na DNA-vezavni regiji proteina (Leslie in sod., 2003). Progesteronska receptorja imata tudi dve domeni s transaktivacijsko aktivnostjo ter eno inhibitorno domeno (ID). Progesteronski receptor PR-B ima na N-terminalnem koncu še tretjo domeno s transaktivacijsko aktivnostjo, ki zavira delovanje inhibitorne regije. Pri progesteronskemu receptorju PR-A je inhibitorna regija funkcionalna in inhibira transaktivacijsko aktivnost ostalih domen (Hanekamp in sod., 2003).

2.3.3.1 Aktivnost progesteronskih receptorjev

Različna N-terminalna konca PR-A in PR-B narekujeta različne funkcionalne karakteristike obeh receptorjev.

V žlezah endometrija estrogeni inducirajo transkripcijo genov in med drugim tudi izražanje progesteronskih receptorjev, progesteron pa inhibira izražanje lastnih receptorjev. Po vezavi liganda na E receptorsko regijo progesteronskega receptorja, pride do dimerizacije receptorja, povezovanja dimera s PRE (od progesterona odzivna regija) področjem na tarčnih genih ter do prepisovanja ustreznih genov. Progesteronska receptorja PR-A in PR-B se med sabo razlikujeta tudi v sposobnosti aktivacije PRE promotorja na tarčnih genih.

Glavna funkcija PR-A v endometriju je regulacija delovanja estrogenov z inhibicijo aktivacije ER α ter s tem inhibicijo od estrogenov odvisne proliferacije endometrija. PR-A v endometriju zavira tudi izražanje PR-B, ki velja za močnega aktivatorja tarčnih genov. S tem PR-B neposredno sodeluje pri regulaciji funkcij endometrija. Do razlik v celični odzivnosti na progesteron prihaja zaradi različnega razmerja PR-A / PR-B ter izražanja progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B (Graham in Clarke, 1997 in Leslie in sod., 2003 in Miyamoto in sod., 2004 in Arnett-Mansfield in sod., 2004 in Ryan in sod., 2005 in De Vivo in sod., 2002).

2.3.3.2 Izražanje progesteronskih receptorjev

Progesteronska receptorja PR-A in PR-B se izražata v miometriju in endometriju maternice, kjer sta odgovorna za diferenciacijo le-tega, v jajčnikih in vaginalnem tkivu, v tkivu dojke, v nekaterih predelih možgan ter celo v žilnem endoteliju, pljučnem tkivu, timusu in pankreasu (Graham in Clarke, 1997 in Davies in sod., 2004).

Pod vplivom estrogenov se izražanje progesteronskih receptorjev poveča, progesteron pa izražanje progesteronskih receptorjev zmanjša. V prvi polovici ciklusa je izražanje progesteronskih receptorjev v epitelnih in stromalnih celicah endometrija in miometrija povečano. V drugi polovici ciklusa pa raven progesterona naraste, kar pomeni zmanjšano izražanje receptorjev PR-A in PR-B. V primerjavi s PR-A se PR-B bolj izraža v sekrecijski fazi v žlezni celicah, PR-A pa je skozi ves cikel bolj izražen v stromi (Graham in Clarke, 1997 in Sasaki in sod., 2001).

Morfološke in biokemijske raziskave so pokazale, da se PR-A nahaja v jedru celic tudi v odsotnosti progesterona, medtem ko se PR-B večinoma nahaja v citoplazmi in se šele v prisotnosti progesterona prenese v jedro celice. Predpostavlja se, da naj bi interakcije med citoplazmatskim PR-B brez vezanega liganda ter drugimi signalnimi molekulami vplivale na proliferacijo tkiva endometrija in s tem stimulacijo rasti rakavih celic (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004 in Ballare, 2006 in Leslie in sod., 2003). PR-B preko membransko vezanega receptorja za rastni faktor ali G-proteina vpliva na signalno transdukcijo, kar sproži ali poveča proliferacijo celic. Znotraj A/B regije PR-B receptorja se nahaja s prolinom bogat motiv, s katerim se receptor neposredno poveže s SH3 domeno c-Src, lahko tudi Hck (Leslie in sod., 2003).

Specifična znotrajjedrna razporeditev progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B prispeva k različni transkripcijski aktivnosti obeh receptorjev. V proliferacijski fazi sta progesteronska receptorja enakomerno porazdeljena v jedru celic, v sekrecijski fazi pa sta v jedru urejena v ločene diskretne enote. Pri raku endometrija so PR-A receptorji v jedru celic porazdeljeni večinoma enakomerno, medtem ko so PR-B receptorji urejeni v ločene enote. Če je v jedrih celic prisotna le ena oblika progesteronskega receptorja, je ta porezdeljen v diskretne enote (Arnett-Mansfield in sod., 2004).

PR-A in PR-B se razlikujeta po različnih funkcijah. Ker se v različnih tipih tkiv pojavljata v različnih količinah, je prav razmerje med PR-A in PR-B, ki je odvisno od trenutnega fiziološkega stanja tkiva, pomembno za odzivnost tkiva na progesteron (Arnett-Mansfield in sod., 2004).

2.3.4 Vloga steroidnih receptorjev pri kancerogenezi

Stimulacija endometrija z estrogeni brez sočasnega nasprotnega vpliva progesteronov je primarni etiološki faktor, povezan z razvojem hiperplazije endometrija in kasneje raka endometrija (Saito in sod., 2003 in Arnett-Mansfield in sod., 2004). V večini primerov še vedno ni pojasnjeno, ali do učinkov hormonov prihaja preko jedrnih receptorjev, membranskih receptorjev ali preko interakcij z drugimi celičnimi makromolekulami (Moutsatsou in Sekeris, 2003).

Pri različnih tipih raka endometrija so znanstveniki ugotovili različno izražanje estrogenskih in progesteronskih receptorjev in s tem različen vpliv hormonov na razvoj raka (Shiozawa in Konishi, 2006 in Liu, 2007).

2.3.4.1 Vloga estrogenskih receptorjev ER α in ER β pri kancerogenezi

Fiziološke funkcije estrogenskih receptorjev ER α in ER β se razlikujejo. ER β uravnava delovanje ER α in ima antiproliferativno in pro-apoptotsko funkcijo. Če pride do neravnovesja

med ER α in ER β v celici, vodi to do od estrogenov odvisne kancerogeneze (Skrzypczak in sod., 2004). Znanstveniki poročajo tako o povečanem kot tudi o zmanjšanem razmerju ER α / ER β pri raku endometrija v primerjavi z normalnim tkivom endometrija (Saegusa in Okayasu, 2000 in Sakaguchi in sod., 2002).

Večina znanstvenih raziskav nakazuje na zmanjšano količino ER β v rakavem tkivu endometrija, kar zveča razmerje ER α / ER β . Pri raku endometrija so poročali o signifikantno nižjem izražanju ER β na ravni mRNA in proteinov v primerjavi z ER α . Z zmanjševanjem količine ER β ter vseh izooblik ER β se v tkivu relativno poveča proliferacijski učinek ER α , kar vodi v povečano verjetnost za nastanek raka endometrija (Skrzypczak in sod., 2004 in Ryan in sod., 2005 in Sakaguchi in sod., 2002 in Fujimoto in sod., 2000 in Šmuc in sod., 2006). Skrzypczak in sod. so pri raku endometrija ugotovili tudi spremenjeno raven izražanja izooblik ER β : povečano izražanje ER β 5 izooblike ter zmanjšano izražanje ER β 2 Δ 5 izooblike.

Tudi funkcionalni polimorfizem v genu, ki kodira ER α , znanstveniki povezujejo z nastankom raka endometrija (Weiderpass in sod., 2000). Spremenjeni receptor lahko sproži nenadzorovano proliferacijo celic pri nižji koncentraciji estrogenov v tkivu, kar lahko vodi v razvoj raka endometrija (Herynk in sod., 2004 in Iwamoto in sod., 2003).

2.3.4.2 Vloga progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B pri kancerogenezi

Za razvoj raka endometrija je zelo pomembno razmerje PR-A / PR-B (Ryan in sod., 2005 in De Vivo in sod., 2002). Pri raku endometrija je razmerje PR-A / PR-B spremenjeno. Zaradi tega je zmanjšana progesteronska zaščita proti učinkom estrogenov (Sasaki in sod., 2001).

Znanstveniki predvidevajo, da je v večini primerov rakavega endometrija izražanje PR-A, PR-B ali obeh zmanjšano. Progesteronski receptor PR-B se največkrat slabo ali pa sploh ne izraža v jedrih slabo diferenciranih endometrioidnih adenokarcinomov. V poznih stadijih bolezni PR-A in PR-B nista prisotna. S tem se zmanjšuje ali povsem izniči vpliv progesterona na učinke estrogenov (Miyamoto in sod., 2004 in Hanekamp in sod., 2003 in Leslie in sod., 2003).

Z zmanjšanjem izražanja progesteronskih receptorjev pri raku endometrija se zmanjša tudi izražanje E-kadherina, transmembranskega glikoproteina, ki ima vlogo pri od kalcija odvisni adheziji celic, kar vodi v bolj invazivni fenotip raka endometrija (Hanekamp in sod., 2003).

V zadnjih študijah znanstveniki poročajo tudi o povečanem izražanju PR-B v rakavem tkivu endometrija. Zaradi funkcionalnega polimorfizma v promotorski regiji progesteronskega receptorja PR-B se poveča prepisovanje PR-B, s tem se spremeni razmerje PR-A / PR-B, kar poveča tveganje za nastanek raka endometrija (Ryan in sod., 2005 in De Vivo in sod., 2002). PR-B deluje v endometriju kot močni aktivator tarčnih genov, PR-A pa naj bi zaviral delovanje PR-B. Spremenjeno razmerje PR-A / PR-B v prid PR-B ima neposredno vlogo pri regulaciji funkcij endometrija (Arnett-Mansfield in sod., 2004 in Ryan in sod., 2005 in Graham in Clarke, 1997 in Leslie in sod., 2003 in Miyamoto in sod., 2004 in De Vivo in sod., 2002). Predpostavlja se, da naj bi tudi interakcije med citoplazmatskim PR-B brez vezanega liganda ter drugimi signalnimi molekulami stimulirale rast rakavih celic (Leslie in sod., 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

Ime kemikalije	Firma
Tris-HCl	Acros Organics
glicin	Carl-Roth
SDS ULTRA PURE	Carl-Roth
NaCl	Merck
2-propanol (izopropanol)	Merck
gvanidin hidroklorid	SIGMA
metanol	Carl-Roth
etanol	Carl-Roth
HCl	Merck
APS	SIGMA
kloroform	Merck
ocetna kislina	Merck
TEMED	SIGMA
vodikov peroksid 30%	Carl-Roth
Tri reagent (monofazna raztopina gvanidin tiocianata in fenola)	SIGMA
Bradfordov reagent	Carl-Roth
varekina	Šampionka Renče
Na-CITRAT	Kemika
DAB	SIGMA
mleko v prahu	Pomurske mlekarne
Tween 20	SIGMA
NaOH	Merck
akrilamid	SIGMA
glicerol	Merck
ECL reagent	Amersham
fiksir	Ilford Rapid Fixer
razvijalec	Ilford PQ Universal; Paper Developer
»West Pico reagent«	SuperSignal West Pico , Pierce

»Stripping pufer« - pufer za odstranjevanje protiteles pri prenosu Western	Pierce
KCl	Merck
MgCl ₂	Kemika
K ₂ HPO ₄	Kemika
Na ₂ HPO ₄	Kemika
NaH ₂ PO ₄	Kemika
Pertex [®] medij za pokrivanje	Mediate (GmbH), invent. Num. PER 40000
Coomassie Brilliant Blue G250	

3.1.2 Laboratorijska oprema

spektrofotometer	UV 1101, Biotech Photometer
magnetna mešala	Tehtnica železniki , HM – 532 Magnetic stirrer, HANNA Instruments HI 200 M
pH meter	SCHOTT, HANNA Instruments HI 8519 N
centrifugi	SIGMA 2K V (hlajena) rotor 12145, 12141 EPPENDORF 5415 D
avtoklav	MEDICO TEHNIKA
vorteks stresalnik	Tehtnica železniki EV-202
usmernik	PS 250-2 , SIGMA Techware
tehtnica	Sartorius Basic BL 1500s
analitska tehtnica	E. Mettler , B5 , 226645
digestorij	SIEMENS MICROMASTER
ledomat	Icematic N5SS
drobilec ledu	Santos
stresalnik	CAT ST 5
termo blok	neo Block 1 , 2-2503, Neolab
termostresalnik	EPPENDORF 1.5 ml
destilator	Destillo Ionenaustauscher ; HERCO
štoparica	Oregon scientific
rokavice	Kimberly-clark ; SAFESKIN * PFE Powder-Free Latex exam Gloves
mikrocentrifugirke	BRAND
plastične centrifugirke	CENTRIFUGE TUBES; 50 mL ; TPP [®]

mikrovalovna pečica	SHARP R-220A
pipete	PIPETMAN, GILSON
aparati za vrečke	SEVERIN Folio
mikroskop	CARL ZEISS, JENA ; OPTI-COM
zamrzovalnik (T= -70°C)	Scien Temp, Adrian
zamrzovalnik (T= -20°C)	Gorenje
hladilnik (T= +4°C)	Gorenje
PVDF membrana	Roth
plastične kivete	Disposable cuvettes PMMA 1,5 mL semimicro ; PLASTIBRAND®
vodna kopel	WB 13 Termo medicinski aparat TKS-1
pH lističi	Universal-Indikatorpapier pH 1-14 ; MN ; Carl- Rooth
kasetnik za razvijanje filmov	Hypercassette RPN 1642; Amersham
filmi	Hyperfilm™ ECL; Amersham Biosciences
membrana	Roth, PVDF, 0,45 µm
miliQ	

3.1.3 Protitelesa, serumi in standardi

proteinski standard	Fermentas standard #SMO441
PAP (Mouse-Peroxidase-Anti-Peroxidase)	Jackson Immuno Research Laboratories, INC
kozji serum	DAKOcytation, X0907
mišji serum	DAKOcytation, X0910
primarna mišja monoklonska protitelesa proti ER α	ER α (F-10): sc-8002 , Santa Cruz
primarna zajčja poliklonska protitelesa proti ER β	ER β (H-150): sc-8974 , Santa Cruz
primarna mišja monoklonska protitelesa proti PR-B	PR (B-30): sc-811 , Santa Cruz
primarna mišja monoklonska protitelesa proti PR-AB	PR (AB-52): sc-810 , Santa Cruz
primarna mišja monoklonska protitelesa proti β -aktinu	kat. št. A 5441 , Sigma
primarna zajčja monoklonska protitelesa proti aktinu	kat. št. A 2066 , Sigma
kozja protitelesa IgG+IgM proti mišjim, označena s hrenovo peroksidazo	Jackson Immuno Research Laboratories, INC
kozja protitelesa IgG proti zajčjim, označena s hrenovo peroksidazo	kat. št. A 0545 , Sigma
BSA (goveji serumski albumin)	Sigma

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija proteinov

Reagenti:

100 % etanol	
2-propanol (izopropanol)	
0,3 M gvanidin hidroklorid v 95 % etanolu	2,866 g gvanidin hidroklorid ($M=95,53$ g/mol) v 100 ml 95 % etanola
1 % SDS	
65 % TCA	5 g TCA v 2,7 ml destilirane vode
0,1 M fosfatni pufer (pH 8,0)	5,3 ml raztopina A: 2,76 g NaH_2PO_4 / 100 ml vode (0,230 M) 94,7 ml raztopina B: 2,84 g Na_2HPO_4 / 100 ml vode (0,200 M) do 200 ml destilirana voda
NaOH	

Proteine smo izolirali iz vzorcev tkiva endometrija, ki smo jih dobili na Ginekološki kliniki Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani. Razpolagali smo z vzorci normalnega in rakavega tkiva 16 bolnic z rakom endometrija, iz katerih je bila predhodno že izolirana RNA. Vzorci so bili vzeti ob histerektomiji ob soglasju pacientk in Komisije Republike Slovenije 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 3*).

Preglednica 3: 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
Stopnja	G2/3	G1	G2/3	G1	G2/S	G2	G1/2*	G2/3	G2	G1/2*	G1/2*	G2/3*	G1/2	S*	G1	G3
Leta	41	80	85	62	56	76	75	55	54	37	46	69	72	62	56	79

Vsi vzorci tkiv so bili predhodno homogenizirani in obdelani s Tri reagentom (1 ml Tri reagenta / 50-100 mg tkiva). Po dodatku kloroforma ter centrifugiranju se je mešanica ločila v tri faze: vodno fazo z RNA, interfazo z DNA ter organsko fazo s proteini. Izolacija RNA je bila že izvedena, mi smo nadaljevali z izolacijo DNA in proteinov.

Postopek:

Izbrane vzorce smo odtalili in centrifugirali 15 minut pri 12000 g ter 4°C. Nato smo v digestoriju previdno odstranili vodno fazo, k preostali interfazi in organski fazi pa dodali absolutni etanol (0,3 ml absolutnega etanola / 1 ml Tri reagenta). Mešanico smo inkubirali 2-3 minute pri sobni temperaturi ob rahlem mešanju ter jo nato centrifugirali 5 minut pri 2000 g ter 4°C. Tako smo precipitirali DNA. Pelet z DNA smo shranili za kasnejšo dokončno izolacijo pri -20°C.

Supernatant s proteini smo odpipetirali v večje centrifugirke. V digestoriju smo dodali izopropanol (1,5 ml izopropanola / 1 ml Tri reagenta), ki obori proteine. Mešanico smo 10 minut počasi stresali na stresalniku pri sobni temperaturi ter nato 10 minut centrifugirali pri 12000 g in 4°C. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli, pelet pa nato spirali z 0,3 M gvanidin hidrokloridom v 95 % etanolu (2 ml gvanidin hidroklorida / 1 ml Tri reagenta) 20 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Po spiranju smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 7500 g in 4°C ter nato supernatant zavrgli. Postopek spiranja z 0,3 M gvanidin hidrokloridom smo trikrat ponovili. Pelet smo resuspendirali v 2 ml 100 % etanola. Pomagali smo si z »vorteks« stresalnikom. Vzorce smo stresali 20 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 8 minut pri 10000 g in 4°C. Če se supernatant ni zbistril, smo centrifugiranje ponovili pri večjem številu obratov. Supernatant smo odpipetirali. Odprte centrifugirke smo postavili v eksikator in usedlino pod vakuumom osušili. Za to je bilo potrebno približno 25 minut. Usedlino smo popolnoma resuspendirali v 1 % SDS. Volumen dodanega 1 % SDS smo

prilagodili količini usedline ter si ga zabeležili. Vzorce smo čez noč shranili v zamrzovalniku pri -20°C .

V nadaljevanju smo vzorce 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 in po potrebi kasneje iz njega nadaljevali izolacijo proteinov, če se je izkazalo, da je bila prvotna končna količina izoliranih proteinov majhna.

Ob prenosu supernatanta v nove mikrocentrifugirke smo izmerili in zabeležili volumen le-tega. Sledila je precipitacija s sveže pripravljeno 65 % TCA, v prisotnosti katere se proteini oborijo. Količino dodane TCA smo prilagodili izmerjenemu volumnu supernatanta (1 volumen 65 % TCA na 10 volumnov supernatanta). Suspenzijo smo po 40 minutni inkubaciji na ledu centrifugirali 20 minut pri maksimalnih obratih in 4°C . 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 ter si zabeležili končni volumen. Če je bil pH prenizek ($\text{pH} < 6,0$), 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 % etanolu	2,94 g Na-citrat (M=294,10 g/mol) v 100 ml 10 % etanola
10 % etanol	12,7 ml 100 % etanola, do 100 ml mili Q
75 % etanol	94,9 ml 100 % etanola, do 100 ml mili Q
8 mM NaOH	

Postopek:

Pelet z DNA, shranjen (v mikrocentrifugirkah) pri začetnih korakih izolacije proteinov, smo odtajali in spirali z 0,1 M Na-citratom v 10 % etanolu (1ml 0,1 M Na-citrata v 10 % etanolu / 1 ml Tri reagenta). Suspenzijo smo po 30 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi ob občasnem mešanju s stresanjem centrifugirali 5 minut pri 7000 g in 4°C. Nato smo supernatant odpipetirali in zavrgli. Postopek spiranja peleta z 0,1 M Na-citratom v 10 % etanolu smo trikrat ponovili. Sledilo je resuspendiranje DNA usedline v 75 % etanolu, 2 ml na vsako mikrocentrifugirko, ter inkubacija 10-20 minut pri sobni temperaturi ob previdnem občasnem stresanju. Nato smo vzorce centrifugirali 5 minut pri maksimalnih obratih in 4°C. Etanol, v katerem so bile nečistoče, smo odpipetirali in zavrgli, usedlino pa v eksikatorju sušili do suhega. Za to je bilo potrebno 20-30 minut. Sprano DNA usedlino smo resuspendirali v primernem volumnu 8 mM NaOH (200 µl – 400 µl 8 mM NaOH na mikrocentrifugirko, odvisno od tega, kako hitro se je usedlina resuspendirala), tako da je bila končna koncentracija DNA med 0,2 in 0,3 µg/µl. Izolirano DNA smo shranili pri -20°C.

3.2.3 Določevanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo

Reagenti:

standardna raztopina BSA (goveji serumski albumin)	$c = 1 \text{ mg BSA} / 1 \text{ ml mili Q}$
Bradfordov reagent (BioRad)	
PBS pufer (pH 7,3)	1 liter: 140 mM NaCl (8,2 g) 2,7 mM KCl (0,2 g) 10 mM Na ₂ HPO ₄ (1,4 g) 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (0,2 g) destilirana voda do 1 litra

Koncentracijo proteina smo določali po znani Bradfordovi metodi. Gre za hitro, natančno in občutljivo metodo določanja koncentracije proteinov. Metoda temelji na vezavi Coomassie Blue G250 barvila na protein v kislem. Vezava anionske oblike barvila na protein poteka zaradi elektrostatskih (predvsem preko arginina) ali hidrofobnih interakcij. Absorpcijski maksimum kompleksa protein-barvilo je pri 595 nm.

Postopek:

Pripravili smo PBS pufer in standardno raztopino BSA. Pripravili smo dve seriji plastičnih kivet. V prvo serijo smo odpipetirali različne volumne standardne raztopine (1 μl , 2 μl , 5 μl , 10 μl), v drugo serijo pa po 2 μl od vsakega vzorca proteinov. Pripravili smo tudi kiveto za slepi vzorec. V vse plastične kivete smo dodali 900 μl PBS pufera (razen v kiveto z 10 μl BSA standardne raztopine, kamor smo dodali le 890 μl PBS pufera, da skupni volumen v kiveti ni odstopal za več kot 1 %) in 100 μl Bradfordovega reagenta. Vsebinsko kivet smo dobro premešali ter inkubirali 5 minut. S slepim vzorcem smo umerili spektrofotometer. Ker je ta metoda določanja koncentracije proteinov relativna, smo standardnim raztopinam z znano koncentracijo BSA izmerili absorbanco pri 600 nm in iz dobljenih rezultatov določili umeritveno krivuljo.

Na podlagi umeritvene krivulje in izmerjenih vrednosti absorbance posameznih vzorcev smo izračunali koncentracijo proteinov v določenem vzorcu.

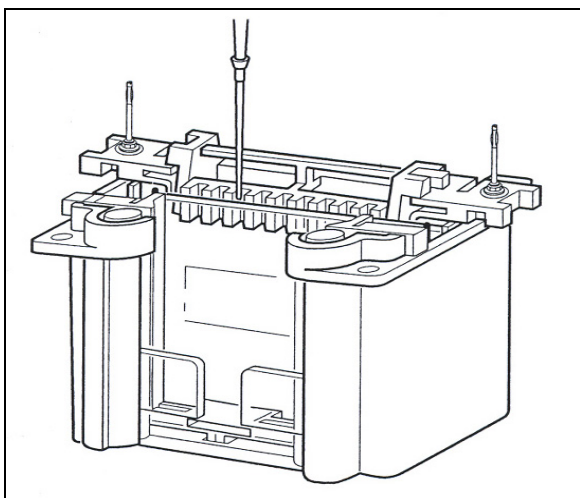
3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS PAGE)

Reagenti:

12 % ločevalni gel	3,35 ml destilirana voda 2,50 ml 1,5 M Tris-HCl , pH 8,8 0,10 ml 10 % SDS 4,00 ml 30 % akrilamid / bis akrilamid 50 µl 10 % amonijev persulfat (APS) 5 µl TEMED
4 % koncentrirni gel	6,10 ml destilirana voda 2,50 ml 0,5 M Tris-HCl , pH 6,8 0,10 ml 10 % SDS 1,30 ml 30 % akrilamid / bis akrilamid 50 µl 10 % amonijev persulfat (APS) 10 µ TEMED
pufer za pripravo vzorcev	1,00 ml 0,5 M Tris-HCl , pH 6,8 0,80 ml glicerol 1,60 ml 10 % SDS 0,40 ml 2-β-merkaptotanol 0,20 ml 0,05 % bromfenol modro 4,00 ml destilirana voda
30 % etanol	
PBS (pH 7,5)	
10 % APS	100 mg APS / 1000 µl destilirane vode
5X elektroforezni pufer (pH 8,3)	za 0,8 l: 12 g Tris-HCl 57,6 g glicin 4 g SDS destilirana voda do 0,8 l

S pomočjo poliakrilamidne SDS PAGE elektroforeze, analitske metode, ločujemo proteine na osnovi molekulske mase in s tem ugotavljamo vsebnost različnih proteinov v vzorcu. Metoda temelji na uporabi anionskega detergenta SDS, ki denaturira proteinske molekule, jih razvije in obda s svojimi molekulami. Ker imajo molekule SDS negativen naboj, bodo imeli tudi vsi s SDS denaturirani proteini negativen naboj, velikost naboja pa bo odvisna od velikosti proteinske molekule. Hitrost potovanja takih molekul v električnem polju je obratno

sorazmerna z njihovo velikostjo. SDS elektroforeza poteka na poliakrilamidnih nosilcih z različno zamreženostjo. Polimerizacija akrilamida in bis akrilamida poteka ob pomoči TEMEDA in APS. TEMED stimulira nastanek prostih radikalov iz APS, le-ti pa katalizirajo polimerizacijo.



Slika 13: Shema naprave za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti SDS (SDS PAGE) (Prirejeno po Mini PROTEAN® 3 Cell. Instruction Manual).

Postopek:

Za SDS PAGE smo uporabili Mini-PROTEAN® 3 Cell elektroforezno aparaturo proizvajalca BioRad (ZDA) (*slika 13*). Postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Sestavili smo aparaturo in najprej v digestoriju pripravili 12 % ločevalni gel. Gel smo nalili v aparaturo med stekelci do določene višine, nad gel pa še 30 % etanol, ki preprečuje gelu, da bi se med strjevanjem izsušil. Med strjevanjem ločilnega gela (45 minut) v digestoriju smo pripravili 4 % koncentrirni gel po protokolu. Ko se je ločilni gel strdil, smo odlili 30% etanol ter gel sprali z destilirano vodo in ga osušili s filter papirjem, da bi se koncentrirni gel brez zračnih žepov posedel na ločilni gel. Dolili smo koncentrirni gel ter vstavili glavničke. Koncentrirni gel smo pustili stati 30 – 40 minut, da se je strdil (Pri pripravi obeh gelov smo vedno uporabili sveže pripravljene APS.). Nosilec z gelom smo vstavili v kadičko za elektroforezo in ga prelili z elektroforeznim pufrom, ki smo ga predhodno 5X redčili. Aparatura je bila pripravljena za nanos vzorcev.

Med strjevanjem gelov smo pripravili vzorce za elektroforezo. Glede na prvotno izračunano koncentracijo izoliranih proteinov v posameznem vzorcu smo vzeli tako količino vzorca, da je bila končna masa proteinov 60 μg . Vsem vzorcem smo dodali pufer za pripravo vzorcev v razmerju 1:5 in vzorce segrevali 10 minut pri 105°C v termo bloku. S tem smo denaturirali proteine. Nato smo vzorce centrifugirali 1 minuto pri 8000 g in nanegli na gel. Poleg vzorcev smo nanegli tudi proteinske standarde (Fermentas standard #SMO441).

Elektroforeza je potekala 45 minut pri napetosti 190 V v 1X elektroforeznem pufu (pH 8,3). Ves čas smo spremljali potek ločevanja proteinov in potovanje fronte in po potrebi prej ali kasneje prekinili potek elektroforeze.

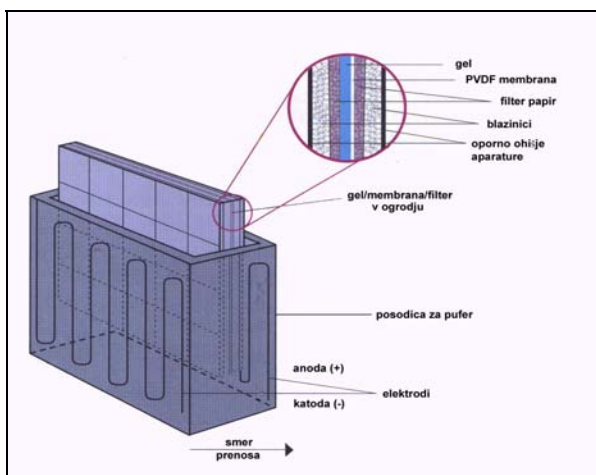
3.2.5 Prenos proteinov na membrano (prenos western)

Reagenti:

pufer za prenos (pH 8,1 – 8,4)	3,03 g Tris (25mM) 14,4 g glicin (192 mM) 200 ml metanol (20 %) do 1 l mili Q
10X TBS (pH 7,5)	24,2 g Tris (200 mM) 292,2 g NaCl (5 M) do 1 l destilirana voda
1X T-TBS	0,8 l: 80 ml 10X TBS 720 ml destilirane vode 800 µl Tween 20 (0,05 %)
membrana	Roth, PVDF, 0,45 µm
primarna protitelesa	·ER α (F-10) - mišja monoklonska protitelesa proti ER α , redčena 1 : 500 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS ·ER β (H-150) - zajčja poliklonska protitelesa proti ER β , redčena 1: 200 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS ·PR (B-30) - mišja monoklonska protitelesa proti PR-B, redčena 1 : 500 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS ·PR (AB-52) - mišja monoklonska protitelesa proti PR-A in PR-B, 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 IgG+IgM proti mišjim, označena s hrenovo peroksidazo (HRP), redčena 1:10000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS kozja protitelesa IgG proti zajčjim, označena s hrenovo peroksidazo (HRP), redčena 1: 2000 z 1 % raztopino posnetega mleka v T-TBS

1 % raztopina posnetega mleka v T-TBS	0,5 g mleka v prahu / 50 ml 1X T-TBS
100 % metanol	
5 % raztopina posnetega mleka v T-TBS (raztopina za blokiranje nespecifične vezave)	2,5 g mleka v prahu / 50 ml 1X T-TBS

Gre za metodo prenosa proteinov iz gela na PVDF membrano. Prenos western je metoda, pri kateri se uporabljajo protitelesa za ugotavljanje prisotnosti, relativne količine in molekulske mase proteinov. Detekcija je lahko direktna (z označenimi primarnimi protitelesi) ali indirektna (z označenimi sekundarnimi protitelesi, ki se vežejo na primarna protitelesa). Specifičnost interakcije protitelo – antigen omogoča identifikacijo točno določenega proteina v proteinski mešanici.



Slika 14: Shema naprave za prenos western (Western Blot) (prir. po Pierce Biotechnology, Inc., 2005. Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide).

Postopek:

Za prenos proteinov na membrano smo uporabili Mini Trans Blot aparaturo (BioRad) po navodilih proizvajalca (BioRad, ZDA) (*slika 14*).

Po končani poliakrilamidni gelski elektroforezi smo pripravili puffer za prenos ter PVDF membrano in filter papir primerne velikosti. Membrano smo najprej potopili za 15 sekund v 100 % metanol, nato za 2 minuti v miliQ ter nazadnje za 5 minut v puffer za prenos. V pufferu za prenos smo namočili še filter papir, gel ter blazinici, ki sta bili priloženi aparaturi. Nato smo

sestavili aparaturo. V pravilnem vrstnem redu in pravilno obrnjeno smo od negativnega (črne barve) proti pozitivnemu (bele barve) polu v ogrodje aparature ustavili v transfer pufri namočene blazinico, filter papir primerne velikosti, gel, PVDF membrano, še en filter papir primerne velikosti in še eno blazinico. Pazili smo, da med plastmi ni bilo zračnih mehurčkov, ki bi ovirali prenos na membrano. Ogrodje smo zaprli in pravilno glede na smer toka vstavili v Mini Trans Blot aparaturo. Vse to smo prelili s transfer pufrom, dodali magnetno mešalo in posodico z ledom za hlajenje aparature med prenosom. Prenos na membrano je potekal pri 80-90 V in 150 mA 45 minut.

Po končanem prenosu je sledilo blokiranje membrane z raztopino za blokiranje nespecifične vezave (5 % raztopina posnetega mleka v T-TBS). Blokiranje je potekalo 1 uro na stresalniku pri sobni temperaturi. Preostale proteine na gelu smo obarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue po postopku, opisanem pod točko 3.2.8.

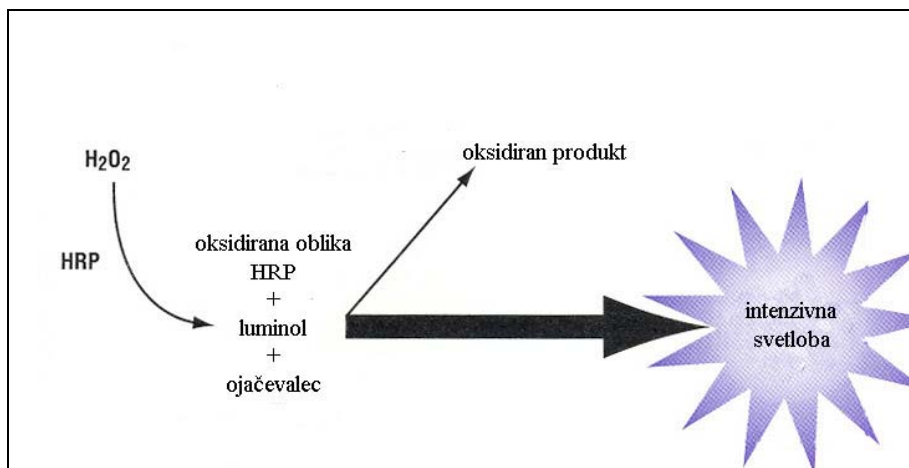
Sledilo je 4X spiranje v 1X T-TBS po 5 minut na stresalniku pri sobni temperaturi ter nato inkubacija z ustreznimi primarnimi protitelesi v 1 % raztopini posnetega mleka v T-TBS (20 ml). Inkubacija je potekala preko noči v hladni sobi. Primarna protitelesa smo odlili in spirali membrano z 1X T-TBS 4X po 5 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Sledila je inkubacija s sekundarnimi protitelesi v 1 % raztopini posnetega mleka v T-TBS (10 ml) 1 uro na stresalniku pri sobni temperaturi. Sekundarna protitelesa smo odlili in spirali membrano z 1X T-TBS 4X po 5 minut na stresalniku pri sobni temperaturi.

3.2.6 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL)

Reagenti:

film	
razvijalec	10 ml razvijalca / 90 ml vode
fiksir	20 ml utrjevalca / 80 ml vode
»SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution« (reagent B)	0,5 ml za eno membrano
»SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution« (reagent A)	0,5 ml za eno membrano

Pri kemiluminiscenci gre za reakcijo med kemiluminiscentno molekulo (luminolom) in vodikovim peroksidom, ki jo katalizira hrenova peroksidaza (HRP), vezana na sekundarnih protitelesih. HRP v prisotnosti vodikovega peroksida reagira z luminolom (ga oksidira), pri čemer odda svetlobo. Intenzivnejša in dalj časa trajajoča svetloba nastane ob dodatku kemiluminiscentnega ojačevalca. S tem se občutljivost metode poveča (*slika 15*). Svetloba se zazna na filmu kot temna lisa.



Slika 15: 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).

Postopek:

V temnici pripravimo kadičke z razvijalcem, utrjevalcem ter navadno vodo, film narežemo na kose primerne velikosti.

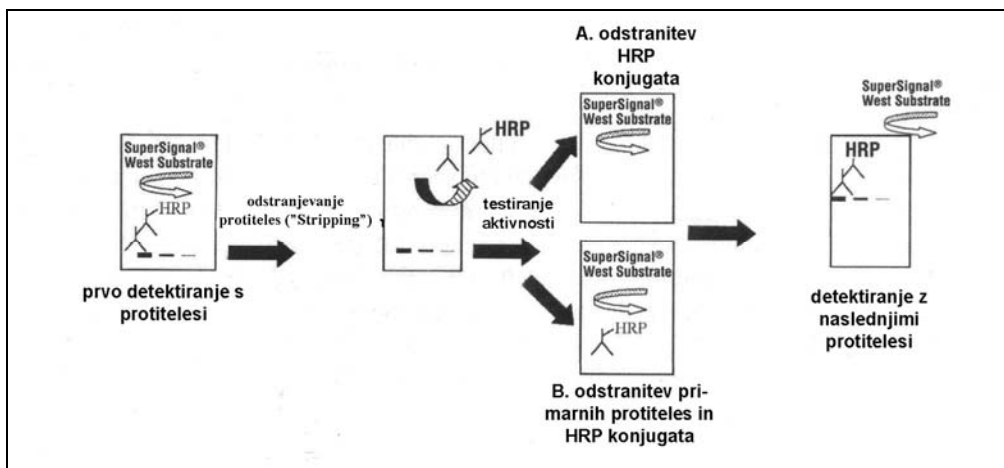
Membrano smo vzeli iz pufra 1X T-TBS, v katerem smo jo spirali, in jo položili na čisto podlago. Pripravili smo 1 ml raztopine reagentov A (vodikovega peroksida) in B (luminol / ojačevalec) v razmerju 1: 1. Tako pripravljeno raztopino smo takoj enakomerno nanесли na membrano in pustili 5 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji z reagentoma smo membrano zavili v prozorno folijo in pri tem pazili, da med folijo in membrano ni bilo zračnih mehurčkov. Membrano smo prilepili v kaseto za razvijanje in nanjo v temnici položili film. Izpostavitvev kemiluminiscentni svetlobi je trajala 5 minut. Nato smo film potopili v razvijalec za 30 sekund, da so se na filmu pojavile lise. Nadalje smo film za nekaj sekund potopili v vodo in končno v fiksir. Film smo ponovno sprali z vodo in ga posušili.

3.2.7 Odstranjevanje protiteles (»Stripping«) in ponovna detekcija proteinov na membrani

Reagenti:

pufer za odstranjevanje protiteles pri prenosu western (»Stripping pufer«)	20 ml za eno membrano
1X T-TBS	0,8 l: 80 ml 10X TBS 720 ml destilirane vode 800 µl 0,05 % Tween 20

Prednost metode detekcije z ojačano kemiluminiscenco (ECL reakcije) je, da omogoča odstranjevanje protiteles s PVDF membrane po prenosu western. S pufrom za odstranjevanje protiteles (»Stripping pufrom«) s PVDF membrane odstranimo primarna in sekundarna protitelesa ter očiščeno membrano ponovno uporabimo za detekcijo drugih vrst proteinov na membrani.



Slika 16: 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).

Postopek:

Vodno kopel smo segreti na 37°C. Puffer za odstranjevanje protiteles («Stripping puffer») smo v vodni kopeli segreti na 37°C (20 ml odstranjevalnega pufra / 1 membrano). Membrano smo položili v stekleno kadičko, jo prelili z 20 ml prej segretega pufra ter jo inkubirali na stresalniku pri sobni temperaturi 60 – 90 minut. Čas inkubacije smo prilagodili intenziteti lis, ki smo jih detektirali na filmu. Vmes smo odstranjevalni puffer 1X zamenjali s svežim, prav tako segretim na 37°C.

Po inkubaciji smo puffer za odstranjevanje protiteles odlili in membrano spirali z 1X T-TBS na stresalniku na sobni temperaturi 4X po 5 minut. Za preverjanje uspešnosti odstranitve primarnih protiteles z membrane smo le-to ponovno inkubirali s sveže pripravljenimi sekundarnimi protitelesi v 1% raztopini posnetega mleka v T-TBS (10 ml) 60 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Nato smo ponovili detekcijo z ojačano kemiluminiscenco (ECL) po postopku, opisanem pod točko 3.2.6.

Če smo dobili signal, je to pomenilo, da nismo odstranili vseh primarnih protiteles in smo postopek odstranjevanja protiteles ponovili. Če signala ni bilo, smo lahko nadaljevali z zaznavanjem proteinov z novimi protitelesi (*slika 16*).

3.2.8 Barvanje gela z barvilom Coomassie Brilliant Blue

Reagenti:

7 % očetna kislina	35 ml 100 % očetne kisline, do 500 ml destilirane vode
Coomassie Brilliant Blue	0,1 % Coomassie Blue R-250 40 % metanol 10 % očetna kislina

Postopek:

Po prenosu proteinov na membrano (prenos western) smo gel položili v čašo, ga prelili z barvilom Coomassie Brilliant Blue, čašo prekrili z aluminijasto folijo ter segrevali do vrenja. Barvilo smo odlili ter gel sprali z vodo. Gel smo nato v čaši prelili s 7 % očetno kislino, v kateri smo s segrevanjem do vrenja pospešili razbarvanje ozadja. Ta postopek razbarvanja ozadja smo ponovili 2-3 krat. 7 % očetno kislino smo odlili in gel spirali s hladno vodovodno vodo.

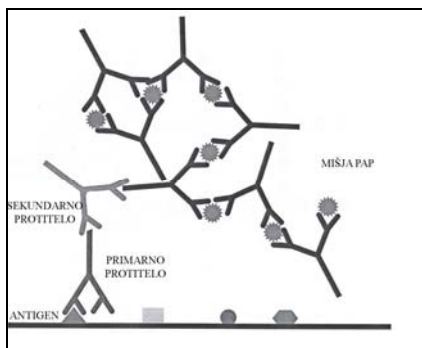
Razbarvani gel smo prenesli na računalnik in ga nato na belem papirju (za ozadje) osušili s pomočjo sušilca gelov.

3.2.9 Imunohistokemijsko barvanje

Reagenti:

TBS, pH 7,5	0,05 M Tris-HCl 0,85 % NaCl
ksilen	
100 % etanol	
96 % etanol	
70 % etanol	
30 % H ₂ O ₂	
T- PBS	PBS 0,05 % Tween 20
0,01 M Na-citrat, pH 6,0	
kozji serum	
mišji serum	
primarna protitelesa (1:200)	mišja monoklonska protitelesa proti PR-B
sekundarna protitelesa (1:100)	kozja protitelesa proti mišjim
PAP (Mouse-Peroxidase-Anti-Peroxidase)	
0,5 M Tris/HCl, pH 7,4	
DAB (3,3` - diaminobenzidin tetra -hidroklorid)	
hematoksilin	
Pertex [®] medij za pokrivanje	

Namen te metode je s specifično reakcijo med označenim protitelesom in izbranim antigenom določiti, identificirati in vizualizirati porazdelitev in lokalizacijo specifične tkivne komponente pri optimalnih pogojih.



Slika 17: Shema vezave primarnih protiteles, sekundarnih protiteles in PAP kompleksa (peroksidaza anti peroksidaza kompleks) (Prirejeno po W. T. Lee, www.anapath.necker.fr.)

Postopek:

S to metodo smo želeli določiti in vizualizirati porazdelitev PR-B receptorjev.

Vzorci smo dobili z Ginekološke klinike Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani. Parafinske rezine tkiva (5 μm) so bile posušene na pozitivno nabitem predmetnem stekelcu pri 50°C preko noči.

Tako pripravljene vzorce smo postavili v pokončno stojalo in inkubirali v kadički s ksilenom 5 minut oziroma toliko časa, da se je odstranil parafin. Sledila je rehidracija v padajočih koncentracijah etanola (100 % Et-OH, 96 % Et-OH, 70 % Et-OH in destilirana voda). Inkubacija v posameznik koncentracijah etanola 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 sveže pripravljenem T-PBS.

V naslednji stopnji smo z denaturacijo proteinov izpostavili antigene. Vzorce v kadički 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 preluknjano plastično folijo, 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 raztopino kozjega seruma s TBS v razmerju 1:5. Na predmetno stekelce smo nanесли 200 μl raztopine kozjega seruma in vzorce blokirali 20 minut. Tako smo preprečili nespecifično vezavo sekundarnih protiteles. Nato smo serum odlili.

Pripravili smo raztopino primarnih protiteles, tako da smo primarna protitelesa redčili z razredčenim (1:5) kozjim serumom v razmerju 1:200. Na predmetno stekelce z vzorcem smo nanесли 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 s kozjim 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 (kozja protitelesa proti mišjim) smo redčili s T-PBS v razmerju 1:100. Na predmetno stekelce z vzorcem smo odpipetirali po 100 µl raztopine protiteles. Sledila je 30 minutna inkubacija s sekundarnimi protitelesi. Vzorce smo nato spirali v T-PBS dvakrat po 5 minut.

Sledila je inkubacija vzorcev z mišjo PAP (mišja peroksidaza-anti-peroksidaza). Na predmetno stekelce smo nanесли 100 µl 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 µl raztopine svežega DAB, Tris/HCl in H₂O₂ (0,0025 g DAB; 5 ml 0,05 M Tris/HCl, pH 7,4; 1,5 µl 30 % H₂O₂) (*slika 18*). 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, da je tkivo ostalo na predmetnem stekelcu.

Nato smo v digestoriju s hematoksilinom obarvali ozadje, kar poveča prepoznavnost in omogoča števno celic. Vzorce smo inkubirali v kadički s hematoksilinom. Po 45 sekundah smo vzorce sprali z navadno vodo. Sledila je dehidracija v naraščajočih koncentracijah etanola (70 % Et-OH, 96 % Et-OH, 100 % Et-OH) in v ksilenu. Vsaka stopnja je trajala 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 PR-B receptorja.

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 skupno 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 skupno število točk za posamezno izbrano območje na filmu.

3.2.11 Statistična analiza

Statistično smo obdelali rezultate raziskave količine estrogenskega receptorja ER β in progesteronskega receptorja PR-B v različnih vzorcih na osnovi postopka SDS PAGE, prenosa western in detekcije z ojačano kemiluminiscenco. Za statistično analizo rezultatov smo uporabili računalniški program SPSS. Izračunali smo povprečje skupnega števila točk estrogenskega receptorja ER β in progesteronskega receptorja PR-B, normirano s proteinom β -aktin za normalno tkivo in za rakavo 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. Postavili smo hipotezo (H_0), da sta količini estrogenskega receptorja ER β in progesteronskega receptorja PR-B v normalnem in rakavem tkivu enaki. To hipotezo smo v okviru naše raziskave želeli ovreči ter dokazati, da obstaja statistično značilna razlika v izražanju estrogenskega receptorja ER β in progesteronskega receptorja PR-B v rakavem endometriju v primerjavi z normalnim.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA PROTEINOV

Izolirali smo proteine iz vzorcev raka endometrija in vzorcev okolnega normalnega endometrija bolnic z rakom endometrija. Proteine smo izolirali tudi iz štirih celičnih linij (HepG2, Ishikawa, MCF7 in JEG-3). Z Bradfordovo metodo, opisano pod točko 3.2.3, smo določili koncentracijo in izračunali maso proteinov v vzorcih. Podatki za posamezne vzorce so podani v preglednici (*preglednica 4*).

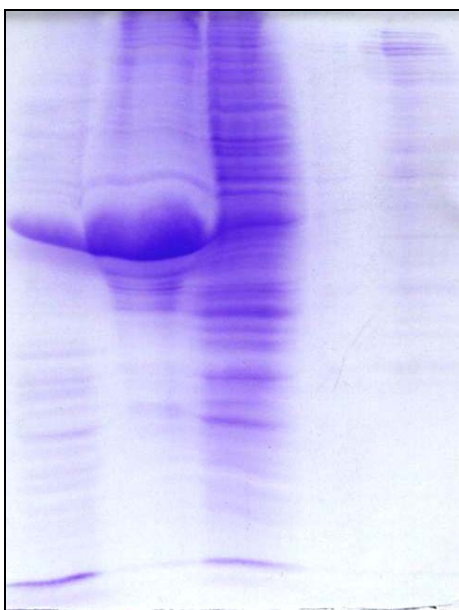
Preglednica 4: Koncentracija in masa izoliranih proteinov iz vzorcev rakavega in okolnega normalnega endometrija in celičnih linij, določena po Bradfordovi metodi.

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	4,3	469	854
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	
HepG2	5,9		1360	
Ishikawa	2,0		614	

4.2 ZAZNAVANJE ER β , PR-B TER β -AKTINA V CELIČNIH LINIJAH

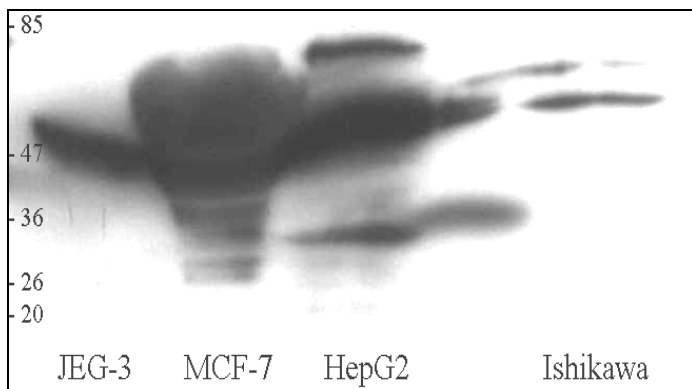
Prisotnost estrogenskega receptorja ER β , progesteronskega receptorja PR-B ter hišnega proteina β -aktina smo najprej proučevali v vzorcih celičnih linij. Uporabili smo celično linijo raka jeter HepG2, celično linijo raka endometrija Ishikawa, celično linijo raka dojke MCF-7 in celično linijo raka horionskih resic JEG-3 (*slika 18*).

Za receptor ER β smo pri vseh celičnih linijah na filmu zaznali signal. Zelo intenziven signal smo zaznali pri celičnih linijah JEG-3, MCF-7 in HepG2, medtem ko je bil signal pri celični liniji Ishikawa šibkejši (*slika 19*). Za progesteronski receptor PR-B smo bolj intenziven signal na filmu zaznali pri celičnih linijah JEG-3 in HepG2, relativno šibkejši pa pri MCF-7. Pri celični liniji Ishikawa signala nismo zaznali (*slika 20*). Za protein β -aktin smo zaznali signal na filmu pri celičnih linijah MCF-7, HepG2 in Ishikawa. Pri celični liniji JEG-3 signala nismo zaznali (*slika 21*)



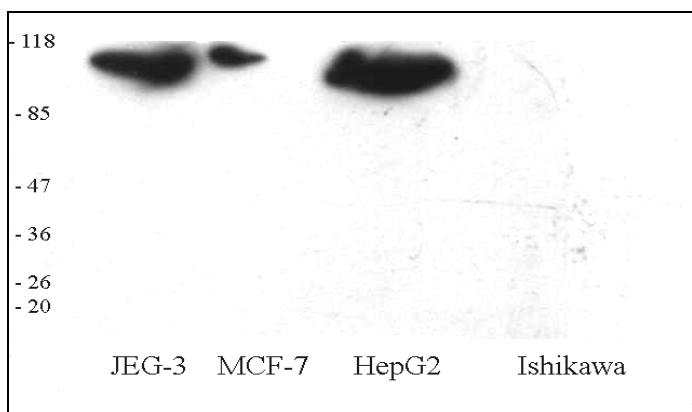
JEG-3 MCF-7 HepG2 Ishik.

Slika 18: SDS-PAGE gel celičnih linij po barvanju s Coomassie Brilliant Blue



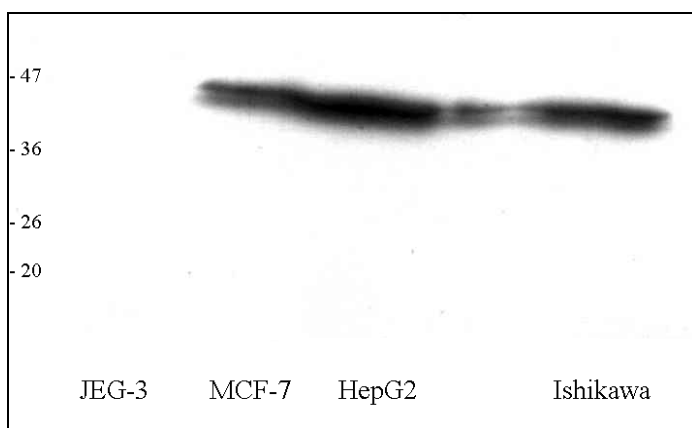
← ERβ (56 kDa)

Slika 19: Film po zaznavanju ERβ v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.



← PR-B (116 kDa)

Slika 20: Film po zaznavanju PR-B v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.



← β-AKTIN (42 kDa)

Slika 21: Film po zaznavanju β-aktina v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.

4.3 ZAZNAVANJE ER β IN PR-B V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA

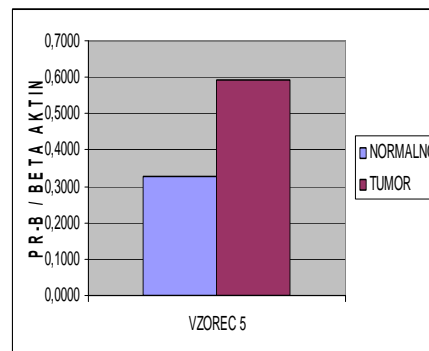
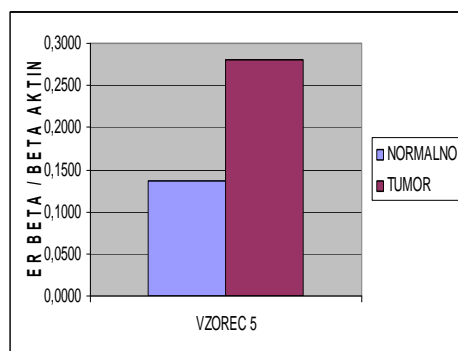
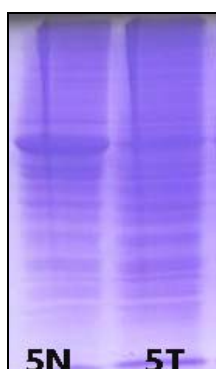
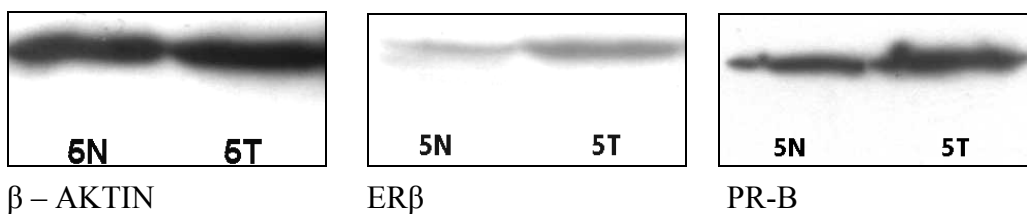
Prisotnost estrogenskih receptorjev ER β in progesteronskih receptorjev PR-B smo proučevali v 16 parih vzorcev raka endometrija in okolnega normalnega endometrija. Proučili smo tudi prisotnost hišnega proteina β -aktina. Dobljene signale proteinov, ki smo jih zaznali na filmu, smo ovrednotili s programom UN-SCAN-IT (Silk Scientific Inc USA) (*preglednica 5*). Količino estrogenskega receptorja ER β , ki smo jo zaznali, smo normirali s proteinom β -aktin za vsak vzorec posebej. Enako smo naredili za progesteronski receptor PR-B. Skupno število točk za estrogenski receptor ER β ter za progesteronski receptor PR-B smo delili s skupnim številom točk za protein β -aktin. Relativno razmerje med količino receptorja ER β v normalnem in rakavem tkivu ter tudi med količino receptorja PR-B v normalnem in rakavem tkivu smo predstavili z grafi in slikami (*slika 22, od a do o*).

Preglednica 5: Vrednosti za celotno število točk za ER β , PR-B in β -aktin v normalnem (N) in tumorskem (T) tkivu vzorcev.

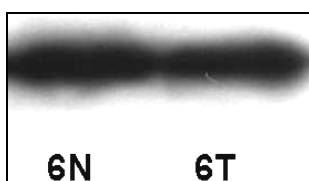
VZOREC	CELOKUPNO ŠTEVILO TOČK		
	ER β	PR-B	B-AKTIN
N5	180855	434406	1331698
T5	337840	712161	1204487
N6	611239	165186	1552676
T6	246798	523879	1299353
N8	59581	203322	792035
T8	65481	261726	84988
N11	270512	27671	926234
T11	658370	440855	1313500
N13	426654	436	1095509
T13	288996	135464	999696
N14	293498	355082	1411323
T14	475375	774420	1201903
N19	45707	390598	248443
T19	95193	561175	390032
N20	38066	337857	2214794
T20	166998	420868	1053766
N21	78567	454475	1085811

T21	197614	327212	1174473
N22	29742	303244	283204
T22	116853	49278	542859
N23	38386	387479	715768
T23	463294	652855	721823
N24	245590	488007	704387
T24	416032	505995	543144
N26	81573	506880	621754
T26	75187	508244	591495
N27	427030	397429	834803
T27	543868	379919	177083
N30	282401	370438	152071
T30	31364	819861	438449
N33	124571	357849	430659
T33	131961	773254	93583

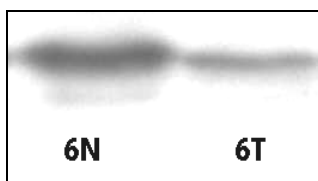
a)



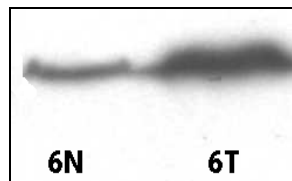
b)



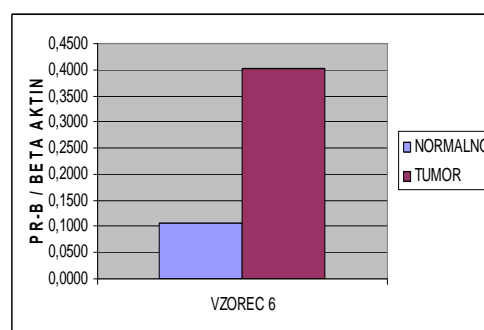
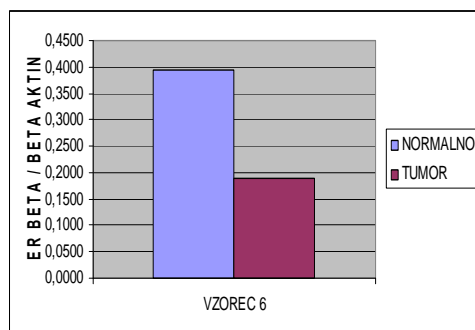
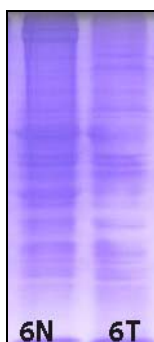
β - AKTIN



ER β



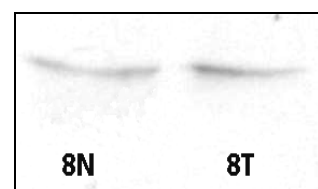
PR-B



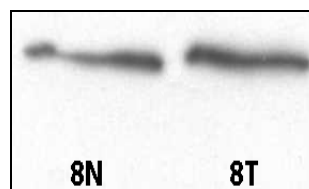
c)



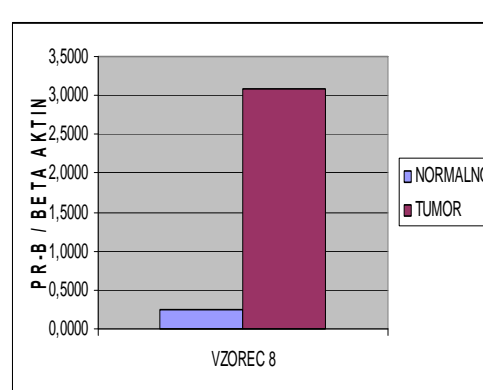
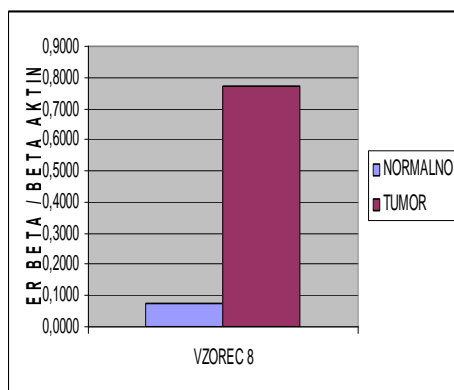
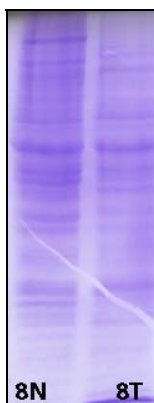
β - AKTIN



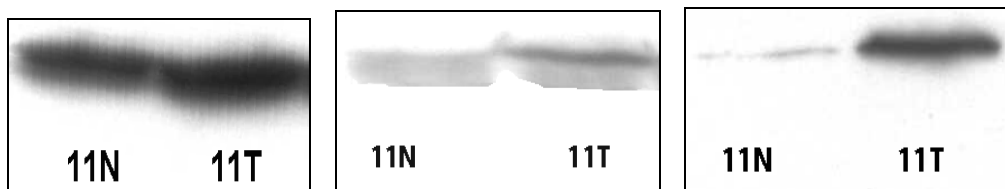
ER β



PR-B



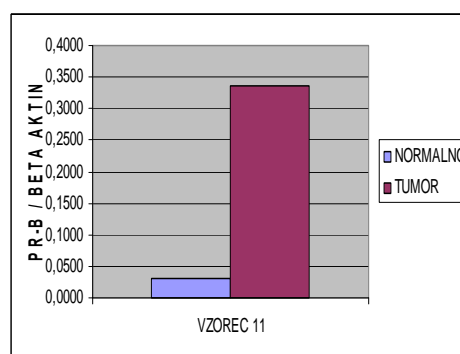
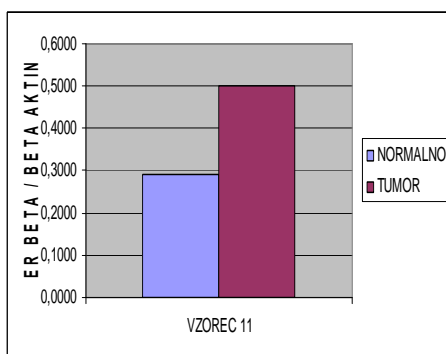
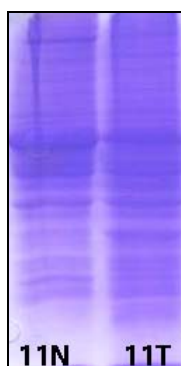
č)



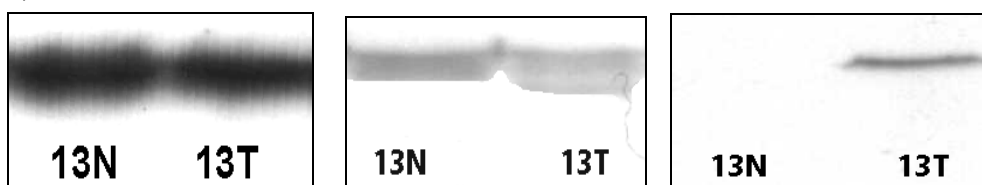
β - AKTIN

ER β

PR-B



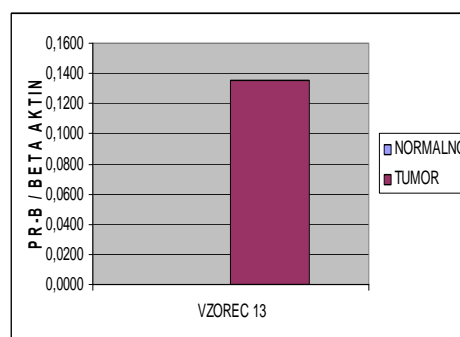
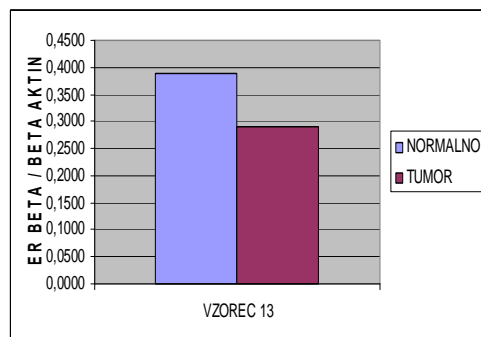
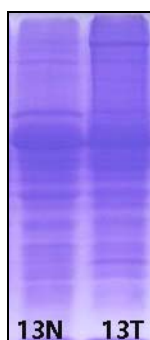
d)



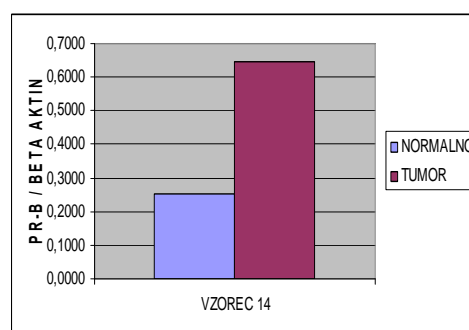
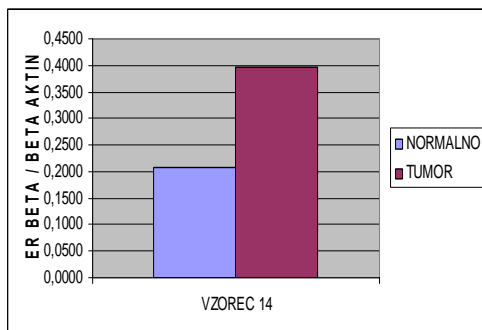
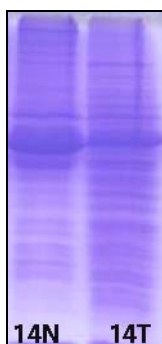
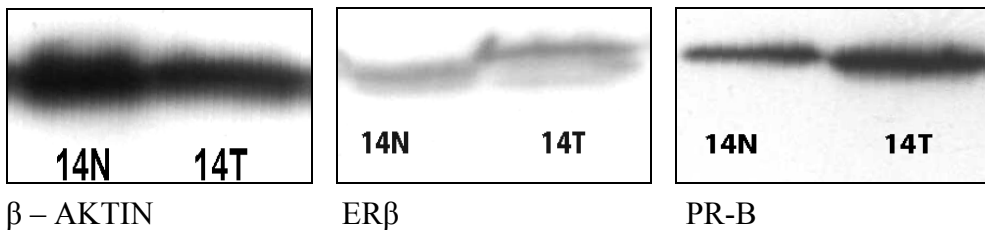
β - AKTIN

ER β

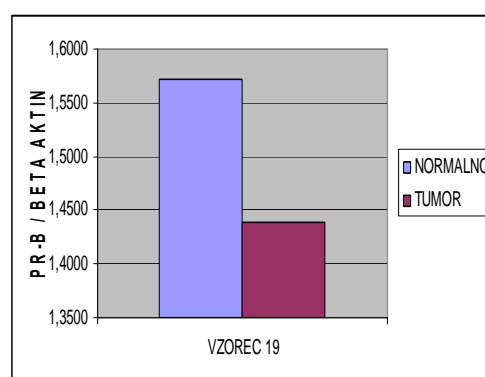
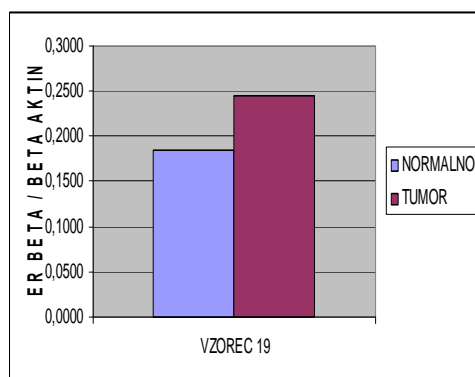
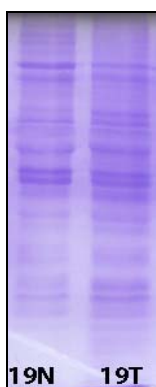
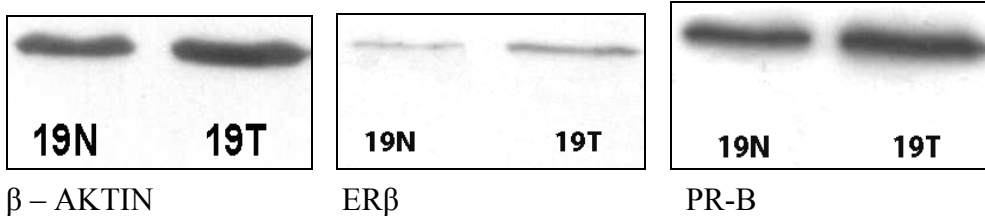
PR-B



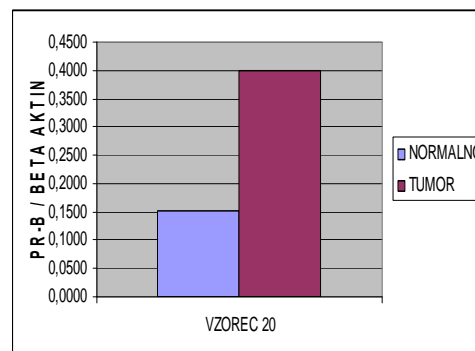
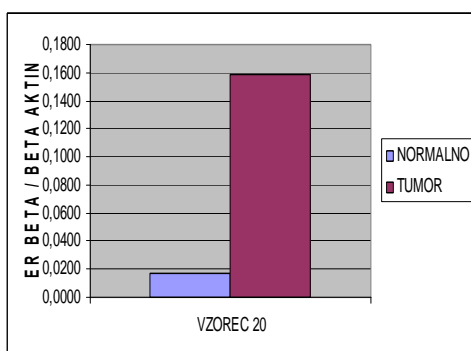
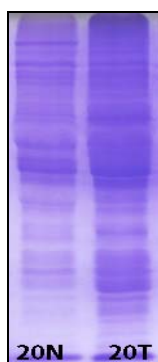
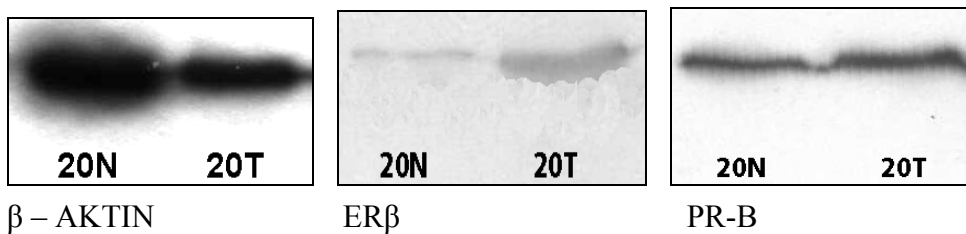
e)



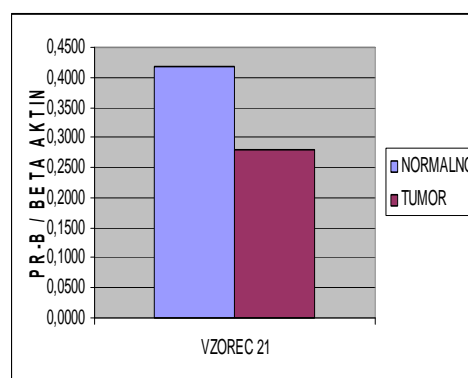
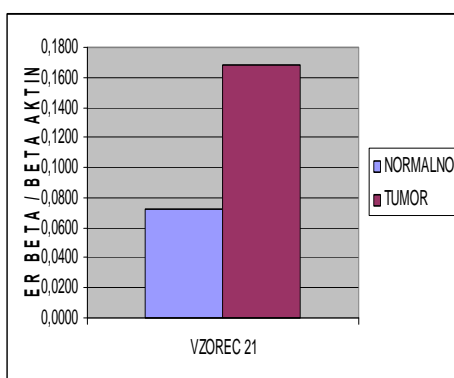
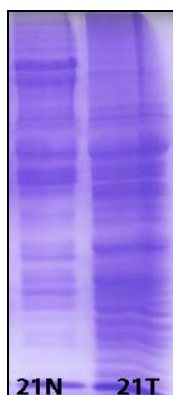
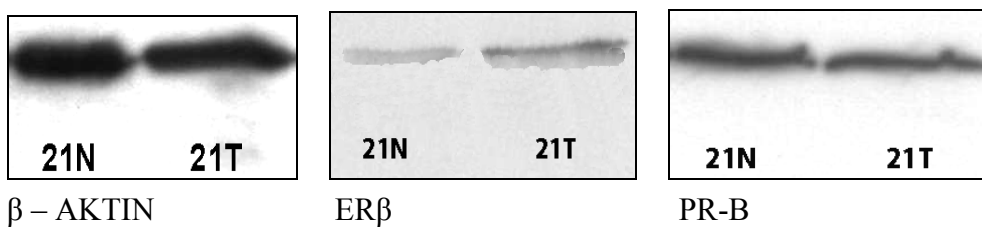
f)



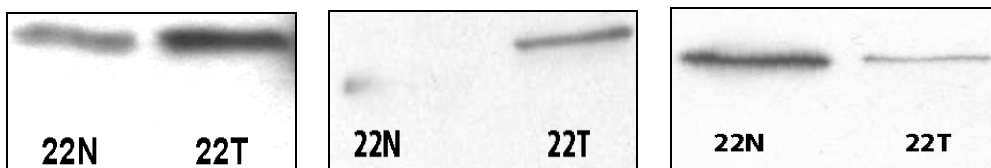
g)



h)



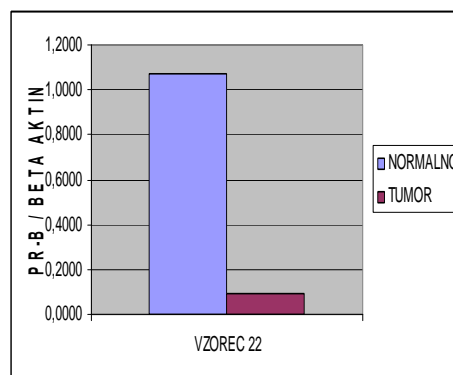
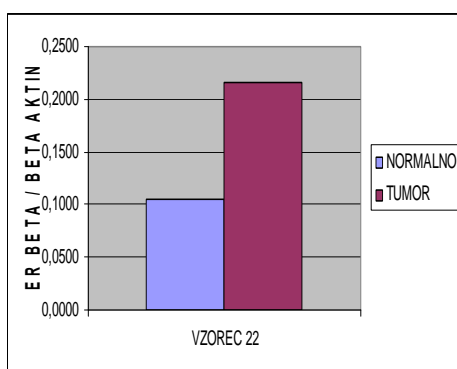
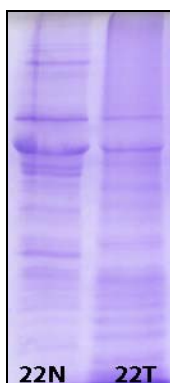
i)



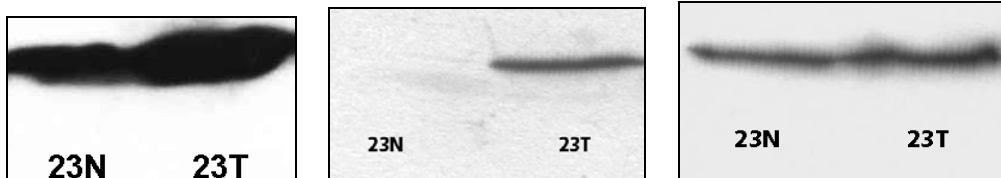
β – AKTIN

ER β

PR-B



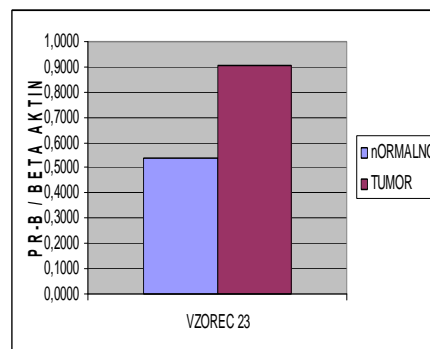
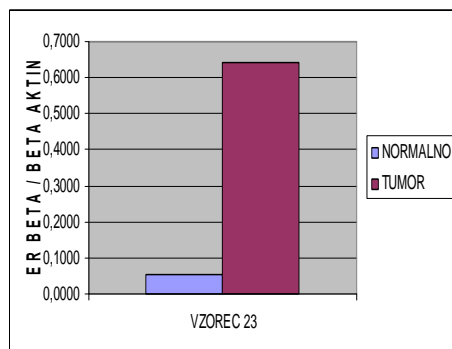
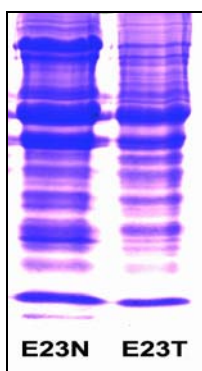
j)



β – AKTIN

ER β

PR-B



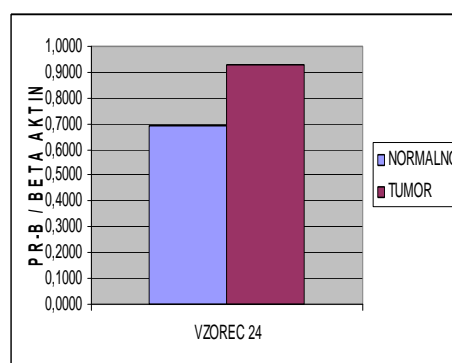
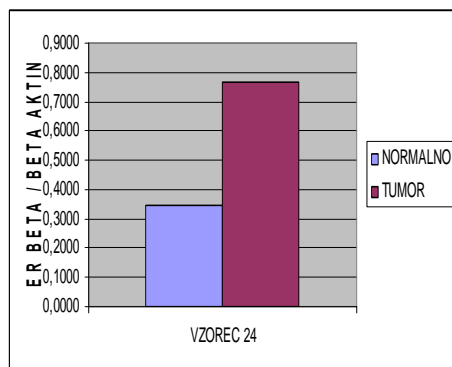
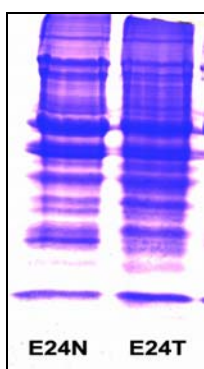
k)



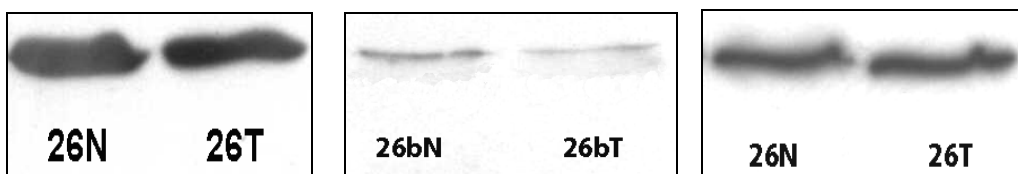
β – AKTIN

ER β

PR-B



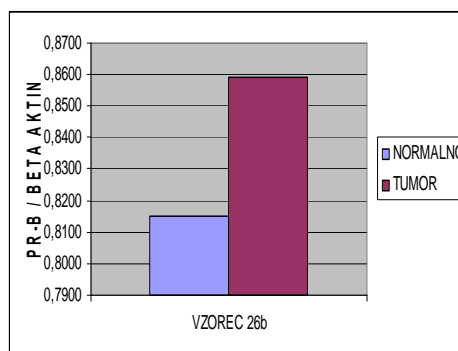
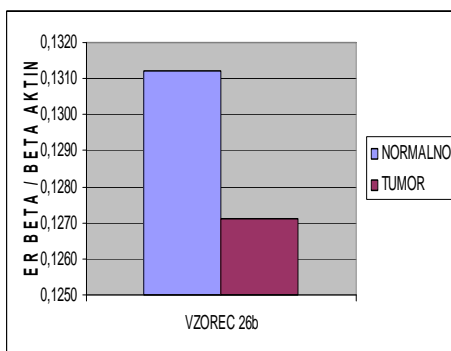
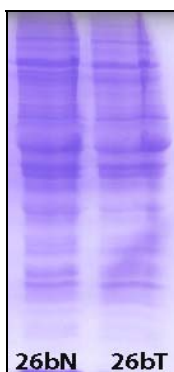
l)



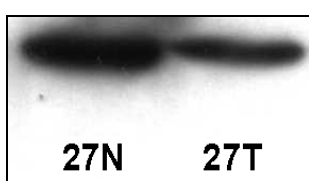
β – AKTIN

ER β

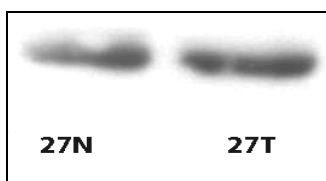
PR-B



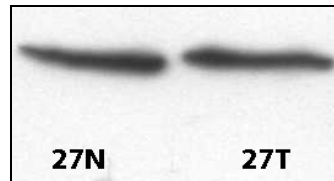
m)



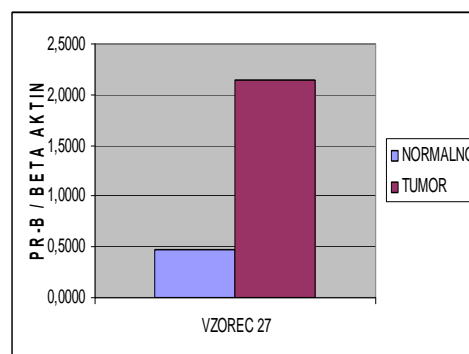
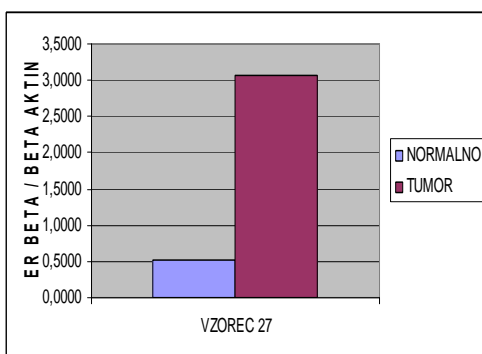
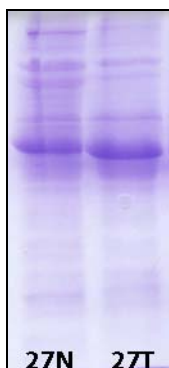
β – AKTIN



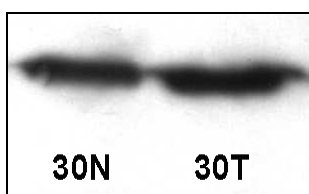
ER β



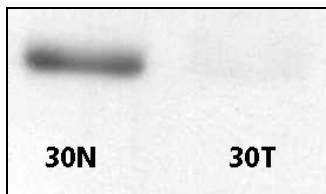
PR-B



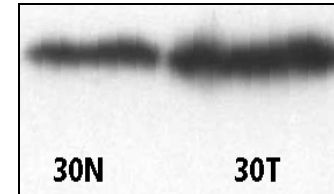
n)



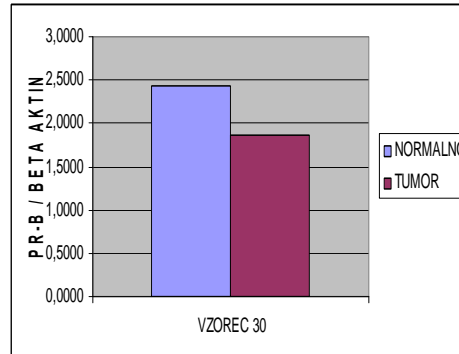
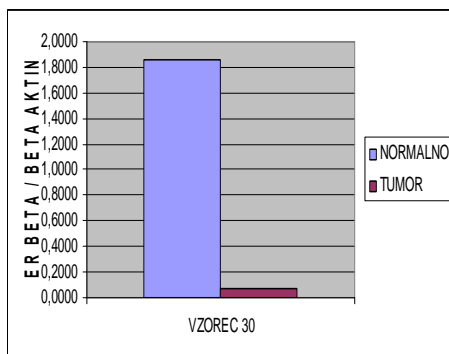
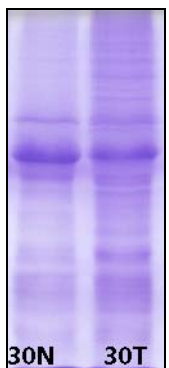
β – AKTIN



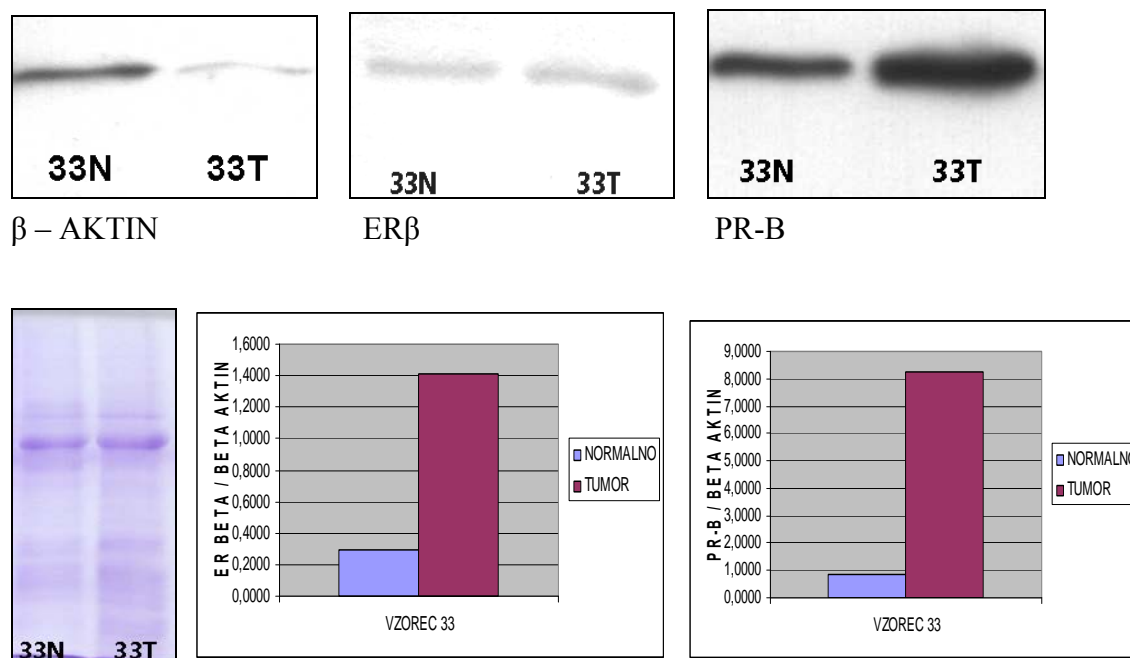
ER β



PR-B

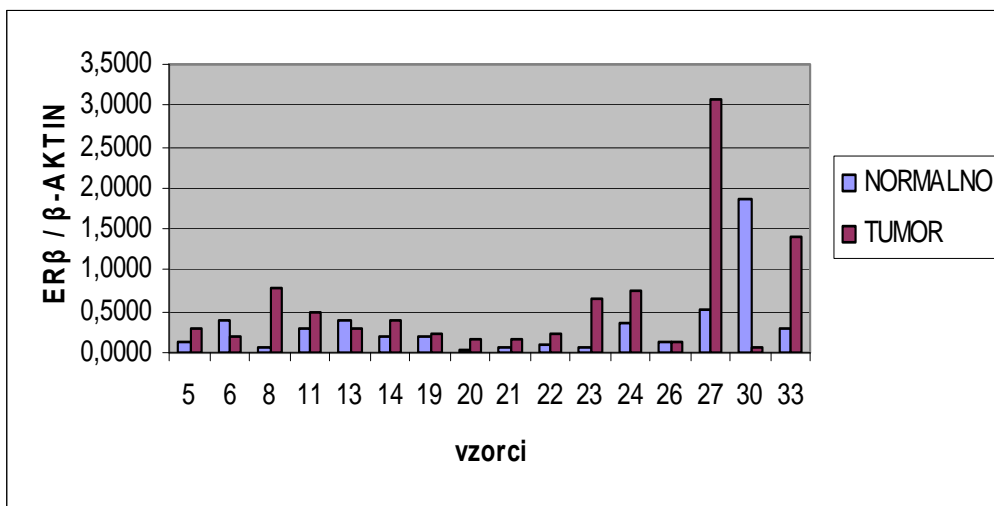


o)



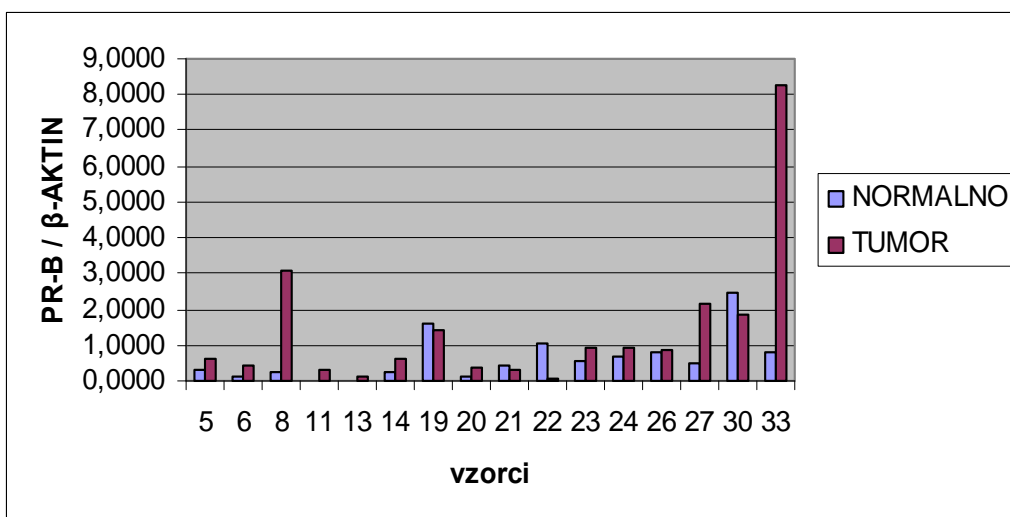
Slika 22: Zaznavanje ER β , PR-B in hišnega proteina β -aktina v 16 vzorcih rakavega tkiva endometrija (T) in okolnega normalnega tkiva (N). Slika SDS PAGE gela prikazuje nanose vzorcev proteinov normalnega (N) in tumorskega (T) tkiva. Slike filmov prikazujejo zaznavanja estrogenskega receptorja ER β , progesteronskega receptorja PR-B ter proteina β -aktina po prenosu western in ECL reakciji: 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. Grafi (od a do o) prikazujejo kvantificirane podatke skupnega števila točk: ER β / β -AKTIN (normalno tkivo, tkivo tumorja endometrija) in PR-B / β -AKTIN (normalno tkivo, tkivo tumorja endometrija).

Razmerje ER β / β -AKTIN je bilo višje v 12 vzorcih pri rakavem tkivu, v 4 vzorcih je bilo pri rakavem tkivu manjše. Normirane vrednosti so predstavljene v grafu (*slika 23*).



Slika 23: Razmerje ER β / β -AKTIN za 16 vzorcev (normalno tkivo, tkivo tumorja).

Razmerje PR-B / β -AKTIN je bilo višje v 12 vzorcih pri rakavem tkivu, v 4 vzorcih je bilo pri rakavem tkivu manjše. Normirane vrednosti so predstavljene v grafu (*slika 24*).



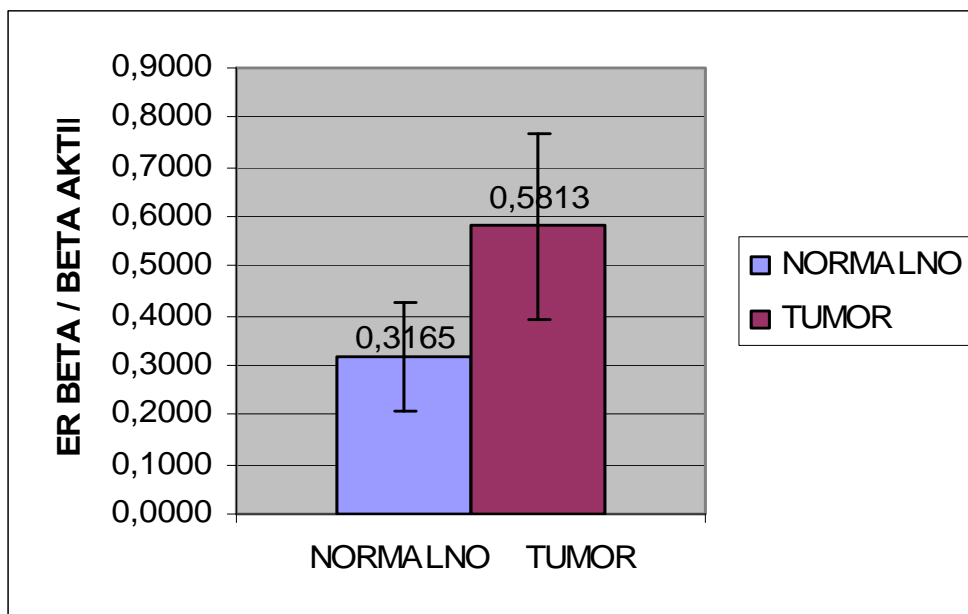
Slika 24: Razmerje PR-B / β -AKTIN za 16 vzorcev (normalno tkivo, tkivo tumorja).

4.3.1 Statistična obdelava rezultatov razmerja ER β / β -AKTIN in PR-B / β -AKTIN

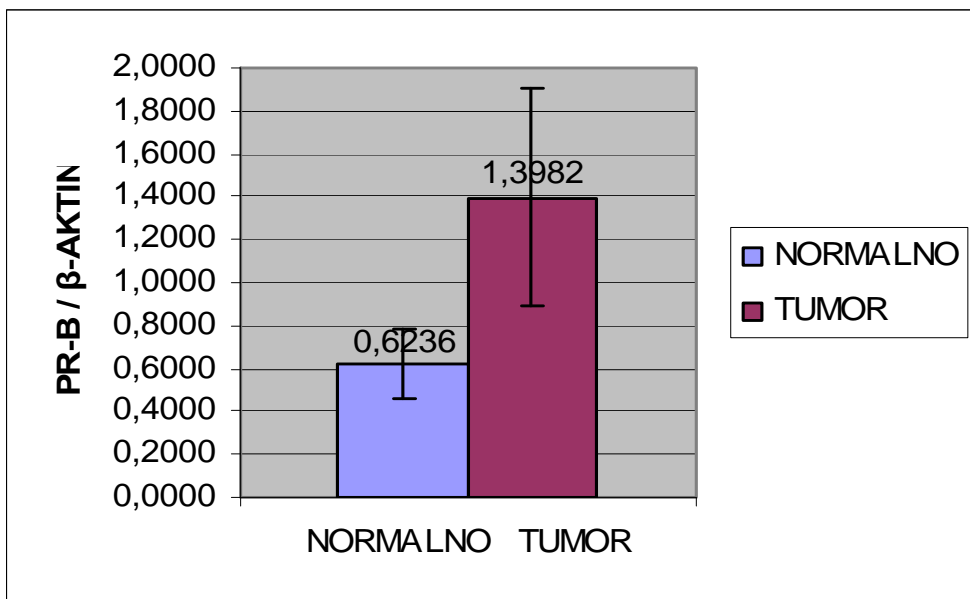
Statistično značilnost razlik med normalnim in rakavim tkivom smo ocenjevali z Wilcoxonovim neparametričnim testom za pare (Wilcoxon Signed Ranks Test) s stopnjo zaupanja (p) 0,05. Uporabili smo normirane vrednosti vzorcev ER β / β -AKTIN in PR-B / β -AKTIN. Razlika pri ER β ni bila statistično značilna, p je bil 0,056 (>0,050), za PR-B pa smo dobili statistično značilno razliko, p je bil 0,044 (<0,050).

Izračunali smo povprečno vrednost razmerja celokupnega števila točk za ER β proti celokupnemu številu točk za β -aktin, ločeno za normalno in rakavo tkivo, in rezultat predstavili v obliki grafa (*slika 25*). Enako smo naredili za PR-B (*slika 26*). Standardna napaka povprečne vrednosti razmerja ER β / β -AKTIN za normalno tkivo znaša 0,3165; za rakavo tkivo pa 0,5813. Za povprečno vrednost razmerja PR-B / β -AKTIN znaša standardna napaka za normalno tkivo 0,6236, za rakavo tkivo pa 1,3982.

Povprečje količine ER β v rakavem tkivu vzorcev je 1,8 krat večje kot v normalnem tkivu, povprečje količine PR-B v rakavem tkivu pa 2,2 krat večje kot v normalnem tkivu.



Slika 25: Povprečne vrednosti razmerja ER β / β -AKTIN v vzorcih normalnega in rakavega tkiva, s prikazano standardno napako.

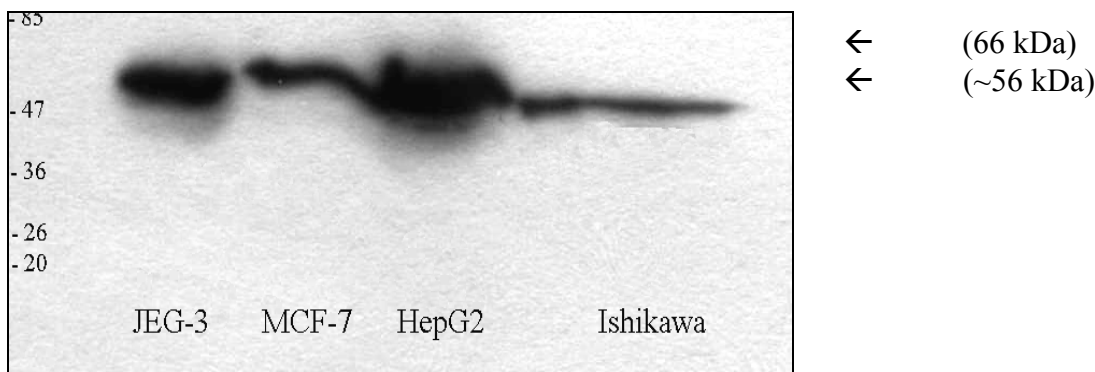


Slika 26: Povprečne vrednosti razmerja PR-B / β-AKTIN v vzorcih normalnega in rakavega tkiva, s prikazano standardno napako.

4.4 ZAZNAVANJE RECEPTORJEV ER α IN PR-A V CELIČNIH LINIJAH IN V VZORCIH RAKA ENDOMETRIJA IN NORMALNEGA ENDOMETRIJA

4.4.1 Zazanavanje receptorja ER α v celičnih linijah in v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija

Prisotnost estrogenskega receptorja ER α smo proučevali v vzorcih celičnih linij raka jeter HepG2, raka endometrija Ishikawa, raka dojke MCF-7 in raka horionskih resic JEG-3 (*slika 18, SDS PAGE gel*). Za detekcijo ER α smo uporabili primarna mišja monoklonska protitelesa proti ER α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz). Za receptor ER α z molsko maso 66 kDa signala pri celičnih linijah na ustrezni višini na filmu nismo zaznali. Pri vseh celičnih linijah pa smo zelo intenziven signal zaznali na višini filma, ki ustreza velikosti med 50 kDa in 60 kDa (*slika 27*).

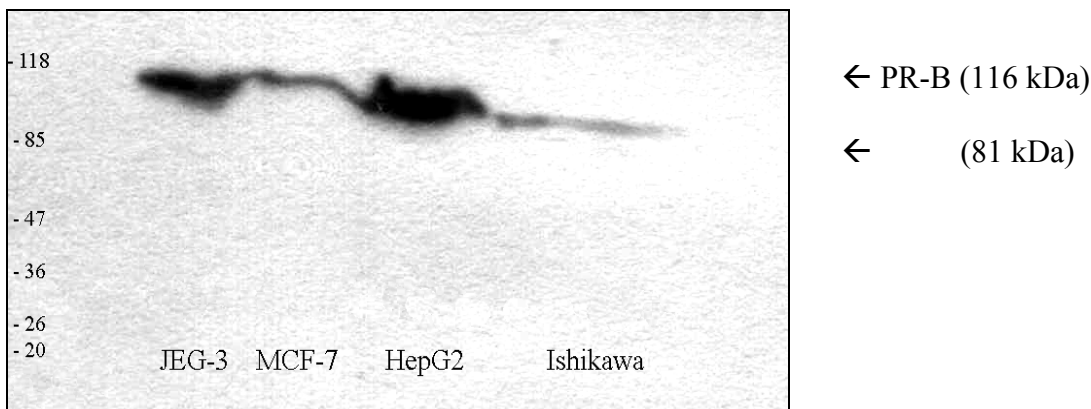


Slika 27: Film po zaznavanju estrogenskega receptorja ER α v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.

Glede na to, da signala za ER α v celičnih linijah nismo zaznali, prisotnosti estrogenskega receptorja ER α v vzorcih raka endometrija in okolnega normalnega endometrija v nadaljevanju našega poskusa nismo proučevali.

4.4.2 Zaznavanje receptorja PR-A v celičnih linijah in v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija

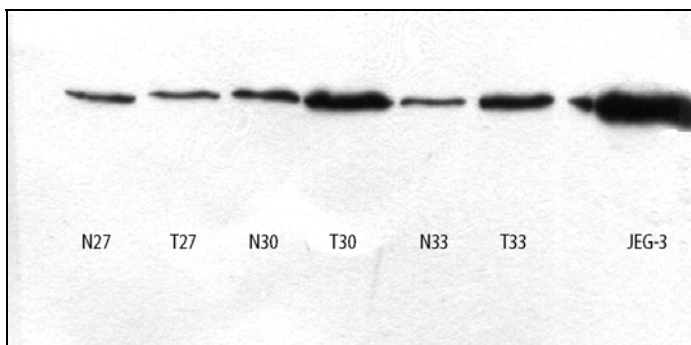
Prisotnost progesteronskega receptorja PR-A smo najprej proučevali v vzorcih celičnih linij JEG-3, MCF-7, HepG2 in Ishikawa (*slika 18, SDS PAGE gel*), vendar signala na ustrezni višini na filmu za PR-A z molsko maso 81 kDa nismo zaznali. Signal smo zaznali pri vseh celičnih linijah na višini filma, ki ustreza velikosti molekule progesteronskega receptorja PR-B (116 kDa). Signal je bil intenzivnejši pri celičnih linijah JEG-3 in HepG2, medtem ko je bil pri celičnih linijah MCF-7 in Ishikawa signal šibkejši (*slika 28*). Za detekcijo PR-A smo uporabili primarna mišja monoklonska protitelesa proti PR-A in PR-B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz).



Slika 28: Film po zaznavanju progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B v vzorcih celičnih linij z ojačano kemiluminiscenco.

Kljub temu, da progesteronskega receptorja PR-A v vzorcih celičnih linij nismo zaznali, smo poskušali prisotnost PR-A ugotoviti tudi v devetih vzorcih raka endometrija (T) in okolnega normalnega endometrija (N). Za kontrolo smo uporabili celično linijo raka horionskih resic JEG-3. Za detekcijo receptorja PR-A smo uporabili mišja monoklonska primarna protitelesa proti PR-A in PR-B, enaka smo uporabili že za detekcijo receptorjev v celičnih linijah. Za progesteronski receptor PR-A z molsko maso 81 kDa signala tudi v vzorcih raka endometrija (T) in normalnega endometrija (N) na ustrezni višini na filmu nismo zaznali. Signal smo zaznali pri večini vzorcev kot tudi pri pozitivni kontroli JEG-3 na višini filma, ki ustreza velikosti molekule progesteronskega receptorja PR-B (116 kDa) (*slika 29*).

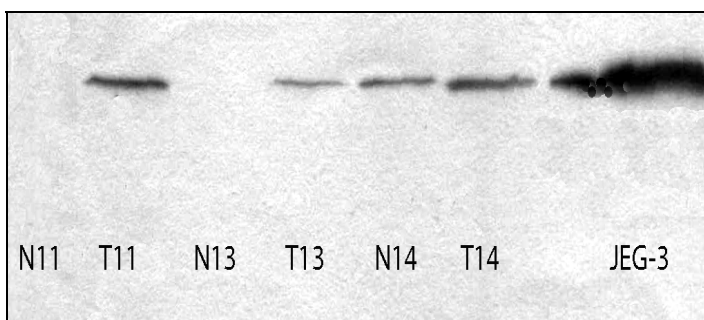
a)



← PR-B (116 kDa)

← (81 kDa)

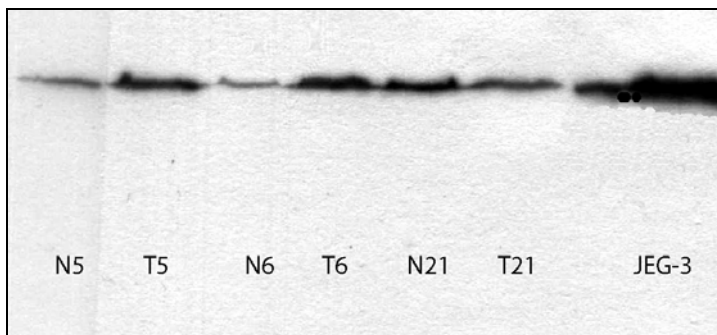
b)



← PR-B (116 kDa)

← (81 kDa)

c)



← PR-B (116 kDa)

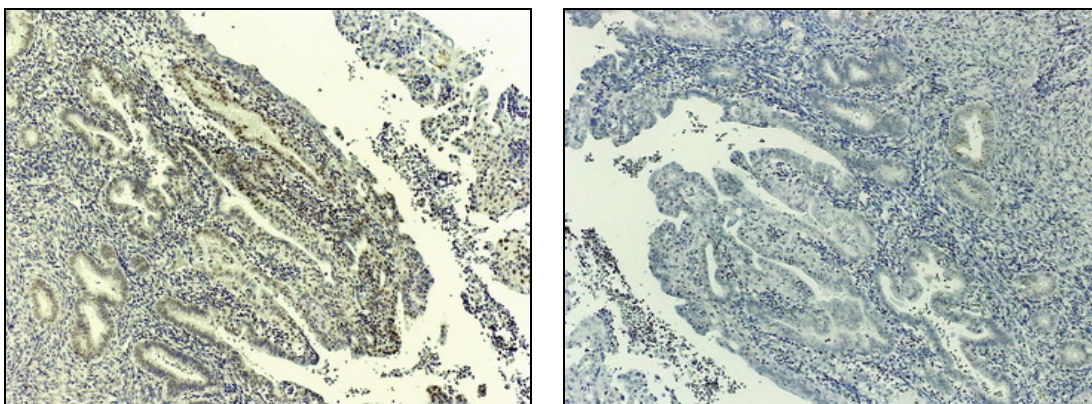
← (81 kDa)

Slika 29: Slike filmov prikazujejo zaznavanje samo progesteronskega receptorja PR-B po prenosu western in ECL reakciji v devetih vzorcih (a) vzorci: 27, 30, 33; b) vzorci: 11, 13, 14; c) vzorci: 5, 6, 21) rakavega tkiva endometrija (T) in okolnega normalnega tkiva (N) ter pri pozitivni kontroli JEG-3.

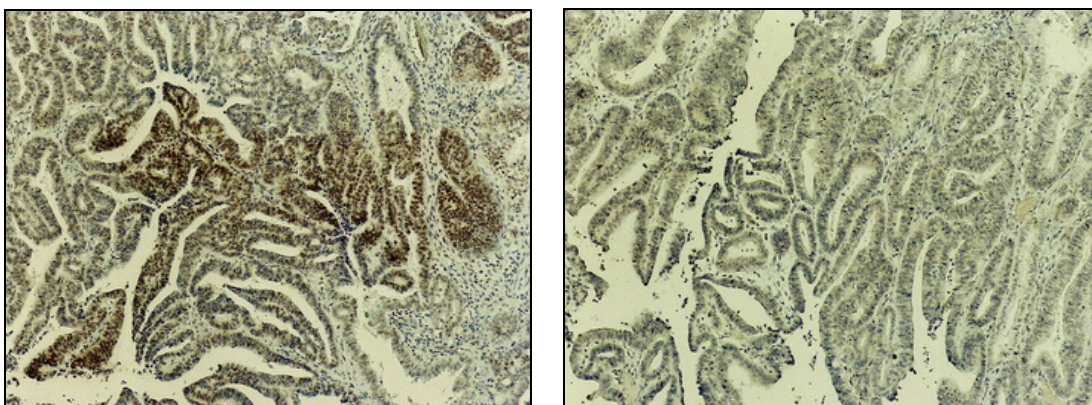
4.5 IMUNOHISTOKEMIJA

Prisotnost in lokacijo progesteronskega receptorja PR-B smo želeli potrditi tudi na celični ravni. S protitelesi proti PR-B smo obarvali parafinske rezine raka endometrija in okolnega normalnega endometrija. Prisotnost PR-B smo proučevali v treh vzorcih (10, 13, 24) pod mikroskopom pri 100x povečavi (*slike 30-32*).

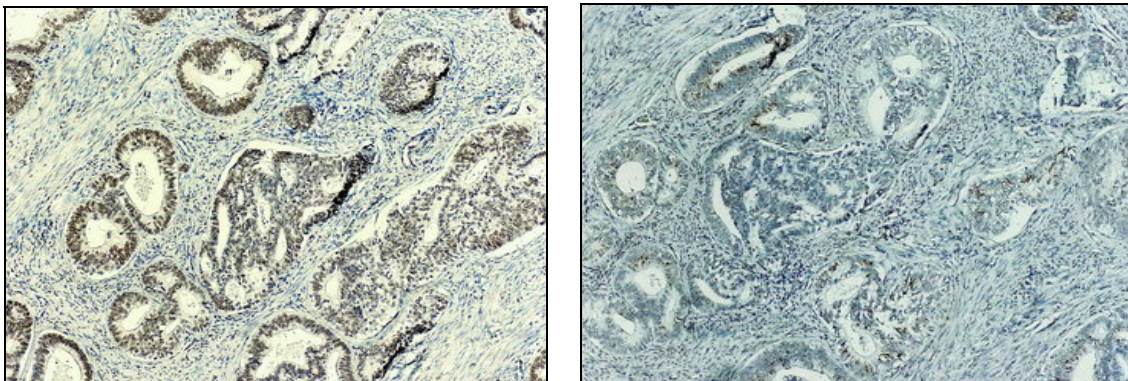
PR-B smo pri vseh treh vzorcih zaznali v celicah endometrijskih žlez, nismo pa ga zasledili v celicah strome.



Slika 30: Histološki preparat, vzorec 10, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakavo tkivo, desno kontrola rakavo tkivo endometrija.



Slika 31: Histološki preparat, vzorec 13, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakavo tkivo, desno kontrola rakavo tkivo endometrija.



Slika 32: Histološki preparat, vzorec 24, obarvan z imunohistokemijsko metodo. Levo rakavo tkivo, desno kontrola rakavo tkivo endometrija.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rak endometrija je od hormonov odvisna oblika raka. V primeru, da se ravnotežje med estrogeni in progestageni poruši in se poveča koncentracija estrogenov v tkivu ter s tem tudi njihovo delovanje, se število delitev celic poveča in s tem tudi možnost naključnih napak pri podvojevanju DNA. Tako stanje lahko vodi do hiperplazije endometrija in raka endometrija (Henderson in Feigelson, 2000). Znanstveniki so dokazali višje koncentracije aktivnega estrogena v vzorcih rakavega tkiva endometrija v primerjavi z vzorci normalnega endometrija pri pacientkah pred in po menopavzi (Berstein in sod., 2003). Na različno delovanje estrogenov in progesteragenov vpliva poleg različne lokalne koncentracije hormonov tudi tkivno specifično izražanje receptorjev za spolne hormone (Flötotto in sod., 2001).

Estrogeni in progestageni delujejo predvsem preko ustreznih znotrajceličnih receptorjev, s čimer vplivajo na prepisovanje tarčnih genov (Penning, 2003 in Labrie in sod., 2000 in Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004). Na ta način so estrogenski in progesteronski receptorji povezani z razvojem raka endometrija. Izražanje estrogenskih ter progesteronskih receptorjev je odvisno od tipa celic ter od faze menstruacijskega ciklusa (Vienonen in sod., 2004), ni pa odvisno od koncentracije estradiola v rakavem tkivu endometrija kot tudi ne od časa nastopa menopavze (Berstein in sod., 2003). Za razvoj raka endometrija je poleg izražanja estrogenskih in progesteronskih receptorjev pomembno tudi razmerje ER α / ER β ter PR-A / PR-B, specifična znotrajjedrna razporeditev receptorjev, pojav izooblik posameznih receptorjev ter funkcionalni polimorfizmi v promotorski regiji PR-B in ER α .

Receptorji za estrogene in progesteron lahko delujejo tudi brez vezanega liganda. Znanstveniki so ugotovili, da receptorji PR-B brez vezanega liganda preko drugih signalnih molekul vplivajo na proliferacijo tkiva endometrija in s tem stimulirajo rast rakavih celic (Lanišnik Rižner in Šinkovec, 2004 in Ballare, 2006 in Leslie in sod., 2003).

V okviru diplomske naloge smo želeli proučiti izražanje estrogenskih receptorjev ER α in ER β ter progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B v rakavem in okolnem normalnem tkivu endometrija iste osebe. Predvidevali smo, da se estrogenski in progesteronski receptorji

različno izražajo v rakavem endometriju v primerjavi z okolnim normalnim tkivom endometrija.

5.1.1 Vzorci tkiva endometrija

Proteine smo izolirali iz vzorcev tkiva endometrija, ki smo jih dobili na Ginekološki kliniki Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani. Razpolagali smo z vzorci normalnega in rakavega tkiva 16 bolnic z rakom endometrija. Iz vzorcev je bila predhodno že izolirana RNA. Opravljena je bila tudi histopatološka klasifikacija vzorcev. Pri 15 vzorcih je šlo za tip I raka endometrija, endometrioidne adenokarcinome, pri 1 pa za tip II raka endometrija in sicer za serozni adenokarcinom. Pri 7 vzorcih raka endometrija tipa I je bilo tkivo dobro do zmerno diferencirano, pri 8 pa zmerno do slabo diferencirano.

5.1.2 Izolacija proteinov

Proteine smo izolirali iz vzorcev raka endometrija in okolnega normalnega endometrija ter določili koncentracijo. Za primerjavo smo proteine izolirali tudi iz celičnih linij raka jeter HepG2, raka endometrija Ishikawa, raka dojke MCF-7 in raka horionskih resic JEG-3.

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 volumna vzorca za nanos na gel. Iz posameznih vzorcev smo skupno izolirali od 283 μg do 3660 μg proteinov. 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. Zasedujemo lahko izražanje genov na ravni mRNA kot tudi na proteinski ravni, na ravni DNA pa npr. prisotnost somatskih mutacij, polimorfizmov.

5.1.3 Izbira ustreznih pogojev za zaznavanje ER β in PR-B ter izbira ustreznega hišnega proteina

5.1.3.1 Izbira ustreznih primarnih in sekundarnih protiteles za zaznavanje ER β in PR-B

Za zaznavanje ER β smo uporabili primarna zajčja poliklonska protitelesa proti ER β (ER β (H-150): sc-8974, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Primerno koncentracijo primarnih protiteles proti ER β (1:200) smo določili na podlagi objavljenega članka Jarzabeka in sod. (2005) ter protokola o steroidnih receptorjih (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Za zaznavanje progesteronskega receptorja PR-B smo uporabili primarna mišja monoklonska protitelesa proti PR-B (PR (B-30): sc-811, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Primerno redčenje protiteles (1:500) smo izbrali na podlagi protokola o steroidnih receptorjih (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

Za določitev primerne koncentracije sekundarnih protiteles (kozja protitelesa proti primarnim mišjim protitelesom (Jackson Immuno Research Laboratories, INC) ter proti primarnim zajčjim protitelesom (Sigma), označena s hrenovo peroksidazo (HRP)), smo preizkusili različna redčenja le-teh (1:10000, 1:5000, 1:2000 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. Zato smo se odločili za razmerje sekundarnih protiteles proti primarnim zajčjim poliklonskim protitelesom 1:2000, proti primarnim mišjim monoklonskim protitelesom pa 1:10000.

5.1.3.2 Izbira ustreznega hišnega proteina

Za normiranje signalov ter s tem primerjavo izražanja proteinov med različnimi vzorci se uporabljajo hišni proteini, najpogosteje gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), ciklofilin, β -aktin, β -tubulin, hipoksantin fosforiboziltransferaza (HPRT) ter fosfolipaza-A2 (PLA2). Hišni proteini se pojavljajo v vseh tkivih in celicah, njihova evolucija poteka počasneje kot pri tkivno specifičnih proteinih. Vse številčnejše raziskave nakazujejo, da naj bi na izražanje hišnih genov in proteinov vplivalo veliko faktorjev, med drugim stopnja

diferenciacije ali proliferacije tkiva, starost, spol, faza celičnega cikla, eksperimentalni pogoji ter patološko stanje tkiva. Razlike v izražanju hišnih proteinov lahko vplivajo na interpretacijo rezultatov, zato je izbira ustreznega hišnega proteina ključnega pomena (Ferguson in sod., 2005).

V našem primeru smo za interni standard izbrali hišni protein β -aktin. Predvideva se, da se izražanje β -aktina v celicah različnih tkiv ne spreminja veliko, ne glede na vplive fizioloških in patoloških faktorjev (Ferguson in sod., 2005), za razliko od GAPDH, ki je znano bolj izražen v rakavem tkivu. Za koncentracijo primarnih mišjih monoklonskih protiteles proti β -aktinu (Kat. št. A 5441, Sigma) smo se odločili na podlagi neobjavljenih rezultatov predhodnih študij (Šmuc in sod.). Redčenje 1:3000 smo uporabili pri vseh poizkusih. Za razmerje sekundarnih protiteles proti primarnim mišjim monoklonskim protitelesom smo izbrali 1: 10000.

5.1.4 Zaznavanje ER β , PR-B ter hišnega proteina β -aktina v celičnih linijah

Prisotnost ER β in PR-B smo proučevali v štirih vzorcih celičnih linij. 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 teh dveh primerih za od hormonov odvisno obliko raka, HepG2 pa zato, ker vemo, da imajo estrogeni in progestageni pomembno vlogo tudi v jetrih. Nekateri znanstveniki celo trdijo, da naj bi bil hepatom od hormonov odvisna oblika raka.

Za receptor ER β smo pri vseh celičnih linijah na filmu zaznali signal, za progesteronski receptor PR-B smo močen signal zaznali pri JEG-3 in HepG2, šibkejši signal na filmu pri MCF-7, pri celični liniji Ishikawa pa signala nismo zaznali, verjetno zaradi manjše količine nanesenih proteinov. Za protein β -aktin smo zaznali signal na filmu pri vseh celičnih linijah, razen pri celični liniji JEG-3. Z našimi rezultati na proteinski ravni smo potrdili objavljene in neobjavljene študije (Šmuc in sod.), v katerih so rezultati PCR v realnem času pokazali, da se ER β izraža v vseh celičnih linijah, PR-AB pa dobro v celičnih linijah Ishikawa in MCF-7 ter slabše v HepG2 in JEG-3 (Šmuc, 2006).

Za pozitivno kontrolo v nadaljnjih poskusih na vzorcih tkiv smo izbrali celični liniji JEG-3 ter HepG2, ker smo tako za estrogenski receptor ER β kot tudi za progesteronski receptor PR-B pri obeh dobili močan signal.

5.1.5 Zaznavanje ER β ter PR-B v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija

Prisotnost ER β in PR-B smo proučevali v 16 parih vzorcev raka endometrija in okolnega normalnega endometrija. Za kontrolo smo uporabili celični liniji JEG-3 ter HepG2. Po kvantifikaciji s programom UN-SCAN-IT smo količini receptorjev ER β ter PR-B normirali s količino β -aktina in relativno razmerje predstavili z grafi. Tako pri ER β kot tudi pri PR-B smo zaznali povišane vrednosti v 12 vzorcih rakavega tkiva v primerjavi z normalnim in v 4 vzorcih normalnega endometrija v primerjavi z rakavim. Povišane vrednosti ER β in PR-B smo zaznali v različnih vzorcih tkiva.

Da bi dokazali statistično značilnost razlik med normalnim in rakavim tkivom, smo uporabili Wilcoxonov neparametrični test za pare (Wilcoxon Signed Ranks Test) s stopnjo zaupanja (p) 0,05. Ta test smo izbrali, ker je primeren tudi za manjše število vzorcev. Poskušali smo ovreči hipotezo (H_0), da sta količini ER β in PR-B v normalnem in rakavem tkivu enaki. Po tem izračunu razlika med normalnim in rakavim tkivom s 95 % stopnjo zaupanja pri ER β ni bila statistično značilna, (p) je bila 0,056 ($>0,050$), za PR-B pa smo dobili statistično značilno razliko, (p) je bila 0,044 ($<0,050$). Izračunali smo tudi povprečno vrednost razmerja celokupnega števila točk za ER β proti celokupnemu številu točk za β -aktin, ločeno za normalno in rakavo tkivo. Enako smo naredili za PR-B. Povprečje količine ER β v rakavem tkivu vzorcev je 1,8 krat večje kot v normalnem tkivu, povprečje količine PR-B v rakavem tkivu pa 2,2 krat večje kot v normalnem tkivu.

Na osnovi večje količine estrogenskega receptorja ER β ter progesteronskega receptorja PR-B v večini vzorcev raka endometrija (12 od 16) lahko sklepamo, da tako ER β kot tudi PR-B vplivata na razvoj raka endometrija, kljub temu, da se dobljeni rezultati ne ujemajo z večino do sedaj objavljenih znanstvenih raziskav.

Znanstveniki poročajo tako o povečanem kot tudi o zmanjšanem razmerju $ER\alpha$ / $ER\beta$ pri raku endometrija, v primerjavi z normalnim tkivom (Saegusa in Okayasu, 2000 in Sakaguchi in sod., 2002 in Šmuc in sod., 2007). Do spremenjenega razmerja prihaja tudi zaradi različnega izražanja izooblik estrogenskih receptorjev. Večina znanstvenih raziskav pa vendarle nakazuje zmanjšano količino $ER\beta$ v rakavem tkivu endometrija. Skrzypczak in sod. so ugotovili, da se med kancerogenezo zmanjšujeta količina in vloga $ER\beta$ v tkivu, v primerjavi z normalnim endometrijem, pri čemer se relativno poveča proliferativni učinek $ER\alpha$, kar poveča verjetnost za nastanek raka endometrija. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi znanstveniki (Ryan in sod., 2005, Sakaguchi in sod., 2002 in Fujimoto in sod., 2000, Saegusa in Okayasu, 2000). Zanimivo je, da so na istih vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija Šmuc in sod. (2006) ter Lanišnik-Ričner in sod. (2006) predhodno dokazali manjše izražanje $ER\beta$ na ravni mRNA. Ker $ER\beta$ uravnava delovanje $ER\alpha$ in ima antiproliferativno in pro-apoptotsko funkcijo, zmanjšana količina receptorja in s tem povečano razmerje $ER\alpha$ / $ER\beta$ vodi do hiperplazije endometrija in raka endometrija.

Znanstveniki tudi predvidevajo, da se v večini primerov rakavega endometrija zmanjša izražanje PR-B, PR-A ali obeh, pri čemer se spremeni razmerje PR-A / PR-B (Sasaki in sod., 2001 in Miyamoto in sod., 2004 in Hanekamp in sod., 2003 in Leslie in sod., 2003). Miyamoto in sod. so dokazali, da se progesteronski receptor PR-B največkrat slabo ali pa sploh ne izraža v jedrih slabo diferenciranih endometrioidnih adenokarcinomov. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Leslie s sod. ter Hanekamp s sod. Slednji so ugotovili, da se z zmanjšanjem izražanja progesteronskih receptorjev pri raku endometrija zmanjša tudi izražanje E-kadherina, ki ima vlogo pri od kalcija odvisni adheziji celic. To naj bi vodilo v bolj invazivni fenotip pri raku endometrija.

Rezultati drugih raziskav dopuščajo možnost vpliva povečanih količin progesteronskega receptorja PR-B na razvoj raka endometrija. Zanimive so ugotovitve Arnett-Mansfield in sod. ter Ryan in sod., da deluje PR-B v endometriju kot agonist estrogenom in da velja za močnega aktivatorja tarčnih genov, PR-A pa naj bi zaviral delovanje PR-B. Spremenjeno razmerje PR-A / PR-B v prid PR-B ima tako neposredno vlogo pri uravnavanju delovanja endometrija. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Graham in Clarke, Leslie in sod., Miyamoto in sod. in De Vivo in sod. Ryan in sod. ter De Vivo in sod. so pomembnost razmerja PR-A / PR-B potrdili tudi z na novo opisanim funkcionalnim polimorfizmom v promotorski regiji PR-B. Zaradi

polimorfizma se poveča prepisovanje PR-B, s tem se spremeni razmerje PR-A / PR-B, kar naj bi po njihovi razlagi povečalo tveganje za nastanek raka endometrija.

5.1.6 Zaznavanje PR-B na ravni celic

Prisotnost in lokacijo PR-B smo želeli potrditi tudi na celični ravni. S protitelesi proti PR-B smo obarvali parafinske rezine raka endometrija in okolnega normalnega endometrija treh bolnic (10, 13, 24). PR-B je bil prisoten v vseh treh vzorcih v celicah raka endometrija, lepo je bil viden v celicah žlez endometrija, nismo pa ga zasledili v celicah strome. S tem smo potrdili študije drugih znanstvenikov. Leslie in sod. so dokazali prisotnost PR-B v dobro diferenciranem raku endometrija predvsem v citoplazmi žleznih celic. V normalnem tkivu se je PR-B obarval v jedrih žleznih celic endometrija ter v celicah strome. O prisotnosti progesteronskega receptorja PR-B v rakavem žlezem epiteliju so poročali tudi drugi znanstveniki (Sasaki in sod., 2001 in Arnett-Mansfield in sod., 2004). Mylonas in sod. so dokazali prisotnost PR-B v žlezem epiteliju in v celicah strome. Primerjali so tudi izražanje PR-B med proliferacijsko in sekrecijsko fazo menstruacijskega ciklusa pri normalnem in rakavem endometriju. PR-B se je v sekrecijski fazi manj izražal v primerjavi s proliferacijsko, razlika v izražanju med normalnim in rakavim endometrijem pa ni bila statistično signifikantna.

Rezultati našega imunohistokemijskega barvanja se pri vzorcih 13 in 24 ujemajo z rezultati prenosa western. Vzorca številka 10 ne moremo primerjati z rezultati prenosa western, ker ga nismo vključili v sklop 16 vzorcev.

5.1.7 Nezaznavanje ER α ter PR-A v celičnih linijah in v vzorcih raka endometrija in normalnega endometrija

Tudi prisotnost ER α smo proučevali pri celičnih linijah HepG2, Ishikawa, MCF-7 in JEG-3, prisotnost PR-A pa tudi v 16 parih vzorcev raka endometrija in okolnega normalnega endometrija. Za kontrolo nanašanja smo uporabili celično linijo raka horionskih resic JEG-3.

Za zaznavanje ER α smo uporabili primarna mišja monoklonska protitelesa proti ER α (ER α (F-10): sc-8002, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), za zaznavanje PR-A pa smo uporabili primarna mišja monoklonska protitelesa proti PR-A in PR-B (PR (AB-52): sc-810, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Primerno redčenje primarnih protiteles proti ER α (1:500) in proti PR-AB (1:1000) smo izbrali na podlagi objavljenih člankov Lia in sod. ter Hanekamp in sod. in na podlagi protokolov o steroidnih receptorjih (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Sekundarna protitelesa (kozja protitelesa proti primarnim mišjim protitelesom (Jackson Immuno Research Laboratories, INC)) smo za ER α redčili v razmerju 1:10000, za PR-AB pa v razmerju 1:20000.

Prisotnost ER α in PR-A smo želeli potrditi tako pri celičnih linijah kot tudi v vzorcih raka endometrija in okolnega normalnega endometrija, vendar signala v nobenem od vzorcev kot tudi v celičnih linijah nismo zaznali.

Šmuc in sod. (2006) so dokazali izražanje ER α na ravni mRNA v celični liniji raka endometrija Ishikawa. Potrdili so tudi večje izražanje ER α v primerjavi z ER β . Rezultati PCR v realnem času v še neobjavljenih študijah (Šmuc in sod.) so pokazali, da se ER α izraža v skoraj vseh celičnih linijah, razen v MCF-7, PR-AB pa dobro v celičnih linijah Ishikawa in MCF-7 ter slabše v HepG2 in JEG-3.

Ker se fiziološke vloge estrogenskih receptorjev ER α in ER β razlikujejo in ker ER β uravnava delovanje ER α , znanstveniki predvidevajo, da ima ER α pomembno vlogo pri nastanku raka endometrija (Ryan in sod., 2005 in Sakaguchi in sod., 2002 in Fujimoto in sod., 2000). Z zmanjševanjem količine ER β v tkivu se vzpostavi neravnovesje med ER α in ER β , proliferativni učinek ER α se relativno poveča, kar vodi do od estrogenov odvisne kancerogeneze (Skrzypczak in sod., 2004 in Šmuc in sod., 2006). Raziskava Saegusa in Okayasu je pokazala, da se v rakavem tkivu ne poveča samo raven ER α mRNA, pač pa tudi ER α proteinov. Tudi funkcionalni polimorfizem ER α , ki lahko sproži nenadzorovano proliferacijo celic pri nižji koncentraciji estrogenov v tkivu, znanstveniki povezujejo z nastankom raka endometrija (Herynk in sod., 2004 in Iwamoto in sod., 2003 in Weiderpass in sod., 2000).

Tudi PR-A receptorji imajo v endometriju pomembno vlogo. V endometriju inhibirajo aktivacijo ER α in s tem od estrogenov odvisno proliferacijo endometrija ter zavirajo izražanje

PR-B. Ker je razmerje PR-A / PR-B pri raku endometrija spremenjeno, se zaradi tega lahko zmanjša progesteronska zaščita proti učinkom estrogenov (Graham in Clarke, 1997 in Leslie in sod., 2003 in Miyamoto in sod., 2004 in Arnett-Mansfield in sod., 2004 in Ryan in sod., 2005 in De Vivo in sod., 2002 in Sasaki in sod., 2001 in Hanekamp in sod., 2003).

Možni vzroki za nezaznavanje receptorjev ER α in PR-A v vzorcih bi lahko bili: napačno zvijanje receptorjev po translaciji, mutacije v specifičnih epitopnih regijah receptorjev, razgradnja receptorjev s proteazami, še najverjetnejši vzrok pa je v nedelovanju primarnih mišjih monoklonskih protiteles tako proti ER α kot tudi proti PR-A. Merlino in sod. so ugotavljali prisotnost in količino progesteronskih receptorjev z dvema vrstama primarnih monoklonskih protiteles (proizvajalcev Dako North America in Santa Cruz). Splošno uporabna primarna zajčja protitelesa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) so se izkazala za neunčikovita. Z njimi v vzorcih niso uspeli detektirati niti PR-A niti PR-B. Podobnih informacij o nedelovanju primarnih protiteles Santa Cruz v drugih člankih nismo zasledili. Šmuc in sod. so tako ER α kot tudi PR-A v istih vzorcih kasneje detektirali z novimi primarnimi protitelesi drugega proizvajalca.

5.2 SKLEPI

Preveriti smo želeli postavljeno hipotezo, da se ER β in ER α ter PR-B in PR-A zaradi spremenjenega hormonskega ravnovesja v tkivu, ki vpliva na napačno podvojevanje DNA, različno izražajo v rakavem endometriju v primerjavi z normalnim ter da te razlike v izražanju vodijo v razvoj hormonsko odvisne oblike raka.

Izolirali smo proteine iz vzorcev rakavega in normalnega tkiva 16 bolnic, izračunali koncentracijo, določili maso proteinov v posameznem vzorcu ter količino izoliranih proteinov za nanos na gel. Za zaznavanje estrogenskih receptorjev ER α in ER β ter progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B smo izbrali ustrezne pogoje: ustrezno redčenje primarnih in sekundarnih protiteles ter na podlagi predhodnih študij β -aktin kot interni standard. Čas izpostavitve filma na membrani (5 minut) kot tudi čas razvijanja filma (30 sekund) sta bila za vse vzorce vedno enaka.

Za primerjavo smo uporabili štiri celične linije: Ishikawa, ker je celična linija raka endometrija, celični liniji MCF-7 in JEG-3, ker gre v teh dveh primerih za od hormonov odvisno obliko raka ter celično linijo raka jeter HepG2, ker vemo, da imajo estrogeni in progestageni pomembno vlogo tudi v jetrih. Za primerjavo z vzorci raka endometrija nas je zanimala prisotnost estrogenskih in progesteronskih receptorjev v celični liniji Ishikawa. Zaznali smo predvsem ER β , vzrok za odsotnost PR-B v tej celični liniji pa je lahko v pogojih gojenja. Za kontrolo izražanja ER β in PR-B smo izbrali JEG-3 in HepG2, za kontrolo izražanja ER α in PR-A pa samo JEG-3. V večini vzorcev (12 od 16) izoliranih proteinov smo zasledili večje količine receptorjev ER β in PR-B v rakavem tkivu endometrija v primerjavi z normalnim tkivom. Prisotnost progesteronskega receptorja PR-B smo dokazali tudi na celični ravni z imunohistokemijskim barvanjem. PR-B je bil prisoten v vseh treh vzorcih v žleznih celicah raka endometrija. Za ER α in PR-A signala niti v vzorcih kakor tudi v celičnih linijah nismo zaznali.

Glavni razlog za nezaznavanje estrogenskega receptorja ER α in progesteronskega receptorja PR-A v vzorcih raka endometrija in okolnega normalnega endometrija bi lahko bil v nedelovanju primarnih mišjih monoklonskih protiteles tako proti ER α kot tudi proti PR-A. Šmuc in sod. so ER α in PR-A kasneje detektirali z novimi primarnimi protitelesi drugega proizvajalca.

Za ER β in PR-B smo ugotovili povečano izražanje v rakavem tkivu endometrija v primerjavi z normalnim. Rezultati za ER β se ne ujemajo z večino dosedaj objavljenih znanstvenih raziskav, vendar razlika ni bila statistično značilna. Statistično značilno razliko smo potrdili za PR-B. Raziskavo bi bilo potrebno nadaljevati na večjem številu vzorcev, v nadaljnjih študijah pa bi bilo zanimivo preveriti tudi prisotnost izooblik estrogenskih in progesteronskih receptorjev in ugotoviti, kakšen pomen bi razlike v izražanju le-teh lahko imele za razvoj raka endometrija. Izmeriti bi bilo treba tudi aktivnost posameznih receptorjev, smiselno pa bi še bilo nadaljevati s proučevanjem izražanja posameznih receptorjev na celični ravni.

Receptorji imajo v endometriju različne funkcije: ER β ima antiproliferativno in pro-apoptotsko funkcijo in uravnava delovanje ER α , PR-A pa uravnava delovanje estrogenov ter zavira izražanje PR-B. Ker je za razvoj raka endometrija zaradi različnih fizioloških funkcij estrogenskih in progesteronskih receptorjev v tkivu pomembno poznati tudi razmerje ER α / ER β ter PR-A / PR-B, bi bilo za natančnejšo predstavo o vlogi receptorjev pri raku endometrija treba imeti rezultate izražanja receptorjev ER α in PR-A. Do sedaj znani rezultati po predhodnih analizah na istih 16. vzorcih, kažejo na mRNA ravni manjše izražanje ER β v primerjavi z ER α in s tem povečano razmerje ER α / ER β pri raku endometrija.

Pomembnost razmerij ER α / ER β ter PR-A / PR-B potrjujejo tudi na novo opisani funkcionalni polimorfizmi, ki povečajo prepisovanje ER α in PR-B in s tem tveganje za nastanek raka endometrija. Nadaljnje raziskave funkcionalnih polimorfizmov pri raku endometrija bi lahko bile usmerjene v določanje SNP kot genskih markerjev, v SNP mapiranje ter v izdelavo individualnih SNP profilov, na podlagi katerih bi se dalo določiti dovzetnost posameznikov za nastanek rakavega obolenja.

Boljše poznavanje izražanja in vloge receptorjev pri nastanku raka endometrija lahko pripomore tudi k razvoju novih potencialnih zdravil za to bolezen, selektivnih modulatorjev estrogenskih receptorjev (SERM) ali selektivnih modulatorjev progesteronskih receptorjev (SPRM).

6 POVZETEK

Rak endometrija je primarni maligni epitelijski tumor, ki se pojavi v sluznici maternice, od koder se lahko razširi tudi v miometrij in na okolne organe. Je od hormonov odvisna oblika raka. 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 celic ter večje možnosti naključnih genetskih napak, kar lahko vodi do nastanka raka endometrija.

Gre za najpogostejši maligni tumor ženskega genitalnega trakta v razvitem svetu. V svetovnem merilu je sedma najpogostejša oblika raka. Število novih primerov raka endometrija v Sloveniji narašča (za leto 2007: 31 primerov / 100.000 ljudi). Po pogostosti je rak endometrija na četrtem mestu za rakom dojke, kožnim rakom in rakom debelega črevesa, pojavnost pa je najpogostejša pri ženskah po menopavzi. Večina dejavnikov tveganja je povezana s prekomerno količino ali izpostavljenostjo estrogenom. 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 estrogensko terapijo brez dodatka progestagenov, kontracepcijska sredstva z visoko ravno estrogena, zdravljanje drugih oblik raka s tamoxifenom, diabetes, starost, genetske predispozicije, debelost in SNP. Tveganje za nastanek te bolezni zmanjšujejo fizična aktivnost, nosečnost in kombinirana kontracepcija. Način zdravljenja raka endometrija je odvisen od tega, s kakšno obliko in stopnjo razvoja raka imamo opraviti, najprimernejša pa sta operacija in/ali kemoterapija.

Na podlagi klinično-patoloških karakteristik lahko obravnavamo dva tipa raka endometrija: tip I, kamor spadajo različno diferencirani endometrioidni adenokarcinomi z dobro prognozo, in tip II, kamor uvrščamo serozni, papilarni in svetlo-celični adenokarcinom s slabšo napovedjo. Glede na molekularno-biološki profil pa poznamo tri poti nastanka raka endometrija: preko hiperplazije, metaplazije ali *de novo*. Vse tri poti vključujejo več stopenj, ki jih spremlja serija biokemijskih in morfoloških sprememb zaradi genetskih sprememb v onkogenih, tumor zavirajočih genih, genih za popravljanje neujemanja DNA baznih parov ter efektorskih genih.

Znano je, da so v razvoj raka endometrija vključeni estrogeni in progestageni, ki med menstruacijskim ciklusom izmenično delujejo preko ustreznih znotrajceličnih receptorjev. Med proliferacijsko fazo so bolj dejavni estrogeni, ki spodbujajo deljenje celic žleznega

epitelija, v sekrecijski fazi pa je močnejše delovanje progestagenov, ki vodijo celice endometrija v diferenciacijo in tako nasprotujejo mitogenemu delovanju estrogenov. Uravnavanje biološke aktivnosti estrogenov in progestagenov poteka na ravni izražanja receptorjev, pa tudi na predreceptorski ravni. Na predreceptorski ravni imajo osrednjo vlogo pri uravnavanju aktivnosti steroidnih hormonov encimi hidroksteroid-dehidrogenaze, na receptorski ravni pa to vlogo prevzamejo jedrni receptorji, od ligandov odvisni transkripcijski faktorji. Mednje spadajo estrogenska receptorja ER α in ER β in progesteronska receptorja PR-A in PR-B. Ob vezavi liganda se vežejo na DNA in uravnavajo izražanje specifičnih genov. Fiziološke funkcije receptorjev se razlikujejo. Nanje vplivajo specifična znotrajjedrna razporeditev receptorjev, spremembe v razmerju ER α / ER β ter PR-A / PR-B, tvorba heterodimerov receptorjev, pojav izooblik ter funkcionalni polimorfizmi posameznih receptorjev. Citoplazmatski PR-B lahko delujejo tudi brez vezanega liganda v povezavi s signalnimi molekulami ter tako vpliva na proliferacijo tkiva endometrija. Predvidevamo, da ima pomembno vlogo pri raku endometrija tudi spremenjeno izražanje estrogenskih in progesteronskih receptorjev.

Namen diplomske naloge je bil proučiti izražanje estrogenskih receptorjev ER α in ER β in progesteronskih receptorjev PR-A in PR-B v rakavem tkivu in okolnem normalnem tkivu endometrija. Iz vzorcev normalnega in rakavega tkiva 16 bolnic smo izolirali proteine. Tem proteinom in proteinom celičnih linij smo določili koncentracijo z Bradfordovo metodo. 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 ter detekcijo z ojačano kemiluminiscenco smo ugotavljali prisotnost receptorjev in hišnega proteina β -aktina v vzorcih in celičnih linijah. Določili smo ustrezne pogoje za detekcijo: ustrezne koncentracije primarnih in sekundarnih protiteles (za ER β in PR-B) ter na podlagi predhodnih študij β -aktin kot interni standard. Čas izpostavitve filma na membrani kot tudi čas razvijanja filma sta bila za vse vzorce vedno enaka. Dobljene rezultate na filmu smo ovrednotili z računalniškim programom UN-SCAN-IT ter jih statistično obdelali. Statistično značilne razlike med normalnim in rakavim tkivom vzorcev smo preverili z Wilcoxonovim neparametričnim testom za pare s stopnjo zaupanja 0,05.

Prisotnost estrogenskih in progesteronskih receptorjev ter hišnega proteina β -aktina smo pričakovali pri vseh celičnih linijah, predvsem pa nas je zanimala prisotnost v celični liniji raka endometrija Ishikawa, kjer smo prisotnost ER β tudi potrdili. Za kontrolo izražanja ER β in

PR-B smo izbrali JEG-3 in HepG2, kjer je bil signal najmočnejši, za kontrolo izražanja ER α in PR-A pa samo JEG-3. Povišane vrednosti ER β in PR-B, normirane na β -aktin, smo zaznali v večini vzorcev (12 od 16) rakavega tkiva in v 4 vzorcih okolnega normalnega tkiva. Razlika med normalnim in rakavim tkivom pri ER β ni bila statistično značilna, za PR-B pa smo dobili statistično značilno razliko. Povprečje količine ER β v rakavem tkivu vzorcev je 1,8 krat večje kot v normalnem tkivu, povprečje količine PR-B v rakavem tkivu pa 2,2 krat večje kot v normalnem tkivu. Prisotnost progesteronskega receptorja PR-B smo potrdili na celični ravni z imunohistološkim barvanjem. PR-B je bil prisoten v vseh treh vzorcih v žleznih celicah raka endometrija. Za estrogenski receptor ER α in progesteronski receptor PR-A signala v nobenem od vzorcev kot tudi v celičnih linijah nismo zaznali. To bi lahko utemeljili z nedelovanjem primarnih mišjih monoklonskih protiteles tako proti ER α kot tudi proti PR-A, kar so potrdile tudi kasnejše raziskave s primarnimi protitelesi drugega proizvajalca.

Za ER β in PR-B smo ugotovili povečano izražanje v rakavem tkivu endometrija v primerjavi z normalnim, za ER α ter PR-A podatkov nimamo. Rezultati za ER β se ne ujemajo z večino dosedaj objavljenih znanstvenih raziskav. Študije izražanja ER α in ER β v istih vzorcih kažejo na mRNA ravni na manjše izražanje ER β v primerjavi z ER α in s tem povečano razmerje ER α / ER β pri raku endometrija. Seveda pa ni nujno, da rezultati na ravni mRNA odražajo raven proteinov v celici. Študije izražanja ER β na proteinski ravni bi bilo treba nadaljevati na večjem številu vzorcev. Smiselno bi bilo na večjem številu vzorcev preveriti tudi prisotnost posameznih receptorjev na celični ravni. Za boljše razumevanje in opredelitev pomena receptorjev pri nastanku raka endometrija bi bilo v prihodnje treba preveriti prisotnost izooblik estrogenskih in progesteronskih receptorjev in ugotoviti njihov pomen pri razvoju kancerogeneze, upoštevati pa bi bilo treba tudi vse faktorje, ki vplivajo tako na izražanje kot tudi na različne funkcije posameznih receptorjev v tkivu.

Nadaljnje proučevanje estrogenskih in progesteronskih receptorjev bi lahko bilo usmerjeno tudi v določanje SNP kot genskih markerjev ter v izdelavo individualnih SNP profilov. Boljše poznavanje izražanja in vloge receptorjev pri nastanku raka endometrija lahko pripomore tudi k razvoju novih potencialnih zdravil za to bolezen.

7 VIRI

Amant F., Moerman P., Neven P., Timmerman D., Limbergen Van E., Vergote I., 2005.
Endometrial cancer. *Lancet* 366: 491-505

Akhmedkhanov A., Zeleniuch-Jacquotte A., Toniolo P., 2001. Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 943: 296-315

Aranda A., Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews* 81(3)

Arnett-Mansfield R., DeFazio A., Mote P.A., Clarke C.L. 2004. Subnuclear distribution of progesterone receptors A and B in normal and malignant endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(3): 1429-1442

Berstein L.M., Tchernobrovkina A.E., Gamajunova V.B., Kovalevskij A.J., Vasilyev D.A., Chepik O.F., Turkevitch E.A., Tsyrlina 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

Davies S., Dai D., Wolf D.M., Leslie K.K. 2004. Immunomodulatory and transcriptional effects of progesterone through progesterone A and B receptors in Hec50co poorly differentiated endometrial cancer cells. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 11(7)

Deligdisch L. 2000. Hormonal pathology of the endometrium. *Modern Pathology* 13(3): 285-294

Deroo B.J. and Korach K.S. 2006. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116(3)

De Vivo I., Huggins G.S., Hankinson S.E., Lescault P.J., Boezen M., Colditz G.A., Hunter D.J. 2002. A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *PNAS* 99(19): 12263-12268
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192172299

Falkenstein E., Tillmann H-C., Christ M., Feuring M., Wehling M. 2000. Multipla actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Reviews* 52: 513-555
<http://pharmrev.aspectjournals.org/cgi/reprint/52/4/513>

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

Fujimoto J., Sakaguchi H., Aoki I., Khatun S., Toyoki H., Tamaya T. 2000. Steroid receptors and metastatic potential in endometrial cancers. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 75: 209-212

Graham J.D., Clarke C.L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* 18(4)

Gustafsson J-Å. 1999. Estrogen receptor β – a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology* 163: 379-383

- Hanekamp E.E., Gielen S.C.J.P., Smid-Koopman E., Kühne L.C.M., DeRuiter P.E., Chadha-Ajwani S., Brinkmann A.O., Grootegoed J.A., Burger C.W., Huikeshoven F.J., Blok L.J. 2003. Consequences of loss of progesterone receptor expression in development of invasive endometrial cancer. *Clinical Cancer Research* 9: 4190-4199
- Henderson B.E., Feigelson H.S. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21(3): 427-433
- Herynk M.H., Fuqua S.A.W. 2004. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine Reviews* 25(6): 869-898
- Hirata S., Shoda T., Kato J., Hoshi K. 2003. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 14(3)
- 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
- Iwamoto I., Fujimoto T., Douchi T., Nagata Y. 2003. Association of estrogen receptor α and β_3 -adrenergic receptor polymorphism with endometrial cancer. *Obstetrics & Gynecology* 102(3)
- Jarzabek K., Koda M., Kozłowski L., Mittre H., Sulkowski S., Kottler M-L., Wolczynski S. 2005. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of oestrogen receptors α and β in human primary breast cancer: Correlation with proliferation marker Ki-67 and clinicopathological factors. *European Journal of Cancer* 41: 2924-2934
- Kang S., Roh J.W., Kim J.W. 2005. Single nucleotid polymorphism: a new risk factor for endometrial cancer?. *Future oncology* 1(3): 323-330

- Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Simard J., Labrie C., El-Alfy M., Pelletier G., Bélanger A. 2000. Intracrinology: 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 hidroksteroid-dehidrogenaz pri uravnavanju aktivnosti estrogenov in progestagenov: primer raka endometrija in endometrioze. *Medicinski razgledi* 43: 419-428
- Lanišnik Rižner T., Šmuc T., Ruprecht 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
- Lazar M.A. 2006. Mechanism of action of hormones that act on nuclear receptors.
<http://www.intl.elsevierhealth.com/e-books/pdf/451.pdf>
- Lecce G., Meduri G., Ancelin M., Bergeron C., Perrot-Appianat M. 2006. Presence of estrogen receptor β in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(3)
- Leslie K.K., Stein M-P., Kumar N.S., Dai D., Stephens J., Wandinger-Ness A., Glueck D.H. 2003. Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 96: 32-41
- Lewandowski S., Kalita K., Kaczmarek L. 2002. Estrogen receptor β . Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. Minireview. *FEBS Letters* 524: 1-5
- Li R., Saito T., Tanaka R., Satohisa S., Adachi K., Horie M., Akashi Y., Kudo R. 2005. Hypermethylation in promoter region of retinoic acid receptor-beta gene and immunohistochemical findings on retinoic acid receptors in carcinogenesis of endometrium. *Cancer Letters* 219: 33-40
- Liang P., Pardee A.B. 2003. Analysing differential gene expression in cancer. *Perspectives. Nature reviews* 3: 869-878

- Liu F.S. 2007. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 46(1): 26-32
- Martinet W., Abbeloos V., Van Acker N., De Meyer G.R.Y., Herman A.G., Kockx M.M. 2004. Western blot analysis of limited number of cells: a valuable adjunct to proteome analysis of paraffin wax-embedded, alcohol-fixed tissue after laser capture microdissection. *Journal of Pathology* 2002: 382-388
- McKenna N., Lanz R.B., O'Malley B.W. 2006. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocrine Reviews* 20(3): 321-344
- Merlino A.A., Welsh T.N., Tan H., Yi L.J., Cannon V., Mercer B.M., Mesiano S. 2007. Nuclear progesterone receptors in the human pregnancy myometrium: evidence that parturition involves functional progesterone withdrawal mediated by increased expression of progesterone receptor-A. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(5):1927-1933
- Miyamoto T., Watanabe J., Hata H., Jobo T., Kawaguchi M., Hattori M., Saito M., Kuramoto H. 2004. Significance of progesterone receptor – A and – B expressions in endometrial adenocarcinoma. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 92: 111-118
- Moutsatsou P., Sekeris C.E. 2003. Steroid receptors in the uterus: implications in endometriosis. *Annals New York Academy of Sciences* 997: 209-222
- Mueck A.O., Seeger H., Lippert T.H. 2002. Estradiol metabolism and malignant disease. *Maturitas* 43: 1-10
- Mylonas I., Jaschke U., Shabani N., Kuhn C., Kriegel S., Kupka M. S., Friese K. 2005. Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ER- α), estrogen receptor beta (ER- β) and progesterone receptor (PR). *Anticancer Research*. 25: 1679-1686.
- Pearce S.T., Jordan V.C. 2004. The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50: 3-22

- 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
- Persson I. 2000. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers: evidence and hypotheses from epidemiological findings. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74: 357-364
- Podczaski E., Mortel R. 2001. Hormonal treatment of endometrial cancer: past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 15(3): 469-489
- Prat J. 2004. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Human Pathology* 35(6)
- Ryan A.J., Susil B., Jobling T.W., Oehler M.K. 2005. Endometrial cancer. *Cell Tissue Research* 322: 53-61
- Saegusa M., Okayasu I. 2000. Changes in expression of estrogen receptors α and β in relation to progesterone receptor and pS2 status in normal and malignant endometrium. *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 510-518
- Saito T., Mizumoto H., Tanaka R., Satohisa S., Adachi K., Horie M., Kudo R. 2003. Overexpressed progesterone receptor form B inhibits invasive activity suppressing matrix metalloproteinases in endometrial carcinoma cells. *Cancer Letters* 209: 237-243
- Sakaguchi H., Fujimoto J., Aoki I., Toyoki H., Khatun S., Tamaya T. 2002. Expression of oestrogen receptor α and β in uterine endometrial and ovarian cancers. *European Journal of Cancer.* 38 Supplement 6: S74-S75
- Sasaki M., Dharia A., Oh B.R., Tanaka Y., Fujimoto S., Dahiya R. 2001. Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Research* 61: 97-102

- Sasaki M., Tanaka Y., Kaneuchi M., Sakuragi N., Dahiya R. 2003. CYP1B1 gene polymorphisms have higher risk for endometrial cancer, and positive correlations with estrogen receptor α and estrogen receptor β expressions. *Cancer Research* 63: 3913-3918
- Schoonen W.G.E.J., Dijkema R., de Ries R.J.H., Wagenaars J.L., Joosten J.W.H., de Gooyer M.E., Deckers G.H., Kloosterboer H.J. 1998. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. II. Comparison of binding, transactivation and ED₅₀ values of several synthetic (anti)progestagens *in vitro* in CHO and MCF-7 cells and *in vivo* in rabbits and rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 64(3-4): 157-170
- Sherman M.E. 2000. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Modern Pathology* 13(3): 295-308
- Sherwin R., Catalano R., Sharkey A. 2006. Large-scale gene expression studies of the endometrium: what have we learnt?. *Reproduction* 132: 1-10
- 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
- Skrzypczak M., Bieche I., Szymczak S., Tozlu S., Lewandowski S., Girault I., Radwanska K., Szczylik C., Jakowicki J.A., Lidereau R., Kaczmarek L. 2004. Evaluation of mRNA expression of estrogen receptor β and its isoforms in human normal and neoplastic endometrium. *International Journal Cancer* 110: 783-787
- Sonoda Y., Barakat R.R., 2005. Screening and the prevention of gynecologic cancer: Endometrial cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 1-15
- Šmuc T., Ruprecht R., Šinkovec J., Adamski J., Lanišnik Rižner T. 2006. Expression analysis of estrogen-metabolizing enzymes in human endometrial cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248: 114-117

Vienonen A., Miettinen S., Bläuer M., Martikainen P.M., Tomás E., Heinonen P.K., Ylikomi T. 2004. Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 11(2)

Weiderpass E., Persson I., Melhus H., Wedrén S., Kindmark A., Baron J.A. 2000. Estrogen receptor α gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* 21(4): 623-627

Šmuc T., Kristan K., Bajc G., Šinkovec J., Ribič-Pucelj M., Husen B., Thole H., Lanišnik Rižner T. 2007. Are 17 β -HSDs responsible for increased estradiol concentrations within ectopic and cancerous endometrium? V: WEINER, Henry (ur.), MASER, Edmund (ur.), LINDAHL, Ronald (ur.), PLAPP, Bryce (ur.). *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism* 13. Purdue: Purdue University, 2007, str. 350-359

Boyer R. Temelji biokemije. 2005. Zbirka *Scripta*. Ljubljana, Študentska založba: 634

Garrett R.H., Grisham C.M. 1999. *Biochemistry*. Second edition. Saunders College Publishing

Koolman J., Roehm K.H. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. Second edition. New York. Thieme.

Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 1998. *Biokemijski praktikum*. Zbirka *Scripta*. Ljubljana, Študentska organizacija Univerze v Ljubljani: 182 strani

Incidenca raka v Sloveniji 2003. 2006. Primic-Žakelj M.(ur.), Bračko M., Hočevar M., Pompe-Kirn V., Strojani P., Zadnik V., Zakotnik B., Žagar T. Ljubljana, Register raka za Slovenijo, Onkološki inštitut Ljubljana. Poročilo RR št.45.
http://www.onko-i.si/uploads/LP_2003.pdf

Hammond J.B.W, Kruger N.J. The Bradford Method for Protein Quantitation. Chapter 2:
7 strani

MILLIPORE – Immobilon-P Transfer Membrane User Guide. 2000. Millipore Corporation

Mini-PROTEAN® 3 Cell. Instruction Manual. BIO RAD: 19 strani

Protein electrophoresis applications guide. 1994. Hoefer Scientific Instruments. Chapter One

Restore™ Western Blot Stripping Buffer INSTRUCTIONS. 2005. Pierce Biotechnology, Inc.:
2 strani

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate INSTRUCTIONS. 2005. Pierce
Biotechnology, Inc. : 6 strani

Susan Archambault 2000. Paired Samples T Test. Psychology Department, Wellesley College
<http://www.wellesley.edu/Psychology/Psych205/pairttest.html>

Tri teagent™ Product Information – Technical bulletin. August 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

PDB (protein data bank)

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Slovensko biokemijsko društvo SBD. Terminološka komisija.

<http://bio.ijs.si/SBD/terminologija.html#M>

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem izr. prof. dr. Tei Lanišnik Rižner za mentorstvo. Hvala za nasvete in kritične pripombe pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Gregorju Anderluhu in prof. dr. Tomu Turku za dragoceni čas.

Posebna zahvala gre Tini Šmuc za vso dodatno strokovno pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju in pri pisanju naloge ter za vzpodbudne besede.

Zahvaljujem se tudi dr. Katji Kristan, Petri Brožič in Gregorju Bajcu za pomoč v laboratoriju, nasvete in dobro voljo, ter vsem ostalim, ki ste mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

Prisrčna hvala staršema za vso vsestransko podporo, spodbudo in zaupanje ter predvsem za potrpežljivost pri čakanju na zaključek študentskih let.

Še posebej sem hvaležna prijateljem in kolegom za vse lepe in nepozabne trenutke med časom študija ter nenazadnje Micikam, ki so mi s svojo energijo, optimizmom in navdihom stale ob strani tudi takrat, ko ni šlo vse gladko. Brez vas študentska leta ne bi bila takšna, kot so bila.

Hvala vsem!