

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATALIJA KOCIPER

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

**PREUČEVANJE EKSPRESIJE GENA ZA LDL RECEPTOR V
NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

**EXAMINATION FOR LDL RECEPTOR GENE EXPRESSION IN NON SMALL
CELL LUNG CANCER TISSUES**

Ljubljana, 2010

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala v Laboratoriju za molekularno diagnostiko – Katedra za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Darka Černeta, mag. farmacije.

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorju izr. prof. dr. Darku Černetu za vse nasvete in za strokovno ter prijazno pomoč pri nastajanju diplomske naloge. Prav tako pa bi se zahvalila vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomske naloge.

Natalija Kociper

Predsednik komisije:

izr. prof. dr. Vojko Kmetec

Članica komisije:

doc. dr. Anamarija Zega

VSEBINA

SEZNAM KRATIC.....	5
1 POVZETEK.....	6
2 PLJUČNI RAK.....	7
2.1 EPIDEMIOLOGIJA PLJUČNEGA RAKA.....	7
2.2 ETIOLOGIJA PLJUČNEGA RAKA.....	7
2.3 DEJAVNIKI TVEGANJA.....	8
2.4 KLASIFIKACIJA.....	8
2.4.1 ZAMEJITEV.....	9
2.4.2 TUMORSKI KAZALCI.....	11
3 ENDOGENI IN EKSOGENI MEHANIZMI PRESKRBE RAKAVEGA TKIVA.....	12
3.1 ENDOGENI MEHANIZMI.....	12
3.1.1 VIŠJE MAŠČOBNE KISLINE SINTETAZA.....	12
3.2 EKSOGENI MEHANIZMI.....	13
3.2.1 LIPOPROTEINSKA LIPAZA.....	13
3.2.2 APOLIPOPROTEIN E.....	13
3.2.3 RECEPTOR ČISTILEC A.....	13
3.2.4 LDL RECEPTOR.....	14
4 LDL RECEPTOR.....	15
4.1 ZGRADBA LDL RECEPTORJA.....	15
4.2 NALOGA LDL RECEPTORJA.....	16
4.3 URAVNAVANJE EKSPRESIJE LDL RECEPTORJA.....	17
5 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	19
6 METODE IN MATERIALI.....	20
6.1 IZBIRA BOLNIKOV IN ZBIRANJE VZORCEV.....	20
6.2 IZOLACIJA RNA.....	20
6.3 PREPIS RNA V cDNA.....	21
6.4 REAL TIME PCR KVANTIFIKACIJA mRNA V VZORCIH.....	21
6.5 STANDARDIZACIJA NA HIŠNI GEN.....	22
6.6 STATISTIČNA ANALIZA.....	22
7 REZULTATI.....	23
8 RAZPRAVA.....	26

9 SKLEP.....	29
10 LITERATURA.....	30

SEZNAM KRATIC:

KOPB = kronična obstruktivna pljučna bolezen

TNM = klasifikacija malignosti tumorja

FAS = višje maščobne kisline sintetaza (fatty acid synthase)

LPL = lipoproteinska lipaza

APO E = apolipoprotein E

SRA = receptor čistilec A (scavenger receptor)

VLDL = lipoprotein zelo nizke gostote (very low density lipoprotein)

LDL = lipoprotein nizke gostote

CD = celični površinski antigeni (Cluster of differentiation; sistemska razvrstitev monoklonskih protiteles)

SRE = sterol regulatorni element (sterol regulatory element)

SREBP = sterol regulatorni element vezoči protein (sterol regulatory element binding protein)

HMG-CoA = hidroksi metilglutaril koencim A

RNA = ribonukleinska kislina

DNA = deoksiribonukleinska kislina

cDNA = komplementarna DNA

PCR = verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

COX = ciklooksigenaza

RLP = lipoproteinski ostanki (remnant like a particles)

PtK2 = ledvične celice (hamster kidney cells)

EAT = Ehrlic-ascites tumor

LNCaP = prostatična rakava linija (androgene celice adenokarcinoma prostate)

PUFA = večkrat nenasičene višje maščobne kisline (polyunsaturated fatty acid)

ACAT = acil koencim A holesterol aciltransferaza

EPA = eikosapentanoična kislina

DHA = dokosaheksanoična kislina

oxLDL = oksidirani LDL

1 POVZETEK

Pljučni rak je najpogostejša rakava bolezen. Delimo ga v dve veliki skupini (drobnocelični in nedrobnocelični pljučni rak), ki se med seboj zelo razlikujeta glede na potek bolezni in način zdravljenja. Po podatkih Registra raka za Slovenijo je leta 2004 zbolelo 1.205 ljudi, 917 moških in 288 žensk. Najpomembnejši dejavnik tveganja pri nastanku pljučnega raka je kajenje. Na nastanek bolezni vplivajo tudi genetski dejavniki in vrsta dejavnikov v delovnem in bivalnem okolju. Na rast in razvoj raka vplivajo še lipidi. Prevzem lipidov iz krvi celicam omogočajo membranski receptorji lipoprotein nizke gostote (LDL receptorji), ki prevzemajo holesterol iz LDL. Sintezo LDL receptorja z negativno povratno zanko v celici uravnava sterol regulatorni element vezajoči protein 2 (SREBP2). Če je znotrajceličnega holesterola preveč, je izražanje gena za LDL receptor zavrt. V rakavih celicah je negativna povratna zveza okvarjena in s tem zviša koncentracijo holesterola v celici, kar ugodno vpliva na rast in razvoj raka. Preizkusili smo hipotezo, da je izražanje gena za LDL receptor v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu v primerjavi z zdravim pljučnim tkivom zvišana. Parne vzorce pljučnega rakavega tkiva in sosednjega zdravega pljučnega tkiva istega bolnika smo zbrali od 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Iz tkiv smo izolirali mRNA LDL receptorja in z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (PCR) izmerili izražanje gena za LDL receptor. Proti pričakovanju smo dobili mejno zvišano izražanje gena za LDL receptor v zdravem (kontrolnem) pljučnem tkivu ($p = 0,0512$) v primerjavi s kontrolnim pljučnim rakavim tkivom. Nivo izražanja gena za LDL receptor v zdravem (kontrolnem) pljučnem tkivu ni bil povezan s kliničnim statusom (stadij bolezni, histološki tip, preživetje bolnika po operaciji, izgubo telesne teže) in tudi ne z ostalimi anamnestičnimi podatki (spol, starost, kajenje, indeks telesne mase). Dodaten pregled različne literature je pokazal, da podatki niso enotni. Nekateri podatki navajajo pomembno vlogo LDL receptorja in spet drugi na različno vlogo LDL receptorja. Nekateri podatki pa kažejo, da LDL receptor nima tako pomembne vloge pri preskrbi rakavega tkiva z lipidi.

Naša raziskava pa kaže na to, da v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu LDL receptor morda vendarle nima tako pomembne vloge pri preskrbi rakavega tkiva z lipidi in na potek ter razvoj pljučne rakave bolezni.

2 PLJUČNI RAK

2.1 Epidemiologija pljučnega raka

Pljučni rak je primaren in sekundaren tumor bronhijev ali pljučnega parenhima. Pri moških je najpogostejši vzrok smrti med malignimi boleznimi, zaradi pljučnega raka pa na leto umre več kot milijon ljudi. V Evropi letno diagnosticirajo preko 150.000 novih primerov bolezni, v svetovnem merilu pa predstavlja 18 % vseh rakavih bolezni (1). Pojavnost pljučnega raka pri moških je v razvitih državah naraščala do devetdesetih let, kasneje pa je pojavnost pri moških upadla. Pri ženskah se pojavnost pljučnega raka še vedno veča. V Sloveniji se je pojavnost pljučnega raka pri moških večala do leta 1995, nato je pojavnost padala in je bila leta 1998 10 % vsega raka pri moških. Pri ženskah se pojavnost stalno veča, leta 1998 je pomenil 5 % vsega raka (1).

2.2 Etiologija pljučnega raka

Karcinogeneza je motnja celičnega ciklusa in je posledica večih molekularnih sprememb na recisivnih in dominantnih genih, ki so vpleteni v uravnavanje rasti, delitve, diferenciacije in umiranja celic (2). Osnova za karcinogenezo je kopičenje genetskih sprememb, ki so povezane s postopnimi histološkimi-fenotipskimi spremembami: od normalnega tkiva do prekancerov (metaplazije, displazije), do intraepitelnega in invazivnega raka (3). Pomembna je presnova kancerogenov, njihova odstranitev ali pretvorba v dejavno obliko. Prekancerovne spremembe bronhialne sluznice lahko nastajajo multifokalno (vpliv kancerogenov na več predelov v pljučih), zato se iz njih lahko razvijejo sinhroni (ob istem času) ali metahroni (ob različnem času) pljučni tumorji (dva ali več) (2). Med pomembnejšimi dejavniki so v karcinogenezo vpleteni prevladujoči onkogeni, ki pospešujejo rast in razvoj; poglobitni za tumorje so zaviralni geni, ki uravnavajo celično smrt, geni popravljalnih mehanizmov in telomeraza. Zunanji dejavniki lahko privedejo do postopnega kopičenja molekularnih sprememb zaviralnih genov za tumorje. Posledice mutacij so aktiviranje protoonkogenov (KRAS, MYC, BCL2, ...) in utišanje za tumorje zaviralnih genov, ki skrbijo za zaviranje čezmerne rasti in spodbujajo apoptozo. Celice z okvarjenimi onkogeni in za tumorje zaviralnih genov se tako nemoteno delijo in kažejo v obsegu molekularnih sprememb ustrezne fenotipske spremembe – od predstopenj do invazivnega raka (3).

2.3 Dejavniki tveganja

Kajenje je najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek raka pljuč. Pljučni rak se razvije pri 10–20 % kadilcev. Drugi dejavniki tveganja za razvoj raka pljuč so: onesnažen zrak, azbestni prah, izpostavljenost arzenu, radioaktivnemu sevanju, radonu, policikličnim ogljikovodikom, vinilkloridu, kromu, niklju, beriliju, kadmiju, svincu, stranskim produktom pri proizvodnji aluminija, uplinjanju premoga, proizvodnji koksa, topljenju železa in jekla, pri delu z močnimi anorganskimi kislinami in izpostavljenosti kremenčevemu prahu. Po nekaterih podatkih naj bi bil pljučni rak pogostejši pri ljudeh, ki jedo veliko živalske maščobe, pri ženskah s kratkimi menstruacijskimi cikli, po nekaterih prebolelih virusnih okužbah. Pljučni rak je pogostejši pri bolnikih s kroničnimi pljučnimi boleznimi z žariščnim ali razširjenim brazgotinjenjem pljuč, kot na primer pri kronični obstruktivni pljučni bolezni (KOPB), pljučni fibrozi, in pri tistih, ki so bili že operirani zaradi pljučnega raka, ter pri bolnikih z rakom zgornjih dihal. Epidemiološke študije so pokazale, da je pljučni rak pogostejši v nekaterih družinah, ki naj bi bile genetsko nagnjene za raka ali za navado kajenja. Več kot 90 % moških bolnikov in 70 % žensk s pljučnim rakom kadi. V primerjavi z nekadilcem je pri kadilcu verjetnost za nastanek raka sedemkrat večja. Tudi pri pasivnem kadilcu je tveganje do 2-krat večje kot pri osebah, ki niso izpostavljene cigaretne dimu. Določen vpliv ima tudi onesnaženost zraka. Pljučni rak je 2-krat pogostejši v velikih mestih ali v krajih z zelo onesnaženim zrakom. Delavci, ki delajo z azbestom (v industriji azbesta) in nekaterimi drugimi kancerogeni (premogov katran, saje, arzen, krom, nikljeve spojine), v industriji izolacijskega materiala, v ladjedelnicah in v rudnikih imajo povečano tveganje za pljučnega raka (2, 3).

2.4 Klasifikacija

Pljučni rak v grobem delimo na drobnoceličnega (15–25 %) na nedrobnoceličnega (75 %) in vse ostale (2–3 %). Drobnocelični rak je znan po hitri rasti z zelo zgodnjimi zasevki po telesu. Nedrobnocelični raki so: epidermoidni karcinom ali ploščatocelični rak, adenokarcinom ali žlezni rak in makrocelularni karcinom ali velikocelični rak (2).

Ta klasifikacija tumorjev sloni na sami klasifikaciji mikroskopskega izgleda celic. Ti dve vrsti raka raste in se razvijata po različnih poteh, zato je klasifikacija pomembna za zdravljenje. Klasifikacija tumorjev glede na celični tip je včasih težka, ker so tumorji pogosto mešani. Ker se drobnocelični in nedrobnocelični zelo različno obnašajo, je zdravljenje različno. Prve zdravimo predvsem s kemoterapijo, druge, ki dalj časa ostajajo

lokalizirani, pa kirurško. Ostali, manj pogosti tumorji v pljučih, so še: karcinoid, limfom, adenom, bronhioloalveolarni karcinom, ki je oblika žleznega raka, hamartom, sarkom in metastaze primarnih tumorjev od drugod (2).

2.4.1 Zamejitev

Ocena razširitve pljučnega raka (zamejitev) pri bolniku vpliva na prognozo in način zdravljenja bolezni. V pomoč je mednarodni sistem ocenjevanja TNM: T – velikost in razširjenost primarnega tumorja; N – zaseženost bezgavk; M – oddaljeni zasevki. TNM sistem velja predvsem za nedrobnocelični rak pljuč. Po dogovoru razdelimo drobnocelični rak pljuč na omejeno obliko – bolezen je omejena na eno polovico prsnega koša vključno z nadključničnimi bezgavkami na isti strani. Razširjena oblika bolezni pomeni razširitev nad omejeno obliko. TNM sistem uporabimo pri bolnikih z zelo omejeno obliko bolezni: stadij I (T1 in T2, N0) in izjemoma stadij II (N1).

Preglednica 1: TNM sistem zamejitve pljučnega raka (22).

Primarni tumor:

TX	Primarnega tumorja z bronhoskopijo ali slikovnimi metodami ne moremo dokazati, rakave celice so prisotne v izpljunku ali bronhialnem izpirku
TO	Ni primarnega tumorja
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor, manjši kot 3 cm, omejen na lobarni bronhij
T2	Tumor, večji kot 3 cm, raste v glavnem bronhiju več kot 2 cm od glavne karine, vrašča v visceralno plevro, pridružena je atelektaza režnja ali pnevmoniti
T3	Tumor vrašča v: prsno steno, prepono, perikard, plevro medpljučja, manj kot 2 cm od glavne karine, atelektaza celega pljučnega krila
T4	Tumor vrašča v: medpljučje, srce, velike žile, sapnik, požiralnik, karino, vretenca, sočasno nastane karcinoza plevre, perikarda ali satelitski nodus v istem režnju

Bezgavke:

NX Ocena lokalnih bezgavk ni možna

N0 Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah

N1 Zasevki so v peribronhialnih in/ali hilusnih bezgavkah iste strani

N2 Zasevki so v subkarinalnih in/ali medpljučničnih bezgavkah iste strani

N3 Zasevki so v medpljučničnih, hilusnih bezgavkah nasprotne strani, nadključničnih bezgavkah iste/nasprotne strani

Oddaljeni zasevki:

MX Oddaljenih zasevkov ne moremo opredeliti

M0 Oddaljenih zasevkov ni

M1 Oddaljeni zasevki so prisotni

Na podlagi TNM ocene razdelimo bolnike s pljučnim rakom v različne stadije bolezni in se nato odločamo o načinih zdravljenja.

Stadiji pljučnega raka:	način zdravljenja
Stadij 0 TIS	
Stadij IA T1, N0, M0	
Stadij IB T2, N, M0	operabilni
Stadij IIA T1,N, M0	
Stadij IIB T2, N, M0; T3, N0, M0	
Stadij IIIA T1-3, N2, M0; T3, N1, M0	odločitev glede na posamezni primer
Stadij IIIB T4, vsak N, M0; vsak T, N3, M0	neoperabilni
Stadij IV vsak T, vsak N, M1	

5-letno preživetje bolnikov s pljučnim rakom v stadiju IA in IB je 60–75 %. Na žalost pa ima skoraj polovica bolnikov ob odkritju pljučnega raka že oddaljene metastaze, zato je povprečno 5-letno preživetje bolnikov samo okoli 10–15 %. V Sloveniji je bilo povprečno 5-letno preživetje pri moških 8 %, pri ženskah pa 10 % (2). Z do sedaj uporabljenimi metodami presejanja skupin s povečanim tveganjem za pljučnega raka so dosegali zgodnejšo diagnozo raka v nižjem stadiju, višji odstotek operabilnosti in daljše relativno

5-letno preživetje. Nobena od metod za presejanje skupin prebivalstva s povečanim tveganjem za zgodnje odkrivanje ni pokazala zmanjšane smrtnosti (31).

2.4.2 Tumorski kazalci

S pomočjo analize snovi, ki jo izloča tumor ali pa nastanejo v drugih celicah rakavega tkiva pod vplivom delovanja tumorskih celic, razlikujemo med zdravim in tumorskim tkivom. V onkologiji jih uporabljamo za:

- presejalno diagnostiko v splošni populaciji,
- spremljanje uspešnosti zdravljenja rakavih bolnikov,
- diagnozo posebnih vrst raka,
- za prognostična sklepanja in odločanje o načinu zdravljenja bolnika.

Med tumorske kazalce uvrščamo tudi citokeratine, ki se pogosto pojavljajo v plazmi bolnika s pljučnimi boleznimi, še posebej pa pri malignih pljučnih tumorjih. Klinična vodila European group on tumor markers (EGTM) priporočajo nevron specifično enolazo (NSE) v diferencialni diagnostiki pljučnega raka, rakave markerje citokeratinski 19 fragment (CYFRA 21-1), karcinoembrionski antigen (CEA) in/ali NSE pa priporočajo za spremljanje in monitoring terapije. NSE korelira s stadijem bolezni in predstavlja prognostično orodje za napoved napredovanja bolezni. Imunološke preiskave NSE so pomembne za diferencialno diagnostiko med histološkimi tipi tumorjev. CEA je primeren za spremljanje in detekcijo razvoja pljučnih metastaz. V pomoč je pri postavljanju diagnoze nedrobnoceličnega raka in pri monitoringu pljučnega raka. CYFRA 21-1 je najbolj občutljiv pri nedrobnoceličnem raku in raku skvamoznih celic. Koncentracije pozitivno korelirajo z napredovanjem stadija, uporabne pa so pri spremljanju poteka bolezni in stanja po operaciji (24, 25).

3 ENDOGENI IN EKSOGENI MEHANIZMI PRESKRBE

RAKAVEGA TKIVA

Pri razvoju tumorskega tkiva je poleg neoangiogeneze pomembna tudi preskrba z lipidi. Lipidi so skupina bioloških molekul, mednje pa uvrščamo višje maščobne kisline, holesterol, fosfolipide in ostale v maščobah topne sestavine. Najbolj so poznani zaradi svoje vloge v energijskem metabolizmu. Najdemo jih tudi v bioloških membranah, lahko so tudi pigmenti, ki absorbirajo svetlobo (karoten, retinal), encimski kofaktorji (vitamin K), hormoni (estrogeni, testosteron), signalne molekule (prostaglandini), prenašalci elektronov (ubikinon) in prekursorji pomembnih sestavin (prostaglandin E2 (PGE2), hormonov). Tumorske celice potrebujejo za preživetje tudi lipide, ki jih lahko pridobijo na dva načina: ali jih pridobivajo eksogeno (torej iz krvi ali okoliškega nerakavega tkiva) ali pa jih sintetizirajo same. Mehanizmi, s katerimi tumorske celice pridobivajo lipide, so v večini primerov enaki tistim, ki jih uporabljajo zdrave celice (FAS, lipoproteinska lipaza, receptor za LDL). Različne in pomembne pa so aktivnosti teh poti, ki privedejo do končnih produktov metabolizma lipidov, med katere sodijo tudi maščobne kisline. Povišano izražanje genov, zvišane aktivnosti encimov in večje število receptorjev so nekateri izmed dejavnikov, ki ločujejo tumorske celice od normalnih in jih izkoriščamo v diagnostiki, prognozi in tudi terapiji rakavih obolenj.

3.1 ENDOGENI MEHANIZMI

3.1.1 Višje maščobne kisline sintetaza

Višje maščobne kisline sintetaza (FAS) je protein, ki je sposoben nove sinteze dolgoverižnih maščobnih kislin iz acetyl-CoA, malonil-CoA in NADPH. Je ključni biosintetski encim v sintezni poti maščobnih kislin. Kljub temu pa je acetyl-CoA karboksilaza (ACC) tisti, ki narekuje hitrost sinteze maščobnih kislin. FAS je aktiven v tumorskih celicah. Sintetizira 16-C nasičeno maščobno kislino palmitat, tako v jetrih kot ostalih lipogenih tkivih. V normalnih tkivih se sinteza maščobnih kislin začne, ko je energija v obliki ogljikovih hidratov v presežku (skladiščenje energije v obliki trigliceridov). Izražanje FAS je povišano pri različnih oblikah raka (rak na dojki, jajčnikih in prostati, pljučni in kolorektalni rak). V normalnem tkivu je izražanje FAS dosežena z indukcijo transkripcije, ki je uravnavana z inzulinom, glukagonom, glukokortikoidi in ščitničnimi hormoni. V rakavih tkivih pa je izražanje FAS najverjetneje nadzorovan preko

mitogen-activated protein (MAP) kinazne in fosfatidilinozitol-3-kinazne (PI3K) poti. Pri študijah na humanih celičnih linijah kolorektalnega raka so ugotovili, da inhibitorji MAP kinaze in PI3K navzdol regulirajo nivo sterol regulatorni element vezajoči protein 1c (SREBP1c) in s tem zmanjšajo transkripcijo FAS promotorja, kar vodi v zmanjšano izražanje FAS in manjšo sintezo maščobnih kislin (5).

3.2. EKSOGENI MEHANIZMI

3.2.1 Lipoproteinska lipaza

Lipoproteinska lipaza (LPL) je glavni encim, ki je odgovoren za hidrolizo cirkulirajočih trigliceridov. LPL je homodimer, ki ima dve nalogi, in sicer trigliceridne hidrolaze ter vezavnega faktorja za receptorsko posredovano vstopanje lipoproteinov v celice. Najdemo ga predvsem v adipoznem tkivu, srčnih in skeletnih mišicah pa tudi v diferenciranih makrofagih, možganih, posteljici, pljučih in β -celicah trebušne slinavke. Tkivno specifično uravnavanje aktivnosti LPL in genskega izražanja zagotavlja kontrolo nad privzemom prostih lipidov v tarčna tkiva (9, 11). Z merjenjem aktivnosti LPL pri bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim raku so ugotovili, da je aktivnost LPL v rakavih celicah zvečana, medtem ko je v okolnem tkivu zmanjšana. To nakazuje, da tumor uravnava aktivnost LPL v okolnem tkivu – jo zmanjša in tako omogoči mobilizacijo lipidov, prostih maščobnih kislin v rakavem tkivu, ki na tak način preživi in raste (11).

3.2.2 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (apo E) je bistvenega pomena za normalno presnovo lipoproteinov, bogatih s trigliceridi. Je apolipoprotein, ki omogoča prenašanje lipoproteinov, v maščobah topnih vitaminov ter holesterola po krvi in limfi. Pri povečani sintezi v tkivu ali celicah se izločajo v kri z apo E obogateni lipoproteini in se lažje vežejo na specifične receptorje, kot so LDL receptor, VLDL receptor in LDL receptorju soroden protein. Na ta način tkivo oziroma celica pridobi več maščob, prav tako pa pridejo do maščob tudi poškodovana tkiva. Študije so pokazale, da je v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu povišano izražanje apo E in zvišana koncentracija proteinov, kar nakazuje, da je apo E vpleten v razvoj raka (12).

3.2.3 Receptor čistilec A

Receptorji čistilci vežejo oksidirani LDL (oxLDL) in različne negativno nabite ligande. Ker lahko rakava bolezen privede do oksidativnega stresa, je smiselno pričakovati zvišano izražanje tega receptorja v rakavem tkivu. Makrofagni receptor čistilec tipa A (SRA) se največkrat omenja v povezavi z rakom na prostati. Domnevajo, da okvarjena ekspresija SRA lahko vodi v nekontroliran vnetni proces, ki bi bil lahko vzrok za nastanek raka. SRA ni reguliran z negativno povratno zanko in z LDL receptorjem. V nasprotju LDL receptorja, pa je SRA pomemben za razvoj ateroskleroze (30).

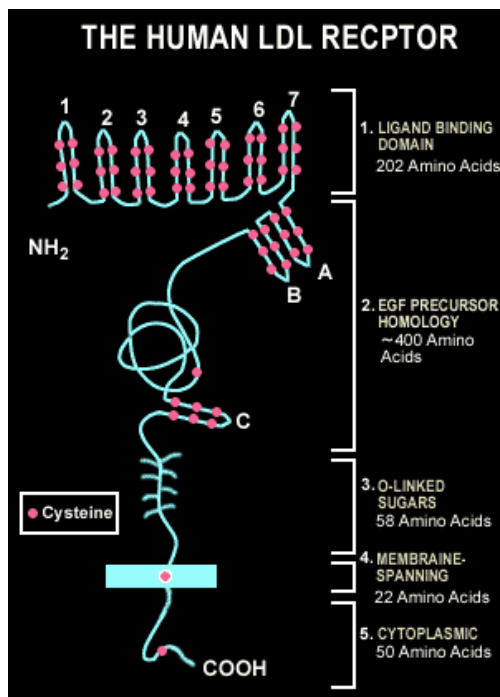
3.2.4 LDL receptor

Višje izražanje gena za LDL receptor v pljučnem rakavem tkivu lahko predstavlja možen eksogeni mehanizem preskrbe rakavega tkiva z lipidi. LDL receptor pa je natančneje obravnavan v poglavju 4.

4 LDL RECEPTOR

Je transmembranski proteinski receptor za vezavo lipoproteinov majhne gostote (LDL), ki se nahaja na plazemski membrani v strukturi, imenovani s klatrinom pokrite jamice. Naloga LDL receptorjev je urejanje homeostaze holesterola z receptorji posredovano endocitozo lipoproteinov. LDL receptor veže apo B LDL in perifernim celicam priskrbi zadostne količine holesterola, s tem pa omogoča energijo za rast in razvoj celic. Odkrila sta ga Goldstein in Brown in za njegovo odkritje sta dobila tudi Nobelovo nagrado. Od 70 % do 80 % LDL-a se presnovi preko LDL receptorja. Prepozna apolipoprotein B100, ki je vgrajen v zunanji fosfolipidni sloj LDL delcev. Receptor prepozna tudi apo E protein. Nahaja se v mišicah, fibroblastih, endoteliju, limfocitih, monocitih, makrofagih, jetrih, pljučih in nadlevisni žlezi (27).

4.1 ZGRADBA LDL RECEPTORJA:



- vezavno mesto (glikoprotein, signalni peptid; 202 aminokislin)
- predel podoben segmentu epidermalni rastni faktor (EGF) (približno 400 aminokislin)
- glikoproteinski predel (58 aminokislin)
- membranski del (22 aminokislin)
- citoplazemski del (50 aminokislin)

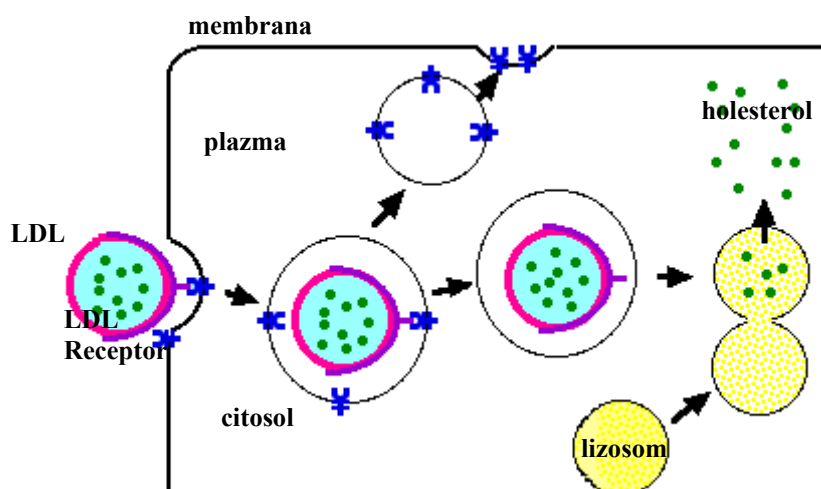
Slika 1: Zgradba LDL receptorja.

LDL receptor lahko opišemo kot himerni protein. Kot prikazuje slika 1, je LDL receptor sestavljen iz številnih funkcionalno ločenih področij. Delujejo lahko neodvisno drug od drugega. Na NH₂ koncu je hidrofoben signalni peptid, ki omogoča usmeritev sintetizirajočih ribosomov k membrani endoplazmatskega retikuluma in se odcepi takoj po

končani sintezi LDL receptorja. Na vezavni del se veže apo E, po principu negativnega naboja na vezavnem mestu in pozitivnega naboja na apo E. Predel, podoben epidermalnemu ravnemu faktorju (EGF) kot LDL, prebada plazemsko membrano. Glikoproteinski del se nahaja neposredno ob membrani, membranski del pa prebada membrano celice in drži receptor v membrani. Pomembna vloga citoplazemskega dela je pri zbiranju LDL receptorja v prevlečenih vdolbinah. Sintetizira se na zrnatem endoplazmatskem retikulumu in se že po 45 minutah po sami sintezi pojavi LDL receptor na membrani celice (27).

4.2 NALOGA LDL RECEPTORJA:

Celice prevzamejo holesterol in njegove estre z receptorsko posredovano endocitozo LDL. Proces se začne z vezavo LDL, na specifična vezavna mesta celice, točneje na LDL receptor. Ta mesta imenujemo s klatrinom pokrite jamice. Nevtralni pH okolja povzroči odprtje LDL receptorja na membrani in s tem omogoči vezavo LDL. Nastane endocitni vezikel, obdan s klatrinskim plaščem. V notranjosti celice klatrinski plašč oddisociira, endocitni vezikel se nato združi z drugim endocitnim veziklom. Zaradi aktivnosti ATP-protonske črpalke, v membrani vezikla pH pade in povzroči disociacijo LDL od LDL receptorjev. Prosti LDL in prosti LDL receptorji se razdružijo v vsak svoj vezikel: LDL v apoptotični vezikel, v katerem se izvrši razgradnja LDL; LDL receptorji pa v reciklažni vezikel, ki potuje nazaj na površino membrane, kjer spet nevtralen pH okolja izven celice povzroči ponovno vezavo LDL (29).



Slika 2: Z LDL receptorjem posredovana endocitoza.

4.3 URAVNAVANJE IZRAŽANJA LDL RECEPTORJA

Izražanje gena za LDL receptor je v zdravih celicah uravnavana preko negativne povratne zanke. LDL receptor je odgovoren za prevzem plazemskih LDL v endocitne vezikle, kjer se apolipoproteini in lipidi razgradijo. Holesterol zapusti lizosome in povzroči zmanjšanje v izraznosti genov za hidrokso metil glutaril CoA reduktazo (HMG-CoA reduktazo) in LDL receptor. Temu sledi še povratna regulacija biosinteze holesterola, povezana z odstranjevanjem holesterola iz plazme. Osnovni in verjetno najpomembnejši način uravnavanja biosinteze poteka preko negativne povratne zanke holesterola. Najpomembnejši členi te zanke so transkripcijski faktorji: sterol regulatorni element vezoči proteini (SREBP) in sterol regulatorni element (SRE), ki se nahaja v promotorju gena za LDL receptor. Transkripcijski faktorji povzročijo razcep membranskih prekursorjskih proteinov v SREBP1a, SREBP1c in SREBP2. Nato vezava regulatornega faktroja SREBP2 in SREBP1a na SRE povzroči povišano izražanje LDL receptorja. SREBP1a je močnejši transkripcijski faktor in je bolj odgovoren za povišano izražanje LDL receptorja, medtem ko je SREBP1c bolj pomemben pri sintezi maščobnih kislin. Znotrajcelični holesterol se lahko veže na SREBP2 in SREBP1a in s tem prepreči njegovo vezavo na SRE. To imenujemo negativna povratna zanka. SRE1 se nahaja tudi v promotorju gena za HMG-CoA reduktazo. HMG-CoA reduktaza je ključni encim pri sintezi holesterola, posledica pa je zmanjšana sinteza znotrajceličnega holesterola. Zmanjšana koncentracija znotrajceličnega holesterola tudi zviša izražanje genov za prekursorjski protein SREBP2. Posledično lahko nastane več proteina SREBP2, ki se veže na SRE, ki se nahaja v genu za LDL receptor in v genu za HMG-CoA. Znižana koncentracija holesterola vodi do povečane sinteze HMG-CoA reduktaze in do povečane sinteze LDL receptorja, kar omogoči povečan vstop holesterola v celico in povečano sintezo holesterola. Vse skupaj pa vodi do povečane koncentracije holesterola v celici. Zvišan znotrajcelični holesterol pa lahko ponovno v večjem obsegu veže SREBP2, ki se tako ne more vezati na SRE (23, 28). V patofizioloških okoliščinah, kot je na primer rak, pa negativna povratna zanka holesterola odpove in celice sintetizirajo LDL receptor in holesterol neodvisno od aktivnosti transkripcijskih faktorjev SREBP. Zvišano izražanje gena za LDL receptor najdemo v različnih rakavih celičnih linijah, in sicer v pljučnem raku, biopsijskih rakavih vzorcih in levkemičnih celicah, pri katerih je negativna povratna zanka uničena. Študija o kolorektalnem raku pri 32 preiskovancih je pokazala, da je bil prisoten protein LDL receptorja pri 12, mRNA LDL receptorja pa pri 17 bolnikih. Kjer ni bilo proteina LDL

receptorja, je bila mRNA gena za LDL receptor še posebej visoka (16). Višja produkcija LDL receptorja je morda pomemben mehanizem v rakavih celicah tudi za pridobitev več esencialnih maščobnih kislin z receptorsko posredovano endocitozo, ki omogoča povišano sintezo prostaglandinov, odgovornih za celično rast.

5 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Pomembna in glavna naloga LDL receptorja je z njim povezana receptorska endocitoza, preko katere preide LDL v celico. Sintezo receptorja v celici ureja raven prostega znotrajceličnega holesterola. Če ga je preveč za potrebe celice, bo ovirana sinteza LDL receptorja. V rakavih tkivih pa je ta zveza prekinjena. V nalogi bomo poskušali raziskati, v kolikšni meri se odraža izražanje gena za LDL receptor v nedrobnoceličnem rakavem pljučnem tkivu. Za analizo in primerjavo bomo vzeli rakavo pljučno tkivo in zdravo (kontrolno) pljučno tkivo istega bolnika. Izražanje gena za LDL receptor bomo v vzorcih izmerili s kvantitativnim PCR in jih bomo nato statistično obdelali. Poskušali bomo dokazati naslednjo hipotezo, da je izražanje gena za LDL receptor v nedrobnoceličnem rakavem pljučnem tkivu višja kot v zdravem pljučnem tkivu. Dokazana hipoteza bi pomenila, da lahko LDL receptor, kot pomemben eksogeni mehanizem, prispeva k pridobivanju lipidov v celice in s tem priskrbi dodaten vir energije, celičnih gradnikov in sinteznih prekurzorjev za rast in razvoj rakavih celic.

6 METODE IN MATERIALI

6.1 IZBIRA BOLNIKOV IN ZBIRANJE VZORCEV

V preiskavo smo vključili 42 preiskovancev, ki so prestali operativno odstranitev nedrobnoceličnega pljučnega raka v stadiju I, II, in III. Vzorce tkiva (rakavo tkivo in vizualno zdravo pljučno tkivo) so odrezali od odstranjenega pljučnega režnja v roku 15 minut. Tumorsko tkivo je bilo odrezano v najbolj zgoščenem predelu, medtem ko je bilo domnevno zdravo tkivo odrezano daleč stran od tumorskega predela. Stadij nedrobnoceličnega pljučnega raka je opredeljen v skladu s TNM klasifikacijo rakavih bolezni. Histološko analizo raka so opredelili v skladu z WHO histološko klasifikacijo. Študijo je odobril nacionalni etični odbor in soglasje je pridobljeno od vseh udeležencev študije. Bolnike so spremljali 4 leta. V prvih dveh letih so bolniki opravili preiskave na vsake 3 mesece in v naslednjih dveh letih na vsakih 6 mesecev. Klinični status in rezultate rentgenskega slikanja smo ocenili rutinsko v času preiskave. V sumljivih primerih so bile postopoma opravljene vse potrebne preiskave. Bolnike v III. fazi bolezni so zdravili po operaciji s kemoterapijo.

6.2 IZOLACIJA RNA

Pri izolaciji RNA smo uporabili približno 30 mg vzorca pljučnega tkiva, ki smo ga homogenizirali v terilnici ob prisotnosti tekočega dušika in homogenat raztopili v reagentu trizola, ki vsebuje fenol in gvanidijev izotiocinat. Za 5-minutno homogenizacijo smo uporabili Cole-Parmer Ultrasonic Processor Instrument (Vernon hills, Illions, ZDA) pri amplitudi 38 %, 1-sekundni pulz z vmesnimi premori dolžine, 2 sekund. Nato smo vzorce po 5-minutni inkubaciji na sobni temperaturi centrifugirali 10 minut pri 12000 g in 2–8 °C. S tem smo odstranili netopen material, supernatant pa je vseboval raztopljen DNA, RNA in proteine. Supernatantu smo dodali 200 µl kloroforma in po 15 sekundah stresanja je prišlo do ločitve organske in vodne faze. S 15-minutnim centrifugiranjem pri 1200 g pri 2–8 °C smo dosegli popolno ločitev obeh faz. DNA je bila raztopljena v fenolni fazi (organski fazi), RNA v vodni fazi, proteini pa so se oborili v plast med obema fazama. Po odstranitvi supernatanta se je RNA v obliki gela nahajal ob steni epruvete. Oborino RNA smo sprali s 75 % etanolom in ponovno centrifugirali pri 7500 g pri 2–8 °C. Etanol smo odstranili in oborino sušili na zraku. RNA smo raztopili v destilirani vodi brez RNAz. Za izolacijo RNA smo porabili RNeasy Mini Kit, proizvajalca Qiagen,

Hilden iz Nemčije, glede na priporočen protokol. Za teste kvalitete in njihove vrednosti smo uporabili RNA 6000 Nano LabChips na bioanalizatorju Agilent 2100.

6.3 PREPIS RNA V cDNA

RNA smo prepisali v cDNA s kitom za arhiviranje cDNA z visoko kapaciteto (High-Capacity cDNA Kit, proizvajalec Applied biosystem, ZDA). Prepis smo uporabili za kvantitativni RT-PCR arhiviranje in shranjevanje, saj je cDNA manj dovzetna za razgradnjo kot mRNA. Med postopkom se naključno izbrani oligonukleotidni začetniki vežejo na RNA molekule, nato pa obratna transkriptaza sintetizira komplementarne verige cDNA s pomočjo prostih nukleotidnih trifosfatov. Z namenom, da bi med postopkom preprečili razgradnjo RNA zaradi morebitne kontaminacije z RNAzami, smo v raztopino dodali še inhibitor RNAz.

Preglednica 1: Sestava raztopine za obratni prepis.

SESTAVINA	KOLIČINA ZA 1 VZOREC
pufer reverzne transkriptaze	10 μ l
raztopina dNTPjev (deoksiribonuklotid trifosfatov)	4 μ l
naključna primaza (encim)	4 μ l
reverzna transkriptaza (multiscribe)	5 μ l
RNA inhibitor	5 μ l
destilirana voda brez RNAz	21 μ l
Skupno	55 μ l

Prepis smo začeli z 10-minutno inkubacijo pri 25 °C, nato je sledila 120-minutna inkubacija pri 37 °C. Po končanem prepisu smo encim uničili s 5-minutno inkubacijo pri 95 °C. Epruveto smo inkubirali v termobloku s PCR reakcijo.

6.4 REAL TIME PCR KVANTIFIKACIJA mRNA V VZORCIH

Izvedli smo Taqman PCR reakcijo, ki temelji na principu klasične verižne reakcije s polimerazo, le da nam dodatno omogoča tudi kvantitativno sledenje pomnoženega zaporedja. Vse reakcije smo izvedli v trojniku. Kvantitativni PCR smo izvedli na aparaturi ABI Prism 7000 SDS PCR (Applied Biosystems). Reakcija je potekala z 2-minutno

inkubacijo pri 50 °C in 10-minutno inkubacijo pri 95 °C, nato je sledilo 40 ponovitev dveh stopenj, in sicer 15-sekundna denaturacija pri 95 °C in 1-minutno pripajanje oligonukleotidnih začetnikov in sonde na cDNA ter sinteza novih kopij.

Preglednica 2: Sestavina reakcijske zmesi za 1 vzorec.

SESTAVINA	KOLIČINA ZA 1 VZOREC
gen za LDL receptor (TaqMan Gene)	1 µl
univerzalna raztopina za PCR (TaqMan Mix)	10 µl
destilirana voda brez RNAz	8 µl
cDNA	1 µl
Skupno	20 µl

6.5 STANDARDIZACIJA NA HIŠNI GEN

Za relativno določitev vsebnosti cDNA, ki jo preučujemo, je potrebno meriti še vsebnost cDNA nekega endogenega standarda, za katerega je značilna konstantna raven izražanja v vseh poskusnih vzorcih. Raven endogenega standarda nam služi kot referenčna vrednost, na katero nominiramo vsebnost tarčne cDNA. S tem izničimo vplive variabilnosti v postopkih izolacije mRNA in prepisa v cDNA na rezultat analize.

6.6 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate smo predstavili z interkvartilnim območjem, ki je med 25. in 75. percentilom ter mediano in z vrednostjo razpona. Za oceno prognozičnih dejavnikov smo uporabili Coxove-regresijske analize. Variacije smo ocenili z Spearmanovimi analizami ureditvene regresije. Statistične analize smo opravili v programu SPSS verzija 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL); $p < 0,05$ in je bila sprejeta kot statistično značilna. Skozi 4-letno spremljanje je zaradi napredovanja bolezni umrlo 21 bolnikov. En bolnik je umrl zaradi drugega vzroka in ni bil vključen v Coxovo-regresijsko analizo.

7 REZULTATI

Preglednica 3: Klinične značilnosti bolnikov (26).

PARAMETER	BOLNIK
število	41
spol (ženski/moški)	11/30
starost (leta)	63,0 {53,0/67,0} (44-77)
indeks telesne mase (kg/m ²)	24,8 {22,2/28,3} (16,4 – 46,5)
izguba telesne teže v zadnjih 3 mesecih (ne/ja)	24/17
kadilski status (nikoli/nekdanji kadilec ali kadilec)	5/36
stadij bolezni (I – III) ^a	17/14/10
histološki tip tumorja (skvamozne celice/ adenokarcinom/makrocelični/drugi)	19/13/5/4

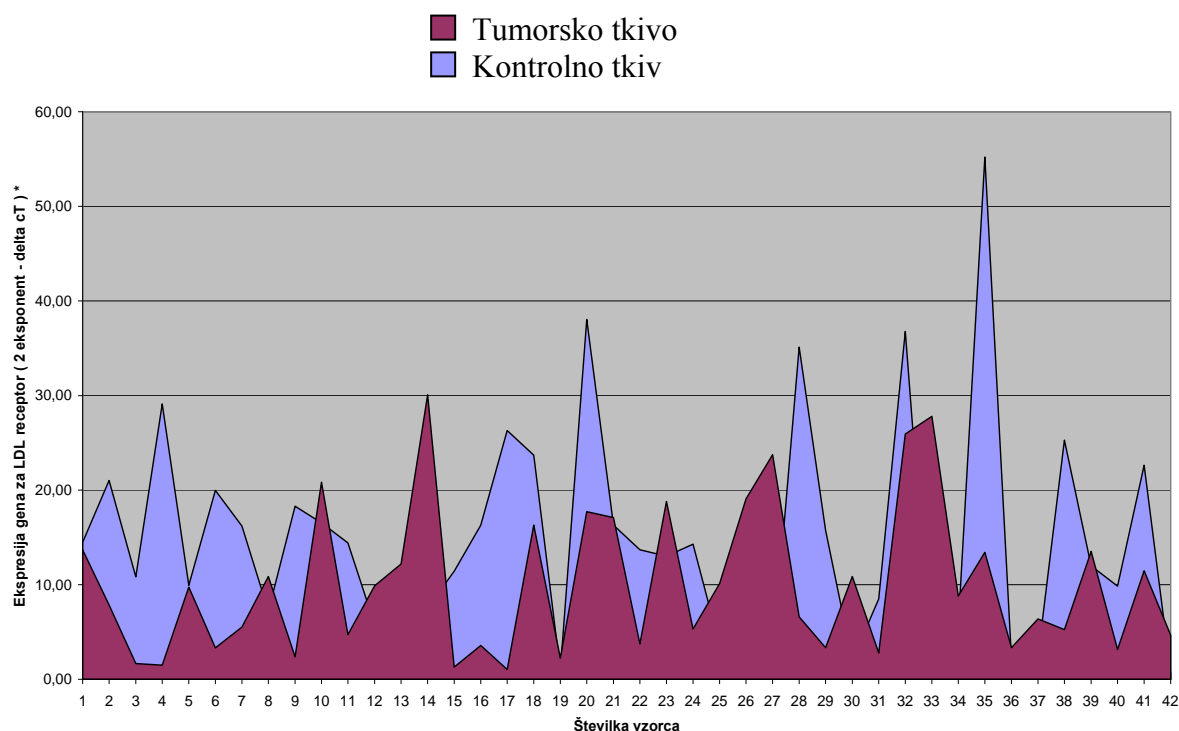
interkvartilno območje {25 % in 75 %} (razpon) ali število osebe

^a V skladu s klasifikacijo TNM

Med 4-letnim spremljanjem je en bolnik umrl zaradi drugega vzroka in je bil zato izključen iz statistične analize. Izhodiščne klinične značilnosti preostalih 41 bolnikov so povzete v preglednici številka 3. Moških je bilo 73,8 %, kar nam pove, da je bil spol neenakomerno porazdeljen. Povprečna starost je bila 62,5 let. Večina oseb je bila kadilcev (37 primerov) in nekdanjih kadilcev z dolgo kadilsko zgodovino.

Vizualno primerjavo nivoja izražanja gena za LDL receptor podaja slika 3. Iz slike 3 je razvidno, da je bil nivo izražanja gena za LDL receptor v zdravih (kontrolnih) tkivih višji kot pa v rakavih tkivih. Statistična analiza rezultatov je pokazala, da je bila mediana kontrolnih vzorcev 13,03, medtem ko je bila mediana rakavih vzorcev 8,75. Izražanje gena za LDL receptor je bila v kontrolnih vzorcih višja za 1,48-krat od rakavih vzorcev. Mann-Whitneyev test je pokazal, da je razlika statistično mejno značilna ($p = 0,0512$). Spearmanov test korelacije je pokazal, da izražanje gena za LDL receptor v rakavih vzorcih ne korelira z izražanjem gena za LDL receptorja v kontrolnih vzorcih ($p > 0,10$). S Spearmanovim testom korelacije smo ugotovili, da izražanje gena za LDL receptor ne korelira s stadijem bolezni (I.–III.) ($p > 0,10$). Še natančnejša statistična analiza s Spearmanovim testom korelacije, je pokazala, da je bilo izražanje gena za LDL receptor v kontrolnih vzorcih manjša v II. stadiju kot v I. stadiju. Med II. in III. stadijem bolezni ter

med I. in III. stadijem ni razlike. To pomeni, da stadij raka ne korelira z izražanjem gena za LDL receptor ($p > 0,10$). Med histološkimi tipi sta prevladovala rak s skvamoznimi celicami (19 primerov) in adenokarcinom (13 primerov). Njuno relativno zadostno število je omogočilo primerjavo izražanja gena za LDL receptor z Mann-Whitneyevim testom med obema histološkima tipoma raka in ugotovili smo, da ni bilo razlike med histološkimi tipi v izražanju gena za LDL receptor.



* ($2^{\text{eksponent} - \text{delta cT}} = 2^{-\Delta cT}$)

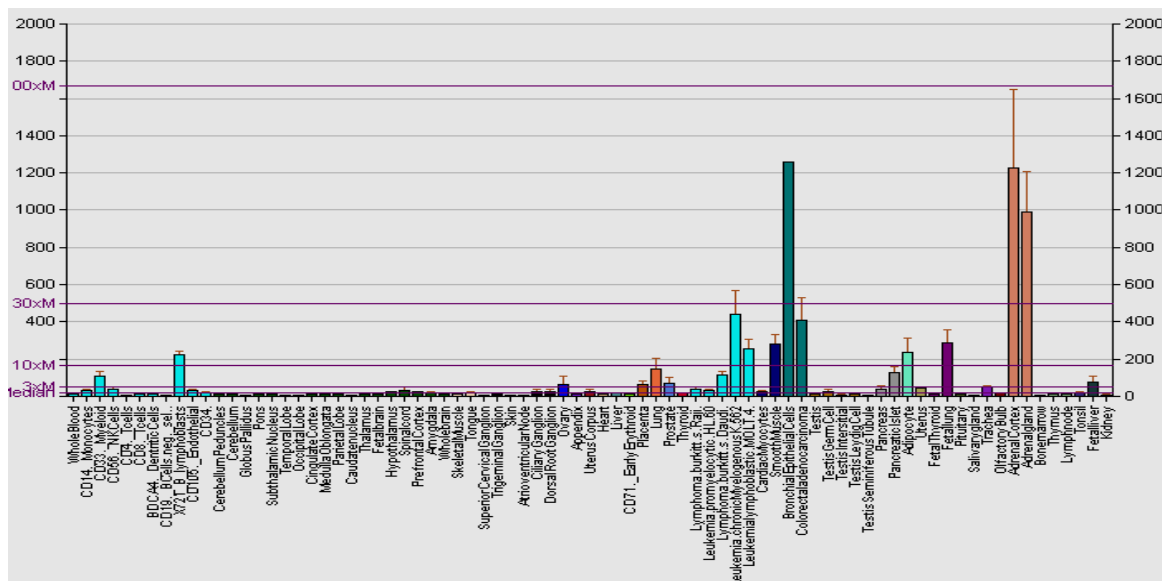
Slika 3: Izražanje gena za LDL receptor v kontrolnem in rakavem tkivu.

V 4 letih opazovanja je zaradi napredovanja bolezni umrlo 21 bolnikov. Primerjali smo izražanje gena za LDL receptor med preživelimi in umrlimi ter ugotovili, da ni razlike v izražanju tega gena. Dodatno smo analizirali povezavo s preživetjem s Coxovo-regresijsko analizo za ugotovitev, kateri parametri napovedujejo preživetje bolnika po operaciji in ugotovili smo, da v nobenem primeru ni razlike v izražanju gena za LDL receptor med umrlimi in preživelimi (4 leta po operaciji). Izražanje gena za LDL receptor torej ne korelira s 4-letnim preživetjem ($p > 0,20$). Prav tako izražanje gena za LDL receptor v rakavih in kontrolnih vzorcih ne korelira z leti, spolom, kadilskim statusom, leti kajenja, indeksom telesne mase in izgubo telesne teže. Izražanje gena za LDL receptor smo primerjali še z drugimi rezultati, ki so bili v naših tkivih izmerjeni v predhodnih

raziskavah. Spearmanov test korelacije je pokazal, da v rakavih vzorcih izražanje gena za LDL receptor korelira z aktivnostjo LPL ($r = -0,3109$; $p = 0,0479$) in z izražanjem gena za FAS ($r = 0,4848$; $p = 0,0013$). V kontrolnih vzorcih je Spearmanov test korelacije pokazal, da izražanje gena za LDL receptor korelira z izražanjem gena za Apo E ($r = 0,3681$; $p = 0,0179$), z izražanjem gena za SRA-1 ($r = 0,6461$; $p < 0,0001$) in z izražanjem gena za FAS ($r = 0,6647$; $p < 0,0001$). Zelo močna korelacija je z izražanjem gena za FAS. Če je potreba po lipidih, je povečana sinteza znotrajceličnega holesterola in povečano pridobivanje iz krvi.

8 RAZPRAVA

Naše študije kažejo, da je pri bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakavim tkivom izražanje gena za LDL receptor višja v kontrolnem tkivu kot pa v rakavem tkivu. Naši rezultati so v nasprotju z današnjim prepričanjem, da je povišano izražanje gena za LDL receptor v rakavih tkivih zaradi okvarjene negativne povratne zanke pri rakavih celicah. Pregled literature o povezavi LDL receptorja z rakom je pokazal, da zvišano izražanje gena za LDL receptor najdemo v različnih rakavih celičnih linijah, in sicer v pljučnem raku, biopsijskih rakavih vzorcih in levkemičnih celicah, pri katerih je negativna povratna zanka uničena. V študijo o kolorektalnem raku je bilo vključenih 32 preiskovancev, med katerimi je bil v 12 primerih prisoten LDL receptor, zvišana ekspresija gena za LDL receptor pa v 17 primerih. Gen za LDL receptor je bil znatno zvišan, kjer ni bil prisoten LDL receptor, kar verjetno izraža veliko potrebo po tem proteinu. Različno izražanje gena za LDL receptor kaže na to, da velik del raka ima receptor ali vsaj močno potrebo (približno 50 %) po njegovi sintezi (16). Analize ekspresije ciklooksigenaza-2 (COX-2) so pokazale povišane vrednosti v 90 % pri črevesnem raku in 40 % adenomov črevesja. Prostaglandin E je pomemben produkt COX, ki vzpodbuja proliferacijo in rast celic. LDL receptor ima pomembno vlogo pri sintezi prostaglandinov E. Zaviralci COX, kot so aspirin in drugi nesteroidi, imajo preventivne učinke na razvoj raka. LDL receptor ima pomembno vlogo pri regulaciji zvišane aktivnosti COX-2 v tumorjih, zaradi tega sta izražanje gena za LDL receptor in izražanje aktivnosti COX-2 istočasno zvišana. LDL receptor poveča dotok arahidonske kisline, COX-2 iz arahidonske kisline pa povečajo sintezo prostaglandinov E2 (PGE2). Povečana sinteza PGE2 vpliva na rast in diferenciacijo celic, kar podpira rast in razvoj tumorja (23). Iz slike številka 4, je razvidno povišano izražanje gena za LDL receptor v različnih tkivih in še posebej precej povišano izražanje v različnih rakavih tkivih (Burkijev limfom, levkemija, kolorektalni rak), kar kaže na tumorogeno vlogo LDL receptorja (27). Naslednja raziskava govori o medsebojnem presnovnem vplivu normalnih in rakavih celic preko delovanja LDL receptorja, ki posledično spreminja koncentracijo holesterola. Prinos holesterola v Ehrlic-ascites tumorske celice (EAT celice) je zmanjšan do 35 %, medtem ko je v ledvičnih celicah (Ptk2 celice) sinteza holesterola inhibirana ob prisotnosti HMG-CoA reduktaze. Blokada delovanja LDL receptorja s protismiselno tehnologijo (antisense technology) povzroča zmanjšan vstop holesterola v EAT celice in zmanjša celično proliferacijo.



Slika 4: Izražanje gena za LDL receptor v različnih tkivih in celicah.

Če pa ni prisotna blokada delovanja LDL receptorja v EAT celicah, lahko pričakujemo ravno obratno, in sicer povečano koncentracijo holesterola in zvišano proliferacijo EAT celic. Zaradi okvarjene negativne povratne zanke v tumorskih celicah pa lahko pričakujemo zvišano izražanje gena za LDL receptor v EAT celicah (17). Raziskava o indukciji izražanja gena za LDL receptor z genisteinom v celični liniji raka črevesja nakazuje, da genistein povzroči začetno začasno zvišano izražanje gena za LDL receptor in poznejšo nižano trajnešo izražanje gena za HMG-CoA reduktaze. Sklepamo lahko, da ima genistein zaščitno vlogo na regulacijo LDL receptorja in gensko izražanje HMG-CoA zaradi zaščitnega izražanja gena za LDL receptor (20). Nekatere literature navajajo podatke, ki kažejo, da povezava med zvišanim izražanjem gena in razvojem raka ni tako trdna. Študija o proliferaciji raka prostate inducirane z lipoproteinskimi ostanki (RLP) preko LDL receptorja kaže na to, da v PC 3 celični liniji raka prostate LDL zmanjšuje izražanje gena za LDL receptor, medtem ko v LNCaP celični liniji raka prostate ne zmanjšuje izražanje gena za LDL receptor. S tem, ko v eni celični liniji zmanjšuje izražanje gena za LDL receptor, v drugi celični liniji pa ne zmanjšuje izražanje gena, opazimo različno obnašanje LDL receptorja v različnih celičnih linijah (18). Nekatera literatura pa odkriva, da ima LDL receptor različno vlogo. Odkritja v članku kažejo, da T-kadherin služi kot signalizacija za LDL receptor in daje signal, odvisen od LDL.

Povišano izražanje T-kadherina preko vezave LDL sproži signalne poti, ki vodijo do pospešene celične proliferacije. Ti podatki nakazujejo, da ima razen vloge pri z receptorjem posredovano endocitozi še ostale naloge, kot je posrednik signalov (21). Rezultati preiskave o vplivu višje maščobnih kislin (PUFA) na izražanje gena za LDL receptor v človeških fibroblastih nakazujejo, da arahidonska kislina, eikosapentanojska kislina (EPA) in omega-3 maščobne kisline (DHA) zvišajo izražanje gena za LDL receptorja. Acil-koencimA: holesterol aciltransferaza (ACAT) vpliva na zmanjšan učinek arahidonske kisline na LDL receptor. Učinek maščobnih kislin je neodvisen od kakršnekoli spremembe v proteinu SREBP1. Sklepamo lahko, da zraven SREBP1c in SREBP2 količino LDL receptorja uravnavajo še drugi dejavniki, kot so PUFA, EPA, DHA in ACAT (19). V naši raziskavi pa ni nobene povezave z izražanjem gena za LDL receptor s stopnjo bolezni (ne s I., ne z II. in ne s III. stopnjo). Prav tako ne korelira s spolom, starostjo in ne s serumsko koncentracijo lipidov. Ne korelira s hujšanjem, kot kazalcem napredovanja bolezni. Ne korelira z dejavniki tveganja, ki vplivajo na razvoj raka, kot sta kajenje in število let kajenja. Izražanje gena za LDL receptor nima niti prognostičnega pomena, ker ne napoveduje preživetje, niti ni razlike med umrlimi in preživelimi štiri leta po operaciji. Izražanje gena za LDL receptor pa močno korelira z izražanjem gena za FAS (v kontrolnem tkivu $p < 0,0001$; v tumorskem tkivu $p = 0,0013$). Aktivnost FAS je poleg drugih regulatorjev uravnavana še preko proteina SREBP1-c. Koncentracija znotrajceličnega holesterola je regulirana preko proteina, ki je iz iste družine, kot je SREBP1c, in sicer SREBP2 ter SREBP1a. SREBP1c je sicer bolj zvišan pri sintezi višje maščobnih kislin, FAS pa je ključni encim pri tej sintezi maščobnih kislin. To lahko pojasni istočasno zvišano ekspresijo gena za LDL receptor in FAS. Če je znotraj celice zvečana potreba po energiji in lipidnih gradnikih, je razumljiva sočasna aktivacija vseh mehanizmov, ki lahko potrebe zadostijo, še posebej, če jih uravnavajo podobni regulatorni mehanizmi.

9 SKLEP

V tej diplomski nalogi smo se naprej seznanili s splošnimi dejstvi o pljučnem raku, kar se tiče epidemiologije, etiologije, klasifikacije in dejavnikov tveganja, in o njegovem mehanizmu preskrbe z lipidi za rast in razvoj pljučnega rakavega tkiva. V nadaljevanju smo se poglobili v zgradbo in vlogo LDL receptorja za lažje razumevanje njegove vloge pri endocitozi ter njegovega genskega izražanja. Z opravljenim delom, opisanem v tej diplomski nalogi, smo se seznanili s samim potekom izolacije mRNA, prepisom RNA v cDNA in izmerili izražanje gena za LDL receptor s kvantitativnim PCRjem, ki je metoda verižne polimerizacije. Dobljene rezultate smo statistično obdelali in testirali podano hipotezo. Za analizo in primerjavo smo vzeli rakavo pljučno tkivo in zdravo (kontrolno) pljučno tkivo istega bolnika. Po opravljeni analizi in obdelavi podatkov smo prišli do rezultatov, in sicer se je izkazalo povišano izražanje gena za LDL receptor v kontrolnih vzorcih oziroma v zdravem (kontrolnem) tkivu, kar je v nasprotju z našimi pričakovanji in podano hipotezo. Rezultati naše raziskave nakazujejo, da izražanje gena za LDL receptor v zdravem (kontrolnem) v pljučnem tkivu nima pomembnega vpliva na preskrbo rakavega tkiva z lipidi, kar bi omogočilo razvoj pljučne rakave bolezni. S tem smo tudi ovrgli podano hipotezo, da je izražanje gena za LDL receptor v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu višja kot v zdravem (kontrolnem) pljučnem tkivu. Nima niti nobene povezave s stadijem, niti z napredovanjem pljučne rakave bolezni. Prav tako nima nobene povezave s preživetjem bolnika. LDL receptor, kot eksogeni mehanizem, torej ni tako pomemben pri pridobivanju lipidov v celice za rast in razvoj rakavih celic.

10 LITERATURA

1. Andriani F., Conte D., Mastrangelo T. e tal. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *International Journal of Cancer* 2004; 108: 9–96.
2. Terčelj M. Zgodnje odkrivanje raka. Center za pljučne bolezni in alergije, interne klinike, Klinični center Ljubljana. *Radiol. Onkol.* 2006; 40: S59–S66.
3. Luzar B., Poljak M., Glavač D., Balažič J. Molekularna diagnostika v medicini; zbornik predavanj 2005; 167–176.
4. http://www.medicinenet.com/lung_cancer/page3.htm
5. Kuhajda FP. Fatty acid Synthase and Cancer: New application of an old pathway. *Cancer Research* 2006; 66: 5977–5980.
6. Osborne TF. Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBPs): Key Regulators of Nutritional Homeostasis and Insulin Action. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 32379–32382.
7. Menendez A. Targeting Fatty Acid Synthase: Potential for Therapeutic Intervention in Her-2/*neu*- Overexpressing Breast Cancer. *Drug news perspect* 2005; 18: 375–85.
8. Kuhajda FP. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *PNAS* 2000; 97: 3450–3454.
9. Preiss-Landl K. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Current opinion in Lipidology* 2002; 13: 471–481.
10. Heintel D. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1216–1223.
11. Černe D. Lipoprotein lipase activity and gene expression in lung cancer and in adjacent noncancer lung tissue. *Experimental lung research* 2007; 33: 217–225.
12. Trost Z. Increased Apolipoprotein E Gene Expression and Protein Concentration in Lung Cancer Tissue Do Not Contribute to the Clinical Assesment of Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Archives of Medical Research* 2008; 39: 663–667.
13. Suzuki K. Serum Oxidized Low-Density Lipoprotein Levels and Risk of Colorectal Cancer: A Case-Control Study Nested in the Japan Collaborative Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1781–1787.
14. Delimaris I. Oxidized LDL, serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer. *Clinical Biochemistry* 2007; 40: 1129–1134.

15. Plathow C. Tumor cell metabolism imaging. *Journ. of nuclear med.* 2008; 49: 43S–64S.
16. Caruso MG., Notarnicola M., Cavallini A., Di Leo A. Low density lipoprotein receptor and mRNA expression in human colorectal cancer. *Anticancer res.* 2001; 21: 429–33.
17. Haeffner EW., Witmtmann U., Kiesewetter et al. Effect of reduced levels of the LDL receptor of Ehrlich ascites tumor cells on cholesterol uptake and cell proliferation a coculture study with baby hamster kidney cells. *Cell biol int.* 2007; 31:790–7.
18. Sekine Y., Koike H., Nakano T. et al. Remnant lipoproteins induce proliferation of human prostate cancer cell, PC-3 but not LNCaP, via low density lipoprotein receptor. *Cancer Epidemiol.* 2009; 33: 16–23.
19. Yu-Poth S., Yin D., Kris-Etheron PM., Zhao G., Etheron TD. Long-chain fatty acid polyunsaturated upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 cells. *J. Nutr.* 2005; 135: 2541–2545.
20. Caruso MG., Messa C., Orlando A. et al. Early induction of LDL receptor gene expression by genistein in DLD-1 colon cancer cell line. *Fitoterapia* 2008; 79: 524– 8.
21. Kipmen-Korgun D., Osibow K., Zotatti C. et al. T-cadherin mediates low-density lipoprotein -initiated cell proliferation via the CA²⁺-tyrosine kinaseErk1/2 pathway. *J. cardiovasc pharmacol.* 2005; 45: 418–30.
22. Debeljak A., Triller N., Kecejli P. in ostali. Smernice za internistično obravnavo bolnika s pljučnim rakom (Uradno stališče Združenja pulmologov Slovenije, letna konferenca, december, 2001)
23. Lum F., D, McQuaid R. K., Gilbertson L. V. in ostali. Coordinate up-regulation of low-density lipoprotein receptor and cyclo-oxygenase-2 gene expression in human colorectal cells and in colorectal adenocarcinoma biopsies. *Int. J. Cancer* 1999; 83: 162–166.
24. Chan D. W., Ronald A. B., Eleftherios P. D. Tumor markers. *Tietz textbook of Clinical Chemistry andMolecular Diagnostics*, Elsevier Saunder 2006; 745–786.
25. Ilievska P., Spirovski M., Trajkov D. Neuron specific enolase - selective marker for small - cell lung cancer. *Radiology and oncology* 2004; 38: 21–26.
26. Trost Z., Sok M., Marc J., Černe D. Increased lipoprotein lipase activity in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter patient survival. *Archives of medical research* 2009; 40: 364–368.
27. http://en.wikipedia.org/wiki/LDL_receptor. File:PBB GE LDLR 202068 s at tn.png.

28. Chen Y., Hughes-Fulford M. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of Low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int. J. Cancer*: 2001;91: 41–45.
29. Boyer R. Temelji biokemije. *Študentska založba* 2008; 515–516.
30. Yang G., Addai J., Tian W. et al. Reduced infiltration of class a scavenger receptor Positive antigen presenting cells is associated with prostate cancer progression. *Cancer Research*: 2004; 64: 2076–2082.
31. Debeljak A. Zgodnja diagnostika začetnih oblik pljučnega raka. *Zdravstveni vetsnik* 2005; 74: 717–20.