

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA VEBER

**VPLIV POLIMORFIZMA c.2846A>G V GENU *MSH3*
NA TVEGANJE ZA RAZVOJ RAKA NA
POŽIRALNIKU V JUŽNOAFRIŠKI POPULACIJI**

**POLYMORPHISM c.2846A>G IN *MSH3* GENE AND
RISK FOR OESOPHAGEAL CANCER IN A SOUTH
AFRICAN POPULATION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na inštitutu ICGEB (Mednarodni center za genetski inženiring in biotehnologijo) v Cape Town-u pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Radovana Komela, univ. dipl. kem. ter delovnim mentorstvom dr. Matjaža Vogelsanga.

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem dr. Matjažu Vogelsangu za povabilo k njegovemu projektu na ICGEB in razpisu teme diplomske naloge. Zahvaljujem se mu za vso pomoč pri izvajanju in izdelavi naloge, za znanje, ki mi ga je nesebično predal ter za iskreno prijateljstvo.

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Štruklju in prof. dr. Radovanu Komelu, da sta podprla sodelovanje pri diplomski nalogi. Iskrena hvala za vso prijaznost in pomoč, ki sta mi jo nudila tekom izdelave naloge.

Prof. dr. Iqbalu Parkerju se zahvaljujem, da mi je omogočil in dovolil delo v laboratoriju na inštitutu ICGEB. Najlepša hvala za vso podporo, razumevanje in prijaznost.

Zahvaljujem se Roche farmacevtski družbi d.o.o. in Javnemu skladu Republike Slovenije za razvoj kadrov in štipendije, ki sta mi s finančno pomočjo omogočila bivanje v Cape Townu.

Članicama komisije prof. dr. Janji Marc in doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar se zahvaljujem za kritičen pregled in vse konstruktivne pripombe.

Zahvala gre tudi vsem sodelavcem z inštituta ICGEB, za odlično vzdušje, prijaznost, pomoč in podporo. Še posebej se tukaj zahvaljujem Julianu Paccezu, Yabing Wangu, Lamequ Mwapaghi, Siti Kabanda in Vuyolwethu Siyo.

Velika zahvala gre tudi družini, prijateljem in Boštjanu za vso podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Radovana Komela, univ. dipl. kem.

Nika Weber

Ljubljana, julij 2012

VSEBINA

VSEBINA	3
POVZETEK	5
ABSTRACT	6
SEZNAM OKRAJŠAV	7
1. UVOD	8
1.1 Rak požiralnika	8
1.1 Dejavniki tveganja za nastanek raka požiralnika	10
1.1.2 Epidemiologija raka požiralnika v podsaharski Afriki	11
1.1.3 Znaki in simptomi	11
1.1.4 Diagnostika	12
1.1.5 Zdravljenje	13
1.2 Popravljanje neujemanja DNK (MMR)	15
1.2.1 MMR in kancerogeneza	18
1.3 Gen MSH3	19
2. NAMEN DELA	22
2.1 Hipoteze:	22
3. METODE	23
3.1 Opis populacije	23
3.2 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)	24
3.2.1 Alelno-specifična genotipizacija	25
3.3 Analiza produktov qPCR z elektroforezo v agaroznem gelu	35
3.4 Analiza in silico	36
3.5 Statistična analiza rezultatov	38
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	39
4.1 Opis populacije	39
4.2 Rezultati genotipizacije	44
4.2.1 Optimizacija genotipizacije polimorfizma rs184967	44
4.2.2 Optimizacija genotipizacije polimorfizma rs1650697	45
4.2.3 Povezanost polimorfizma rs184967 s tveganjem za razvoj raka požiralnika	46
4.3 Povezava med genotipi in vplivi okolja na tveganje za pojav raka požiralnika	48

4.3.1 Povezava med genotipi in kajenjem.....	48
4.3.2 Povezava genotipov in uživanja alkohola	49
4.3.3 Povezava med genotipom in rakom v družini.....	50
4.4 Analiza in silico.....	52
4.5 Izražanje mRNK	54
4.5.1 Optimizacija ekspresije	54
4.5.2 Ugotavljanje učinkovitosti pomnoževanja DNK pri qPCR.....	56
4.5.3 Vpliv genotipa na izražanje mRNK <i>MSH3</i>	60
4.5.4 Primerjava izražanja mRNK v tumorskem in zdravem tkivu bolnikov	61
5 ZAKLJUČEK.....	63
6 VIRI IN LITERATURA	64

POVZETEK

Rak požiralnika je bolezen, ki se endemično pojavlja v določenih predelih sveta. Vzroki nastanka bolezni niso popolnoma razjasnjeni, znano pa je, da na nastanek bolezni vpliva medsebojno delovanje genetskih dejavnikov in dejavnikov okolja. Pri spremembi normalne v rakovo celico imajo veliko vlogo popravljalni mehanizmi v celici, ki odkrivajo in popravljajo napake, ki nastanejo v DNK. Med te mehanizme sodi tudi sistem odpravljanja napak MMR. Sistem MMR sestavlja več različnih genov, med njimi tudi gen *MSH3*.

V okviru diplomske naloge smo želeli proučiti povezanost polimorfizmov rs184967 in rs1650697 v genu *MSH3* z razvojem raka na požiralniku pri dveh južnoafriških populacijah. V preiskavo smo vključili 1361 preiskovancev, od tega je bilo 694 bolnikov, 667 zdravih posameznikov, pa nam je služilo kot kontrolna skupina. Ugotovili smo, da polimorfizem rs184967 spremeni tveganje za nastanek raka požiralnika v temnopolti populaciji pri kadilcih in pri osebah, ki so imele katerokoli vrsto raka v družini, v populaciji mešanih prednikov pa pri osebah, ki uživajo alkohol. Pri polimorfizmu rs1650697 metode qPCR žal nismo uspeli optimizirati do te mere, da bi bila primerna za nadaljnje analize, zato genotipizacije nismo izvedli. Nadalje smo želeli z analizo *in silico* predvideti, ali polimorfizmi rs184967, rs1650697 in rs26279 gena *MSH3*, ki kodirajo aminokislinske spremembe v proteinu Msh3, vplivajo na funkcijo proteina. Rezultati *in silico* analize so predpostavljali, da aminokislinske spremembe nimajo nobenega vpliva na funkcijo proteina. Proučili smo ali polimorfizem vpliva na izražanje mRNA gena *MSH3* in ugotovili, da noben genotip polimorfizma rs184967 ne vpliva na izražanje mRNK gena *MSH3*. Preverili smo tudi morebitno razliko v izražanju mRNK gena *MSH3* v normalnih in tumorskih tkivih pacientov in ugotovili, da ni nobene razlike v izražanju. Izkazalo pa se je, da je izražanje mRNK *DHFR* više v tumorskem tkivu kot v normalnem.

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da je polimorfizem rs184967 v genu *MSH3* povezan s spremenjeno dovetnostjo za raka na požiralniku, in sicer preko spremicanja vpliva okoljskih dejavnikov, kot sta kajenje in uživanje alkohola, na organizem.

ABSTRACT

Oesophageal cancer is a disease that endemically occurs in specific parts of the world. The causes of the disease are not entirely clear. However; we know that the disease is caused by interaction between genetic and environmental factors. The change from a normal to a malignant cell is strongly influenced by repair mechanisms in a cell which detect and repair the errors appearing in DNA. One of these mechanisms is the mismatch repair (MMR) system. The MMR system is composed of various genes, among which is also the *MSH3*.

In this diploma thesis we wanted to study the influence of the polymorphism rs184967 and rs1650697 in the *MSH3* gene on the development of oesophageal cancer in two ethnic groups of the South African population. The research included 1361 individuals; 694 cancer cases and 667 controls. The qPCR method was used to define the genotypes of the study cases. We notice that the polymorphism rs184967 changes the risk of developing oesophageal cancer among smoking Black Ancestry individuals and among individuals with family history of cancer. In the Mixed Ancestry ethnic group the risk of developing oesophageal cancer is increased among those individuals that consume alcohol. Concerning the rs1650697 polymorphism the qPCR method could not be optimised in order to be suitable for further analysis. Then an *in silico* analysis was used to find out whether the polymorphisms rs184967, rs1650697 and rs26279 in the *MSH3* gene affects the function of a protein Msh3. The results showed there is no effect of the polymorphism on the protein's function. We wanted to find out whether polymorphism affects the expression of mRNA *MSH3* gene and according to the results no genotype of the rs184967 polymorphism effects the expression of mRNA *MSH3* gene. We also wanted to see if there were any possible modification in the expression of mRNA *DHFR* in patients' normal and cancer tissue and we did not observe any differences in its expression. However, the expression level of mRNA *DHFR* was higher in cancer tissue than in normal tissue samples.

On the basis of the obtained results it can be concluded that rs184967 polymorphism in *MSH3* gene is associated with the altered susceptibility to oesophageal cancer in the event of exposure to environmental factors such as smoking and alcohol consumption.

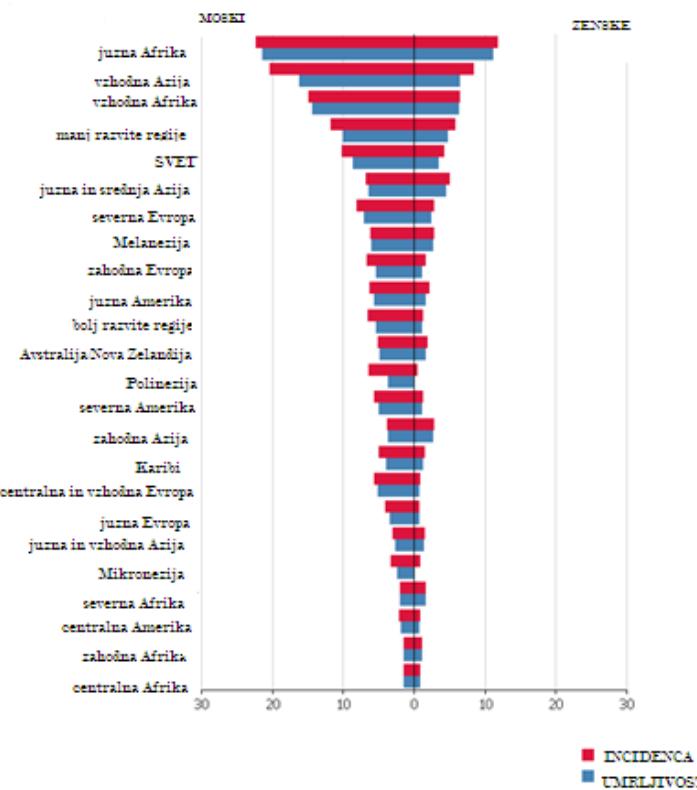
SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
bp	bazni par
cDNK	komplementarna DNK, pripravljena iz matrične informacijske RNK z encimom reverzna transkriptaza
Cp	cikel, kjer je presežena linija fluorescenčnega praga (<i>angl. crossing point</i>)
CT	računalniška tomografija
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EUZ	endoskopski ultrazvok
GERB	gastroezofagelana refluksna bolezen
ID-zanke	zanke, ki nastanejo na DNK molekuli zaradi vstavitev in delecij
MMR	sistem popravljanja neujemanja DNK (<i>angl. Mismatch Repair</i>)
mRNK	informacijska RNK
MSI	nestabilnost mikrosatelitskih zaporedij DNK (<i>angl. Microsatellite Instability</i>)
PCNA	jedrni antigen proliferirajočih celic (<i>angl. Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. Polymerase Chain Reaction</i>)
PET CT	pozitronska emisijska tomografija in računalniška tomografija
RFC	replikacijski faktor C (<i>angl. Replication Factor C</i>)
RNK	ribonukleinska kislina
TBE	pufer tris/borat/EDTA
TNM	mednarodna klasifikacija rakavih obolenj (<i>angl. Tumor Node Metastases</i>)

1. UVOD

1.1 Rak požiralnika

Rak požiralnika je bolezen, ki se pojavlja v poznejših obdobjih življenja, večinoma v šestem in sedmem desetletju življenja. Za to obliko raka pogosteje zbolevajo moški, in sicer tudi do 6-krat pogosteje kot ženske [1]. Po podatkih GLOBOCAN-a 2008 [2] se bolezen uvršča na osmo mesto glede na pogostost pojavljanja. Zanimivo je, da se endemično pojavlja v določenih delih sveta, in sicer v južni Afriki, vzhodni Aziji in vzhodni Afriki. Število obolelih v manj razvitih predelih je bistveno višje kot v bolj razvitih predelih (Slika 1). Podatki iz Registra raka za Slovenijo kažejo, da je bila incidenčna stopnja raka požiralnika v letih 2004-2008 pri moških 7,2 bolnika na 100.000 prebivalcev, pri ženskah pa je bila incidenca 1,4 bolnic na 100.000 prebivalcev. Ocene za leto 2011 napovedujejo rahlo znižanje incidenčne stopnje pojavnosti raka požiralnika, in sicer naj bi ta znašala pri moških 7, pri ženskah pa 1 [3].



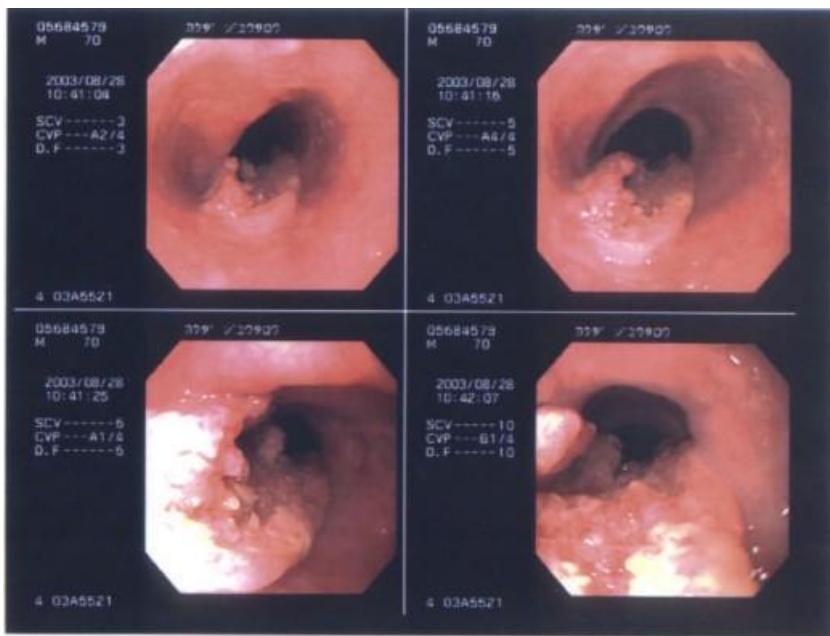
Slika 1: Incidenca in smrtnost raka požiralnika glede na regije [2]

Poznamo različne histopatološke oblike raka požiralnika, kot so ploščatocelični rak, adenokarcinom, drobnocelični rak in melanom. Najpogosteji obliki sta adenokarcinom in ploščatocelični rak. Pri belcih v razvitem svetu se pogosteje pojavlja adenokarcinom, medtem ko se ploščatocelični rak pojavlja pogosteje v manj razvitih območjih [1]. Adenokarcinom se pojavlja najpogosteje v spodnji tretjini požiralnika, in sicer v žleznih celicah. Ploščatocelični rak se za razliko od adenokarcinoma pojavlja v srednjem delu požiralnika, in sicer v ploščatih, ravnih celicah, ki ležijo na površini požiralnika. Žal večino primerov odkrijejo v napredovalem stadiju, zato petletno relativno preživetje bolnikov spada med manjše; po podatkih Registra raka Slovenije je bilo relativno petletno preživetje za moške v obdobju 2004-2008 10,9%, za ženske pa 19,6% [1, 3].

Razvoj bolezni poteka v več stadijih (Preglednica I). Stadije opisujemo s TNM klasifikacijo (*angl. 'Tumor Node Metastasis'*), ki je mednarodna klasifikacija rakavih obolenj, pri čemer opisuje črka T globino infiltracije tumorja (T=0 pomeni, da tumor ni prisoten, z večanjem tumorja se povečuje tudi številka; T=4 pomeni, da tumor vrašča v sosednje organe), N nam pove prizadetost regionalnih bezgavk, pri čemer vrednost 0 pomeni, da regionalne bezgavke niso prizadete, M pa pove prisotnost oddaljenih metastaz, pri čemer 0 pomeni, da metastaz ni, 1 pa pomeni, da metastaze so [4,5].

Preglednica I: Opis stadijev raka požiralnika s TNM klasifikacijo [4]

Stadij	Globina infiltracije tumorja	Prizadetost regionalnih bezgavk	Prisotnost oddaljenih metastaz
S 0	T0	N0	M0
S I	T1	N0	M0
S IIA	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
S IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
S III	T3	N1	M0
	T4	vsak N	M0
S IV	vsak T	vsak N	M1



Slika 2: Razvoj raka požiralnika [20]. Na slikah je prikazana različna stopnja razraščenosti tumorja v požiralniku.

1.1 Dejavniki tveganja za nastanek raka požiralnika

Dejavniki tveganja za pojav bolezni se razlikujejo v odvisnosti od vrste raka. V porastu sta epiteljski oblici raka, in sicer je pojavnost adenokarcinoma prehitela ploščatocelično obliko raka. Možen vzrok naraščajoče obolenosti za adenokarcinomom je domnevno povišana incidenca pojavljanja gastroezofagealne refluksne bolezni (GERB). Neepiteljske oblike raka (sarkomi, limfomi) niso v porastu in so tudi na splošno zelo redke [8,9].

Dejavniki tveganja za nastanek adenokarcinoma so:

- GERB,
- debelost,
- Barrettov požiralnik (ploščatocelični epitelij se nadomešča s cilindričnim epitelijem, ki je značilen za želodec ali črevo),
- hiatalna hernija (premik gastroezofagelanega sfinktra navzgor v prsnici koš),
- svetlopolta etnična skupina

Dejavniki tveganja za nastanek ploščatocelične oblike raka so:

- ahalazija požiralnika (nesposobnost sprostitve gastroezofagelanega sfinktra),
- uživanje alkohola,
- dieta z visokim vnosom škroba in ne uživanje sadja in zelenjave,

- Plummer-Vinsonov sindrom (triada simptomov: težka anemija zaradi pomanjkanja železa, oteženo požiranje, atrofične spremembe na ustni in žrelni sluznici, sluznici jezika in požiralnika)
- kajenje
- predhodna obolenost za ploščatoceličnim rakom vratu in glave,
- radioterapija in lokalne fizične travme,
- temnopolta etnična skupina,
- okužba s HPV (humani papilomski virus).

Pri obeh oblikah raka je obolenost višja pri moškem spolu. [8,9]

1.1.2 Epidemiologija raka požiralnika v podsaharski Afriki

V podsaharski Afriki je rak požiralnika peta najpogostejsa vrsta raka. Ne glede na sorazmerno pogosto pojavljanje pa se mu v raziskavah ne posveča veliko pozornosti, saj se finančna pomoč usmerja bolj v raziskave HIV-a in AIDS-a ter HPV, ki predstavljajo v tej regiji ogromen problem. Finančne težave pa se ne kažejo samo v raziskavah, ampak tudi v celotnem zdravstvenem sistemu, kjer zaradi pomanjkanja trpi sama diagnostika bolezni, dostopnost do dragih zdravil, vodenje evidenc in statistike ter podobno. Redka izjema je Republika Južna Afrika, ki je, poleg Mauritiusa, v letu 2002 edina oddala Svetovni zdravstveni organizaciji poročilo o številu smrtnih žrtev zaradi raka [6]. Republika Južna Afrika ima po podatkih GLOBOCAN 2008 registrirano najvišjo incidenco pojavljanja bolezni med državami podsaharske Afrike, in sicer 23,5 obolelih na 100.000 prebivalcev [2]. Dejavniki tveganja so enaki kot zgoraj našteti, pri tem pa se poudarja visoka stopnja revščine, ki pogojuje podhranjenost in kronično pitje alkohola. Nekatere študije pa nakazujejo tudi povišan pojav bolezni pri določenih etničnih skupinah, na kar naj bi vplival določen genetski dejavnik.

1.1.3 Znaki in simptomi

Najpogostejši prvi znak, ki ga bolnik z rakom na požiralniku opazi, je zatikanje pri požiranju. Sledijo lahko bolečine pri požiranju, hripavost, hujšanje, bolečina v prsnem košu, kašelj, utrujenost, nevralgija glosofaringeusa in povečane vratne ter podključnične

bezgavke. Prvi znaki se po navadi pojavijo tri do štiri mesece pred diagnozo bolezni. Bolezenski znaki pa so odvisni od lege in velikosti tumorja ter od načina njihovega razraščanja.

Pri napredovali obliki bolezni se lahko pojavijo hematemiza (bruhanje krvi), ki je posledica krvavitve prebavnega trakta med usti in spodnjim delom dvanajstnika, hemoptiza (krvavi kašelj), melena (odvajanje mazavega črnega blata), ki je posledica krvavitve dela prebavil med usti in sredino debelega črevesa, kaheksija, kroničen kašelj, hripavost, lahna paraliza trebušne prepone, Hornerjev sindrom [1,8,9].

1.1.4 Diagnostika

Pred izbiro zdravljenja naj bi se izvedle vse spodaj naštete preiskave [7].

- Endoskopski pregled požiralnika, želodca in dvanajstnika (ezofagogastroduodenoskopija) s krtačenjem in biopsijo sumljivih sprememb na sluznici za histološko potrditev bolezni → biopsija s histološkim pregledom omogoča določitev tipa in stadij tumorja.
- Endoskopski ultrazvok (EUZ) požiralnika → določimo lego in dolžino tumorja, obliko rasti, stopnjo stenoze, od primarnega tumorja ločene lezije in druge spremembe na sluznici.
- Rentgensko slikanje požiralnika s kontrastom (ezofagogastrografija) → določimo lego in dolžino tumorja, stopnjo zožitve svetline požiralnika, spremembe osi in lego organa ter druge patološke spremembe na požiralniku in želodcu; preiskava je pomembna predvsem, kadar zaradi hudega zoženja požiralnika endoskopski pregled celotnega zgornjega prebavnega trakta ni možen.
- Računalniška tomografija (CT) prsnega koša → je šibkejša metoda kot EUZ za prikazovanje globine vraščanja tumorja v steno požiralnika, infiltracije v okolico in v regionalne bezgavke ; pokaže pa oddaljene spremembe in metastaze v vratu, prsnem košu in trebuhu; CT je pomemben zlasti v primerih, kadar EUZ ni možen zaradi hude stenoze požiralnika
- CT/ultrazvok trebuhu.
- Pozitronska emisijska tomografija in računalniška tomografija (PET CT) → preiskava iz dveh delov; PET je funkcionalna slikovna preiskava, pri kateri z

vbrizganimi radiofarmaki, označenimi s pozitronskimi sevalci zaznavamo proliferacijo, hipoksijo, perfuzijo tkiv; CT pa omogoča natančno lokalizacijo s PET vidnih procesov v telesu.

- Bronhoskopija.

1.1.5 Zdravljenje

Zdravljenje je lahko kirurško, sistemsko ali s pomočjo radioterapije. Običajno pa poteka kot kombinacija med naštetimi načini.

KIRURŠKO ZDRAVLJENJE

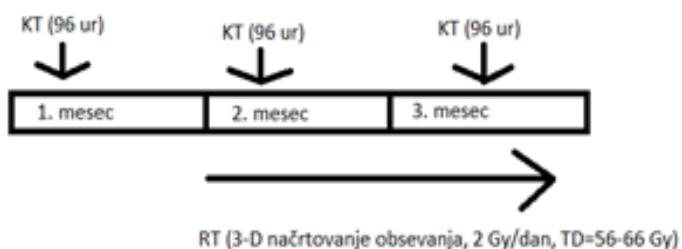
Pri večini bolnikov je ob odkritju raka požiralnika bolezen že tako napredovala, da operacija ni izvedljiva. Zadnja leta se vse bolj uveljavlja predoperativno zdravljenje, s katerim zmanjšamo tumor in povečamo možnost za popolno odstranitev tumorskega tkiva. Operacijo izvedemo v namen kurative ali paliative. Pri kurativni operaciji gre za radikalno operacijo tumorja z limfadenektomijo (kirurška odstranitev ene ali več bezgavk). V kolikor histološki pregled pokaže ostanke tumorja v resekcijskih robovih ali kadar zaradi tehničnih ovir ni možna makroskopska odstranitev celotnega tumorskega tkiva, govorimo o paliativni resekciji. O paliativni resekciji govorimo tudi takrat, kadar naredimo anastomozo, in sicer jo naredimo na požiralniku nad tumorjem z želodcem, kolonom ali jejunumom. Prav tako med paliativne resekcije štejemo rekanalizacijo z laserjem in peroralno intubacijo. Pri rekanalizaciji z laserjem začasno zmanjšamo disfagijo s pomočjo laserja, ki uniči tumor.

Pooperativno zdravljenje poteka pod popolnim nadzorom vitalnih funkcij, bolniki včasih potrebujejo mehanično ventilacijo, širokospektralne antibiotike ter parenteralno hidracijo in hranjenje [4,7].

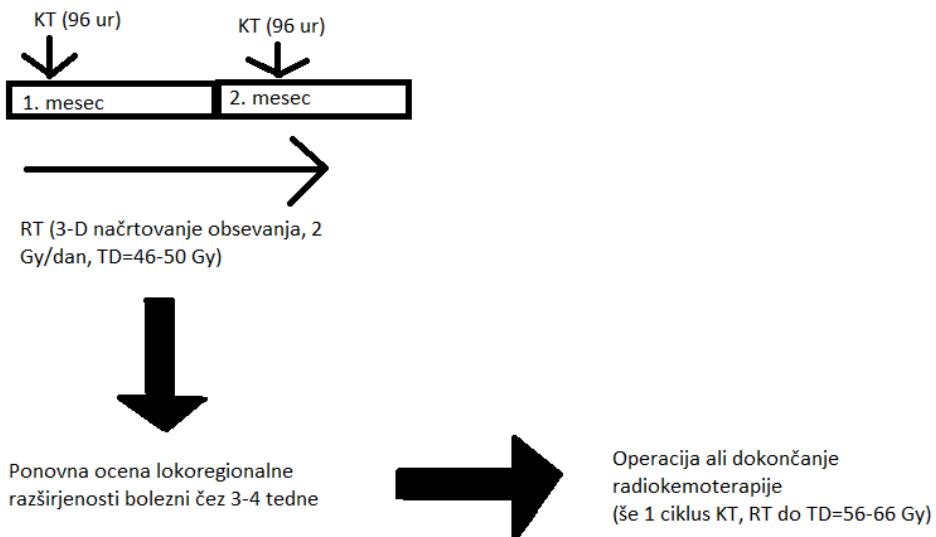
SISTEMSKO ZDRAVLJENJE

Sistemsko zdravljenje s kemoterapijo lahko poteka kot definitivna kemoterapija (zdravljenje poteka s kemoterapijo v kombinaciji z obsevanjem; Slika 3) ali v kombinaciji s kirurškim zdravljenjem kot oblika predoperativnega zdravljenja, kjer s kemoterapijo

želimo omejiti velikost tumorja ali ga celo zmanjšati preden se opravi kirurški poseg (Slika 4). Kemoterapija (KT) poteka v treh ciklih z razmikom 3-4 tedne v kombinaciji s cisplatinom (1. dan) in 5-fluorouracilom (1.-4. dan). Pričakujemo lahko več neugodnih stranskih učinkov in možnost posameznih smrtnih primerov. Sistemsko zdravljenje, ki ga uporabljamo za zmanjšanje in zajezitev tumorja ne smemo izvajati rutinsko pri vseh bolnikih z operativnim tumorjem, ampak ga moramo izvajati le v okviru kontroliranih kliničnih študij [4,7].



Slika 3: Definitivna radiokemoterapija. Slika prirejena po [7]. V prvem mesecu poteka kemoterapija s citostatiki, v drugem in tretjem pa se k zdravljenju doda še radioterapija.



Slika 4: Predoperativna radiokemoterapija. Slika prirejena po [7].

1.2 Popravljanje neujemanja DNK (MMR)

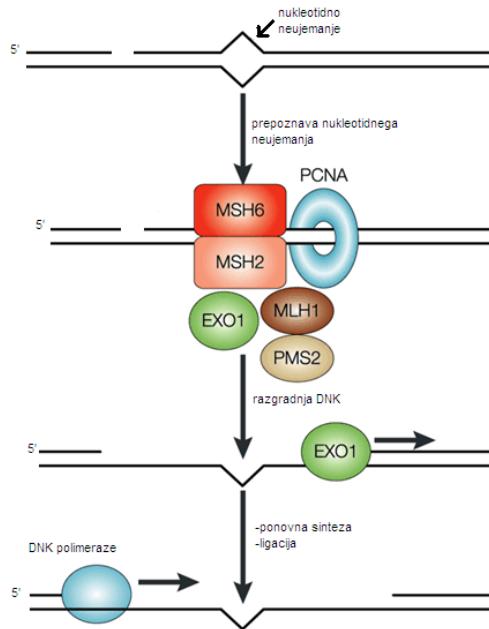
Kancerogeneza je zapleten proces, na katerega vplivajo številni dejavniki okolja in genetski dejavniki. Raziskovalci iz različnih strok si prizadevajo, da bi s številnimi študijami ovrgli ali potrdili vplive proučevanih faktorjev in izpopolnili razumevanje samega razvoja in poteka kancerogeneze. Znano je, da delovanje rakotvornih dejavnikov povzroča nastanek napak v genskem materialu. Prav tako pa lahko do napak pride tudi med aktivnostmi deokisribonukleinske kisline (DNK), kot so na primer podvojevanje in rekombinacija. V kolikor napake v vijačnici DNK niso popravljene, lahko pride do mutacij v celicah, kopičenje le-teh pa posledično privede do razvoja raka. V celicah dnevno prihaja do napak v D NK, ki jih odpravljajo popravljalni mehanizmi. Med te mehanizme spada tudi sistem popravljanja neujemanja v D NK (MMR – *angl. mismatch repair*). MMR popravlja nukleotidna neujemanja, ki nastanejo med procesom podvojevanja D NK, s tem pa zmanjša možnost za pojav mikrosatelitske nestabilnosti (MSI – *angl. microsatellite instability*). Gre za verižno-specifični mehanizem, ki popravlja samo na novo nastalo verigo D NK. Domneva se, da mehanizem razlikuje med matrično in hčerinsko verigo na podlagi vrzeli med Okazakijevimi fragmenti zaostajajoče verige in 3' konci na vodilni verigi [10,11,13].

Mehanizem delovanja je sestavljen in treh glavnih korakov:

1. iskanje in prepoznavanje neujemanja nukleotidov
2. popravljanje neujemanja in razgradnja poškodovane verige D NK
3. ponovna sinteza D NK

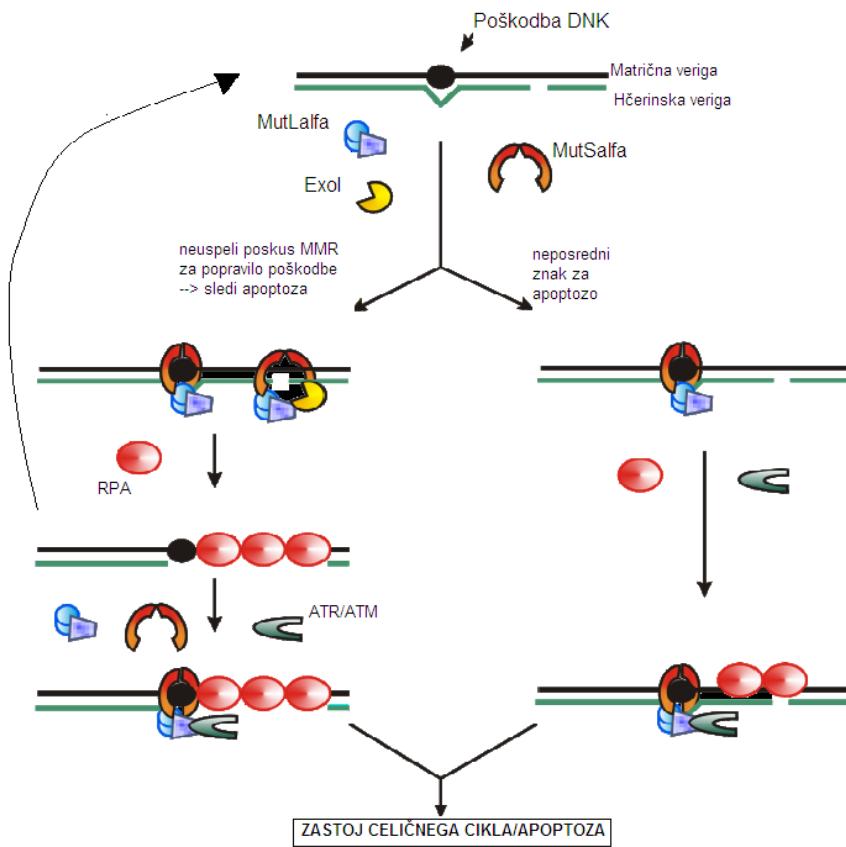
V prvem koraku so pomembnejši proteini MutS, ki prepoznajo nukleotidno neujemanje ter se nanj pripnejo. Pri ljudeh MutS proteini delujejo kot dimeri, in sicer gre za heterodimere. Pri proteinu MutS α gre za kompleks MSH6 in MSH2, medtem ko je MutS β dimer med MSH3 in MSH2. Kompleks MutS α prepozna manjše insercijske/delecijske (ID) zanke in enonukleotidna neujemanja, MutS β pa večje ID zanke. Kompleks potuje vzdolž verige D NK in išče napake. Prepoznavi napake in pripetju MutS heterodimera na D NK sledi vezava MutL α , ki velja za najpomembnejši kompleks popravljalnega mehanizma MMR. MutL α je heterodimer med MLH1 in PMS2. Omenjeni kompleks prepozna kompleks D NK-MutS ter se nanj veže. Z vezavo na kompleks pa pritegne eksonukleazo I (EXO1) in ostale proteine, ki nadaljujejo proces popravljanja D NK. Tako najprej pride do izreza

nukleotidnega neujemanja z EXO1, nastalo vrzel pa zapolni DNK-polimeraza δ. Novo sintetizirane dele pa nadalje zlepi DNK ligaza I [10,11,13].



Slika 5: Poenostavljen prikaz mehanizma delovanja MMR. Slika prirejena po [12].

Poleg popravljanja nukleotidnega neujemanja v DNK, ima MMR pomembno vlogo tudi pri odzivu na poškodbe DNK, ki so posledica številnih citotoksičnih spojin. Proteini MMR pri odzivu na različne oblike nepopravljivih poškodb DNK, signalizirajo programirano celično smrt (t.i. apoptozo) in sprožijo zastoj celičnega cikla v fazi G2. Mehanizem še ni povsem razjasnjen, poznana pa sta dva modela, ki predlagata vlogo MMR pri signaliziranju poškodbe v DNK. Prvi model je t.i. »jalov cikel popravljanja napake DNK« (angl. futile DNA repair cycle) (Slika 6 levo). MMR je verižno-specifičen in popravlja samo na novo nastalo verigo DNK. Citotoksične spojine poškodujejo matrično DNK, zato so takšne napake za MMR nepopravljive. Nekajkratni neuspeli poskusi popravila poškodbe v DNK aktivirajo signalno pot, ki sproži apoptozo. Alternativni model je »neposredno signaliziranje« (angl. direct signaling) (Slika 6 desno), kjer naj bi proteini MMR neposredno sprožili signaliziranje apoptoze [10,13].



Slika 6: Signaliziranje poškodbe DNK z MMR mehanizmom. Slika povzeta po [13].

Znano je, da so celice z okvarjenima hMutS α in hMutL α nesposobne ustaviti celični cikel pri odzivu na nekatere citotoksične učinkovine in so zato na te učinkovine odporne. Primer takšne učinkovine je metotreksat (Mtx), ki se uporablja za zdravljenje raka in učinkuje kot inhibitor dihidrofolat reduktaze (DHFR). DHFR je encim, ki katalizira redukcijo dihidrofolata v tetrahidrofolat in je zelo pomemben pri proliferaciji celic. Prav zaradi vloge pri rasti in proliferaciji celic je DHFR eden izmed ključnih tarč za zdravljenje raka. Vendar pa so raziskave pokazale, da človeške tumorske celice pogosto postanejo odporne na delovanje Mtx. Glede na predlagan mehanizem odpornosti, naj bi pri zdravljenju z Mtx prišlo do pomnoževanja regije na kromosому, kjer se nahajata gena *DHFR* in *MSH3*. Opisan fenomen vodi v povečano izražanje gena *DHFR*, ki omogoči odpornost na zdravilo, s povečanjem števila tarčnih mest za Mtx. Prav tako, pa povečano izražanje gena *MSH3* vodi v povečano tvorbo kompleksa MutS β (heterodimer MSH2-MSH3), kar posledično privede do zmanjšanega nastajanja MutS α (kompleks MSH2 in MSH6), in s tem do razgradnje nekompleksiranega MSH6, kar znatno pripomore do neurejenega delovanja celotnega MMR sistema in vodi v hipermutabilnost ter odpornost na učinkovino [32].

Poleg metotreksata so, v povezavi z okvarjenim MMR, opazili tudi odpornost na cisplatin in prokarbazin [10].

1.2.1 MMR in kancerogeneza

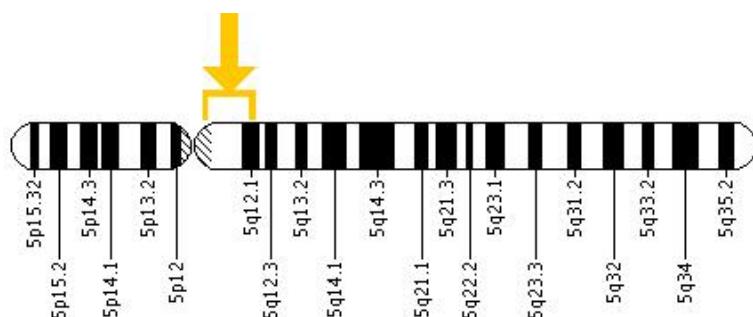
Vloga MMR je izrednega pomena za celico, saj s prepoznavanjem napak v genskem materialu in z nadaljnjam ukrepanjem popravlja neujeemanje nukleotidnega zaporedja in s tem preprečuje nastanek in kopiranje mutacij v genomu. Povezano med pojavom raka in okvarjenim MMR sistemom so opazili pri dednem nepolipoznem raku debelega črevesa znanem tudi pod imenom Lynchev sindrom. Trenutno velja, da Lynchev sindrom povzročajo mutacije v genih *MLH1*, *MSH2* in *MSH6*, predvideva pa se, da je s pojavom Lynchevega sindroma povezanih več genov. Okvare teh genov povezujejo s pojavom mikrosatelitskih nestabilnosti (MSI) [13].

Nastanek MSI povzročijo mutacije v genih MMR, kateri nato niso več sposobni kodirati popravljalnih proteinov. Insercijsko/delecijske zanke, ki skupaj z enonukleotidnimi neujeemanji predstavljajo tarčo za MMR, ostanejo nepopravljene, kar se kaže kot MSI. Posledično kopiranje DNK-napak (kot so MSI in enonukleotidna neujeemanja) v pomembnih geni vodi v razvoj raka [11].

Pri Lynchevem sindromu se izpostavlja tudi vloga dedovanja genskega materiala iz generacije v generacijo, in sicer raziskave kažejo, da se pri polovici sorodnikov v družinah s tem sindromom pojavi v zaporednih generacijah rak debelega črevesa in danke, rak endometrija ali kakšna druga oblika raka. Nadaljnja spoznanja so privedla do možnosti genskega testiranja, pri čemer ugotavljajo spremembe DNK v genih mehanizma MMR [13].

1.3 Gen *MSH3*

Gen *MSH3* (mutS homolog 3) se nahaja na V. kromosomu, in sicer od 79,950,293. do 80,172,633 baznega para in je sestavljen iz 24 eksonov (Slika 7). Protein, ki ga gen kodira prav tako imenujemo Msh3 in je sestavljen iz 1137 aminokislin. Kot že omenjeno protein Msh3 predstavlja pomembno funkcijo v sistemu MMR, in sicer s proteinom Msh2 tvori heterodimer MutS β , ki prepoznavata krajše ID zanke in enonukleotidna neujemanja.



Slika 7: Pozicija gena *MSH3* na kromosому V [14].

V laboratorijih Mednarodnega centra za genetski inženiring in biotehnologijo (ICGEB) v Cape Townu (Republika Južna Afrika) so ugotovili, da polimorfizem rs26279 (alel A) poveča tveganje za razvoj raka na požiralniku pri kadilcih iz populacije z mešanimi predniki, ne pa tudi pri temnopolti afriški populaciji [33]. Domnevajo, da gre za označevalni polimorfizem (*angl. marker polymorphism*), ki se pri populaciji mešanih prednikov deduje skupaj s polimorfizmom, ki zares poveča tveganje za rakotvornost. Dodatne študije nakazujejo, da je polimorfizem rs184967 pravi t.i. bolezenski polimorfizem (*angl. disease polymorphism*), ki je kriv za spremenjeno tveganje za raka. Zanimiv pa je tudi polimorfizem rs1650697, ki se, poleg tega, da zapisuje aminokislinsko spremembo na proteinu MSH3, nahaja tudi na promotorski regiji gena *DHFR*, in bi lahko vplival na njegovo izražanje. Kot že prej omenjeno je DHFR pomemben za nadzorovan rast in proliferacijo celic, sprememba izražanja DHFR pa lahko vodi v nenadzorovan celično rast in v posledično rakotvornost [32].

POLIMORFIZMI *MSH3*

V genu *MSH3* lahko zasledimo številne polimorfizme, med drugim tudi rs26279, rs184987 in rs1650697.

- **Polimorfizem rs26279** se nahaja na 3133. baznem paru kodirajoče regije gena *MSH3* in predstavlja spremembo gvanina v adenin (c.3133G>A). Nukleotidna sprememba zapisuje spremembo aminokisline alanin (Ala, A) v treonin (Thr, T) na mestu 1045 v proteinu Msh3 (p. Ala1045Thr; Slika 8)

```
1025 VGNYHMGFLVSEDESKLDPG A AEQVPDFVTFLYQITRGIAA 1065
      ↓
      T
```

Slika 8: Prikaz spremembe Ala1045Thr v proteinu Msh3. Slika povzeta po [15].

- **Polimorfizem rs184967;** gre za spremembo adenina v gvanin v 2846. baznem paru kodirajoče regije gena *MSH3* (c.2846A>G). Polimorfizem kodira spremembo aminokisline glutamin (Gln, Q) v aminokislino arginin (Arg, R) v 949. kodonu v proteinu Msh3 (p.Gln949Arg; Slika9).

```
929 IGIVDGIFTRMGAADNIYKG Q STFMEELTDAAEIIRKATSQ 969
      ↓
      R
```

Slika 9: Prikaz spremembe Gln949Arg v proteinu Msh3. Slika povzeta po [15].

Polimorfizem rs184967 se nahaja v bližini rs26279, zato domnevamo, da bi bil lahko dober kandidat za pravi bolezenski polimorfizem.

- **Polimorfizem rs1650697** predstavlja spremembo c.265A>G v kodirajoči regiji gena *MSH3*, oziroma spremembo c.473T>C v promotorski regiji gena *DHFR*, ki se nahaja na komplementarni verigi DNK. V proteinu Msh3 polimorfizem kodira aminokislinsko spremembo izolevcin (Ile, I) v valin (Val, V) na mestu 79 (p.Ile79Val; Slika 10).

59 AAAAPPAPPAPAFPPQLPPH I ATEIDRRKKRPLENDGPVKK 99
↓
V

Slika 10: Prikaz spremembe Ile79Val v proteinu Msh3. Slika povzeta po [15].

Polimorfizem rs1650697 poleg spremembe aminokisline v proteinu Msh3 spreminja tudi 5' neprevajajočo se regijo (UTR, *angl.* untranslated region) gena *DHFR* [16].

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je:

- 1.) v dveh južnoafriških populacijah, temnopoliti afriški populaciji in populaciji z mešanimi predniki, z raziskavo "primer-kontrola" (*angl. case-control study*) proučiti vpliv dveh kandidatnih polimorfizmov, rs184967 in rs1650697 v genu *MSH3* ;
- 2.) z analizo *in silico* predvideti, ali polimorfizma v genu *MSH3* vplivata na funkcijo proteina (polimorfizma namreč zapisujeta zamenjavo aminokisline v proteinu MSH3);
- 3.) proučiti, ali polimorfizma vplivata na izražanje mRNA gena *MSH3*;
- 4.) ker se polimorfizem rs1650697 nahaja tudi na promotorski regiji gena *DHFR*, bomo prouči vpliv polimorfizma rs1650697 na izražanje mRNA gena *DHFR*.

2.1 Hipoteze:

1. Vsaj eden izmed polimorfizmov spremeni tveganje za razvoj raka na požiralniku pri obeh proučevanih populacijah in predstavlja t.i. bolezenski polimorfizem (*angl. disease polymorphism*)
2. Vpliv bolezenskega polimorfizma je povezan z okoljskimi dejavniki, kot je npr. kajenje.
3. Bolezenski polimorfizem spremeni izražanje mRNA gena *MSH3* oz. *DHFR* ali pa vpliva na funkcijo proteina MSH3.

3. METODE

3.1 Opis populacije

V preiskavo je bilo zajetih 1361 preiskovancev. 694 bolnikov z rakom požiralnika, ki so bili zajeti v raziskavi, je bilo sprejetih v bolnišnico Groote Schuur v Cape Townu, ki se nahaja v provinci Western Cape v Republiki Južni Afriki. Zdrave posamezni brez rakavih obolenj, ki so predstavljali kontrolno populacijo, smo prav tako zbirali v istem geografskem območju kot bolnike z rakom požiralnika, to je v Cape Townu in okolici. V raziskavo jih je bilo zajetih 667. Zbiranje preiskovancev je potekalo med letoma 2000 in 2010.

V raziskavo sta bili zajeti dve etnični skupini južnoafriške populacije, in sicer temnopolta populacija ter t.i. populacija mešanih prednikov. Temnopolta populacija je zajemala Xhosa-govoreče Južnoafričane, medtem ko gre pri populaciji mešanih prednikov za skupino ljudi, ki izhajajo iz zakonov med različnimi rasami; t.j. med temnopolimi Afričani in priseljenci, ki so na ozemlje južne Afrike prišli v 17. stoletju (zahodni Evropejci, Khoisan, Indonezijci ali Malezijci).

Vsi preiskovanci so izpolnili anketo, s katero smo pridobili podatke o njihovem življenjskem okolju in navadah. Anketa nam je podala podatke o spolu in starosti preiskovancev, pri čemer starostna meja preiskovancev ni bila postavljena. Anketiranci so se morali opredeliti ali so kadilci ali nekadilci, pri čemer smo kot kadilce smatrali tudi tiste, ki so kadili v preteklosti, pa so kasneje to razvado opustili. Pri uživanju alkohola smo pod tiste, ki uživajo alkohol upoštevali tako preiskovance, ki pijejo redno kot tudi tiste, ki alkohol uživajo občasno. Pri pojavu bolezni rak v družini smo kot pozitivne odgovore smatrali tiste, ki so trdili, da se je rak pojavit pri sorodniku iz prvega kolena ali pri najmanj dveh sorodnikih iz drugega kolena, pri tem pa nismo upoštevali razlik med oblikami in vrstami raka.

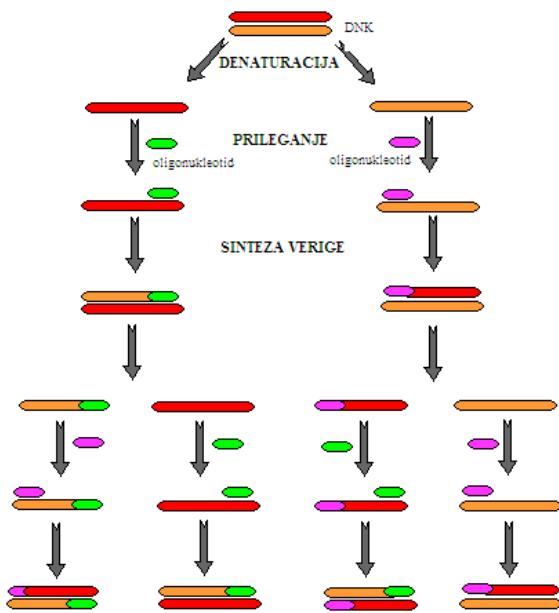
Vzorci DNK za genotipizacijo so bili prehodno izolirani iz zamrznjenih vzorcev krvi s standardnim protokolom. Študija je bila odobrena s strani etične komisije Univerze Cape Town/bolnišnica Groote Schuur.

3.2 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, ki se uporablja za pomnoževanje izbranega tarčnega odseka DNK. Gre za *in vitro* metodo, ki je relativno hitra, visoko občutljiva in poceni. PCR vključuje tri osnovne korake, ki se med reakcijo ciklično 30-40-krat ponovijo (Slika 11), in sicer:

1. Denaturacija DNK – reakcija poteka pri temperaturi 90-96°C, kjer pride do razčlenitve dvojerižne DNK
2. Prileganje začetnih oligonukleotidov – med reakcijo, ki poteka pri 40-60°C prihaja do prileganja začetnih oligonukleotidov na natančno določeno mesto v DNK. Specifičnost prileganja je pogojena z nukleotidnim zaporedjem začetnikov, ki je komplementarno zaporedju dela DNK, ki ga želimo pomnoževati.
3. Sinteza verige s polimerazo – reakcija poteka pri temperaturi 72°C, kjer se aktivira DNK-polimeraza, ki sintetizira komplementarno verige DNK.

Danes zelo priljubljena metoda PCR je kvantitativni PCR (qPCR, *angl. quantitative PCR*), ki omogoča sprotno detekcijo namnožene DNK. Metoda je visoko občutljiva in specifična, ima široko kvantitativno območje in je dobro ponovljiva. Uporabna je pri delu z vzorci z nizko koncentracijo DNK in RNK oz. pri rokovjanju z omejenimi količinami vzorcev. Detekcija produktov poteka vzporedno s samim pomnoževanjem, tako da lahko ob vsakem ciklu izmerimo količino nastalega PCR-produkta. Detekcija poteka na osnovi merjenja fluorescence, in sicer specifično ali nespecifično. Specifičen način detekcije poteka z začetnimi oligonukleotidi, ki so označeni s fluorofori. Le-ti se specifično vežejo na določeno mesto, ki ga pomnožujemo. V našem primeru smo se odločili za nespecifični način detekcije, pri čemer smo uporabili fluorescentno barvilo SybrGreen, ki v prosti obliki ne fluorescira, ko pa nastanejo produkti dvojne vijačnice, se barvilo interkalira vanjo in začne močno fluorescirati. Jakost fluorescence je odvisna od količine nastalega produkta [24,25,26].



Slika 11: Shema verižne reakcije s polimerazo. Povzeto po [19]

3.2.1 Alelno-specifična genotipizacija

Princip metode

Genotipe smo določili s pomočjo modificirane metode qPCR, in sicer z alelno-specifično metodo qPCR. Gre za hitro in enostavno metodo, s katero lahko določimo genotip vzorcev. Pri delu smo uporabili tri začetne oligonukleotide. Dva alelno specifična začetna oligonukleotida sta bila načrtana tako, da se je zadnja baza na njunih 3'-koncih ujemala samo z enim od obeh alelov proučevanega polimorfizma. Skupni obratnosmerni začetni oligonukleotid ni imel vključenih neujemanj. Genotipizacija vsakega vzorca je potekala vzporedno v dveh reakcijah, v eni reakciji smo pomnoževali en alel, medtem ko je v drugi reakciji potekalo pomnoževanje drugega alela. Metoda temelji na hipotezi, da se bo pomnoževanje z začetnim oligonukleotidom, ki se na 3'-koncu ne ujema popolnoma z zaporedjem na D NK, začelo kasneje, oziroma bo popolnoma onemogočeno, v primerjavi s pomnoževanjem D NK, kjer je ujemanje med začetnim oligonukleotidom in D NK popolno. Genotip smo določili glede na sposobnost pomnoževanja D NK v obeh reakcijah, saj so se različna neujemanja kazala s časovno zakasnitvijo pri pomnoževanju (razlike v Cp) [22].

Materiali in aparature

- Delovna PCR-komora z lučko UV
- Polavtomatska 8-kanalna pipeta (Eppendorf)
- Polavtomatske pipete (različni volumni)
- Nastavki za pipete
- Avtoklavirane epice
- Prozorna samolepljiva folija (Roche)
- Aluminijeva folija (zaščita ploščice pred svetlobo)
- Mikrotitrská ploščica s 384- vdolbinicami (Roche)
- Mini centrifuga in centrifuga z nastavkom za mikrotitrské ploščice (Eppendorf)
- Vibrirajoči mešalnik
- Ciklični pomnoževalnik Roche LightCycler 480II
- Komplet KAPA SYBR® FAST Universal 2x qPCR Master Mix, ki je vključeval:
 - Fluorescenčno barvilo SYBR Green I
 - MgCl₂
 - dNTPs
 - pufer
 - KAPA SYBR® DNK polimerazo
- Začetni oligonukleotidi:

Istosmerni zač. oligonukleotid rs165067C_F: 5'-CCAGTCCCAGACAGAACCTACTTC

Istosmerni zač. oligonukleotid rs165067T_F: 5'-CCAGTCCCAGACAGAACCTACTTT

Obratnosmerni zač. oligonukleotid rs165067_R: 5'-AGCCGATTCTCCAGTCTACG

Istosmerni zač. oligonukl. rs184967A_F: 5'-GCCTGCAGACAATATATATAAAGGAAA

Istosmerni zač. oligonukl. rs184967G_F: 5'-GCCTGCAGACAATATATATAAAGGAAG

Obratnosmerni zač. oligonukleotid rs184967_R: 5'-CTCAAGTGTAGCATAGGCAATGG

- Vzorci DNK, ki so bili predhodno izolirani iz krvi preiskovancev

Postopek genotipizacije

Pri pripravi reakcijske zmesi smo bili natančni in previdni, saj nismo želeli, da bi kontaminirali vzorce DNK. Metoda PCR je namreč visoko občutljiva in bi ob morebitni kontaminaciji vzorcev s tujo DNK pomnoževali lažne odseke in tako dobili nepravilne

rezultate. Pri laboratorijskem delu smo zato vedno uporabljali sveže rokavice, čisto haljo in delovno komoro, katero smo po obsevanju z UV-lučko vedno predhodno očistili s 70% etanolom. Začetne oligonukleotide in DNK vzorce smo najprej odtalili, jih premešali na vibracijskem mešalniku in zbrali na dnu epice s centrifugiranjem. Prav tako smo premešali in centrifugirali KapaSybr®Fast Universal 2x qPCR Master Mix komplet. Vse reagente smo prenesli v komoro, kjer smo si pripravili kadičko z ledom, na katero smo položili mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinicami. Z aluminijevo folijo smo pred svetlobo zaščitili plastični vsebnik kompleta KapaSybr®Fast qPCR Master Mix. Le-ta vsebuje fluorescenčno barvilo SYBR® Green-a, ki ni obstojno na svetlobi.

V vdolbinice smo najprej odpipetirali po 1 μ L vzorca DNK (vsak vzorec smo odpipetirali dvakrat in sicer v dve sosednji vdolbinici), nato pa v prvo vdolbinico dodali 3 μ L reakcijske mešanice, ki je vsebovala KapaSybr®Fast qPCR Master Mix komplet in par začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje enega alela. V drugo vdolbinico smo dodali 3 μ L mešanice za pomnoževanje drugega alela proučevanega polimorfizma (Preglednica II).

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi

REAGENT	VOLUMEN
Komplet KAPA SYBR® FAST Universal 2x qPCR Master Mix	2 μ L
*eden izmed dveh istosmernih začetnih oligonukleotidov za proučevani polimorfizem (2 μ M)	0,5 μ L
a) rs1650697C_F	
b) rs1650697T_F	
c) rs184967G_F	
d) rs184967A_F	
*obratnosmerni začetni oligonukleotid za proučevani polimorfizem (2 μ M)	0,5 μ L
a) in b) rs1650697_R	
c) in d) rs184967_R	
Vzorec DNK (5ng/ μ L)	1 μ L
Skupni volumen	4 μ L

*Različne reakcijske mešanice a-d) so omogočale razlikovanje med različnimi aleli dveh polimorfizmov. Tako smo z reakcijsko mešanicą a) pomnoževali alel C polimorfizma rs1650697; z

b) smo pomnoževali alel T polimorfizma rs1650697. V reakcijski mešanici c) je potekalo pomnoževanje polimorfizma rs184967 (alel G) in v d) pomnoževanje rs184967 (alel A).

Preglednica III: Protokol verižne reakcije s polimerazo za genotipizacijo (45 ciklov)

Stopnja reakcije	T reakcije	t reakcije
Začetna denaturacija	95 °C	5 min
*Denaturacija	95 °C	5 s
*Prileganje začetnih oligonukleotidov	58 °C	22 s
*Sinteza verige	72 °C	4 s
**Analiza talilne krivulje	Sprememba 65 > 95 °C	30s

*V cikličnem delu qPCR so se izmenjevale te reakcije. Detekcija količine DNK je bila izvedena po sintezi verige v vsakem ciklu.

**Količina DNK je bila merjena konstantno med poviševanjem temperature.

Po končanem PCR smo s pomočjo analize talilnih vrhov preverili, če se kateri od vzorcev ni specifično pomnoževal. V kolikor smo odkrili napako pri pomnoževanju, smo posamezni vzorec ponovno pripravili in ponovili reakcijo PCR.

3.2.2 Analiza genskega izražanja z metodo RT qPCR

Princip metode

Metoda qPCR omogoča tudi analizo nivoja izražanja mRNA določenega gena v različnih tkivih. Nivo izražanja mRNA se določa posredno, in sicer preko določanja količine komplementarne DNA (cDNA, *angl. complementary DNA*). Zato je potrebno mRNA izolirano iz tkiva najprej pretvoriti v cDNA. Pretvorbo izvedemo z reakcijo reverzne transkripcije (RT), kjer polimeraza im. reverzna transkriptaza pretvori enoverižno mRNA v dvojerižno cDNA. Celoten proces od izdelave cDNA do kvantitativne določitve izražanja gena zato pogosto označujemo kot RT qPCR.

Po detekciji produktov, je potrebno rezultate kvantitativno ovrednotiti in določiti stopnjo izražanja genov. Obstaja več načinov kvantitativne določitve, in sicer absolutna, relativna ali komparativna kvantifikacija. Pri absolutni kvantifikaciji se uporablja kalibracijska krivulja, ki je lahko umerjena z razredčenimi PCR produkti, rekombinantno DNK ali RNK, linearimi plazmidi ali obdelanimi tkivnimi vzorci. Absolutna kvantifikacija ni najboljša izbira, saj se rezultati lahko razlikujejo odvisno od tega, katero kalibracijsko krivuljo smo izbrali. Prav tako imamo opravka z biološkimi vzorci, ki so zelo variabilni in zato kalibracijska krivulja pri enem vzorcu ni nujno reprezentativna tudi za druge vzorce. Relativna kvantifikacija je zaradi tega boljša izbira [17]. Gensko izražanje lahko izrazimo relativno glede na:

- endogeno kontrolo (referenčni gen, za katerega velja konstantna ekspresija ali gen, ki nas zanima)
- eksogeno kontrolo (univerzalna in/ali umetna kontrolna RNK ali DNK)
- referenčni genski indeks (sestavljen iz več referenčnih genov)
- tarčni genski indeks (sestavljen iz povprečja rezultatov, pridobljenih iz študije o genih, kateri nas zanimajo)

Za doseganje zanesljivih rezultatov je potrebno kontrolirati eksperimentalne napake in zagotoviti enake pogoje med reakcijo PCR za vse vzorce. Prav tako je potrebno poskrbeti, da relativne primerjave potekajo na vzorcih, ki vsebujejo enako količino RNK, enako količino analiziranega tkiva ali enako število izbranih celic [17].

Z metodo RT-qPCR smo želeli ugotoviti, ali se gena *MSH3* in *DHFR* v tumorskem in zdravem tkivu bolnikov različno izražata. Odločili smo se za relativno kvantifikacijo s pomočjo endogene kontrole, in sicer smo izražanje preiskovanih genov primerjali z izražanjem gena *GAPDH*, ki velja za vzdrževalni gen, zaradi česar smo ga uporabili kot referenčni gen. Vzdrževalni geni so geni, ki so esencialni za preživetje celice in zaradi tega bolj ali manj konstantno nastajajo v vseh tipih celic. *GAPDH* po raziskavah sodi v skupino vzdrževalnih genov, katerih nastajanje v celicah se najmanj spreminja, ne glede na različne dejavnike, katerim je celica izpostavljena [28]. Med temi dejavniki je med bolj vprašljivimi citotoksično zdravljenje, saj z določenimi zdravili lahko močno pripomoremo k spremenjenemu izražanju genov. V kolikor bi želeli še zanesljivejše podatke, bi bilo priporočljivo ponoviti poskuse z različnimi referenčnimi geni.

Materiali in aparature

- Delovna komora z lučko UV
- Polavtomatske pipete proizvajalca Eppendorf (različni volumni)
- Nastavki za pipete
- Avtoklavirane epice
- Prozorna samolepljiva folija (Roche)
- Aluminijeva folija (zaščita ploščice pred svetlobo)
- Mikrotitrská ploščica s 96 vdolbinicami (Roche)
- Mini centrifuga in centrifuga z nastavkom za mikrotitrské ploščice (Eppendorf)
- Vibrirajoči mešalnik
- Ciklični pomnoževalnik Roche LightCycler 480II
- Komplet KAPA SYBR® FAST Universal 2x qPCR Master Mix, ki je vključeval:
 - Fluorescenčno barvilo SYBR Green I
 - MgCl₂ (2,5 mM)
 - dNTPs
 - pufer
 - KAPA SYBR® DNK polimerazo
- dH₂O
- Začetni oligonukleotidi:

Istosmerni zač. oligonukleotid DHFR-Fw: 5'-GAATCACCCAGGCCATCTTAAAC

Obratnosmerni zač. oligonukleotid DHFR-Rv: 5'-GCCTTCTCCTCCTGGACATCA

Istosmerni zač. oligonukleotid MSH3-Fw: 5'-GGCTCCTATGTTCCTGCAGAAG

Obratnosmerni zač. oligonukleotid MSH3-Rv: 5'-CCCTCTTCCTAGTTCATCCAAGAT

Istosmerni zač. oligonukleotid GAPDH-Fw: 5'-GCCTGCTTCACCACCTC

Obratnosmerni zač. oligonukleotid GAPDH-Rv: 5'-GGCTCTCCAGAACATCATCC

- Vzorci cDNK, pripravljene iz celokupne RNK, ki je bila izolirana iz sveže-zamrznjenih vzorcev tkiv pridobljenih pri biopsiji obolelih preiskovancev.

Postopek analize

Pri pripravi reakcijske zmesi smo bili pozorni, da vzorcev nismo kontaminirali s tujo DNK.

Pri delu smo uporabljali zaščitno haljo in rokavice, vzorce za reakcijo PCR pa smo pripravljali v delovni komori, katero smo po obsevanju z ultravijolično svetlobo očistili s

70% etanolom. cDNK smo najprej premešali in centrifugirali, nato pa 1 µL pripravljene cDNK nanesli v vdolbinico na mikrotitrski ploščici. Raztopini začetnih oligonukleotidov (isto- in obratnosmernega) za pomnoževanje odseka cDNK določenega gena smo odtalili, ju premešali in centrifugirali ter jih dodali vzorcem. Na koncu smo premešali še komplet KAPA SYBR® FAST Universal 2x qPCR Master Mix in ga dodali vzorcem. Dodali pa smo tudi dH₂O (Preglednica IV). Analizo vsakega gena v posameznem vzorcu smo izdelali v treh paralelkah.

Mikrotitrsko ploščico smo nato zaprli s samolepilno folijo, jo na kratko centrifugirali in analizirali v cikličnem pomnoževalniku LightCycler 480II s predhodno nastavljenim programom (Preglednica V). Analizo izražanja mRNA za vsak proučevani gen smo izvedli v treh paralelkah. Uspešnost in specifičnost podvajanja smo naknadno preverili z agarozno gelsko elektroforezo in analizo talilnih vrhov.

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi

REAGENT	VOLUMEN
Komplet KAPA SYBR® FAST Universal 2x qPCR Master Mix	5 µL
dH ₂ O	2 µL
*istosmerni začetni oligonukleotid (2 µM): a)DHFR_F b)MSH3_F c)GAPDH_F	1 µL
*obratnosmerni začetni oligonukleotid (2 µM) a)DHFR_R b)MSH3_R c)GAPDH_R	1 µL
Vzorec DNK	1 µL
Skupni volumen	10 µL

*Pripravili smo tri različne reakcijske zmesi, za pomnoževanje mRNA genov a) DHFR, b) MSH3 in c) GAPDH, posamično.

Preglednica V: Protokol verižne reakcije s polimerazo za genotipizacijo (45 ciklov)

Stopnja reakcije	T reakcije	t reakcije
Začetna denaturacija	95° C	3 min
*Denaturacija	95° C	30 s
*Prileganje začetnih oligonukleotidov	60° C	30 s
*Sinteza verige	72° C	25 s
**Analiza talilne krivulje	Sprememba 65 > 95 °C	30s

*V cikličnem delu qPCR so se izmenjevale te reakcije. Detekcija količine DNK je bila izvedena po sintezi verige v vsakem ciklu.

**Količina DNK je bila merjena konstantno med poviševanjem temperature.

Relativna kvantifikacija dobljenih rezultatov

Po namnožitvi in detekciji produktov, je bilo potrebno rezultate kvantitativno ovrednotiti in tako ugotoviti stopnjo izražanja genov. Stopnjo izražanja smo določili relativno glede količino *GAPDH* v vzorcu po naslednji enačbi:

Enačba 1:

$$\text{ekspresija} = (E_{\text{GAPDH}})^{\Delta C_p \text{GAPDH}} / (E_{\text{target}})^{\Delta C_p \text{target}} [23]$$

Upoštevanje učinkovitosti (E) pomnoževanja DNK v reakciji PCR ima ogromen vpliv na zanesljivost izračunanega izražanja mRNK. Učinkovitost pomnoževanja smo zato predhodno določili z dvema različnima metodama:

- dilucijsko metodo in
- povečanje fluorescence v eksponentni fazи

Dilucijska metoda

Pri dilucijski metodi smo učinkovitost pomnoževanja DNK izračunali s pomočjo analize razredčenih vzorcev. Uporabili smo 10-, 100- in 1000-kratno redčitev vzorca in neredčen vzorec ter izvedli reakcijo PCR. Iz dobljenih rezultatov smo pripravili graf Cp (presečišče krivulje fluorescence z osnovno linijo; angl. *crossing point*) v odvisnosti od koncentracije vzorca ($C_p = f(\ln c)$). Z linearno regresijo smo nato določili premico, ki se je rezultatom najbolj prilegla in izračunali učinkovitost iz naklona premice po enačbi:

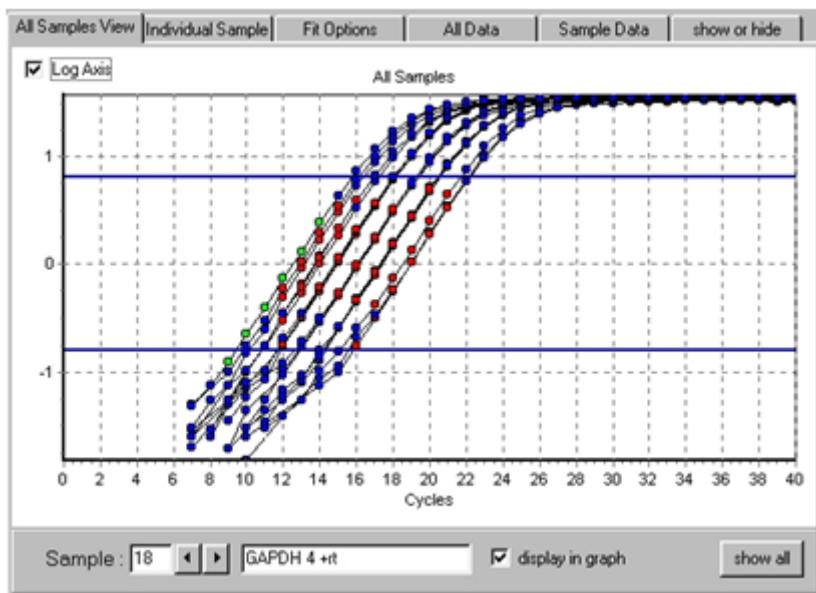
Enačba 2: $E = 10^{(-1/\text{naklon})}$ [17]

Meritve smo izvajali v treh paralelkah in kot rezultat Cp vzeli povprečje le-teh. Podatke smo obdelovali s pomočjo programa Excell (Microsoft Office). V kolikor je kakšen Cp občutno izstopal, ga nismo upoštevali. Zaradi majhne količine cDNK, smo učinkovitost izračunali iz sedmih vzorcev cDNK.

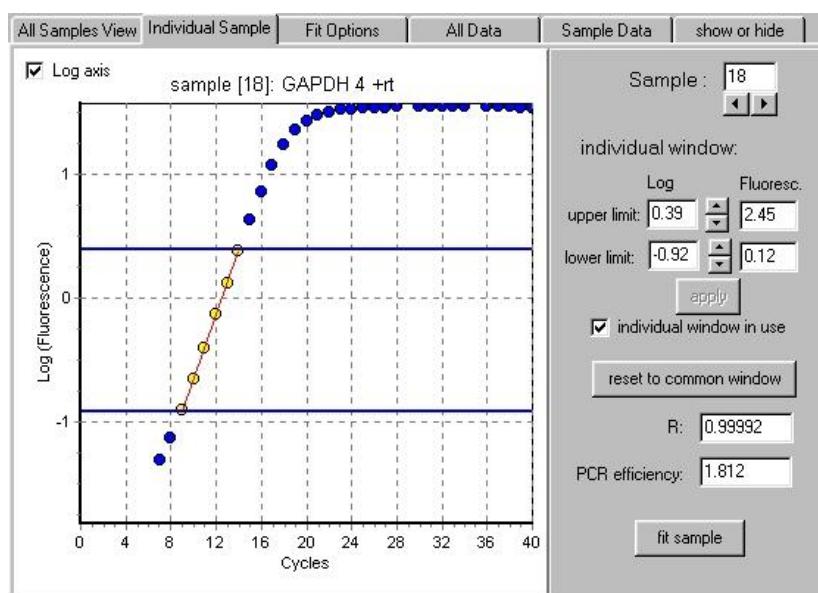
Povečanje fluorescence v eksponentni fazi

Drugi, a ne zadnji način določanja učinkovitost pomnoževanja DNK, je uporaba naklona premice v eksponentni fazi pomnoževanja DNK. Ujemanje premice s točkami lahko naredimo s prostim očesom ali pa si pomagamo z računalniškim programom, kakršen je LinRegPCR [18].

Podatke iz aparature za qPCR (jakost fluorescence v odvisnosti od števila ciklov) smo prenesli v Excell (Microsoft Office), le-te pa nadalje v program LinRegPCR. Za kar najboljše ujemanje premice z eksperimentalnimi podatki smo izbrali možnost $R^2=0,999$ in zagnali izračun z gumbom 'Fit all'. Računalniški program LinRegPCR je izračunal učinkovitost pomnoževanja DNK v vsaki reakciji qPCR posebej (slike 12 in 13).



Slika 12: Primer računanja učinkovitosti s programom LinRegPCR. Slika prikazuje primer računanja učinkovitosti s povečevanjem fluorescence v eksponentni fazi. V grafu so prikazane vse meritve vzorcev, ki so bile vnesene v program. Modre vodoravne črte postavljajo mejo območju, v katerem se določa linearost. Rdeče obarvane točke linearost dosegajo, modro obarvane točke pa ne in so zato izključene iz računanja linearnosti. Nadalje si ogledamo vsak vzorec posebej, kot prikazuje naslednja slika [17].



Slika 13: Primer računanja učinkovitosti s programom LinRegPCR. Zgornja slika prikazuje posamičen vzorec. Enako kot zgoraj razloženo modri vodoravni črti določata

območje, kjer se določa linearnost. S pregledom posameznih vzorcev se prepričamo o vrednostih standardne deviacije (R) in vidimo izračunano posamezno učinkovitost za PCR [17].

3.3 Analiza produktov qPCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Uspešnost podvajanja pravih fragmentov DNK smo preverili tudi z elektroforezo v agaroznem gelu.

Materiali in aparature

- agaroha
- dH₂O
- Tris/HCl
- Borna kislina
- EDTA 0,5M
- Etidijev bromid (10 mg/mL)
- Standardna lestvica znanih velikosti DNK fragmentov (Fermentas)
- Elektronska tehtnica
- Mikrovalovna pečica
- Gumijasta prijemalka za prijemanje vroče steklovine
- Kadička za elektroforezo
- Pipete in nastavki za pipete
- Komora z UV svetilko
- Steklena bučka
- Steklene čaše

Izvedba

En gram agaroze in 130 mL 1x pufra TBE (Preglednica VI) smo 3 min segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agaroza raztopila. Mešanico smo nato pod tekočo vodo ohladili, dodali 10 µL etidijevega bromida ($c=10 \text{ mg/mL}$) in raztopino vlili v kadičko ter počakali, da se je gel strdil. Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali nanašalni pufer, ki pa ni presegal 1/3 končnega volumna. Na gel smo nanesli tudi lestvico znanih velikosti DNK fragmentov (Fermentas). Elektroforeza je potekala do 45 minut pri napetosti 100 V. Gel smo pregledali pod ultravijolično lučjo in analizirali položaje lis.

Pozor. Etidijev bromid je mutagena, karcinogena in teratogena substanca, zato pri delu z njim veljajo posebni varnostni postopki. Obvezna je bila uporaba zaščitne opreme.

Preglednica VI: Priprava TBE (tris/borat/EDTA) pufra

Reagent	Količina
dH ₂ O	800 mL
Tris/HCl	108 g
borna kislina	55 g
EDTA 0,5M	40 mL
dopolni do	1 L

3.4 Analiza *in silico*

Z analizo *in silico* smo želeli predvideti, kakšen učinek ima zamenjava aminokisline na funkcijo proteina. Za izvedbo analize *in silico* je na voljo več računalniških programov. Mi smo se odločili za naslednje: SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant), Align-GVGD in PolyPhen (Polymorphism Phenotype). Najprej smo v podatkovni bazi SWISS-PROT poiskali 31 zapisov aminokislinskega zaporedja za protein MSH3 pri človeku in nekaterih drugih vrstah. Uporabili smo samo tiste zadetke, pri katerih je bil zapis za protein MSH3 popoln. S pomočjo programov MUSCLE in CLUSTALW2 smo aminokislinska zaporedja poravnali in jih uporabili pri nadaljnji obdelavi z zgoraj omenjenimi programi. Programi niso primerni za direktno klinično uporabo, ampak nas lahko usmerjajo pri eksperimentalnem delu in nikakor niso namenjeni zamenjavi za laboratorijsko delo.

SIFT program glede na vnesena aminokislinska zaporedja organizmov predvidi, ali je neka sprememba aminokisline škodljiva za proteinsko funkcijo ali ne. Algoritem SIFT se praviloma uporablja za človeške polimorfizme, a ga lahko uporabimo tudi pri drugih vrstah, saj temelji na osnovi, da so pomembni deli proteinov evolucijsko ohranjeni med organizmi. Pri visoko podobnih predelih proteina, torej predelih, kjer je ohranjenost zaporedja največja, velja, da opažene aminokislinske zamenjave vodijo v izgubo proteinske funkcije. Obratno velja, da so zamenjave aminokislinskih zaporedij bolj tolerirane pri slabše ohranjenih predelih proteina. Algoritem SIFT poteka v več korakih. Program najprej prilega proteinska zaporedja z utežno matriko. V naslednjem koraku na vseh mestih proteina preračuna verjetnost vpliva zamenjave aminokisline za vsako od dvajsetih aminokislin. Te verjetnosti so normalizirane z verjetnostjo najbolj pogoste aminokisline, ki se pojavi na tej poziciji in so podane kot vrednosti SIFT. V kolikor so dobljene vrednosti manjše od 0,05, program predvideva, da zamenjava na tem mestu vodi v izgubo proteinske funkcije (Preglednica VII). [29,13,18]

AlignGVGD algoritem je prav tako večstopenjski program, pri čemer najprej s pomočjo Grantham Variation (GV) algoritma poravna zaporedja in izmeri obseg variacije (ohranjanje vrst), nadalje pa z Difference Grantham (DV) algoritmom izmeri razdaljo med temi zaporedji in z zaporedjem s spremenjeno aminokislino. V kolikor dobimo vrednost $GD=0$, pomeni, da je sprememba nevtralna in da nima pomena za proteinsko funkcijo. Vrednosti $GD \neq 0$ in $GV \leq 61,3$ pomenijo, da gre za škodljivo spremembo. Vrednosti $0 < GD \leq 61,3$ in $GV > 61,3$ predstavljajo nevtralno spremembo. Vse ostale vrednosti se smatrajo kot neuvrščene (Preglednica VII). [30,13,18]

Pri **PolyPhen** programu za razliko od zgornjih dveh, vnesemo samo aminokislinsko zaporedje za človeški protein, nadalje pa program sam izbere ostala zaporedja proteinov drugih vrst, s katerimi izvede primerjave. Sledi poravnava zaporedij in izračun verjetnosti zamenjave aminokisline ter vpliv zamenjave na funkcijo proteina. Program predvideva možnost vpliva zamenjave aminokisline na strukturo in funkcijo proteina s pomočjo informacij o lastnostih aminokislin in o strukturnih parametrih. Program nam poda rezultate v opisni obliki kot: nenevarna sprememba, domnevno uničujoča sprememba ali uničujoča sprememba (Preglednica VII) [13,18].

Preglednica VII: Podajanje rezultatov različnih programov

	Škodljiva sprememba	Nevtralna sprememba	Neuvrščeno
SIFT	<0,05	>0,05	/
AlignGVGD	GD≠0 in GV≤61,3	<ul style="list-style-type: none"> • GD=0 ali • 0<GD≤61,3 in GV>61,3 	ostale vrednosti
PolyPhen	Opisno	Opisno	Opisno

3.5 Statistična analiza rezultatov

Pri statistični obdelavi podatkov, ki smo jih pridelali z genotipizacijo smo se opirali na program SPSS Statistic 19.0. Glede na to, da smo imeli na razpolago atributivne nominalne spremenljivke, smo uporabili deskriptivno statistiko in Fisherjev eksaktni test. Pri vrednotenju posameznih parametrov smo upoštevali, da na njih lahko vplivajo drugi parametri, tako da smo proučevan parameter prilagodili na vplive ostalih parametrov. Vrednosti p, ki so bile manjše od 0,05, smo smatrali za pomembno različne. Pri statističnih analizah smo upoštevali 95% interval zaupanja (95% I.Z.). Razmerje obetov (*angl. odds ratio*) je mera velikosti vpliva, opisuje moč povezave ali neodvisnost med dvema binarnima spremenljivkama. Uporablja se v opisni statistiki in je pogosto uporabljen v znanstvenih medicinskih, epidemioloških in socioloških raziskavah.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Opis populacije

V preiskavo je bilo zajetih 1361 preiskovancev, od tega 694 bolnikov in 667 zdravih ljudi. Sodelujoči v raziskavi so izpolnili anketni vprašalnik, s katerim smo pridobili podatke predstavljene v sledečih tabelah. Preiskovance smo razdelili na dve populaciji, in sicer na temnopolto afriško populacijo in populacijo mešanih prednikov ter s Fischerjevim eksaktnim testom preverjali morebitna značilna odstopanja.

Temnopolta afriška populacija

Preglednica VIII: Splošne karakteristike preiskovancev temnopolte afriške populacije

Karakteristika	Zdravi	Bolni	Razmerje obetov (95% I.Z.)*	p-vrednost
Število primerov	383	434	/	/
Histologija				
• Ploščatocelični		381(97,2%)	/	/
• Adenokarcinom		11 (2,8%)		
Spol				
• ženski	247 (64,7%)	211(48,6%)	1,00 (referenca)	
• moški	135 (35,3%)	223(51,4%)	1,93 (1,46-2,56)	<0,01
Starost	59,9 ($\pm 11,3$)	56,4($\pm 15,8$)	/	0,08
Kajenje				
• nekadilec	248(65,3%)	153(35,4%)	1,00 (referenca)	
• kadilec	132 (34,7%)	280(64,6%)	3,44 (2,58-4,59)	<0,01
Uživanje alkohola				
• ne	213(55,6%)	180(41,8%)	1,00 (referenca)	
• da	170(44,4%)	251(58,2%)	1,75 (1,32-2,31)	<0,01
Kraj rojstva I				
• Eastern Cape	183(52,3%)	358(88,4%)	1,00 (referenca)	
• Western Cape	167(47,7%)	47(11,6%)	0,14 (0,10-0,21)	<0,01

Kraj rojstva II				
• mesto	232(61,2%)	114(26,3%)	1,00 (referenca)	
• predmestje	147(38,8%)	319(73,7%)	4,42 (3,28-5,95)	<0,01
Pojav raka v družini				
• ne	318(83,7%)	305(82,7%)	1,00 (referenca)	
• da	62(16,3%)	64(17,3%)	1,08 (0,73-1,58)	0,71

* 95 % I.Z., 95 % interval zaupanja

Pri temnopoliti afriški populaciji opazimo, da se ploščatocelični rak požiralnika pojavlja pogosteje kot adenokarcinom, kar je v skladu z do sedaj objavljenimi študijami [6,8,9]. Ravno tako študija Layke *in sod.* [8] omenja povišan pojav ploščatoceličnega tipa raka pri temnopoliti etnični skupini.

Opazimo tudi statistično pomembno razliko pri pojavljanju raka požiralnika glede na spol, in sicer moški obolevajo za rakom požiralnika do dvakrat pogosteje kot ženske. Takšen rezultat smo pričakovali, saj podatke o povišani pojavnosti raka požiralnika pri moškem spolu podajata tako Register raka Republike Slovenije kot Mednarodna agencija za raziskovanje raka (IARC), ki deluje pod okriljem Svetovne zdravstvene organizacije (WHO).

Pri ugotavljanju vpliva kajenja na pojavnost raka požiralnika rezultati kažejo, da se rak požiralnika pojavlja več kot trikrat pogosteje pri kadilcih kot pri nekadilcih. Pričakovali smo, da bodo kadilci pogosteje obolevali za rakom požiralnika, zato rezultati, ki smo jih dobili, niso presenetljivi. Znano je, da pri kajenju nastajajo kancerogene snovi, ravno tako v študijah zasledimo kajenje kot enega izmed dejavnikov tveganja za razvoj raka požiralnika. Potrebno je opozoriti, da smo pod kadilce šteli tudi osebe, ki so se označile za bivše kadilce, saj se nam je zdelo smiselno, da je tudi kajenje v preteklosti lahko pustilo posledice. Pri tem pa moramo poudariti, da anketa, ki je bila izvedena, ni vsebovala natančnejših podatkov o bivših kadilcih, oziroma ni točno določila, kdo vse se šteje pod bivše kadilce. Tako ne vemo, ali je šlo za nekdanje redne ali samo občasne kadilce, ali so kadili daljše časovno obdobje (na primer 10 let) ali krajše (1 mesec).

Pri vplivu uživanja alkohola opažamo, da se rak požiralnika pojavlja do dvakrat pogosteje pri osebah, ki uživajo alkohol, kot pri osebah, ki alkohola ne uživajo. Rezultat je pričakovani, saj spadajo žgane pijske med dejavnike, ki vplivajo na povišano tveganje za razvoj raka požiralnika. Obdelava vprašalnikov je bila pri ocenjevanju vpliva alkohola

najbolj problematična, saj je bilo očitno, da je bilo opravljenih več različnih anket. Odgovori so bili tako pri nekaterih anketah tipa da/ne, pri drugih so bili odgovori opisnega tipa: občasno, malo, srednje, veliko. Odločili smo se, da pod redno uživanje alkohola zajamemo vse odgovore, kot so: srednje, veliko in odgovor da, za skupino, ki ne uživa alkohola pa smo upoštevali odgovore ne in pa tiste, ki so zapisali, da alkohol uživajo le občasno. Ankete, ki so zahtevale opisne odgovore, niso imele dorečeno, kaj pomeni posamezni opis; tako na primer za odgovor veliko, ne vemo kakšna je količina popitega alkohola na teden. Preiskovanci so se tako subjektivno uvrščali v posamezne skupine. Morda bi bilo smiselno statistično preveriti vse možne odgovore, ki jih ankete predlagajo, vendar menimo, da bi se v tem primeru srečali s problemi pri interpretaciji rezultatov, saj ankete niso določile kaj pomeni na primer občasno uživanje alkohola in bi lahko tako rezultate tolmačili popolnoma subjektivno, poleg tega bi problemi pri interpretaciji nastali tudi zaradi prevelike količine odgovorov in posledično nepreglednega števila rezultatov. Zanimivi so podatki iz raziskav Cook *s sod.* (1971) [21] in Kachala *s sod.* (2010) [6], kjer se omenja vpliv lokalnih žganih pijač, narejenih iz koruze, na povišan pojav raka požiralnika. Te lokalne žgane pijače vsebujejo tudi močno povišane količine svinca; članka nadalje omenjata možnost vpliva težkih kovin na pojav raka požiralnika.

Statistično pomembne razlike se pri temnopolti afriški populaciji kažejo v kraju rojstva, in sicer se rak požiralnika pogosteje pojavlja pri osebah, ki so bile rojene v predmestnem okolju, kot pri osebah, ki so rojene v mestnem okolju. Ravno tako opažamo, da se rak požiralnika pogosteje pojavlja pri osebah rojenih v provinci Eastern Cape, kot pri osebah, rojenih v provinci Western Cape. Povišano pojavnost raka požiralnika pri osebah rojenih v predmestnem okolju si lahko razlagamo kot vpliv revščine na kakovost življenjskih pogojev, in sicer se v predmestjih pojavljajo problemi kot so kakovost hrane (cenejša, bolj mastna hrana, manj sadja, zelenjave), visoka stopnja revščine, brezposelnosti, posledično domnevamo o povišanem uživanju alkoholnih pijač, vprašljiva je tudi dostopnost do zdravstvenih storitev.

Pri podatkih o pojavu raka v družini nismo opazili statistično pomembnih razlik med osebami, kjer se je rak v družini pojavil, in osebami, kjer raka v družini ni bilo.

Populacija mešanih prednikov

Preglednica IX: Splošne karakteristike preiskovancev populacije mešanih prednikov

Karakteristika	Zdravi	Bolni	Razmerje obetov (95% I.Z.)*	p-vrednost
Število primerov	284	260	/	/
Histologija				
• Ploščatocelični		211 (87,9%)	/	/
• Adenokarcinom		29 (12,1%)		
Spol				
• Ženski	194 (68,3%)	90 (34,6%)	1,00 (referenca)	
• Moški	90 (31,7)	170(65,4%)	4,07 (2,85-5,82)	<0,01
Starost	60,5(±10,4)	57,5(±16,6)	/	0,31
Kajenje				
• kadilec	176(62%)	240 (93%)	1,00 (referenca)	
• nekadilec	108(38%)	18 (7%)	0,12 (0,07-0,21)	<0,01
Uživanje alkohola				
• ne	183(64,4%)	79(30,4%)	1,00 (referenca)	
• da	101(35,6%)	181(69,6%)	4,15 (2,90-5,94)	<0,01
Kraj rojstva I				
• Western Cape	235(94%)	218(92%)	1,00 (referenca)	
• Eastern Cape	15(6%)	19(8%)	1,37 (0,68-2,75)	0,38
Kraj rojstva II				
• Mesto	266(97,8%)	241(94,9%)	1,00 (referenca)	
• predmestje	6(2,2%)	13(5,1%)	2,39 (0,90-6,40)	0,08
Pojav raka v družini				
• ne	201(82,3%)	130(60,5%)	1,00 (referenca)	
• da	77(27,7%)	85(39,5%)	1,71 (1,17-2,49)	0,01

* 95 % I.Z., 95 % interval zaupanja

Podobno kot pri temnopolti afriški populaciji tudi pri populaciji mešanih prednikov opažamo, da se ploščatocelični tip raka požiralnika pojavlja pogosteje kot adenokarcinom, kar je v skladu z že objavljenimi študijami.

Tudi pri vplivu spola na tveganje za razvoj raka dobljeni podatki niso presenetljivi, saj sledijo trendom, ki so objavljeni na straneh Mednarodne agencije za raziskave raka. Opažamo, da se rak požiralnika pri moških pojavlja celo štirikrat pogosteje kot pri ženskah.

Pri proučevanju vpliva kajenja opazimo, da se rak požiralnika pogosteje pojavlja pri kadilcih. Enako kot pri temnopolti populaciji lahko sklepamo, da rezultati niso presenetljivi, saj kajenje spada med dejavnike tveganja za razvoj raka požiralnika. Ravno tako kot pri temnopolti populaciji moramo opozoriti na dejstvo, da smo pri obdelavi anketnih vprašalnikov za kadilce smatrali tudi bivše kadilce.

Pri ugotavljanju vpliva uživanja alkohola opazimo, da osebe, ki uživajo alkohol do štirikrat pogosteje zbolijo za rakom požiralnika kot osebe, ki alkohola ne uživajo. Takšen rezultat smo pričakovali, saj alkohol spada med dejavnike tveganja za razvoj raka požiralnika. Tudi tukaj je potrebno tako kot pri temnopolti afriški populaciji opozoriti na slabost anketnih vprašalnikov, kateri niso bili enoznačni in so vsebovali več možnih tipov odgovorov, ravno tako posamezni možni odgovori niso bili točno definirani.

Za razliko od temnopolte afriške populacije, pri populaciji mešanih prednikov ni opaziti spremembe tveganja za nastanek raka glede na kraj rojstva. Razvidno je, da je večina preiskovancev rojena v mestnem okolju in prihaja iz province Western Cape.

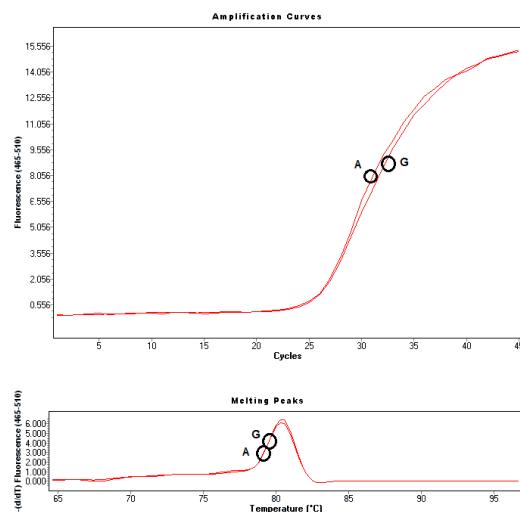
Pojav raka v družini, se je pri populaciji mešanih prednikov izkazal kot dejavnik, ki pomembno poveča tveganje za razvoj raka na požiralniku. Bolezen se namreč, skoraj dvakrat pogosteje pojavlja pri osebah, ki imajo raka v družini, kot pri osebah, kjer raka v družini ni. Sklepamo lahko, da obstaja možnost genske predispozicije za razvoj raka požiralnika pri populaciji mešanih prednikov.

4.2 Rezultati genotipizacije

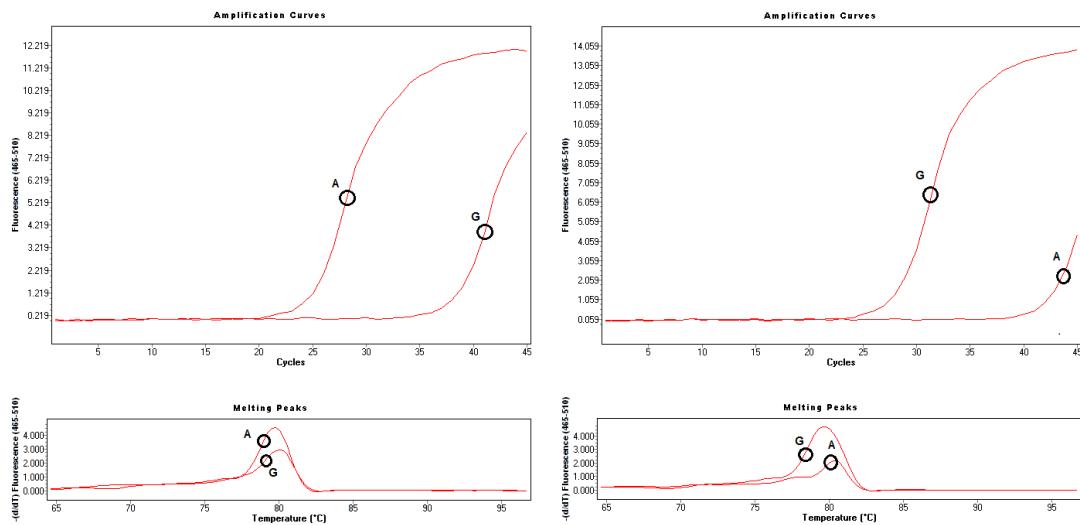
4.2.1 Optimizacija genotipizacije polimorfizma rs184967

Genotipe smo določili z alelno specifično qPCR-metodo. Vzorci so bili v paralelkah pomnoženi enkrat z začetnim oligonukleotidom rs184967_A in enkrat z rs184967_G. V kolikor je bil Cp pri obeh vzorcih enak, smo sklepali, da gre za heterozigot AG (Slika 14). Če je bil eden od Cp-jev občutno nižji od drugega (upoštevali smo razliko vsaj 3 enot), smo sklepali, da gre za homozigot AA ozziroma GG (Slika 15). Vzorcev, kjer sta bile vrednosti Cp za oba alela enake ali višje od 30, nismo upoštevali, saj so namigovali, da v vzorcu ni bilo DNK. Genotipizacijo v teh vzorcih smo ponovili. Pri ponovitvah, kjer so bili rezultati ponovno negativni, smo domnevali, da je DNK v vzorcu razpadla ozziroma izolacija ni bila uspešna. Ravno tako smo ponovili PCR pri vzorcih, kjer sta bili vrednosti Cp-jev različni za 1-3 enote, saj ta razlika ni omogočala zanesljivega genotipiziranja.

Reakcijska mešanica je bila sestavljena po napotkih izdelovalca in na podlagi predhodnih izkušenj, zato je nismo spremajali tekom optimizacije. Smo pa nekajkrat spremenili temperaturo pri protokolu PCR-ja, z namenom, da bi dobili čim boljšo izostritev krivulj talilnih vrhov in čim večjo Cp-razliko med aleloma, ter s tem jasne podatke, kdaj je šlo za homozigota (AA ali GG) in kdaj za heterozigot (AG) (Slike 14 in 15).



Slika 14: Prikaz krivulje podvajanja in krivulje talilnega vrha v primeru heterozigota (AG). Posamezni vzorec smo podvojevali v dveh paralelkah, in sicer enkrat z začetnim oligonukleotidom, ki je bil specifičen za alel A in drugič z začetnim oligonukleotidom, ki je bil specifičen za alel G. V primeru heterozigota se Cp-ja med paralelnima vzorcema nista razlikovala.



Slika 15: Prikaz krivulje podvajanja in krivulje talilnega vrha v primeru homozigota AA (levo) in homozigota GG (desno). Posamezni vzorec smo podvojevali v dveh paralelkah, in sicer enkrat z začetnim oligonukleotidom, ki je bil specifičen za alel A in drugič z začetnim oligonukleotidom, ki je bil specifičen za alel G. V primeru homozigota sta se vrednosti Cp med paralelnima vzorcema razlikovali. V primeru homozigota AA je bila Cp vrednost vzorca, kjer smo pomnoževali z začetnim oligonukleotidom, ki je bil specifičen za alel A, nižja kot Cp vrednost vzorca, kjer smo vzorec pomnoževali z začetnim oligonukleotidom, ki je bil specifičen za alel G (Slika levo). Obratno smo v primeru homozigota GG dobili vrednost Cp pri vzorcu, ki je bil pomnožen z začetnim oligonukleotidom, specifičnim za alel G, nižjo vrednost kot pri paralelnem vzorcu, ki je bil pomnožen z začetnim oligonukleotidom, specifičnim za alel A (Slika desno).

4.2.2 Optimizacija genotipizacije polimorfizma rs1650697

Optimizacija za polimorfizem rs1650697 ni bila uspešna. Dobljene Cp vrednosti niso bile ustrezne, in sicer so se razlike med Cp gibale med 3 in 5, zaradi česar je bilo nemogoče vrednotiti kdaj gre za homozigote in kdaj za heterozigote.

Vzroki neuspešnosti genotipizacije polimorfizma rs1650697 so verjetno začetni oligonukleotidi, ki niso bili dovolj alelno specifični. Genotipizacijo bi bilo zato smiselno ponoviti z novimi začetnimi oligonukleotidi.

Zaradi neuspšne optimizacije metode smo bili nadaljnje raziskave polimorfizma rs1650697 primorani opustiti.

4.2.3 Povezanost polimorfizma rs184967 s tveganjem za razvoj raka požiralnika

Pojavnost genotipov pri različnih populacijah

Preverili smo, ali je polimorfizem v obeh populacijah v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Gre za pravilo, ki nam pomaga pri določanju frekvenc alelov in genotipov v populaciji. Velja, da alelna in genotipska frekvenca v populaciji ostajata enaki iz generacije v generacijo, razen če ni prisotnih motenj; to so mutacije, selekcije, migracije, majhne populacije in tako dalje. Takšne motnje so v naravi vedno prisotne, zato Hardy-Weinbergovo ravnovesje ni možno v naravi. Hardy-Weinbergovo ravnovesje tako predstavlja teoretično osnovno stanje, ki predstavlja bazno linijo in na podlagi katerega lahko vrednotimo odstopanja. Velja, da je populacija, ki je v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, zaprta, se ne razvija in ne prihaja do mutacij.

Ničelna hipoteza: Populacija je v Hardy-Weinbergovem ravnovesju

Alternativna hipoteza: Populacija ni v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Izvedli smo χ^2 -test ter za obe populaciji potrdili, da sta v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (Preglednica X in Preglednica XI).

Preglednica X: Temnopolta afriška populacija

genotip	opazovane frekvence	pričakovane frekvence	p-vrednost
GG	559	558,6	p=0,894 => alternativna hipoteza je ovržena, sprejmemo ničelno hipotezo: populacija je v Hardy-Weinbergovem ravnovesju
AG	146	146,7	
AA	10	9,6	

Preglednica XI: Populacija mešanih prednikov

genotip	opazovane frekvence	pričakovane frekvence	p-vrednost
GG	403	405,4	p=0,210 => alternativna hipoteza je ovržena, sprejmemo ničelno hipotezo: populacija je v Hardy-Weinbergovem ravnovesju
AG	89	84,2	
AA	2	4,4	

Nadalje nas je zanimalo, ali se določeni genotipi statistično različno pojavljajo pri zdravih in bolnih preiskovancih. Izvedli smo Fischerjev eksaktni test, kjer smo testno spremenljivko (genotip) prilagodili glede na spol, starost, kajenje, uživanje alkohola, kraj rojstva I, kraj rojstva II in glede na pojav raka v družini.

Preglednica XII: Pojavnost genotipov pri temnopolti afriški populaciji

genotip	zdravi/bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p-vrednost
• GG	243 (75,9)/316 (80%)	1,00 referenca	
• AG	74 (23,1%)/72 (18,2%)	0,68 (0,44-1,06)	0,09
• AA	3 (1%)/7 (1,8%)	2,94 (0,49-17,63)	0,24

Iz Preglednice XII je razvidno, da se pri temnopolti afriški populaciji genotipa AG in AA glede na GG statistično signifikantno različno ne pojavljata med zdravimi in bolnimi preiskovanci.

Preglednica XIII: Pojavnost genotipov pri populaciji mešanih prednikov

genotip	zdravi/bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p-vrednost
• GG	212(81,3%)/191 (82%)	1,00 referenca	
• AG	49 (18,7%)/40 (17,2%)	0,67 (0,38-1,18)	0,16
• AA	0 (0%)/2 (0,8%)	/	/

Podobno kot pri temnopolti afriški populaciji smo tudi pri populaciji mešanih prednikov (Preglednica XIII) ugotovili, da se genotip AG glede na GG statistično različno ne pojavlja med bolnimi in zdravimi preiskovanci. Pri genotipu AA statistična analiza ni bila mogoča, saj pri kontrolnih primerih pri populaciji mešanih prednikov nismo imeli niti enega primera z genotipom AA.

4.3 Povezava med genotipi in vplivi okolja na tveganje za pojav raka požiralnika

4.3.1 Povezava med genotipi in kajenjem

Temnopolta afriška populacija

Preglednica XIV: Povezava genotipov in kajenja

	nekadilci			kadilci		
genotip	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% IZ.)	p-vrednost	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% IZ.)	p-vrednost
GG	160/118	1,00 (referanca)		81/197	1,00 (referanca)	
AG	53/24	0,48 (0,25-0,90)	0,02	21/48	0,90 (0,46-1,76)	0,75
AA	1/3	6,74 (0,55-82,8)	0,14	2/4	0,82 (0,06-11,04)	0,88

Pri tej analizi smo temnopolto afriško populacijo razdelili na kadilce in nekadilce in pri vsaki skupini ločeno izračunali razmerja obetov za raka na požiralniku. Medtem, ko pri kadilcih ne zasledimo spremenjenega tveganja za raka glede na genotip, pa lahko pri temnopolih nekadilcih opazimo, da ima genotip AG zaščitniški vpliv na razvoj raka. Opazimo namreč, da imajo nekadilci z genotipom AG, dvakrat nižje tveganje za razvoj raka na požiralniku kot temnopolti nekadilci z genotipom GG (Preglednica XIV). Domnevamo, da imajo osebe iz temnopolte afriške populacije, ki ne kadijo in imajo genotip AG, nižje tveganje za razvoj raka požiralnika kot osebe iz temnopolte populacije, ki ne kadijo in imajo genotip GG. Domnevamo tudi, da v kolikor osebe kadijo, se prednost genotipa AG v primerjavi z genotipom GG izniči. Sklepamo torej, da obstaja možnost povezave med vplivom kajenja in genotipom AG na tveganje za nastanek raka požiralnika pri temnopolti afriški populaciji. Sklepamo, da polimorfizem spremeni učinkovitost procesa MMR, in s tem odziv na poškodbe DNK, ki so še posebej pogoste pri kadilcih.

Populacija mešanih prednikov

Preglednica XV: Povezava genotipov in kajenja

	Nekadilci			kadilci		
genotip	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost	zdravi/bo lni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost
GG	89/15	1,00 (referenca)		123/174	1,00 (referenca)	
AG	14/1	0,62 (0,07-5,79)	0,68	35/89	0,68 (0,37-1,22)	0,19
AA	0/1	/	/	0/1	/	/

Pri populaciji mešanih prednikov nismo ugotovili nobene povezave med genotipi in kajenjem na vpliv tveganja za razvoj raka požiralnika (Preglednica XV). Pri izračunu za genotip AA smo imeli na razpolago premalo preiskovancev z genotipom AA, da bi povezavo med kajenjem in genotipom lahko ustrezno statistično ovrednotili.

4.3.2 Povezava genotipov in uživanja alkohola

Temnopolta afriška populacija

Preglednica XVI: Povezava genotipov in uživanja alkohola

	ne uživajo alkohola			uživajo alkohol		
genotip	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost
GG	134/131	1,00 (referenca)		109/183	1,00 (referenca)	
AG	44/33	0,59 (0,33-1,07)	0,08	30/38	0,82 (0,40-1,65)	0,57
AA	1/4	2,71 (0,18-39,72)	0,47	2/3	2,17 (0,18-26,0)	0,54

Pri temnopolti afriški populaciji nismo opazili nobene povezave med genotipi in uživanjem alkohola na tveganje za razvoj raka požiralnika (Preglednica XVI).

Populacija mešanih prednikov

Preglednica XVII: Povezava genotipov in uživanja alkohola

	ne uživajo alkohola			uživajo alkohol		
genotip	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost
GG	141/57	1,00 (referenca)		71/134	1,00 (referenca)	
AG	28/14	1,18 (0,52-2,70)	0,70	21/26	0,44 (0,20-0,93)	0,03
AA	0/1	/	/	0/1	/	/

Pri populaciji mešanih prednikov opazimo statistično signifikantno razliko pri osebah, ki uživajo alkohol, in sicer imajo osebe z genotipom AG, ki uživajo alkohol, nižje tveganje za razvoj raka požiralnika kot osebe z genotipom GG, ki uživajo alkohol (Preglednica XVII). Torej imajo osebe z genotipom GG, ki uživajo alkohol povečano tveganje za razvoj raka požiralnika kot osebe z genotipom AG, ki uživajo alkohol. Glede na to, da tveganje ni različno pri osebah, ki alkohola ne uživajo, lahko domnevamo, da obstaja možnost, da osebe z genotipom GG postanejo bolj dovzetne za razvoj raka požiralnika kot osebe z genotipom AG le v primeru uživanja alkohola. Pri genotipu AA statistična analiza ni bila možna, saj med vzorci zdravih oseb nismo imeli niti ene osebe z genotipom AA.

4.3.3 Povezava med genotipom in rakom v družini

Temnopolta afriška populacija

Preglednica XVIII: Povezava genotipov in pojava raka v družini

	ni pojava raka v družini			pojav raka v družini		
genotip	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p- vrednost
GG	199/233	1,00 (referenca)		42/40	1,00 (referenca)	
AG	66/46	0,47 (0,28-0,77)	<0,01	8/17	3,94 (1,14-13,61)	0,03
AA	3/3	2,18 (0,31-15,4)	0,44	0/2	/	/

Pri temnopolti afriški populaciji opazimo, da je pri osebah z genotipom AG, kjer se rak v družini ne pojavlja, manjše tveganje za razvoj raka kot pri osebah z genotipom GG

(Preglednica XVIII). V kolikor pa se je v družini rak pojavlja, so osebe z genotipom AG kazale višje tveganje za razvoj raka požiralnika kot osebe z genotipom GG. Zakaj je prišlo do takšnih rezultatov je težko komentirati. Statistična obdelava podatkov nakazuje vpliv genotipa AG na spremenjeno dovzetnost za razvoj raka v povezavi s pojavom oz. odsotnostjo raka v družini, vendar pa so za podrobno razumevanje te zapletene povezave potrebne dodatne raziskave. Poleg tega je zbiranja podatkov o pojavu raka v družin, potekalo na osnovi lastne presoje preiskovancev. Prav tako, bi rezultati lahko bili bolj pomenljivi, če bi pri analizi upoštevali samo pojav raka na požiralniku.

Populacija mešanih prednikov

Preglednica XIX: Povezava genotipov in pojava raka v družini

genotip	ni pojava raka v družini			pojav raka v družini		
	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p-vrednost	zdravi/ bolni	razmerje obetov (95% I.Z.)	p-vrednost
GG	148/102	1,00 (referenca)		58/58	1,00 (referenca)	
AG	34/19	0,56 (0,28-1,12)	0,10	15/15	1,12 (0,38-3,36)	0,84
AA	/	/	/	/	/	/

Pri populaciji mešanih prednikov po statistični obdelavi podatkov ne opazimo nobenih signifikantnih razlik. Pri genotipu AA nismo imeli na razpolago nobenih podatkov, zato statistično vrednotenje ni bilo možno.

Zanimivo je odkritje, da je genotip AG polimorfizma rs184967 povezan z vplivi okolja, kot sta npr. kajenje in alkohol. Dejstvo je, da je človeški organizem vsakodnevno izpostavljen dejavnikom okolja, ki povzročajo napake v DNK. Da večina teh napak ne vodi v nadaljnji nastanek raka poskrbijo številni popravljalni mehanizmi (med njimi tudi MMR), ki z odpravljanjem napak poskrbijo, da se le-te ne kopijo v celici in jo s tem obvarujejo pred spremembami v rakovo celico. Glede na rezultate naše raziskave, lahko sklepamo, da polimorfizem rs184967 spremeni aktivnost proteina MSH3, in s tem tudi učinkovitost MMR sistema pri odzivu na povišano pogostost poškodb DNK, kot rezultat vplivov okolja (kajenje, alkohol). Sklepamo torej, da določeni polimorfizmi v genih MMR zmanjšajo učinkovitost MMR sistema in s tem omogočijo okoljskim dejavnikom (kajenje,

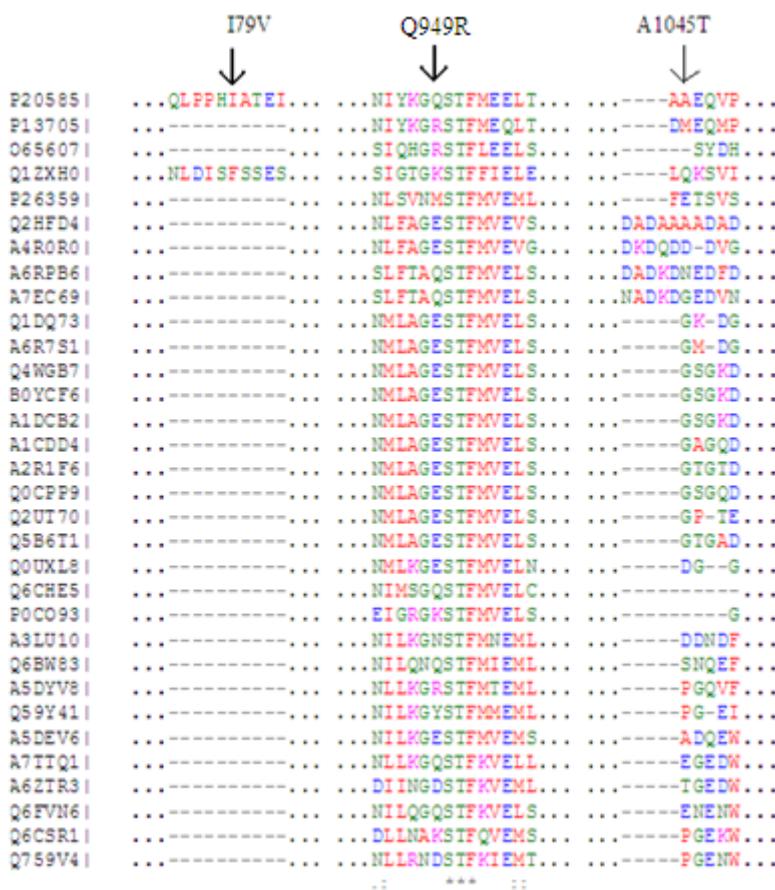
alkohol), da znatno pripomorejo k poškodbam DNK, katere nadalje zaradi znižane učinkovitosti MMR niso več tako dosledno odpravljene.

Iz rezultatov pa lahko tudi sklepamo, da je kljub polimorfizmom v genih MMR, MMR popravljanje dovolj učinkovito, da popravi vsakodnevne napake v DNK pri posameznikih, ki niso izpostavljeni tako hudim okoljskim vplivom, kot sta kajenje in alkohol. Podobno smo odkrili tudi za druge polimorfizme v ostalih genih MMR [33].

4.4 Analiza *in silico*

Z analizo *in silico* smo želeli ugotoviti, ali računalniški algoritmi predvidevajo, da polimorfizem rs184967 (sprememba aminokisline Q949R) v proteinu MSH3 vpliva na funkcijo proteina. Enako smo preverili še za polimorfizem rs1650697 (sprememba aminokisline I79V) in rs26279 (sprememba aminokisline A1045T), ki je predmet predhodnih raziskav. V Preglednici XXIII so prikazana različna zaporedja proteina MSH3, ki smo jih poravnali s pomočjo programa CLUSTALW2, z označenimi polimorfizmi rs184967, rs1650697 in rs26279. Za primerjavo smo vzeli celotna zaporedja naslednjih vrst: *Homo sapiens* (P20585), *Mus musculus* (P13705), *Arabidopsis thaliana* (O65607), *Dictyostelium discoideum* (Q1ZXH0), *Schizosaccharomyces pombe* (P26359), *Chaetomium globosum* (Q2HFD4), *Magnaporthe oryzae* (A4R0R0), *Botryotinia fuckeliana* (A6RPB6), *Sclerotinia sclerotiorum* (A7EC69), *Coccidioides immitis* (Q1DQ73), *Ajellomyces capsulata* (A6R7S1), *Neosartorya fumigata* (B0YCF6), *Neosartorya fischeri* (A1DCB2), *Aspergillus clavatus* (A1CDD4), *Aspergillus niger* (A2R1F6), *Aspergillus terreus* (Q0CPP9), *Aspergillus oryzae* (Q2UT70), *Emericella nidulans* (Q5B6T1), *Phaeosphaeria nodorum* (Q0UXL8), *Yarrowia lipolytica* (Q6CHE5), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D (P0CO93), *Scheffersomyces stipitis* (A3LU10), *Debaryomyces hansenii* (Q6BW83), *Lodderomyces elongisporus* (A5DYV8), *Candida albicans* (Q59Y41), *Meyerozyma guilliermondii* (A5DEV6), *Vanderwaltozyma polyspora* (A7TTQ1), *Saccharomyces cerevisiae* (A6ZTR3), *Candida glabrata* (Q6FVN6), *Kluyveromyces lactis* (Q6CSR1) in *Ashbya gossypii* (Q759V4).

Iz Slike 16 je razvidno, da se sprememba Q949R nahaja v dokaj ohranjenem delu proteina, ki bi lahko predstavljal funkcionalen del MSH3, medtem ko se zamenjavi I79V in A1045T nahajata na področju, kjer je ohranjenost zaporedja nizka. Poravnana zaporedja smo nadalje uporabili pri naslednjih programih: SIFT, AlignGVGD in PolyPhen. Rezultati so podani v Preglednici XX.



Slika 16: Poravnava aminokislinskih zaporedij s programom CLUSTALW2

Preglednica XX: Rezultati *in silico* analize z uporabo programov SIFT, AlignGVGD in PolyPhen

Polimorfizem	AK sprememba	SIFT	AlignGVGD	PolyPhen
rs184967	Q949R	0,43 (tolerated)	GV=184,22 GD=0,00	benign
rs26279	A1045T	0,57 (tolerated)	GV=278,41 GD=0,00	Benign
rs1650697	I79V	0,26 (tolerated)	GV=353,86 GD=0,00	Benign

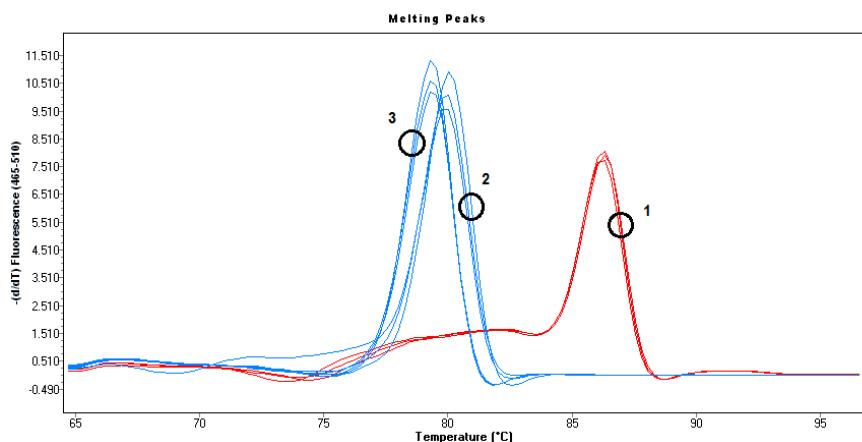
Podatki, ki smo jih pridobili z analizo *in silico* kažejo, da aminokislinske spremembe, ki jih povzročajo izbrani polimorfizmi, ne vplivajo na izgubo funkcije proteina (Preglednica XX). Pri tem upoštevamo, da gre za računalniški program, ki ne more odtehtati laboratorijskega raziskovalnega dela. Nadalje smo želeli preveriti, ali polimorfizem rs184967 (natančneje genotipa GG ali AG) vplivata na izražanje mRNA *MSH3* in ali se izražanje mRNA *MSH3* in *DHFR* razlikuje me zdravim in tumorskim tkivom.

4.5 Izražanje mRNK

4.5.1 Optimizacija ekspresije

Preverjanje uspešnosti qPCR

S pomočjo qPCR smo želeli ugotoviti, ali se gena *MSH3* in *DHFR* različno izražata v rakavih in zdravih tkivih bolnikov. Ekspresijo mRNK genov *MSH3* in *DHFR* smo določali na podlagi primerjave z referenčnim genom *GAPDH*. Vzorce cDNK, ki so bili predhodno pripravljeni iz celokupne RNK, ki je bila izolirana iz sveže-zamrznjenih vzorcev biopsij normalnih in tumorskih tkiv obolelih za rakom požiralnika, smo pomnoževali z reakcijo qPCR, in sicer za vsak gen posebej po tri paralelke. Na spodnji Sliki 17 lahko vidimo grafičen prikaz primera analize talilnih vrhov za en vzorec. Iz slike lahko razberemo, da je bilo pomnoževanje posameznih odsekov cDNK *MSH3*, *GAPDH* in *DHFR* specifično.

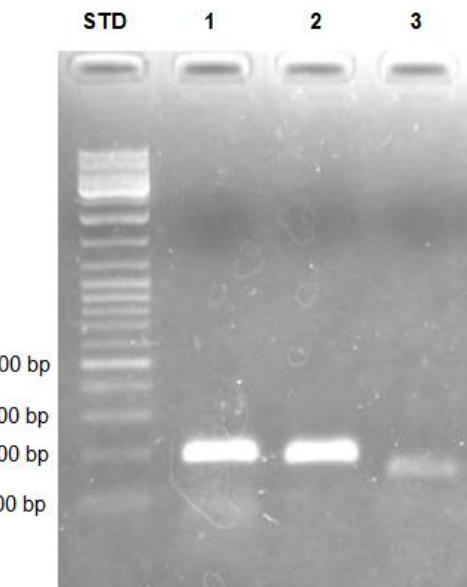


Slika 17: Na sliki je prikazan primer prikaza analize talilnih vrhov na enem izmed preučevanih vzorcev. Iz analize talilnih vrhov lahko vidimo, da so se pomnoževali trije različni produkti v treh paralelkah. Označke: 1=GAPDH, 2=MSH3, 3=DHFR.

Analiza produktov qPCR z elektroforezo na agaroznem gelu

Z analizo produktov qPCR na agaroznem gelu smo se želeli prepričati o velikosti fragmentov, ki smo jih preučevali in s tem dokazati, da gre za točno specifične fragmente. Produkte qPCR in standard z meritno lestvico smo nanesli na agarozni gel in izvedli elektroforezo.

Pri pomnoževanju odsekov cDNK *GAPDH*, *MSH3* in *DHFR* smo pričakovali 171 bp, 152 bp in 126 bp velike fragmente DNK.



Slika 18: Na sliki so prikazane lise fragmentov, ki so bile opazne na gelu pod UV-svetlogo. V prvi koloni je nanesen standard z velikostno lestvico, oznaka 1 predstavlja fragment *GAPDH* (velikost 171 bp), oznako 2, *MSH3* (152 bp); in oznako 3, *DHFR* (126 bp).

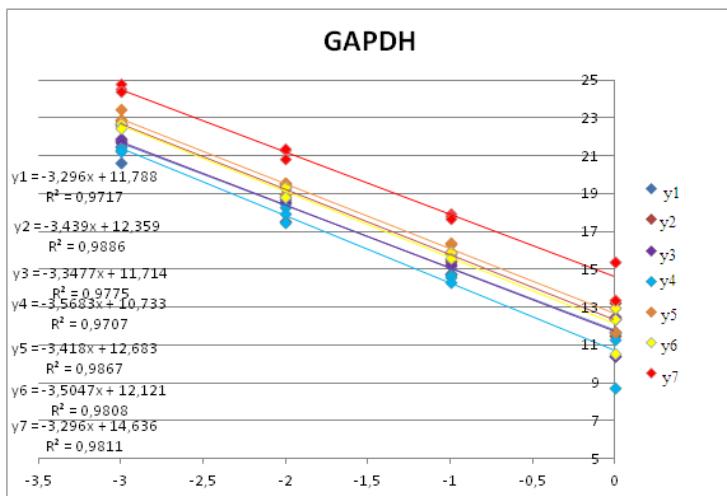
Na podlagi prikazanih rezultatov elektroforeze ugotavljamo, da so bili pomnoženi odseki pravi.

4.5.2 Ugotavljanje učinkovitosti pomnoževanja DNK pri qPCR

Ekspresijo mRNA *MSH3* in *DHFR* v posameznem vzorcu smo želeli določiti glede na količino *GAPDH* v istem vzorcu. Pred tem smo morali izračunati učinkovitosti pomnoževanja *GAPDH*, *MSH3* in *DHFR*.

Dilucijska metoda

Najprej smo učinkovitost (E) računali po dilucijski metodi. Odločili smo se, da najprej izračunamo učinkovitost za *MSH3*, *DHFR* in *GAPDH* v 7 izbranih vzorcih. Iz dobljenih podatkov smo narisali grafe (Grafi 1-3) in iz naklonov premic po enačbi $E=10^{(-1/\text{naklon})}$ izračunali učinkovitosti (Preglednice XXI-XXIII).

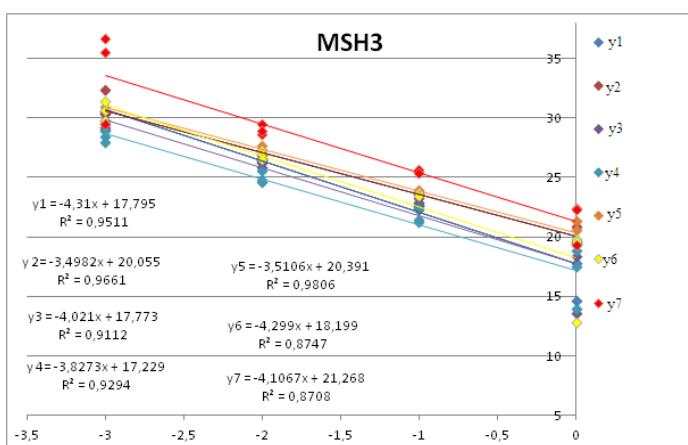
Graf 1: Dilucijska metoda *GAPDH*: $C_p = f(\ln c)$ 

Izračun učinkovitosti iz naklona premice: $E = 10^{(-1/\text{naklon})}$

Preglednica XXI: Prikaz izračunov učinkovitosti qPCR za gen *GAPDH* pri izbranih vzorcih

Vzorec	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7
naklon	-3,296	-3,439	-3,348	-3,568	-3,418	-3,505	-3,296
E	2,0109	1,9534	1,9894	1,9065	1,9614	1,9290	2,0104
R	0,9717	0,9886	0,9775	0,9707	0,9867	0,9808	0,9811

Povprečje $E = 1,9659$

Graf 2: Dilucijska metoda *MSH3*: $C_p = f(\ln c)$ 

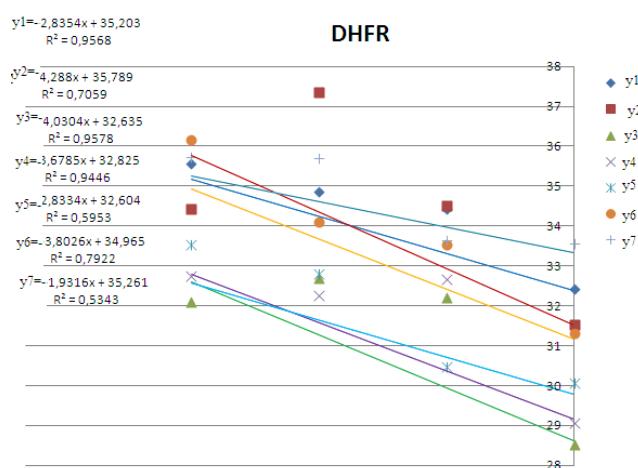
Izračun učinkovitosti iz naklona premice: $E = 10^{(-1/\text{naklon})}$

Preglednica XXII: Prikaz izračunov učinkovitosti qPCR za gen *MSH3* pri izbranih vzorcih

vzorec	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7
naklon	-4,31	-3,498	-4,021	-3,827	-3,511	-4,299	-4,107
E	1,7062	1,9314	1,7729	1,8251	1,9269	1,7085	1,7519
R	0,9511	0,9661	0,9112	0,9294	0,9806	0,8747	0,8708

Povprečje E= 1,803

Graf 3: Dilucijska metoda *DHFR*: Cp=f(ln c)



Izračun učinkovitosti iz naklona premice: $E=10^{(-1/\text{naklon})}$

Preglednica XXIII: Prikaz izračunov učinkovitosti qPCR za gen *DHFR* pri izbranih vzorcih

vzorec	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7
naklon	-2,835	-4,288	-4,030	-3,679	-2,833	-3,803	-1,932
E	2,2526	1,7706	1,7706	1,8700	2,2539	1,8322	3,2939
R	0,9568	0,7059	0,9578	0,9449	0,5953	0,7922	0,5343

Povprečje E= 2,141

Izračuni so pokazali (Preglednice XXI- XXIII), da je učinkovitost metode različna za posamezne gene ter da jo je potrebno upoštevati pri izračunih ekspresije. Dilucijska metoda je izredno zamudna in poteka v več korakih, zaradi česar tvegamo večje število napak pri sami redčitvi reakcijskih mešanic, ter zahteva večje količine vzorcev. Glede na

to, da so nekateri izmed rezultatov presegali vrednost 2, kar je nerealno, in glede na to, da so razlike med učinkovitostmi za isti gen med različnimi vzorci zelo velike, smo se odločili, da učinkovitost izračunamo tudi z metodo povečane fluorescence v eksponentni fazi.

Povečanje fluorescence v eksponentni fazi

Učinkovitosti pomnoževanja posameznih odsekov cDNK smo izračunali za vse analizirane vzorce neposredno iz podatkov, ki smo jih pridobili z reakcijo qPCR. Izmed izračunanih učinkovitosti za *GAPDH*, *MSH3* in *DHFR*, posamično, smo določili povprečja. Rezultati so podani v preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: Rezultati učinkovitosti po metodi povečane fluorescence v eksponentni fazi

Gen	Povprečje vrednosti učinkovitosti	Povprečje standardne deviacije
<i>GAPDH</i>	1,6688	0,018
<i>MSH3</i>	1,6700	0,018
<i>DHFR</i>	1,6831	0,017

Pri povprečju so bile upoštevane vrednosti dobljene pri vseh analiziranih vzorcih.

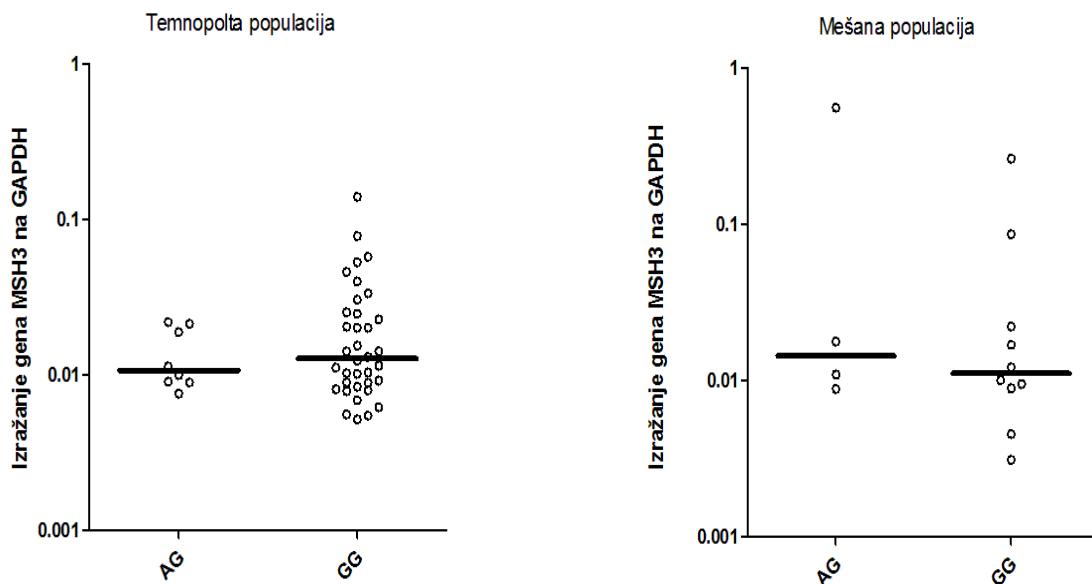
Izračunane vrednosti so nižje od 2, zato domnevamo, da so rezultati realnejši od tistih, ki nam jih je prikazala dilucijska metoda. Dobra stran te metode je tudi v tem, da so podatki pridobljeni iz eksponentne faze. Prav tako kot pri dilucijski metodi, tudi tukaj ni vpliva morebitnih fluorescenčnih šumov v ozadju. V izračunih izražanja mRNA *GAPDH*, *MSH3* in *DHFR* (Enačba 1; Metode) smo zato uporabili te vrednosti. Omenjena metoda je enostavna, poleg tega pa učinkovitost pomnoževanja DNK in izražanje genov računamo iz istih podatkov, ki smo jih pridobili pri qPCR.

V praksi se učinkovitost pomnoževanja DNK razlikuje od vzorca do vzorca. Upoštevanje učinkovitosti ima ogromen vpliv pri natančnosti izračuna rezultatov ekspresije. Že majhna razlika v učinkovitosti med referenčnim in tarčnim genom lahko poda previsoke ali prenizke vrednosti ekspresije tarčnega gena [17]. Podatki, ki jih izračunamo po matematičnih modelih, ki upoštevajo učinkovitost PCR so zato zanesljivejši od podatkov,

ki jih pridobimo brez upoštevanja učinkovitosti. Konstantna učinkovitost v vseh vzorcih nam omogoča, da so tudi primerjave med vzorci zanesljivejše. Vse več strokovnega gradiva opozarja na pomembnost upoštevanja učinkovitosti, vendar je še vedno prevečkrat prezrta.

4.5.3 Vpliv genotipa na izražanje mRNK *MSH3*

Graf 4: Vpliv genotipa na izražanje gena pri temnopolti afriški populaciji (graf desno) in populaciji mešanih prednikov (graf levo)

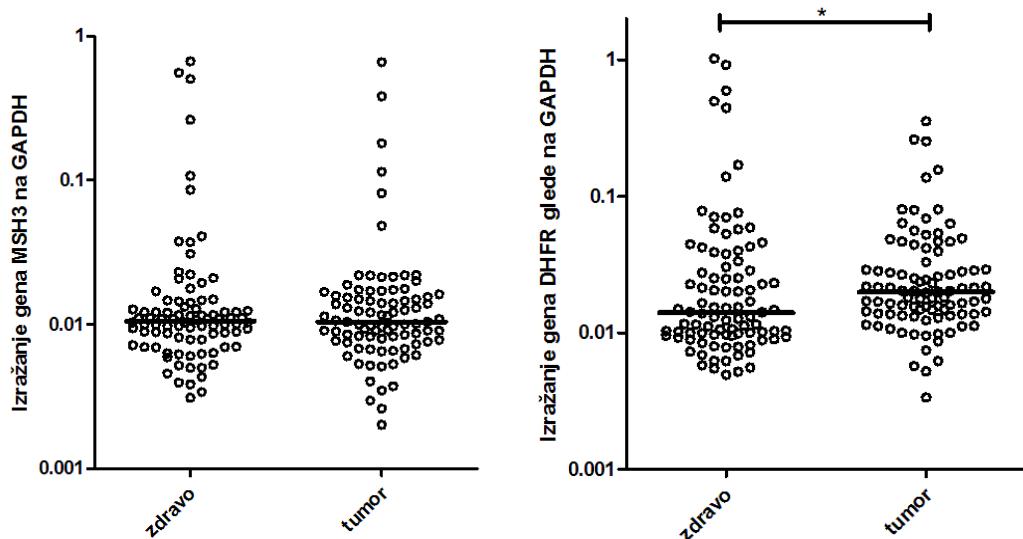


Pri nobeni od populacij nismo opazili, da bi kateri od genotipov polimorfizma rs184967 vplival na izražanje mRNK *MSH3*. Pri izvedbi te raziskave bi bil smiselno analizirati več vzorcev, še posebej tudi tiste z genotipom AA.

4.5.4 Primerjava izražanja mRNK v tumorskem in zdravem tkivu bolnikov

Izračunali smo izražanje mRNA *MSH3* in *DHFR* glede na *GAPDH* v tumorskem in zdravem tkivu v 97 posameznikih z rakom požiralnika. Preiskovanci so bili vzeti iz obeh južnoafriških populacij.

Graf 5: Izražanja mRNA *MSH3* in *DHFR* glede na *GAPDH* v tumorskem in zdravem tkivu.



Izražanje mRNA *MSH3* in *DHFR* je bilo normalizirano glede na *GAPDH*. Središčne vrednosti so naslednje: *MSH3* (zdravo), 0,01058; *MSH3* (tumor), 0,01045; *DHFR* (zdravo), 0,01403; in *DHFR* (tumor), 0,01989. * pomeni statistično pomembno razliko. Statistično pomembnost smo izračunali z Mann-Whitney t-testom.

Za gen *MSH3* (Graf 5 desno) nismo opazili spremenjenega izražanja mRNA med tumorskim in zdravim tkivom.

Izražanje mRNA *DHFR* (Graf 5 levo) je povišano v tumorskih tkivih v primerjavi z normalnimi tkivi pri obolelih. Razlika je statistično pomembna ($P = 0,0126$). Povečano izražanje *DHFR* lahko vodi v odpornost na zdravljenje s kemoterapevtiki, kot je na primer metotreksat [10]. Glede na rezultate naše raziskave, priporočamo previdnost pri zdravljenju teh bolnikov z metotreksatom in kemoterapevtiki s podobnim mehanizmom delovanja. Metotreksat je namreč inhibitor encima dihidrofolat reduktaze (DHFR). Dihidrofolna kislina se tako ne more pretvoriti v aktivno tetrahidrofolno kislino, ki je potrebna za

sintezo timidina. S tem je ovirana izgradnja nukleinskih kislin in posledično proliferacija celic. Povečano izražanje DHFR tako izniči inhibitorni vpliv metotreksata in omogoči odpornost nanj. Za določitev vzrokov povišanega izražanja mRNK gena *DHFR* v tumorskem tkivu je potrebno narediti dodatne raziskave.

5 ZAKLJUČEK

V okviru rezultatov diplomske naloge smo prišli do zaključka, da polimorfizem rs184967 v genu *MSH3* sam ne spremeni tveganja za razvoj raka na požiralniku pri temnopolti afriški populaciji, prav tako tudi ne pri populaciji mešanih prednikov. Zato se na prvi pogled zdi, da polimorfizem rs184967 gena *MSH3* ni bolezenski polimorfizem, kot smo domnevali v hipotezi.

Vendar, ob analizi vplivov povezave genskih in okoljskih dejavnikov na dovzetnost južnoafriških posameznikov za raka na požiralniku, lahko ugotovimo, da polimorfizem rs184967 skupaj z vplivi okolja pomembno spremeni tveganje za razvoj bolezni. Opazili smo namreč, da rs184967 (genotip AG) pri temnopoltih nekadilcih pomembno zmanjša tveganje za razvoj raka, prav tako, isti genotip predstavlja zaščitniški vpliv pri posameznikih iz populacije z mešanimi predniki, ki prekomerno uživajo alkohol. Ugotovili smo tudi, da polimorfizem skupaj s pojavom raka v družini spremeni dovzetnost za raka pri temnopolti populaciji. Rezultati nakazujejo, da bi polimorfizem rs184967 kljub vsemu lahko bil pravi bolezenski polimorfizem, ki spremeni učinkovitost procesa MMR, in s tem odziv na poškodbe DNK, ki so posledica vplivov okolja. Potrdili smo torej hipotezo, da je polimorfizem pri vplivu na tveganje za razvoj raka povezan z dejavniki okolja. Za potrditev naših rezultatov bi morali vpliv polimorfizma potrditi še v kakšni drugi populaciji.

Žal nismo odkrili na kakšen način polimorfizem okvari delovanje procesa MMR. Rezultati analize *in silico* kažejo, da aminokislinske spremembe, ki jih povzročajo izbrani proučevani polimorfizmi, ne vplivajo na izgubo funkcije proteina *MSH3*. Pri nobeni populaciji nismo opazili, da bi kateri od genotipov polimorfizma rs184967 vplival na izražanje mRNK gena *MSH3*. Prav tako nismo opazili spremenjenega izražanja mRNK *MSH3* med tumorskim in zdravim tkivom. Zanimivo, pa je bilo izražanje mRNK *DHFR* v tumorskem tkivu višje kot v normalnem tkivu. Glede na rezultate naše raziskave, priporočamo previdnost pri zdravljenju teh bolnikov z metotreksatom in kemoterapeutiki s podobnim mehanizmom delovanja.

Poleg tega smo potrdili nekatere rezultate drugih raziskav. Bolezen se v obeh populacijah pojavlja pogosteje pri moških kot ženskah. Kajenje in alkohol pa predstavlja večje tveganje za razvoj bolezni.

6 VIRI IN LITERATURA

- [1] Hočvar M, Novaković S, Jezeršek Novaković B, Strojan P, Žgajnar J: Onkologija – Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka; Mladinska knjiga, Ljubljana, 2009: 316-318
- [2] International Agency for Research on Cancer, WHO, GLOBOCAN 2008; Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008; dostopno na: <http://www.globocan.iarc.fr/> (april 2012)
- [3] Rak v Sloveniji 2008, Register raka Republike Slovenije; dostopno na: http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/LP_2008.pdf (april 2012)
- [4] Maligna obolenja prebavil; Doktrina priporočila; dostopno na: <http://www.kclj.si/abdkrg/rak1.pdf> (april 2012)
- [5] Ćeranić D, Veingerl B, Skok P: Naše izkušnje v predoperativni zamejitvi raka požiralnika z endoskopskim ultrazvokom. Zdravstveni vestnik 2006; 75: 21-26
- [6] Kachala R: Systematic review: epidemiology of Oesophageal Cancer in Subsaharan Africa. Malawi Medical Journal 2010; 22: 65-70
- [7] Anderluh F, Šečerov A, Oblak I, Velenik V: Zdravljenje nemetastatskega raka požiralnika. ONKOLOGIJA/pregledi 2007; 2: 106-107
- [8] Layke CJ, Lopez PP: Esophageal Cancer: A Review and Update. American Family Physician 2006; 73: 2187-2194
- [9] Cheung WY, Liu G: Genetic Variations in Esophageal Cancer Risk and Prognosis. Gastroenterol Clin N Am 2009; 38: 75-91
- [10] Li GM: Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell research 2008; 18: 85-98

- [11] Jiricny J: The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews, Molecular cell biology* 2006; 7: 335-346
- [12] Martin A, Scharff MD: AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 605-614
- [13] Vogelsang M: Izdelava modela za funkcionalno analizo različic človeškega gena MLH1 v kvasovki *Saccharomyces Cerevisiae*. Doktorska disertacija 2010: 5-17, 50-51
- [14] Genetics Home Reference; dostopno na: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH3> (april 2012)
- [15] UniProt; dostopno na: <http://www.uniprot.org/uniprot/P20585> (april 2012)
- [16] National Center for Biotechnology Information; dostopno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1650697 (april 2012)
- [17] Pfaffl WM: Relative quantification; Real-time PCR. International University Line: 63-82
- [18] Tavtigian SV, Greenblatt MS, Lesueur F, Byrnes GB: In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum Mutat.* 2008; 29: 1327-1336
- [19] dostopno na: <http://accn.net/Bio/book/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html> (april 2012)
- [20] dostopno na: <http://vizita.si/clanek/bolezni/ste-izpostavljeni-raku-na-poziralniku.html> (april 2012)
- [21] Cook P: Cancer of the Oesophagus in Africa; A Summary and Evaluation of the Evidence for the Frequency of Occurrence, and a Preliminary Indication of the Possible

Association with the Consumption of Alcoholic Drinks Made from Maize. British Journal of Cancer 1971; 25: 853-880

[22] Alves Sanches Dutra L, Godoy Garcia Costa P, Franciele Ribeiro Velasco L, Amorim Amato A, Barcelos Barra G: Allele-Specific PCR Assay to Genotype SNP rs7903146 in TCF7L2 Gene for Rapid Screening of Diabetes Susceptibility. Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52: 1362-1366

[23] Relative Quantification Normalized Against a Reference Gene; dostopno na: http://www3.biorad.com/B2B/vanity/gexp/content.do?BV_SessionID=@@@@0607712052.1337169262@@@@&BV_EngineID=ccccadfgkeiemeeecfngcfkmdhkkdfll.0&root=/Product%20Family/GX/Home&pcatoid=35468&ccatoid=36539&country=US&language=English&BV_SessionID=@@@@0607712052.1337169262@@@@&BV_EngineID=ccccadfgkeiemeeecfngcfkmdhkkdfll.0 (maj 2012)

[24] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögren B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N: The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine 2006; 27: 95-125

[25] Boyer RF: Temelji biokemije; Študentska založba, Ljubljana, 2008

[26] Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ: Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 1991; 252: 1643–1651

[27] dostopno na: <http://www.kapabiosystems.com/products/name/kapa-sybr-fast-qpcr-kits> (maj 2012)

[28] Barber DR, Harmer WD, Coleman RA, Clark BJ: GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues Physiol. Genomics 2005; 21: 389-395

[29] Kumar P, Henikoff S, Ng CP: Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Natural Protocols* 2009; 4: 1073-1082

[30] dostopno na:
<http://www.cmgs.org/BPGs/pdfs%20current%20bpgs/Additional%20file%201%20-%20Web%20Resources.pdf> (maj 2012)

[31] Relative Quantification of Gene Expression; User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystem; december 1997 (obnovljeno oktober 2010)

[32] Drummond J, Genschel J, Wolf E, Modrich P: DHFR/MSH3 amplification in methotrexate-resistant cells alters the hMutS α /hMutS β ratio and reduces the efficiency of base–base mismatch repair. *PNAS* 1997; 94: 10144-10149

[33] Vogelsang M, Wang Y, Veber N, Malagho Mwapaghla L, Parker I: The Cumulative Effects of Polymorphisms in the DNA Mismatch Repair Genes and Tobacco Smoking in Oesophageal Cancer Risk. *PLoS ONE* 2012; 7: e36962