

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA SVOLJŠAK

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI ENCIMOV ZA
DETOKSIFIKACIJO ESTROGENKINONOV PRI
RAKU ENDOMETRIJA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA SVOLJŠAK

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI ENCIMOV ZA
DETOKSIFIKACIJO ESTROGENKINONOV PRI RAKU
ENDOMETRIJA**

**DETERMINATION OF PRESENCE OF ESTROGEN
QUINONE DETOXIFICATION ENZYMES IN
ENDOMETRIAL CANCER**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Neli Hevir, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Janku Kosu in prof. dr. Tei Lanišnik Rižner za kritične pripombe pri pisanju diplomske naloge. Najlepša hvala asist. dr. Neli Hevir za predano znanje, usmerjanje in pomoč v vseh fazah izdelave diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Neli Hevir, mag. farm.

Katja Svolfšak

I. KAZALO VSEBINE

I. KAZALO VSEBINE	III
II. POVZETEK	V
III. ABSTRACT.....	VI
IV. SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 Rak endometrija.....	1
1.1.1 Epidemiologija raka endometrija	1
1.1.2 Rak endometrija tipov I in II.....	1
1.1.3 Dejavniki tveganja in dejavniki zaščite pri razvoju raka endometrija	2
1.1.4 Simptomi in zdravljenje raka endometrija	4
1.2 Vloga estrogenov pri razvoju raka endometrija.....	4
1.3 Metabolizem estrogenov.....	5
1.3.1 Biosinteza estrogenov.....	5
1.3.2 Oksidativni metabolizem estrogenov	6
1.3.3 Učinki metabolitov estrogenov	8
1.3.4 Glutation S-transferaze (GST)	10
1.3.5 NAD(P)H-kinon-oksidoreduktaze.....	11
2 NAMEN DELA.....	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 Materiali.....	13
3.1.1 Vzorci tkiva	13
3.1.2 Kemikalije, topila in standardi	14
3.1.3 Protitelesa in sredstva za blokiranje nespecifične vezave	14
3.1.4 Raztopine, pufri in geli	15
3.1.5 Laboratorijska oprema.....	18
3.1.6 Programska oprema.....	18

3.2	Metode	19
3.2.1	Izolacija proteinov in prenos western.....	19
3.2.1.1	Izolacija proteinov.....	19
3.2.1.2	Merjenje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo.....	20
3.2.1.3	Ločitev proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE).....	21
3.2.1.4	Prenos proteinov na membrano (prenos western).....	21
3.2.1.5	Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL).....	24
3.2.1.6	Računalniška obdelava podatkov in statistična analiza.....	25
3.2.2	Barvanje parafinskih tkivnih rezin.....	26
3.2.2.1	Barvanje parafinskih tkivnih rezin s hematoksilinom in eozinom.....	26
3.2.2.2	Imunohistokemijsko barvanje tkivnih rezin.....	27
3.2.2.3	Ovrednotenje barvanja tkivnih rezin.....	28
4	REZULTATI	29
4.1	Optimizacija metod	29
4.1.1	Optimizacija prenosa western.....	29
4.1.2	Izbira ustreznega načina normalizacije.....	30
4.1.3	Optimizacija imunohistokemijskega barvanja tkivnih rezin.....	32
4.2	Rezultati prenosa western	33
4.2.1	Encima GSTP1 je v rakavem endometriju več kot v kontrolnem tkivu.....	33
4.2.2	Spremenjena porazdelitev izooblik NQO1 pri raku endometrija.....	35
4.3	Rezultati barvanja tkivnih rezin	38
5	RAZPRAVA	42
6	SKLEP	45
7	LITERATURA	46

II. POVZETEK

Rak endometrija je četrto najpogostejše rakavo obolenje pri ženskah v razvitem svetu. Na njegov razvoj pomembno vplivajo estrogeni. Ti preko receptorjev za estrogene stimulirajo proliferacijo celic endometrija, poleg tega pa lahko produkti oksidativnega metabolizma estrogenov, predvsem estrogenkinoni, povzročajo poškodbe DNA. V parnih vzorcih rakavega in okolnega kontrolnega endometrija smo preverili prisotnost dveh encimov, glutation S-transferaze pi 1 (GSTP1) in NAD(P)H-kinon-oksidoreduktaze tipa 1 (NQO1), ki imata pomembno vlogo pri detoksifikaciji metabolitov estrogenov. Z metodo prenosa western smo pokazali, da je količina encimov GSTP1 in NQO1 v rakavem endometriju večja kot v kontrolnem endometriju. Zaznali smo tri izooblike NQO1: NQO1a, NQO1b in NQO1c; med njimi je bilo največ NQO1c. Vse tri izooblike so bile v rakavem tkivu prisotne v večji količini kot v kontrolnem tkivu, najbolj pa je pri tem izstopala NQO1a. Prisotnost GSTP1 in NQO1 v tumorskem endometriju smo potrdili tudi z imunohistokemijskim barvanjem tkivnih rezin. Rezultati naše študije kažejo, da je v okolnem kontrolnem tkivu, ki bi lahko predstavljalo predstopnjo raka endometrija, manj encimov, ki ščitijo celice pred toksičnimi učinki estrogenkinonov. Posledično bi lahko to vplivalo na kopičenje le-teh in s tem na iniciacijo raka endometrija. Naša študija pomembno prispeva k razumevanju biokemije raka endometrija, obenem pa odpira nova vprašanja o vlogi proučevanih encimov, ki bi jih bilo potrebno podrobneje raziskati.

III. ABSTRACT

Endometrial cancer is the fourth most common malignancy in women in developed world. Estrogens play a significant part in development of endometrial cancer; they can stimulate cell proliferation via estrogen receptors and cause DNA damage via their oxidative metabolites, such as estrogen quinones. Two of the estrogen metabolizing enzymes, glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1) and NAD(P)H-quinone oxidoreductase type 1 (NQO1), were studied in paired samples of endometrial cancer and adjacent control endometrium. Both enzymes have an important role in detoxification of estrogen quinones. Higher protein levels of GSTP1 and NQO1 in endometrial cancer tissue was shown by western blot. Three isoforms of NQO1 were observed: NQO1a, NQO1b, and NQO1c; NQO1c was the most abundant. While the levels of all three isoforms were elevated in tumors compared to controls, the increase was the most noticeable in NQO1a. Presence of GSTP1 and NQO1 in cancerous endometrium was confirmed by immunohistochemical staining. Our results show lower levels of protective enzymes in the control adjacent tissue, which may represent a preliminary stage of endometrial cancer. This could result in the accumulation of estrogen quinones and thus the initiation of endometrial cancer. Our study is an important contribution to the understanding of the biochemistry of endometrial cancer, while the role of the studied enzymes needs to be further evaluated.

IV. SEZNAM OKRAJŠAV

16 α -OHE1/E2	16 α -hidroksiestron/estradiol
COMT	katehol-O-metiltransferaza
CYP	citokrom P450
DAB	3,3'-diaminobenzidin
E1	estron
E2	estradiol
ECL	ojačana kemiluminiscenca
GST	glutation S-transferaza
GSTP1	glutation S-transferaza pi 1
HRP	hrenova peroksidaza
Ish	celična linija raka endometrija Ishikawa
K	vzorec kontrolnega nerakavega endometrija
NAD ⁺ /H	oksidirana/reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADP ⁺ /H	oksidirana/reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NQO	NAD(P)H/NRH-kinon-oksido-reduktaza
NQO1	NAD(P)H-kinon-oksido-reduktaza tipa 1
NQO2	NRH-kinon-oksido-reduktaza tipa 2
NRH	dihidronikotinamid ribozid
P	placenta
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PAP	peroksidaza-antiperoksidaza
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. phosphate buffered saline)
PPIA (CYC)	peptidilprolil-izomeraza A (ciklofilin A)
PVDF	polivinilidenfluorid
Q	kinon
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SULT	sulfotransferaza
T	vzorec rakavega endometrija
TBS	pufer s Tris-om in NaCl (angl. Tris buffered saline)
TPBS	fosfatni pufer s polisorbitom 20 (angl. phosphate buffered saline with

	Tween 20)
Tris	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol
TTBS	pufer s Tris-om in polisorbatom 20 (Tween/Tris buffered saline)
UDP	uridin-5'-difosfat, kofaktor (prenašalec heksoz)
UGT	UDP-glukuronoziltransferaza

1 UVOD

1.1 Rak endometrija

1.1.1 Epidemiologija raka endometrija

Rak endometrija oziroma rak maternične sluznice je šesti najpogostejši rak pri ženskah, za katerim vsako leto v svetu zbolijo več kot 288 000 žensk, skoraj 74 000 pa jih umre (1). Med posameznimi regijami obstajajo precejšnje razlike. V državah v razvoju so dejavniki tveganja zaradi drugačnega življenjskega sloga manj pogosti, zato je rak endometrija tam redek (2, 3). V Sloveniji pa je, tako kot v Evropi in ostalem razvitem svetu, najpogostejši ginekološki rak in četrti najpogostejši rak pri ženskah (1). V letih od 2004 do 2008 je bilo v Sloveniji povprečno 28,5 novih primerov na 100 000 žensk, napoved za leto 2011 pa je 29 novih primerov na 100 000 žensk (4), kar nas uvršča v sam svetovni vrh (1, 5). Incidenca raka endometrija je v porastu, kar lahko pripišemo podaljševanju pričakovane življenjske dobe in vse pogostejši debelosti in neaktivnosti prebivalstva, ki vplivata na njegov razvoj (3). Kljub porastu pojavnosti pa se je umrljivost zaradi boljših načinov zdravljenja zmanjšala (6). Izmed vseh žensk v svetu, ki umrejo za rakom, je rak maternične sluznice vzrok smrti v 2,2 % primerov, kar je relativno malo glede na njegovo pogostost (4,8 % vseh rakavih obolenj pri ženskah) (1). Razlog temu je, da velik delež tega raka odkrijejo zgodaj in sicer na podlagi nepravilnih krvavitev. V zgodnjih stadijih, ko je tumor omejen na endometrij, je zdravljenje večinoma učinkovito in prognoza zelo dobra (91-% petletno preživetje), medtem ko znaša skupno petletno preživetje pri bolnicah z rakom endometrija 73 % (7).

Incidenca raka endometrija drastično narašča s starostjo in je najvišja pri ženskah v sedmem desetletju življenja (1, 3). Gre večinoma za bolezen žensk po menopavzi, bolnice pred menopavzo predstavljajo le 20-25 % primerov (7).

1.1.2 Rak endometrija tipov I in II

Razlikujemo med dvema tipoma raka endometrija. Večino primerov predstavljajo tumorji tipa I ali endometroidni adenokarcinomi (7, 8). Razvijejo se preko hiperplazije endometrija, ki je posledica dolgotrajne izpostavljenosti endogenim in eksogenim estrogenom ob hkratnem pomanjkanju zaščitnega delovanja progesterona in posledično porušenega ravnotežja med

proliferacijo in diferenciacijo celic (3, 8). Rak endometrija tipa I je najpogostejši pri mlajših ženskah pred, v in po menopavzi. Njegova prognoza je zaradi dobre do zmerne diferenciacije tumorja in nizke stopnje invazivnosti relativno dobra (7).

Približno 10 % primerov raka endometrija uvrščamo med tumorje tipa II (3). Histološko gre za serozne papilarne ali svetlocelične adenokarcinome (7, 8). Ti se razvijejo v atrofičnem endometriju in čeprav zanje splošno velja, da so neodvisni od estrogenov (3, 7, 8, 9), študije kažejo, da to ne drži v vseh primerih (10). Rak endometrija tipa II je značilen za starejše ženske po menopavzi (7), ki so v povprečju 6 let starejše od pacientk s tumorjem tipa I (9). Tumorji tipa II so slabše diferencirani in bolj agresivni, razvijajo se hitreje, pogosteje se vraščajo v miometrij, zasevajo v bezgavke ter metastazirajo po telesu in imajo zato slabšo prognozo (7).

Raki endometrija tipov I in II se razlikujejo tudi v molekularnih značilnostih in poteku kancerogeneze (7, 8, 9, 11, 12). Nekateri primeri raka endometrija pa izkazujejo značilnosti obeh tipov in predstavljajo vmesne oblike s prekrivajočimi se morfološkimi, kliničnimi, molekularnimi in patološkimi lastnostmi (12). V okviru diplomske naloge smo se osredotočili na raka endometrija tipa I.

1.1.3 Dejavniki tveganja in dejavniki zaščite pri razvoju raka endometrija

Dejavniki tveganja za razvoj raka endometrija so v veliki meri povezani s povečano izpostavljenostjo estrogenom, pri čemer je tveganje odvisno od količine estrogenov in trajanja izpostavljenosti (2, 13; Preglednica I). Zaščitno pa delujejo predvsem tisti dejavniki, ki zmanjšujejo vplive estrogenov (14).

Preglednica I: Dejavniki tveganja in dejavniki zaščite pri razvoju raka endometrija (povzeto po 2, 3, 7, 14, 15)

Dejavniki tveganja	Dejavniki zaščite
debelost	
zgodnja prva menstruacija	
pozna menopavza	
nuliparnost	nosečnost
hormonska nadomestna terapija	kajenje
zdravljenje s tamoksifinom	kombinirani peroralni kontraceptivi
genske predispozicije	fizična aktivnost
sladkorna bolezen	prehrana, fitoestrogeni
sindrom policističnih jajčnikov	
tumorji jajčnikov, ki proizvajajo estrogene	

Pred menopavzo so visoke koncentracije estrogenov in nizka raven progesterona naravno prisotni v proliferativni fazi menstrualnega cikla. Tveganje za razvoj raka endometrija je zato višje pri ženskah z zgodnjo prvo menstruacijo in/ali pozno menopavzo in pri ženskah brez otrok, saj je pri njih skupno število ciklov in s tem izpostavljenost endometrija estrogenom brez nasprotujočega delovanja progesterona večje. V nosečnosti se vzdržuje visoka raven progesterona, obenem pa se zmanjša število menstrualnih ciklov. Oboje naj bi ščitilo pred nastankom raka maternične sluznice, pri čemer je stopnja zaščite odvisna od števila nosečnosti (2, 15). Raven estrogenov in s tem tveganje za razvoj raka endometrija se poveča tudi pri ženskah s tumorjem jajčnikov, ki proizvajajo estrogene, in pri sindromu policističnih jajčnikov. Pri slednjem so pogosti cikli brez ovulacije, posledica katerih je zmanjšano nastajanje progesterona, prisotno pa je povečano nastajanje androgenov, ki se lahko periferno pretvorijo v estrogene (7). Uporaba hormonske nadomestne terapije telo izpostavi eksogenim estrogenom in s tem poveča tveganje, ki pa naj bi bilo ob sočasni uporabi progestagenov vsaj 10 dni v mesecu praktično zanemarljivo (7). Kombinirani peroralni kontraceptivi naj bi zaradi stalnega vnosa progestagenov delovali celo zaščitno (3). Tamoksifen je zdravilna učinkovina, ki jo uvrščamo med selektivne modulatorje estrogenskih receptorjev in se uporablja za zdravljenje raka dojk. Učinkovina ima estrogenu podobne učinke na tkivo endometrija in tako spodbuja nastanek raka maternične sluznice (2). Prekomerna telesna masa (indeks telesne mase nad 25 kg/m^2) je pomemben dejavnik tveganja, ki je prisoten pri skoraj 50 % žensk z rakom endometrija. Pri ženskah s prekomerno telesno maso pred menopavzo so pogosti cikli brez ovulacije in s tem kronično pomanjkanje progesterona (3), po menopavzi pa so koncentracije estrogenov povišane zaradi pretvorbe androgenov v estrogene v adipocitih (2, 3). Dejavnik tveganja, neodvisen od debelosti, je tudi sladkorna bolezen, mehanizmi povezave z razvojem raka pa še niso pojasnjeni (2).

Povečano tveganje obstaja tudi pri posameznicah, ki izhajajo iz družin, v katerih je bila diagnoza te oblike raka že postavljena (3). Prav tako je znana povezava s sindromom dednega nepolipoznega raka debelega črevesa oziroma Lynchevim sindromom II, pri katerem pride do sprememb v popravljalnih mehanizmih DNA. Posledica je visoko tveganje za razvoj različnih oblik raka, med drugim tudi raka endometrija (3, 7, 15).

Kajenje je povezano z zgodnejšim nastopom menopavze in indukcijo jetrnih encimov, ki deaktivirajo estrogene, zato ga štejemo med zaščitne dejavnike (7). Prav tako ugodno vplivata tudi vzdrževanje normalne telesne mase in fizična aktivnost, ki znižata razpoložljivo raven

estrogenov (3). Prehrana z visoko vsebnostjo maščob naj bi negativno vplivala na razvoj raka endometrija (2, 14), medtem ko naj bi fitoestrogeni (14), β -karoten, enkrat nenasičene maščobne kisline, sadje in zelenjava predstavljali zaščito (2), a raziskave vpliva hrane na tveganje za razvoj raka endometrija so precej nedosledne in si pogosto nasprotujejo.

1.1.4 Simptomi in zdravljenje raka endometrija

Najpogostejši simptom je nepravilna krvavitev iz maternice ali krvavitev po menopavzi (15, 16), do 20 % bolnic pa ob diagnozi nima nobenih znakov bolezni (16). Ostali simptomi, kot so bolečine v spodnjem delu trebuha in gnojen ali krvavkast izcedek iz nožnice, se navadno pojavijo ob napredovali bolezni (16).

Najpomembnejši način zdravljenja bolnic z rakom endometrija je operativna odstranitev maternice (histerektomija) ter obeh jajcevodov in jajčnikov (salpingo-ooforektomija) in izpiranje peritoneja medenice (3, 6, 12). Po potrebi se izvede tudi medenična in obaortna odstranitev bezgavk (6). Ostali načini, ki lahko predstavljajo samostojno zdravljenje ali pomožno terapijo so radioterapija, hormonska terapija s progestageni in kemoterapija (3, 12, 15).

1.2 Vloga estrogenov pri razvoju raka endometrija

Kancerogeneza je večstopenjski proces, v katerem genotoksičnim učinkom (inicijaciji) sledi povečana proliferacija celic (promocija). Estrogeni so v tkivih tako ligandi receptorjev za estrogene kot tudi substrati encimov prve faze metabolizma (17). Ta dvojna vloga, v kateri estrogeni simultano povzročajo poškodbe DNA preko produktov oksidacije in stimulirajo proliferacijo celic preko vezave na receptorje za estrogene, vpliva na njihovo zmožnost iniciacije in/ali promocije kancerogenih procesov (18, 19).

Estrogeni preko znotrajceličnih receptorjev vplivajo na prepisovanje tarčnih genov, preko membranskih receptorjev pa na citosolne signalne poti (8, 19, 20). Preko teh mehanizmov spodbujajo delitev celic in zavirajo apoptozo (11), tem učinkom pa nasprotuje progesteron (6). Poleg antiestrogenskih učinkov, ki vključujejo zmanjšanje števila receptorjev za estrogene in povečano metabolično inaktivacijo estrogenov (2), progesteron inducira diferenciacijo celic endometrija in tako nasprotuje mitogenemu delovanju estrogenov (8). Zvišana koncentracija endogenih ali eksogenih estrogenov ob hkratni nižani koncentraciji

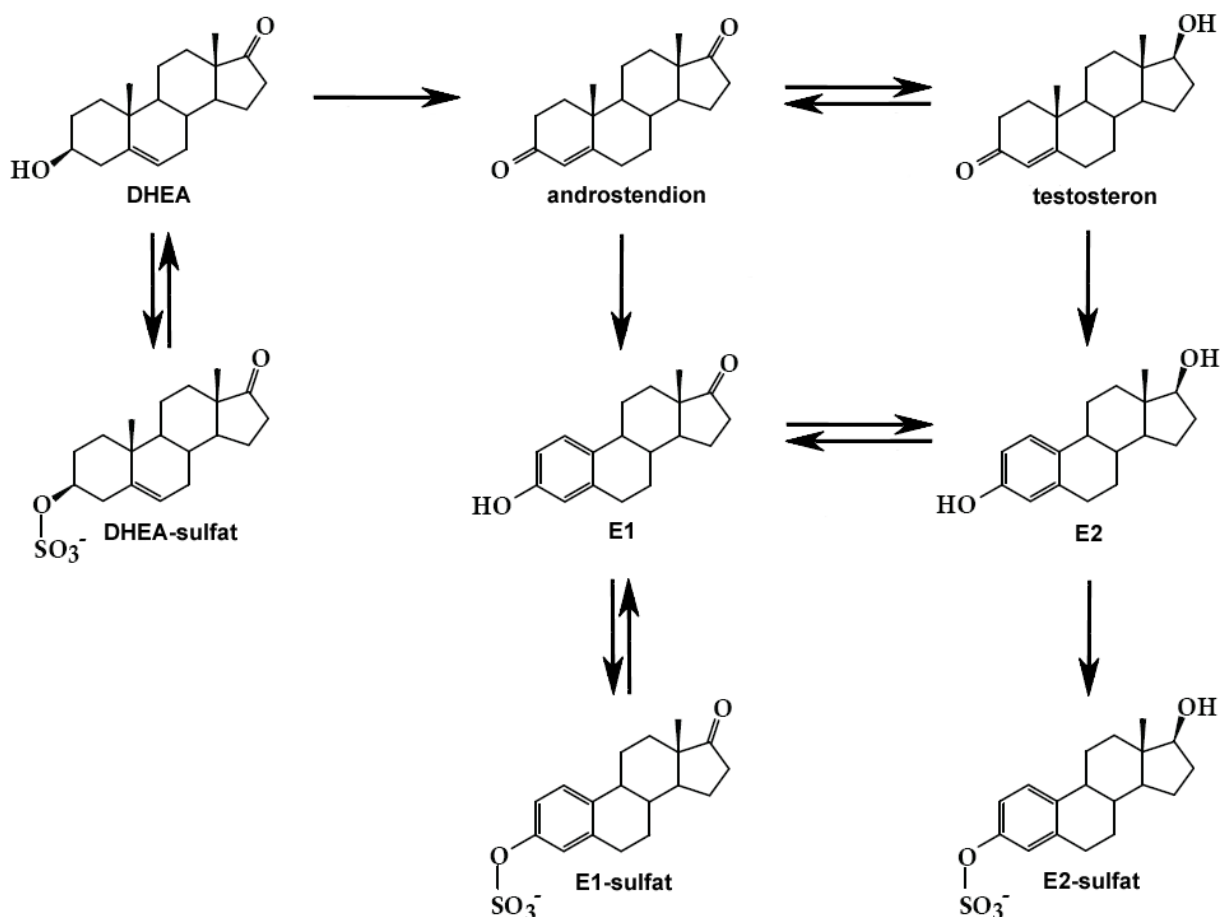
progesterona ali eksogenih progestagenov tako vodi do povečane mitotske aktivnosti endometrijskih celic in s tem večje možnosti naključnih napak pri podvojevanju DNA, ki lahko vodijo do nastanka raka endometrija (8).

Poleg od estrogenov odvisne proliferacije celic pa na nastanek tumorja maternične sluznice vpliva tudi metabolna aktivacija estrogenov v endogene kemične kancerogene, pri čemer se tvorijo reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Pri metabolizmu estrogenov nastajajo reaktivni estrogenkinoni, ki lahko reagirajo z dušikovimi bazami v DNA in tvorijo predvsem N3-adeninske in N7-gvaninske adukte (18). ROS pa lahko povzročajo oksidativne poškodbe makromolekul in porušijo redoks ravnovesje v celicah (21).

1.3 Metabolizem estrogenov

1.3.1 Biosinteza estrogenov

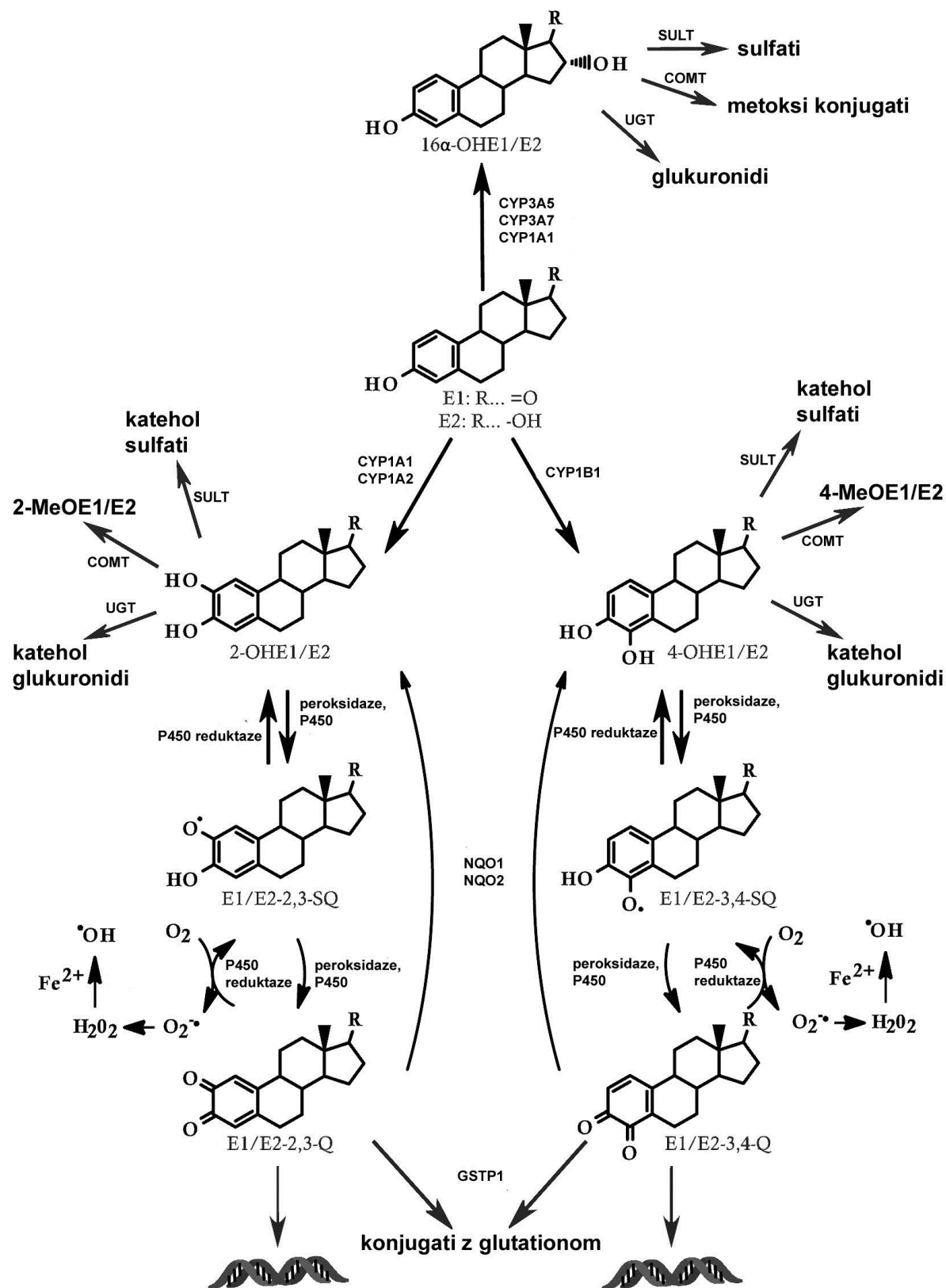
Pri ženskah pred menopavzo poteka sinteza estrona (E1) in estradiola (E2), biološko najbolj aktivnega estrogena, v jajčnikih in perifernih tkivih – v maščobnem tkivu, koži in drugih tkivih. Estrogeni, ki delujejo v določenem tarčnem tkivu, lahko izhajajo iz treh virov: (i) ovarijske sekrecije, (ii) periferne sinteze estronsulfata, ki se v tarčnem tkivu pretvori v aktivno obliko, in (iii) lokalne sinteze estrogenov v tarčnem tkivu (22). Ob odsotnosti ovarijske sinteze v obdobju po menopavzi je možna le še periferna biosinteza (23, 24). Lokalno, v tkivu endometrija, se lahko E2 sintetizira po dveh poteh, aromatazni in sulfatazni (Slika 1). Po aromatazni poti estrogeni nastajajo iz neaktivnih androgenov: dehidroepiandrosteronsulfata in dehidroepiandrosterona, ki izvirata iz nadledvične žleze ter androstendiona in testosterona, ki nastajata v jajčnikih (22, 23, 25). Ključen korak te poti je reakcija aromatizacije obroča A steroidnega skeleta, ki jo katalizira encim aromataza (26). E2 pa lahko nastaja tudi po tako imenovani sulfatazni poti iz E1-sulfata (22, 23, 25). Vsi encimi, potrebni za navedene pretvorbe, so izraženi v endometrijskem tkivu (22). E2 se lahko oksidira do manj aktivnega E1 ali se konjugira s sulfatom, kar vodi v izgubo aktivnosti (8). V nasprotju z ostalimi konjugati, katerih vloga je povečanje vodotopnosti in olajšanje izločanja iz telesa, se pri sulfatiranih estrogenih razpolovni čas precej podaljša (27), kar kaže na to, da imajo v telesu vlogo prekursorjev teh steroidnih hormonov (27, 28).



Slika 1: Lokalna biosinteza estrogenov (prirejeno po 23). DHEA, dehidroepiandrosteron.

1.3.2 Oksidativni metabolizem estrogenov

Estrogeni se metabolizirajo v hormonsko neaktivne ali manj aktivne vodotopne spojine, ki se iz telesa izločajo z urinom in/ali blatom (28). Podvrženi so oksidativnemu metabolizmu na različnih mestih, ki ga katalizirajo različni citokromi P450 (CYP). Pri tem nastajajo predvsem 2- in 4-hidroksilirani metaboliti, imenovani tudi kateholestrogeeni, ter v manjši meri 16 α -hidroksilirani metaboliti (Slika 2) (28, 29), možni pa so še številni drugi (28). Nastanek 16 α -hidroksiestrona/estradiola (16 α -OHE1/E2) katalizirajo različni encimi CYP. Zanje je značilno, da imajo še delno ohranjeno hormonsko aktivnost (28) ter da se deaktivirajo z O-metilacijo, glukuronidacijo ali sulfatacijo (30). Encima CYP1A1 in CYP1A2 katalizirata reakcijo pretežno v smeri nastanka 2-OHE1/E2, CYP1B1 pa skoraj izključno v smeri nastanka 4-OHE1/E2 (24, 30). V jetrih v večji meri poteka metabolizem do 2-OHE1/E2, medtem ko v ekstrahepatičnih tkivih poteka predvsem hidroksilacija do 4-OHE1/E2 (24, 28).



Slika 2: Oksidativni metabolizem estrogenov (prirejeno po 30). SQ, semikinon.

Kateholestrogeni, ki so produkt hidroksilacije A obroča steroidnega skeleta, se v ekstrahepatičnih tkivih v veliki meri O-metilirajo s katehol-O-metiltransferazo (COMT) (27,

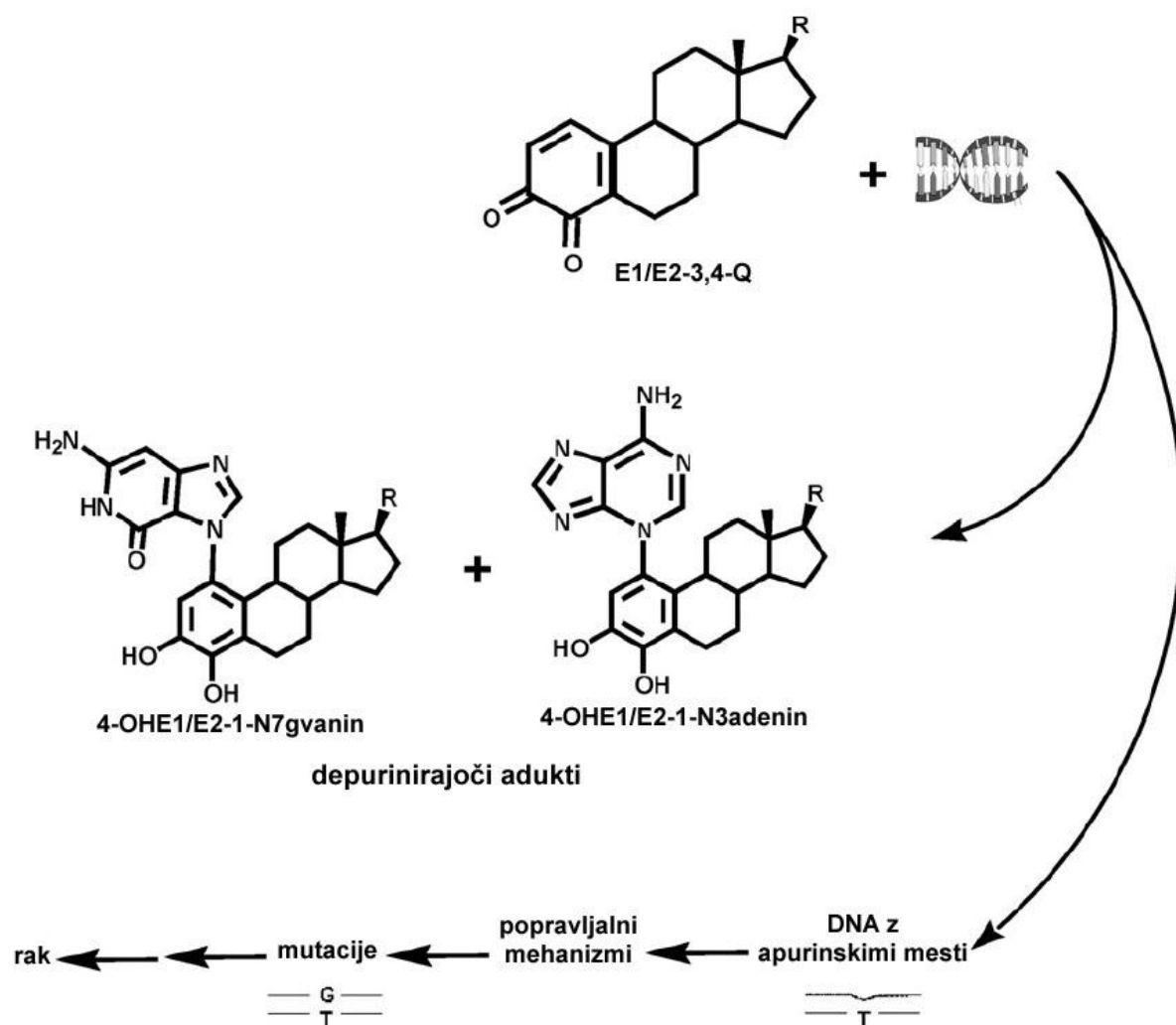
31), možna pa je tudi inaktivacija s sulfotransferazami (SULT) in UDP-glukuronoziltransferazami (UGT), ki katalizirajo konjugacije s sulfatom in glukuronsko kislino (27, 32). Kompetitivna reakcija tem pretvorbam je oksidacija v reaktivne semikinone in kinone (31). Slednji se lahko v reakciji enoelektronske redukcije pretvorijo nazaj v semikinone, ti pa spet oksidirajo do ortokinonov. V tem redoks kroženju nastajajo ROS (30, 31). Kinoni se lahko detoksificirajo po dveh mehanizmih. NAD(P)H-kinon-oksido-reduktaza tipa 1 (NQO1) in dihidronikotinamid ribozid (NRH)-kinon-oksido-reduktaza tipa 2 (NQO2) katalizirata dvoelektronsko redukcijo v enem koraku do ustreznih kateholestrogenov, ki lahko vstopajo v prej naštete reakcije druge faze metabolizma, s čimer ščitita celice pred presežnim nastajanjem ROS in poškodbami DNA (30). Druga pot odstranjevanja kinonov je konjugacija z glutationom (30, 33, 34). Ta lahko poteče spontano ali jo katalizirajo glutation S-transferaze (GST), kar je bolj učinkovito (27, 33). Med encimi GST je glutation S-transferaza pi 1 (GSTP1) najbolj izražena v številnih tkivih, tudi endometriju (30). Če sta procesa deaktivacije estrogenkinonov nezadostna, lahko ti reaktivni elektrofilni reagirajo z DNA (34).

1.3.3 Učinki metabolitov estrogenov

Porušeno ravnovesje med aktivirajočimi in deaktivirajočimi potmi v oksidativnem metabolizmu estrogenov lahko vodi v povečano lokalno sintezo kateholestrogenov in ROS ter tako vpliva na razvoj raka endometrija (30, 34). V redoks kroženju med kinoni in semikinoni namreč z redukcijo O₂ nastaja superoksidni radikal, ki se spontano ali pod vplivom encima superoksid-dismutaze pretvori v vodikov peroksid. Ob prisotnosti Fe²⁺ ionov se iz slednjega generirajo hidroksilni radikali (Slika 2) (20, 31), ki lahko porušijo redoks ravnovesje v celicah (21) in povzročajo oksidativne poškodbe celičnih makromolekul (20, 21).

4-OHE1/E2 in 2-OHE1/E2 so potencialni kancerogeni, vendar pripisujejo močnejši kancerogeni potencial 4-OHE1/E2 (28, 31). Vzrokov temu je več: (i) kateholestrojeni so še vedno aktivni, pri čemer 4-OHE1/E2 delujejo agonistično na receptorje za estrogene, 2-OHE1/E2 pa imajo antiestrogene učinke, (ii) 2-hidroksilirani estrogene se hitreje izločajo iz telesa in deaktivirajo z O-metilacijo, (iii) 2-metoksiestradiol, metabolit 2-OHE2, zavira angiogenezo in proliferacijo celic (28) in (iv) estrogenkinoni, ki nastanejo iz 2- in 4-OHE1/E2, estron/estradiol-2,3-kinoni (E1/E2-2,3-Q) in E1/E2-3,4-Q, so močni elektrofilni in lahko reagirajo s celičnimi nukleofili, tudi dušikovimi bazami v DNA, s katerimi lahko tvorijo stabilne ali depurinirajoče adukte (18, 31, 34). Stabilni adukti ostanejo v DNA verigi ali se

odstranijo s popravljivimi mehanizmi. Depurinirajoči pa se zaradi destabilizacije glikozidne vezi sprostijo iz DNA verige in izločijo iz organizma. E1/E2-3,4-Q tvorijo v primerjavi z E1/E2-2,3-Q več depurinirajočih aduktov z DNA, med njimi prevladujeta 4-OHE1/E2-1-N3adenin in 4-OHE1/E2-1-N7gvanin (Slika 3). Nastala mesta v DNA brez purinskih baz lahko aktivirajo izrezovalne popravljalne mehanizme, preko teh pa se v primeru napačnega popravljanja uvedejo mutacije, ki lahko sprožijo nastanek rakavega obolenja (31, 34).



Slika 3: Reakcije estrogenkinonov z DNA kot pot iniciacije rakavih obolenj (prirejeno po 18, 31, 34)

Dva encima, ki pomembno sodelujeta v detoksifikaciji škodljivih kinonov, sta GSTP1 in NQO1, katerih prisotnost v rakavem in kontrolnem nerakavem endometriju bomo preverjali v okviru te diplomske naloge.

1.3.4 Glutation S-transferaze (GST)

Transferaze katalizirajo prenos funkcionalnih skupin iz ene molekule na drugo (35). Encimi GST so naddružina encimov, ki katalizirajo konjugacijo kosubstrata, reduciranega glutaciona, s številnimi elektrofilni (27). Široko so prisotni v filogenetski vrsti ter se nahajajo v mnogih izooblikah v številnih tkivih, v katerih lahko predstavljajo več kot 10 % citosolnih proteinov. Razdelimo jih v tri skupine: citosolne, mitohondrijske in mikrosomalne oblike. Prvi dve skupini vključujeta topne, tretja pa membransko vezane proteine (36). Pri sesalcih poznamo 6 družin citosolnih GST: alfa, mu, pi, theta, zeta in omega (37). Topni encimi GST so veliki od 45 do 55 kDa (38) in so homo ali heterodimeri (27, 36), katerih podenoti izhajata iz iste družine. Encimi iz družine pi so lahko prisotni tudi kot monomeri in tvorijo interakcije z drugimi proteini (36). Ocenjeno je, da obstaja pri človeku vsaj 20 različnih izooblik GST (27). Med njimi je najpomembnejša GSTP1, ki je prisotna v številnih tkivih in tudi v večini tumorskih celic (27, 39).

GST so encimi druge faze metabolizma, ki detoksificirajo širok nabor reaktivnih elektrofilov preko konjugacije z glutationom - tripeptidom, sestavljenim iz glutaminske kisline, cisteina in glicina. Vpleteni so v metabolizem različnih endogenih substanc kot tudi ksenobiotikov (36), med njimi številnih zdravil (27). Prav tako so vpleteni v sintezo eikozanoidov (prostaglandinov in levkotrienov) (36) in imajo vlogo v intraceličnem transportu steroidnih hormonov (39).

Izražanje *GST* inducirajo policiklični aromatski ogljikovodiki, fenolni antioksidanti, ROS, barbiturati, sintezni glukokortikoidi in številne druge spojine (27). Velik del induktorjev aktivira transkripcijo preko elementa, odzivnega na antioksidante (angl. antioxidant-responsive element), elementa, odzivnega na ksenobiotike (angl. xenobiotic-responsive element), GSTP ojačevalca 1 (angl. GSTP enhancer 1) ali elementa, odzivnega na glukokortikoide (angl. glucocorticoid-responsive element). Za večino induktorjev velja, da so hkrati tudi substrati encimov GST ali da se metabolizirajo v spojine, ki nastopajo kot njihovi substrati. Indukcija GST tako predstavlja adaptacijski mehanizem na obremenjenost celic z elektrofilni (40).

1.3.5 NAD(P)H-kinon-oksido-reduktaze

Oksido-reduktaze so encimi, ki katalizirajo prenos elektronov, navadno v obliki hidridnih ionov ali vodikovih atomov (35). NAD(P)H/dihidronikotinamid ribozid (NRH)-kinon-oksido-reduktaze (NQO) so citosolni flavoproteini, ki katalizirajo prenos dveh elektronov in s tem redukcijo kinonov v hidrokinone. Pri sesalcih poznamo dve kinon-oksido-reduktazi, NQO1 in NQO2, v evbakterijah, glivah in arhebakterijah pa so prisotne še druge poddružine: NQO3, NQO4 in NQO5 (41).

NQO so proteini s flavin adenin dinukleotidom kot prostetično skupino, ki katalizirajo obligatorno dvoelektronsko redukcijo kinonov, kinoniminov, nitroaromatov in azo barvil (42). S tem preprečujejo neželene enoelektronske redukcije, ki generira ROS (43). NQO1 in NQO2 se razlikujeta v potrebnih kofaktorjih. NQO1 uporablja kot elektron donor NAD(P)H, NQO2 pa njegov metabolit NRH (41). NQO1 sodeluje tudi pri odstranjevanju superoksidnih radikalov, čeprav manj učinkovito kot superoksid-dismutaza, ter ima zaščitno vlogo, nepovezano z encimsko funkcijo. Regulira namreč proteasomsko razgradnjo specifičnih proteinov preko interakcije z njimi. Tako stabilizira tumor zavirajoče proteine p53, p73 α in p33 (42).

NQO1 inducirajo številni oksidanti, antioksidanti, ksenobiotiki in UV svetloba (44). Induktorji aktivirajo transkripcijo gena predvsem preko elementa, odzivnega na antioksidante (angl. antioxidant-responsive element) in tako ščitijo pred citotoksičnimi in kancerogenimi učinki (42).

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je proučiti prisotnost encimov GSTP1 in NQO1 v rakavem in kontrolnem nerakavem endometriju. Encima sta vpletena v patogenezo raka endometrija, saj detoksificirata estrogenkinone, ki lahko delujejo kot iniciatorji kancerogeneze. Naša hipoteza je, da je količina encimov v rakavem in nerakavem tkivu različna. Raven encimov bomo preverili z dvema metodama, prenosom western in imunohistokemijskim barvanjem parafinskih rezin tkiva, ki ju bomo predhodno tudi optimizirali za naš namen uporabe.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Vzorci tkiva

Vzorci tkiva, ki smo jih uporabili v naši študiji, so bili zbrani v sodelovanju z Ginekološko kliniko Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (prim. asist. Jasno Šinkovec). Uporabljenih je bilo 45 parov vzorcev rakavega in okolnega kontrolnega nerakavega endometrija bolnic z rakom endometrija (Preglednica II), starih med 27 in 83 let (povprečna starost 62 let), ki so prestale histerektomijo v letih med 2003 in 2010.

Preglednica II: Podatki o bolnicah. Označeni so vzorci žensk pred menopavzo.

Vzorec	Starost ob operaciji (leta)	Diferenciacija*	Vzorec	Starost ob operaciji (leta)	Diferenciacija*
5	39	G2/G3	38	78	G2/G3
7	50	G1	40	71	G1
8	83	G2/G3	42	81	G1
10	53	G1	44	73	G1
11	60	G1	47	27	G1/G2
13	64	G2	49	70	G1
14	73	G2	50	73	G1
18	79	G1	52	75	G2/G3
19	74	G1/G2	53	50	G2/G3
20	76	G2/G3	54	71	G1
21	53	G2	55	75	G2
22	36	G1/G2	56	55	G1/G2
23	45	G1/G2	57	43	G1
24	69	G2/G3	59	48	G1
25	54	G3/CC	61	83	G2
26	72	G1/G2	62	59	G1
27	62	SCE**	63	66	G1/G2
30	54	G1	65	80	G1/G2
31	69	G2/G3	66	72	G1
32	52	G1	68	45	G1
33	77	G3	70	55	G2
34	57	G1	71	48	G1/G2
35	61	G2			

* Diferenciacija po klasifikaciji Mednarodne organizacije za ginekologijo in porodništvo (International Federation of Gynecology and Obstetrics): G1 pomeni dobro, G2 zmerno in G3 slabo diferenciacijo. Tumor se uvrsti v skupino z nižjo diferenciacijo v primeru hudih citoloških atipij (2, 3, 6).

** Serozni cistadenokarcinom endometrija

Vzorci so bili odvzeti s soglasjem pacientk, študija pa je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko. Vzorci so bili po odvzemu do nadaljnje obdelave shranjeni v raztopini za stabilizacijo RNA (RNA Later) pri -20 °C. Diagnozo karcinoma je s histološko preiskavo potrdila izkušena patologinja (prim. asist. Jasna Šinkovec).

3.1.2 Kemikalije, topila in standardi

Kemikalije z večjim vplivom na rezultat so zbrane v spodnji preglednici (Preglednica III).

Preglednica III: Uporabljene kemikalije

Kemikalije	Proizvajalec
Bradfordov reagent (Quick Start Bradford Dye Reagent)	BioRad
bromfenolno modro	BioRad
Coomassiejevo briljantno modro	Sigma
DAB substrat in kromogen	Thermo Scientific
RapidStep ECL Reagent	Calbiochem
eozin	Sigma
floksin	Sigma
hematoksilin	Sigma
s hrenovo peroksidazo označen streptavidin (Precision Protein StrepTactin HRP Conjugate)	BioRad
Pertex® medij za pokrivanje	Mediate
Ponceau S	Sigma
zaviralec proteaz (Protease inhibitor cocktail)	Sigma
proteinska standarda za določevanje molekulskih mas	
▪ Precision Plus Protein WesternC Standards	BioRad
▪ Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas
raztopina za stabilizacijo RNA (RNA Later)	Qiagene
akrilamid/bisakrilamid (Rotiphorese gel)	Roth
goveji serumski albumin	BioRad
TRI Reagent	Sigma

3.1.3 Protitelesa in sredstva za blokiranje nespecifične vezave

Preglednica IV: Protitelesa in sredstva za blokiranje nespecifične vezave

Protitelo/sredstvo za blokiranje	Proizvajalec in kataloška številka
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne
primarna mišja protitelesa proti ciklofilinu A	AbCam, ab58144
sekundarna kozja protitelesa proti mišjim, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Jackson ImmunoResearch, 115-035-146
primarna kunčja poliklonska protitelesa proti GSTP1	AbCam, ab65977

Protitelo/sredstvo za blokiranje	Proizvajalec in katalogska številka
primarna kunčja poliklonska protitelesa proti NQO1	AbCam, ab97385
sekundarna kozja IgG + IgM protitelesa proti kunčjim, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Jackson Immunoresearch, 111-035-045
sekundarna kozja IgG protitelesa proti kunčjim	Jackson Immunoresearch, 111-005-003
kozji serum	Jackson Immunoresearch, 005-000-121
kunčja peroksidaza-antiperoksidaza protitelesa	Jackson Immunoresearch, 323-005-024

3.1.4 Rastopine, pufri in geli

Pufer za lizo celic (angl. lysis buffer; v našem primeru uporabljen za raztapljanje proteinov)

urea	8,4 g
tiourea	3,0 g
3-[(3-holamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat (CHAPS)	0,8 g
bidestilirana voda	do 20 ml

Ločevalni/separacijski 10-% NaDS gel

bidestilirana voda	4,1 ml
1,5 M 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (Tris)-HCl, pH 8,8	2,5 ml
30-% akrilamid/bisakrilamid (Rotiphorese gel)	3,3 ml
10-% natrijev dodecilsulfat (NaDS)	100 µl
amonijev persulfat	100 µl
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	5 µl

Zbiralni/koncentracijski gel

bidestilirana voda	6,1 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
30-% akrilamid/bisakrilamid	1,3 ml
10-% NaDS	100 µl
amonijev persulfat	100 µl
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	10 µl

NaDS pufer

4x Tris-HCl/NaDS, pH 6,8	7 ml
glicerol	3 ml

NaDS	1 g
ditiotritol	0,93 g
barvilo bromfenol modro	1,2 mg

5x elektroforezni pufer

Tris-HCl	15 g
glicin	72 g
NaDS	5 g
destilirana voda	do 1 l

Pred uporabo pufer 5x redčimo.

Pufer za prenos

Tris	3,03 g
glicin	14,4 g
metanol	200 ml
bidestilirana voda	do 1 l

Raztopina barvila Ponceau

ocetna kislina, 100-%	12,5 ml
bidestilirana voda	225 ml
uprašeno barvilo Ponceau S	12,5 mg

Raztopina barvila Coomassiejevo briljantno modro

Coomassiejevo briljantno modro	0,1 %
metanol	40 %
ocetna kislina	10 %

10x pufer s Tris-om in NaCl (TBS)

Tris	24,2 g
natrijev klorid	292,2 g
bidestilirana voda	do 1 l

Sestavine med mešanjem raztopimo v bidestilirani vodi in pH uravnamo na 7,5.

0,1-% pufer s Tris-om in polisorbatom 20 (TTBS)

10x TBS	100 ml
---------	--------

destilirana voda do 1 l
Tween 20 1 ml

5-% mleko

posneto mleko v prahu 2,5 g
0,1-% TTBS do 50 ml

Mayerjev hematoksilin

hematoksilin 12 g
kalijev aluminijev sulfat 200 g
kalijev jodat 0,8 g
citronska kislina 4,0 g
kloralhidrat 200 g
demineralizirana voda 4 l

V polovici vode ob rahlem segrevanju in mešanju raztopimo kalijev aluminijev sulfat in barvilo. Pustimo stati preko noči, naslednji dan dodamo segreti raztopini citronsko kislino, kloralhidrat in jodat. Dodamo ostalo demineralizirano vodo in raztopino med mešanjem hitro ohladimo.

Eozin-floksin

raztopina eozina (1 g eozina v 100 ml demineralizirane vode) 50 ml
raztopina floksina (1 g floksina v 100 ml demineralizirane vode) 5 ml
ocetna kislina 2 ml
etanol, 95-% 390 ml

Tris-EDTA pufer za izpostavitvev antigenov

Tris 1,21 g
EDTA 0,37 g
destilirana voda do 1 l
Tween 20 0,5 ml

Tris pufer za izpostavitvev antigenov

Tris 6,1 g
natrijev klorid 8,8 g

destilirana voda do 1 l

pH uravnamo na 9,0 in nato dodamo Tween 20 (0,5 ml).

10x PBS

natrijev hidrogenfosfat 10,9 g

natrijev dihidrogenfosfat 3,7 g

natrijev klorid 90 g

bidestilirana voda do 1 l

pH uravnamo na 7,4.

Fosfatni pufer s polisorbitom 20 (TPBS)

10x PBS 100 ml

destilirana voda do 1 l

Tween 20 1 ml

3.1.5 Laboratorijska oprema

Preglednica V: Laboratorijska oprema

Oprema	Proizvajalec in model
oprema za vakuumsko koncentriranje in sušenje vzorcev	Speed Vac, Thermo
spektrofotometer	BioTek Sinergy H4
aparatura za NaDS PAGE in prenos western	Mini Trans-Blot, BioRad
usmernik	Sigma Techware
polivinilidenfluoridna (PVDF) membrana	Millipore
optični čitalec	Amersham Biosciences
mikrovalovna pečica	Zanussi
aparatura za detekcijo kemiluminiscence	LAS-4000, Fujifilm
mikroskop	Zeiss AXIO scope A1
fotoapararat	Canon PowerShot G10

3.1.6 Programska oprema

Preglednica VI: Programska oprema

Programska oprema	Proizvajalec
Lab Scan	Amersham Biosciences
Mini Image Reader LAS-4000 V 2.11	Fujifilm
Multi Gauge V 3.2	Fujifilm
GraphPad Prism 6.01	GraphPad software
AxioVision Release 4.8.2	Zeiss

3.2 Metode

3.2.1 Izolacija proteinov in prenos western

Z metodo prenosa western smo semikvantitativno določili količino proteinov GSTP1 in NQO1 v 30 parih vzorcev rakavega in kontrolnega nerakavega endometrija.

3.2.1.1 Izolacija proteinov

Proteine smo izolirali iz vzorcev, iz katerih je bila predhodno že izolirana RNA. Vzorce rakavega in kontrolnega nerakavega endometrija, ki so bili shranjeni v raztopini za stabilizacijo RNA, so predhodno zamrznili v tekočem dušiku in zdrobili v prah ter jih obdelali s TRI Reagent-om (1 ml TRI Reagent-a na 50 – 100 mg tkiva) po navodilih proizvajalca (45). Po dodatku kloroforma in centrifugiranju se je mešanica ločila v tri faze: vodno fazo z RNA, interfazo z DNA in organsko fazo s proteini. Po izolaciji RNA so preostali dve fazi do nadaljnje obdelave shranili pri -20 °C.

Izbrane vzorce smo odtalili in centrifugirali (12000 g, 15 min, 4 °C). Previdno smo odstranili preostalo vodno fazo, nato pa oborili DNA z dodatkom brezvodnega etanola (0,3 ml na 1 ml TRI Reagent-a). Mešanico smo nežno pretresli in inkubirali 3 min pri sobni temperaturi med rahlim stresanjem in jo centrifugirali (2000 g, 5 min, 4 °C). Supernatant smo odpipetirali v centrifugirko in ob tem združili vsebino vseh mikrocentrifugirk, ki so vsebovale isti vzorec. Oborjeno DNA smo ustrezno označili in shranili pri -20 °C. Proteine smo iz supernatanta oborili z izopropanolom (1,5 ml na 1 ml TRI Reagent-a), inkubirali pri sobni temperaturi med rahlim stresanjem 10 min, nato pa centrifugirali (7200 g, 15 min, 4 °C). Supernatant smo odpipetirali in oborjene proteine 20 min spirali z 0,3 M gvanidinijevim kloridom v 95-% etanolu (2 ml na 1 ml TRI Reagent-a) pri sobni temperaturi med rahlim stresanjem. Po centrifugiranju (7200 g, 6 min, 4 °C) smo supernatant odstranili. Postopek spiranja smo še dvakrat ponovili. Oborjene proteine smo spirali še z brezvodnim etanolom (2 ml na 1 ml TRI Reagent-a) 20 min pri sobni temperaturi med počasnim stresanjem. Sledilo je centrifugiranje (7200 g, 10 min, 4 °C). Potem smo supernatant odstranili, centrifugirke pa odprte postavili v aparaturo za koncentriranje in sušenje vzorcev SpeedVac in oborjene proteine pod vakuumom posušili. Sušenje je trajalo približno 30 min. Posušene oborjene proteine smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C, dokler nismo izolirali proteinov iz vseh vzorcev.

Proteine smo raztopili v pufri za lizo (približno 150 μ l na 1 ml TRI Reagent-a, po potrebi tudi več). Raztopino smo prenesli v mikrocentrifugirke, ponovno centrifugirali (2000 g, 1 min, 4 °C) in dvakrat na kratko sonificirali, da smo razbili agregate proteinov. Med posameznima korakoma sonifikacije smo vzorce postavili na led, da ni prišlo do povišanja temperature in denaturacije proteinov. Sledilo je centrifugiranje (2000 g, 3 min, 4 °C).

Raztopinam proteinov smo pomerili koncentracijo (opisano v poglavju 3.2.1.2), dodali zaviralec proteaz (1 μ l na 100 μ l vzorca), premešali z vibracijskim stresalnikom in centrifugirali (3000 g, 15 min, 4 °C). Vzorce smo nato alikvotirali in jih ustrezno označili. Po dva alikvota za skorajšnjo uporabo smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C, preostale, namenjene daljšemu shranjevanju, pa pri -80 °C.

3.2.1.2 Merjenje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo

Koncentracije proteinov smo določili z Bradfordovo metodo, ki temelji na vezavi barvila Coomassiejevo briljantno modro na protein v kislem mediju. Interakcije med barvilom in proteinom so elektrostatske (predvsem z argininom, v manjši meri z lizinom in histidinom) in hidrofobne (s tirozinom, triptofanom in fenilalaninom). Nastali kompleks ima absorpcijski maksimum pri 595 nm, samo barvilo pa pri 465 nm. Metoda je relativna - za določitev koncentracije potrebujemo umeritveno krivuljo (46).

Meritev koncentracije proteinov v vzorcih smo opravili po navodilih proizvajalca Bradfordovega reagenta (BioRad, 47). Vzorce smo pripravili tako, da smo 1 μ l vsake od raztopin proteinov (v primeru slepega vzorca 1 μ l pufra za lizo) dodali 19 μ l bidestilirane vode, dobro premešali na vibracijskem stresalniku in na kratko centrifugirali (20 s). 5 μ l tako pripravljenih vzorcev smo odpipetirali v vdolbine mikrotitrne plošče. Enako smo pripravili tudi raztopine govejega serumskega albumina, standarda za umeritveno krivuljo (0, 1, 3, 5, 7, 9 in 11 μ l 1 mM govejega serumskega albumina in bidestilirana voda do 20 μ l). Vzorcem in standardnim raztopinam smo dodali po 250 μ l na sobno temperaturo ogretega Bradfordovega reagenta in dobro premešali, ob tem pa pazili, da nismo ustvarjali mehurčkov, ki bi motili meritev. Ploščico smo inkubirali 5 min na sobni temperaturi in nato s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 595 nm. Iz izmerjenih absorbanco standardnih raztopin smo narisali umeritveno krivuljo in na podlagi te izračunali koncentracije proteinov v vzorcih.

3.2.1.3 Ločitev proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE)

Elektroforeza je separacijska tehnika, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. NaDS PAGE temelji na uporabi anionskega detergenta NaDS, ki se nespecifično veže na protein in ga pri tem popolnoma denaturira, disulfidne vezi pa moramo prekiniti z dodatkom reducenta. Razmerje med nabojem in dolžino polipeptidne verige v kompleksu z NaDS je enako za vse proteine, zato se ločitev med elektroforezo vrši le na podlagi velikosti molekul (46).

NaDS PAGE smo izvedli na gelu debeline 1,5 mm v aparaturi Mini Trans-Blot (BioRad) po navodilih proizvajalca (48). Gel smo pripravili tako, da smo sestavili stekelca in s preizkusom z vodo preverili ali tesnijo. Pripravili smo ločevalni gel in ga vlili med stekelca do primerne višine, nanj pa nalili 20-% etanol, ki je preprečeval izsušitev gela. Med strjevanjem (približno 35 min) smo pripravili še koncentracijski gel. Odstranili smo etanol in ločevalni gel osušili s filter papirjem, nato pa nanj nalili koncentracijski gel in vstavili glavniček ter pustili, da se strdi (približno 30 min).

Vzorci za elektroforezo smo pripravili tako, da smo volumnu raztopine proteinov, ki je ustrezal 30 µg proteinov, dodali bidestilirano vodo do volumna 10 µl in 6 µl NaDS pufra. Tako pripravljene vzorce smo dobro premešali na vibracijskem stresalniku in jih na kratko centrifugirali (20 s). Vzorce smo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Na vsaki membrani sta bila kot pozitivni kontroli tudi nanosa proteinskih frakcij placente in celične linije raka endometrija Ishikawa. Vzorce teh smo pripravili na enak način, le da smo pri Ishikawi uporabili 15 µg proteinov in inkubirali 10 min pri 95 °C.

Nosilec z gelom smo vstavili v elektroforezno kadičko, odstanili glavniček in v kadičko nalili elektroforezni pufer. Na gel smo nanесли vzorce in proteinska standarda za določevanje molekulskih mas ter kadičko obdali z ledom. Ločevanje vzorcev na gelu je potekalo pri napetosti 200 V, dokler ni fronta dosegla dna gela (približno 40 min).

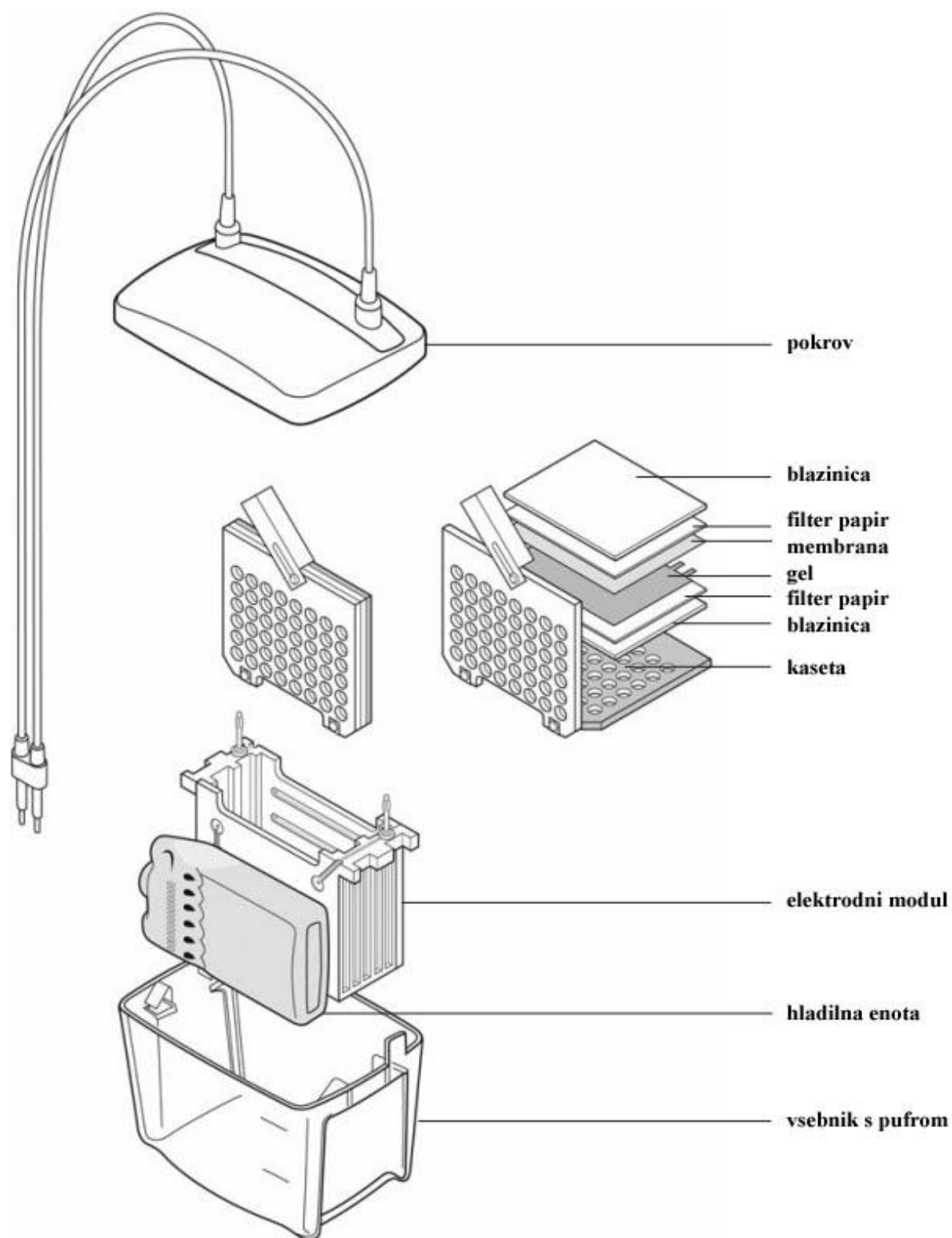
3.2.1.4 Prenos proteinov na membrano (prenos western)

Prenos western je prenos proteinov iz gela na membrano, izvaja pa se z namenom imunološke detekcije proteinov po elektroforezi. Protitelesa so velike molekule, zato je hitrost njihove difuzije skozi poliakrilamidni gel zelo majhna in posledično neposredna inkubacija gela v raztopini protiteles ni najbolj uspešna. Proteine tako prenesemo na membrano, na katero se

vežejo preko močnih hidrofobnih interakcij. Nezasedena mesta na membrani blokiramo ter jo inkubiramo najprej v primarnih protitelesih proti iskanemu proteinu, nato pa v ustrezno označenih sekundarnih protitelesih, ki se vežejo na Fc-regijo primarnih protiteles (46).

Za prenos western smo uporabili aparaturo Mini Trans-Blot (BioRad) in postopek izvedli po navodilih proizvajalca (48). Že med potekom NaDS PAGE smo izrezali PVDF membrano in filter papir v velikosti gela. Aktivirali smo membrano: za 15 s smo jo potopili v metanol, zatem za 2 min v bidestilirano vodo, nato pa v pufer za prenos, v katerem smo jo pustili do uporabe. Po končani elektroforezi smo ločili stekelci od gela. Koncentracijski gel smo odrezali in zavrgli, ločevalni gel pa potopili v pufer za prenos. Prav tako smo v ta pufer namočili blazinici, ki sta priloženi aparaturi, tik pred namestitvijo pa tudi filter papir. Kaseto smo sestavili, kot je prikazano na sliki (Slika 4), ob tem pa pazili, da se med plasti niso ujeli zračni mehurčki. Kaseto smo zaprli in jo pravilno glede na smer toka vstavili v aparaturo. Prelili smo z dobro ohlajenim pufrom za prenos ter dodali magnet za mešanje in hladilno enoto. Kadičko smo obdali z ledom in postavili na magnetno mešalo. Prenos je potekal pri napetosti 100 V med stalnim mešanjem 1 h, pri čemer smo ga po 30 min ustavili in kaseti zamenjali med seboj, da smo zagotovili enake pogoje prenosa za oba gela.

Po končanem prenosu smo vizualizirali proteine, prenešene na membrano, in tiste, ki so ostali na gelu. Membrano smo 5 min inkubirali v raztopini barvila Ponceau med rahlim stresanjem, nato pa jo sprali z destilirano vodo in skenirali. Spirali smo jo s TTBS dvakrat po 5 min oziroma do razbarvanja. Gel smo med rahlim stresanjem barvali 5 min z raztopino barvila Coomassiejevo briljantno modro, nato pa ga spirali v 7-% očetni kislini dokler se ni ozadje razbarvalo. Ob tem smo očetno kislino večkrat zamenjali. Nato smo gel skenirali.



Slika 4: Aparatura za prenos western (prirejeno po 49)

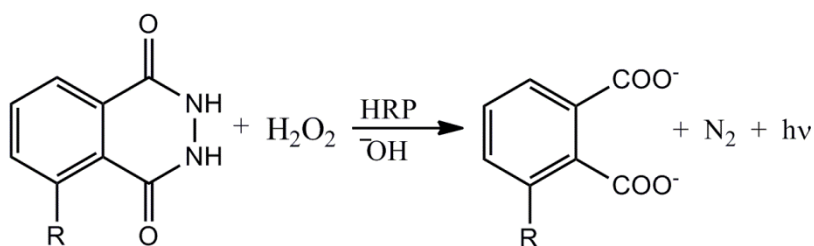
Membrano smo 2 h blokirali v 5-% mleku pri sobni temperaturi ob počasnem stresanju. S tem smo preprečili nespecifično vezavo protiteles na nezasedena mesta na membrani. Sledila je inkubacija s primarnimi protitelesi proti ciklofilinu A (peptidilprolil-izomeraza A; CYC

oziroma PPIA), ki je bil na podlagi predhodnih študij izbran za referenčni protein (29). Uporabljena so bila mišja protitelesa proti PPIA (1:1000) v 1-% raztopini mleka v TTBS (enako raztopino mleka smo uporabili za redčenje vseh protiteles). Inkubacija je potekala preko noči pri 4 °C ob počasnem stresanju. Primarna protitelesa smo odlili in membrano spirali s TTBS (4 x 5 min) pri sobni temperaturi med hitrejšim stresanjem. Sledila je inkubacija s sekundarnimi protitelesi. To so bila kozja protitelesa proti mišjim (1:5000), konjugirana s HRP. Dodali smo še s HRP označen streptavidin za zaznavo proteinskih standardov (predhodno redčen 1:10 s TTBS; 1 µl na 10 ml raztopine protiteles). Inkubacija je potekala 2 uri pri sobni temperaturi ob počasnem stresanju. Po ponovnem spiranju s TTBS (4 x 5 min) pri sobni temperaturi ob hitrejšem stresanju smo detektirali ciklofilin po postopku, opisanem v nadaljevanju. Po detekciji smo membrano spet spirali s TTBS ob stresanju pri sobni temperaturi (4 x 5 min).

Postopek smo ponovili še za imunodetekcijo encimov GSTP1 oziroma NQO1. Membrane smo inkubirali preko noči pri 4 °C med počasnim stresanjem v primarnih kunčjih protitelesih proti GSTP1 (1:300) oziroma primarnih kunčjih protitelesih proti NQO1 (1:3000). Spet je sledilo spiranje s TTBS in inkubacija v sekundarnih, s HRP konjugiranih kozjih protitelesih proti kunčjim (1:10000), katerim smo dodali 1 µl streptavidin-HRP. Inkubacija je potekala 2 uri pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Po ponovnem spiranju s TTBS je sledila detekcija.

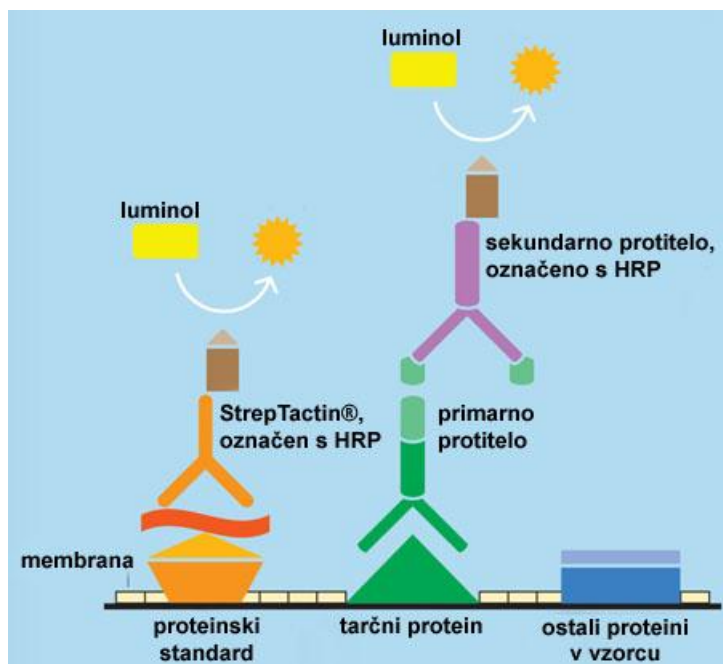
3.2.1.5 Detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ECL)

Pri kemiluminiscenci gre za pretvorbo kemične energije v svetlobno (50). Ob reakciji med kemiluminiscentno molekulo (luminolom) in vodikovim peroksidom se sprošča svetloba (Slika 5). Reakcijo katalizira HRP, vezan na sekundarno protitelo (Slika 6). Intenzivnost svetlobe se poveča ob prisotnosti ojačevalcev (51).



Slika 5: Reakcija ECL detekcije med luminolom (R...-NH₂) in vodikovim peroksidom, katalizirana s HRP (prirejeno po 51)

Proteine smo identificirali na podlagi njihove velikosti z uporabo proteinskih standardov Precision Plus Protein WesternC. Ti so označeni z zaporedjem Strep-Tag®, sinteznim peptidom iz osmih aminokislin, ki ob dodatku sinteznega streptavidina StrepTactin®, označenega s HRP, omogoča njihovo detekcijo z ECL (Slika 6) (52).



Slika 6: ECL detekcija proteinskih standardov in tarčnih proteinov pri prenosu western (prirejeno po 53)

Sprano membrano smo položili na ravno površino in enakomerno popršili z reagentom RapidStep ECL Reagent. Po eni minuti smo jo vstavili v prozorno plastično mapo in pri tem pazili, da se med mapo in membrano niso ujeli zračni mehurčki. Z detektorjem LAS-4000 smo opravili meritev oddane svetlobe. Po detekciji smo membrano sprali s TTBS (4 x 5 min) in uporabili za detekcijo drugih proteinov ali pa jo posušili na zraku in shranili zaščiteni pred vlago.

3.2.1.6 Računalniška obdelava podatkov in statistična analiza

Rezultate detekcije smo zajeli s programom Image Reader LAS-4000. Signale, zajete ob detekciji, pa tudi tiste iz gelov in membran smo glede na intenziteto ovrednotili s programom Multi Gauge.

Signali na različnih membranah se lahko razlikujejo v stopnji; ta odstopanja smo zmanjšali z uporabo vzorcev placente (P) in celične linije Ishikawa (Ish). Ti vzorci so služili kot pozitivna kontrola, hkrati pa tudi kot zunanji standardi na vsakem gelu in membrani. Za normalizacijo

signalov ECL detekcije se običajno uporabljajo referenčni proteini (v našem primeru je bil to PPIA), ki so interni standardi in so hkrati pokazatelji nanosa na gel, prenosa na membrano in stanja proteinov (npr. morebitnega razpada proteinov). Drug način normalizacije pa je z upoštevanjem celokupne količine proteinov v vzorcu, na katero lahko sklepamo iz signalov barvanja membran in gelov. Preverili smo normalizacijo na referenčni protein PPIA, na celokupno količino proteinov na membrani in na celokupno količino proteinov, ki so ostali na gelu po prenosu na membrano ter jih primerjali med seboj in izbrali najustreznejšo metodo. Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili s programom GraphPad Prism 6.01. Pri tem smo uporabili neparametrični t-test (Wilcoxonov test) za parne vzorce z dvostranskim tveganjem in stopnjo zaupanja 0,95.

3.2.2 Barvanje parafinskih tkivnih rezin

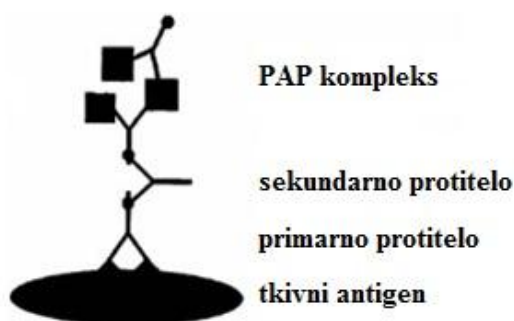
Parafinske rezine rakavega in kontrolnega nerakavega endometrija so nam odstopili na Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (prim. asist. Jasna Šinkovec). Uporabili smo 26 tkivnih rezin rakavega endometrija. Na 5 preparatih smo imeli poleg rakavega endometrija tudi tkivo okolnega kontrolnega nerakavega endometrija. Z imunohistokemijskim barvanjem parafinskih tkivnih rezin smo vizualizirali porazdelitev encimov GSTP1 in NQO1 v rakavem in kontrolnem tkivu endometrija ter ovrednotili intenziteto obarvanja.

3.2.2.1 Barvanje parafinskih tkivnih rezin s hematoksilinom in eozinom

Tkivnim rezinam, fiksiranim na objektivnih stekelcih, smo odstranili parafin s ksilenom (2 x 4 min) in jih hidrirali z namakanjem v etanolu padajočih koncentracij (100-%, 96-% in 70-%, v vsakem 5 min) in destilirani vodi (3 min). Rezine smo nato inkubirali v Mayerjevem hematoksilinu (6 min) in spirali v mlačni vodi (5 min), ki smo jo vmes enkrat zamenjali. Sledilo je še spiranje v demineralizirani vodi (1 min) in 80-% etanolu (1 min), nato pa barvanje v raztopini eozin-floksina (2 min). Tkivne rezine smo potem inkubirali v 96-% (2 min), nato pa še v brezvodnem etanolu (2 + 5 min) in ksilenu (2 x 4 min) ter jih pustili v digestoriju, da so se posušile. Na tkivo smo kanili malo medija za pokrivanje Pertex® in namestili krovno stekelce, počakali, da se je lepilo posušilo, in preparate označili.

3.2.2.2 Imunohistokemijsko barvanje tkivnih rezin

Namen imunohistokemijskega barvanja tkivnih rezin je s pomočjo specifične reakcije med izbranim antigenom in označenimi protitelesi identificirati določeno tkivno komponento (v našem primeru NQO1 in GSTP1) in vizualizirati njeno porazdelitev. Pri tem smo uporabili metodo s kompleksom peroksidaza-antiperoksidaza (PAP). Ta temelji na kompleksu encima peroksidaze in antiperoksidaznega protitelesa, ki je enakega izvora kot primarno protitelo. Antiperoksidazno protitelo in primarno protitelo, usmerjeno proti tkivnemu antigenu, lahko povežemo preko sekundarnega protitelesa (Slika 7). Metoda s kompleksom PAP zaradi dodatne stopnje omogoča ojačitev signala (52).



Slika 7: PAP metoda (prirejeno po 52)

Iz tkivnih rezin smo s ksilenom odstranili parafin (2 x 5 min) in jih hidrirali z namakanjem v etanolu padajočih koncentracij (100-%, 96-%, 80-% in 70-%, v vsakem 5 min) in destilirani vodi (5 min). Nato smo vzorce spirali s TPBS med počasnim stresanjem (5 min). Endogene peroksidaze smo 40 min med stresanjem blokirali z 0,9-% raztopino vodikovega peroksida v TPBS, nato pa ponovno spirali s TPBS (5 min). V naslednji stopnji smo izpostavili antigene. Uporabili smo 0,01 M raztopino natrijevega citrata (pH 6), s katero smo prelili tkivne rezine v stekleni kadički, vse skupaj segreli do vrenja v mikrovalovni pečici in nato inkubirali 30 min med stalnim vrenjem, ob tem pa po potrebi dolivali raztopino. Po 30 min ohlajanja smo 5 min spirali s TPBS med rahlim stresanjem, nato pa stekelce po robovih obrisali in pri tem pazili, da se nismo dotaknili tkiva. Na vsako tkivno rezino smo nanесли 100 µl blokirne raztopine (5-% kozji serum v TPBS) in jo pokrili s kosom parafilma, ob tem pa pazili, da vmes nismo ujeli mehurčkov zraka. Tkivne rezine smo v blokirni raztopini inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Serum smo odstranili in na rezine nanесли 100 µl primarnih kunčjih protiteles proti GSTP1 (1:20) oziroma proti NQO1 (1:200) v 5-% kozjem serumu, na negativno kontrolo pa le 5-% kozji serum. Tkivne rezine smo prekrili s parafilmom. Inkubacija v

primarnih protitelesih je potekala preko noči pri 4 °C v vlažni komori. Stekelca smo nato spirali s TPBS (2 x 5 min) med rahlim stresanjem, robove previdno obrisali in na tkiva nanесли 100 µl sekundarnih kozjih protiteles proti kunčjim (1:100 v TPBS). Inkubacija je potekala 1 uro v vlažni komori na sobni temperaturi. Ponovno smo spirali s TPBS (2 x 5 min), nato pa na rezine nakapljali 100 µl kunčjih PAP protiteles (1:500) v 0,05 M Tris-HCl in inkubirali 30 min v vlažni komori pri sobni temperaturi. Po spiranju s TPBS (2 x 5 min) smo obrisali robove stekelc in na tkivne rezine nanесли 100 µl mešanice substrata DAB in kromogena (20 µl DAB kromogena na 1 ml DAB substrata (55)), ki smo jo pripravili tik pred uporabo. Inkubacija je potekala do zadostnega obarvanja tkivnih rezin oziroma do začetka obarvanja kontrolnih rezin, vendar največ 15 min. Reakcijo smo ustavili tako, da smo stekelca spirali z destilirano vodo (2 x 5 min). Sledila je inkubacija v hematoksilinu (45 s), spiranje v navadni vodi (90 s, vmes smo vodo zamenjali) in v destilirani vodi (5 min). Dehidracija tkiva je potekala z izpostavitvijo etanolu naraščajočih koncentracij (70-%, 80-%, 95-% in 100-%, v vsakem 5 min) in ksilenu (5 min). Ko so se stekelca posušila, smo na tkivne rezine nanесли kapljico medija Pertex® in pritrdili krovna stekelca.

3.2.2.3 Ovrednotenje barvanja tkivnih rezin

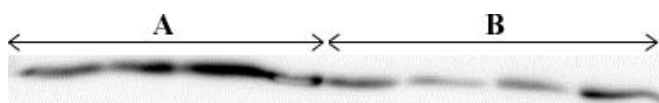
Tkivne rezine smo si ogledali pod mikroskopom in vizualno ocenili njihovo obarvanost v primerjavi z negativno kontrolo. Pri prepoznavanju tkiv in struktur smo si pomagali s tkivno rezino istega vzorca, pobarvano z eozinom in hematoksilinom. Nekatere odseke smo slikali s fotoaparatom in slike zajeli s programom AxioVision.

4 REZULTATI

4.1 Optimizacija metod

4.1.1 Optimizacija prenosa western

V seriji preliminarnih poskusov smo optimizirali metodi NaDS PAGE in prenos western za naš namen uporabe. Preverili smo, če za ustrezne končne rezultate zadostuje uporaba 30 μg proteinov vsakega vzorca namesto predhodno uporabljenih 60 μg . Na elektroforezna gela smo nanesli ustrezno pripravljene izbrane vzorce v dveh nanosih, pri čemer je bilo enkrat nanešenih 60 μg , drugič pa 30 μg proteinov. Priprava vzorcev in elektroforeza je potekala po protokolu, opisanem v poglavju 3.2.1.3, prav tako prenos western (poglavje 3.2.1.4). Lise so bile jasno vidne tudi v primerih, ko smo uporabili le 30 μg proteinov. Poleg tega so bile lise v teh primerih lepše ločene med seboj kot ob nanosih 60 μg proteinov (Slika 8). Zato smo se odločili, da v nadaljnjih poskusih uporabljamo nanos 30 μg proteinov.



Slika 8: Optimizacija nanosa proteinov. Prikazana je detekcija PPIA pri nanosu 60 μg (A) in 30 μg (B) proteinov: ob uporabi manjše količine proteinov so signali dobro vidni in lepše ločeni med seboj.

Zagotoviti smo želeli tudi ustrezno detekcijo referenčnega proteina PPIA, pri katerem so se v preteklosti pojavljale težave zaradi slabe detekcije. Za razliko od predhodnih poskusov, ki so potekali v naši raziskovalni skupini, smo čas prenosa na membrano skrajšali iz 75 min na 60 min. Ker je PPIA majhen protein, bi namreč ob daljšem času prenosa lahko prehajal preko PVDF membrane in se izgubljal v medij. Ob detekciji je bil PPIA lepo viden, torej je bila naša odločitev o skrajšanju časa prenosa proteinov na membrano pravilna.

Preverili smo tudi, če lahko inkubiramo dve membrani hkrati v isti raztopini protiteles. Po elektroforezni ločitvi proteinov in prenosu western smo membrani, na katerih se je zaporedje vzorcev dvakrat ponovilo, razpolovili tako, da so vse polovice vsebovale enako zaporedje vzorcev. Po dve polovici smo inkubirali v protitelesih v isti kadički, pri tem sta bili membrani enkrat obrnjeni druga proti drugi, torej spodnja navzgor in zgornja navzdol, drugič pa obratno, druga vstran od druge. Med signali ob detekciji ni bilo opaznih razlik. Z opravljenimi poskusi

smo pokazali, da je možna inkubacija dveh membran naenkrat v istih protitelesih ter da njuna orientacija nima vpliva na vezavo protiteles.

Ob preliminarnih poskusih smo opazili tudi, da prihaja do nespecifične vezave protiteles na membrano, zato smo blokiranje v 5-% raztopini mleka podaljšali iz začetne 1 h na 2 h. Poleg tega smo zaradi močnih signalov zmanjšali nanose proteinov, izoliranih iz celične linije Ishikawa, iz 30 µg na 15 µg. Vse ugotovitve iz preliminarnih poskusov smo prenesli v protokole, ki so bili nato uporabljeni za analizo vseh nadaljnjih vzorcev in so opisani v poglavjih 3.2.1.3 in 3.2.1.4.

Z optimizacijo NaDS PAGE in prenosa western smo uspeli:

- zmanjšati porabo vzorcev zaradi manjšega nanosa, ob tem pa se kvaliteta rezultatov ni zmanjšala, pač pa zaradi boljše ločenosti lis le še povečala;
- zagotoviti pogoje poskusov, pri katerih smo dobili ponovljivo dobro detekcijo PPIA;
- zmanjšati porabo protiteles z inkubacijo dveh membran hkrati v isti kadički;
- poenotiti prenos proteinov na obeh membranah z menjavo pozicije kaset med prenosom proteinov na membrano;
- zmanjšati nespecifično vezavo protiteles na membrano.

4.1.2 Izbira ustreznega načina normalizacije

Za normalizacijo signalov iskanih proteinov (GSTP1 oziroma NQO1) smo uporabili tri različne pristope: normalizacijo na (i) signal referenčnega proteina PPIA, (ii) celokupni signal proteinov, ki so se prenesli na membrano (normalizacija na proteine na membrani) in (iii) celokupni signal proteinov, ki so po prenosu na membrano ostali na gelu (normalizacija na proteine na gelu). Uporaba referenčnega proteina za normalizacijo ima več prednosti. Signali proteinske frakcije na gelu in membrani so odvisni le od nanosa vzorca in njegovega prenosa iz gela na membrano. Iz signala za referenčni protein, ki je odvisen tudi od uporabljenih reagentov, pa lahko sklepamo še na morebitne poškodbe ali razpad proteinov. Vsi ti dejavniki vplivajo tudi na signal iskanega proteina. Pri normalizaciji na referenčni protein naj bi tako dobili med seboj bolj primerljive rezultate, ki so manj odvisni od nanosa, prenosa, uporabljenih reagentov in stanja proteinov in zato boljše prikazujejo realno stanje v vzorcu. Zato se pri prenosu western najpogosteje uporablja normalizacija na referenčni protein.

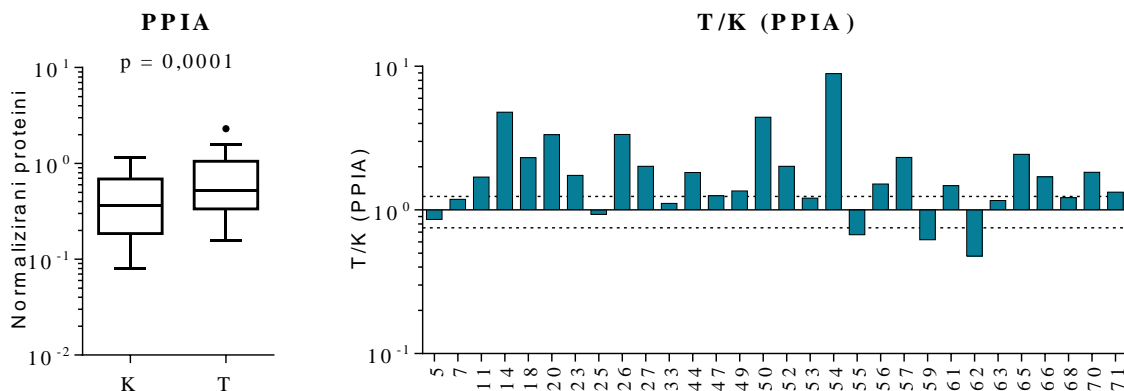
Signale smo obdelali, kot je opisano v poglavju 3.2.1.6, in primerjali količino proteinov NQO1 in GSTP1 v rakavem (T) in kontrolnem (K) endometriju. Iz spodnje preglednice je razvidno, da smo z različnimi načini normalizacije dobili precej različne rezultate (Preglednica VII). Izstopali so predvsem rezultati normalizacije na referenčni protein PPIA, medtem ko so bili rezultati, ki smo jih dobili z normalizacijo na proteine na gelu in normalizacijo na proteine na membrani, med seboj zelo primerljivi tudi na ravni posameznih vzorcev (podatki niso prikazani).

Preglednica VII: Izbira ustreznega načina normalizacije. Primerjava rezultatov, pridobljenih z normalizacijo na PPIA, proteine na gelu in proteine na membrani.

	Normalizacija na PPIA		Normalizacija na proteine na gelu		Normalizacija na proteine na membrani	
	T/K	p vrednost	T/K	p vrednost	T/K	p vrednost
GSTP1	=	0,5699	↑	< 0,0001	↑	0,0002
NQO1	↑	0,0961	↑	< 0,0001	↑	< 0,0001
NQO1a	↑	< 0,0001	↑	< 0,0001	↑	< 0,0001
NQO1b	=	0,4400	↑	< 0,0001	↑	0,0002
NQO1c	=	0,2286	↑	0,0405	↑	0,0248

Količina proteina v tumorskem vzorcu je: ↑ povečana ($T/K > 1,2$), = nespremenjena ($0,8 \leq T/K \leq 1,2$).

Rezultati, ki smo jih pridobili z normalizacijo na PPIA, so zelo odstopali od rezultatov, ki smo jih dobili ob normalizaciji na proteine na gelu in membrani. Poleg tega smo že ob detekciji PPIA na membrani opazili, da obstajajo razlike v količini tega proteina med tumorskimi in kontrolnimi vzorci (Slika 10, Slika 11, poglavje 4.2), zato smo njegovo raven v naših vzorcih natančneje proučili. Po normalizaciji na proteine na membrani smo ugotovili, da je količina PPIA v tumorskem tkivu endometrija statistično značilno povečana v primerjavi s kontrolnim nerakavim endometrijem (1,7-krat, $p = 0,0001$); povečano količino tega proteina smo opazili v 67 % parov vzorcev (Slika 9). Do enakih ugotovitev so v svoji raziskavi prišli tudi Li in sodelavci, ki so zaznali povečano izražanje *PPIA* in večje količine PPIA v rakavem tkivu endometrija (56).



Slika 9: PPIA pri raku endometrija. Okvir z ročaji (levo) prikazuje razlike v količini PPIA v vzorcih kontrolnega in rakavega endometrija. Histogram (desno) pa kaže razmerje T/K (PPIA) za posamezne vzorce. Vrednosti na grafih so prikazane na logaritemski skali.

V našem primeru, ko količina izbranega referenčnega proteina med tumorskim in kontrolnim tkivom ni bila primerljiva in je to vplivalo na rezultate, je bila normalizacija na osnovi proteinov na membrani oziroma gelu ustrežnejša. Na podlagi tega smo se odločili, da podamo rezultate, normalizirane na količino proteinov, ki so se prenesli na membrano.

4.1.3 Optimizacija imunohistokemijskega barvanja tkivnih rezin

Namen preliminarnih poskusov imunohistokemijskega barvanja je bil določiti optimalno koncentracijo primarnih protiteles, ki bi zagotavljala dobre rezultate in čim manj nespecifičnega barvanja. Na tkivnih rezinah enega vzorca so bile po protokolu, opisanem v poglavju 3.2.2.2, preizkušene različne redčitve primarnih protiteles: za GSTP1 redčitev v razmerju 1:30 in 1:100, za NQO1 pa 1:100 in 1:200. Pri GSTP1 je bilo v obeh primerih barvanje precej šibko, zato smo se odločili za še višjo koncentracijo protiteles (1:20). V primeru NQO1 smo že pri nižji izmed obeh koncentracij dobili dobre rezultate. Pri višji koncentraciji je bila razlika v barvanju minimalna, smo pa zaznali več nespecifičnega barvanja, zato smo se odločili za uporabo redčitve v razmerju 1:200. Izbiro koncentracij smo potrdili še na večjem številu vzorcev.

Že v začetnih poskusih je bilo barvanje v primeru GSTP1 zelo šibko, zato smo se odločili za optimizacijo postopka izpostavitve antigenov (angl. antigen retrieval). Formalin in ostali aldehidi, uporabljeni za fiksiranje tkivnih rezin namreč povzročijo premreženje proteinov, kar lahko zakrije antigene. Posledica je šibek ali lažno negativen rezultat imunohistokemijskega barvanja, zato protokol vključuje uporabo raztopine, ki prekine te povezave in razkrije

antigene (57). Poleg v začetnem protokolu uporabljene 0,01 M raztopine natrijevega citrata (pH 6) smo preizkusili še Tris-EDTA in Tris pufer. Barvanje se s tem ni izboljšalo, pri Tris pufru pa so se tkivne rezine celo delno odlepile od objektnega stekelca. Zaradi teh rezultatov smo se odločili še naprej uporabljati citratni pufer, le da smo prilagodili čas inkubacije. Po nasvetu proizvajalca protiteles smo preizkusili z 8 minutno inkubacijo namesto začetnih 20 min. Tudi ta ni dala želenih rezultatov, zato smo podaljšali čas na 30 min, kar je izboljšalo barvanje, zato smo to prilagoditev vnesli v protokol, ki smo ga nato uporabili za barvanje vzorcev in je opisan v poglavju 3.2.2.2.

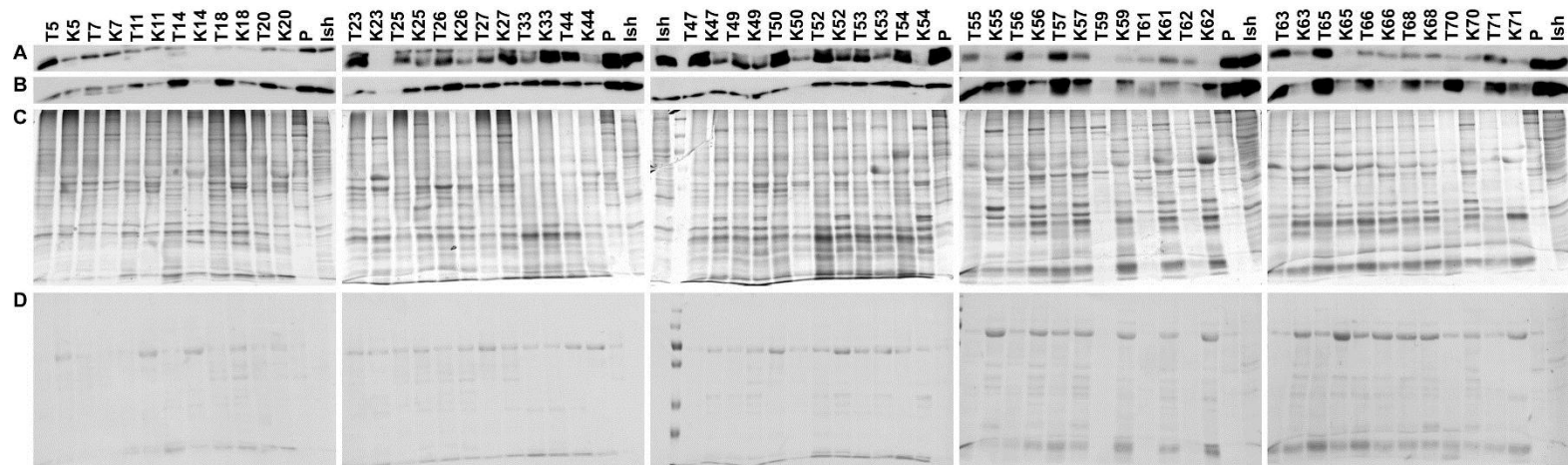
Z optimizacijo imunohistokemijskega barvanja smo torej uspeli določiti optimalni koncentraciji primarnih protiteles proti GSTP1 in NQO1. Poleg tega smo z manjšo spremembo začetnega protokola dosegli nekoliko boljše barvanje v primeru GSTP1.

4.2 Rezultati prenosa western

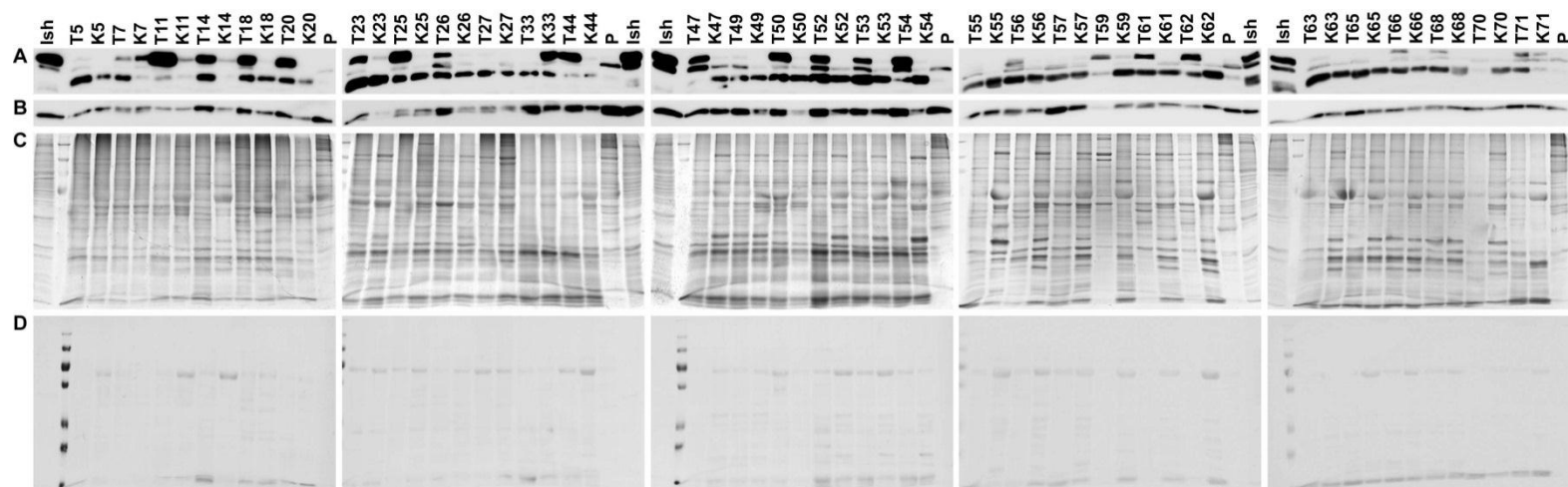
Prisotnost proteinov GSTP1 in NQO1 smo z metodo prenosa western preverili v 30 parih vzorcev tumorskega in kontrolnega okolnega nerakavega endometrija. Poleg iskanih encimov smo preverili tudi količino referenčnega proteina PPIA, na katerega smo želeli normalizirati rezultate vsakega posameznega vzorca. Na spodnjih slikah (Slika 10, Slika 11) so prikazani zbrani rezultati za vse vzorce in za proteinske frakcije placente in celične linije Ishikawa.

4.2.1 Encima GSTP1 je v rakavem endometriju več kot v kontrolnem tkivu

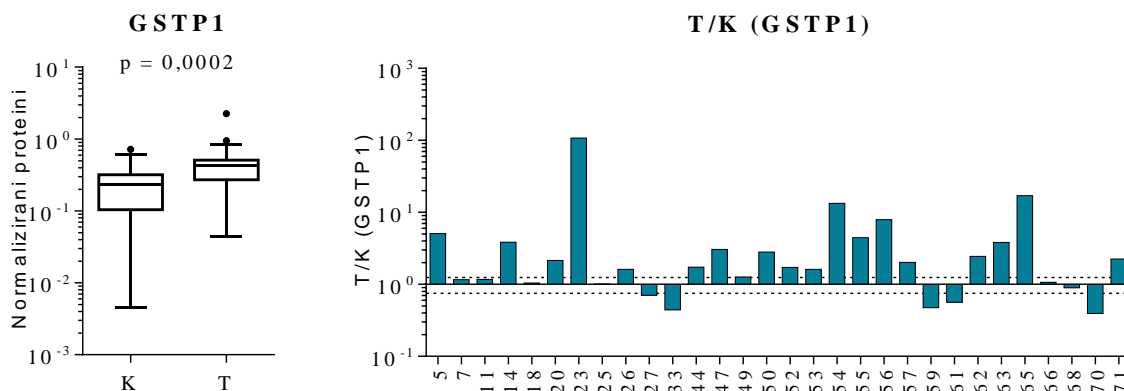
GSTP1 smo zaznali v vseh vzorcih raka endometrija in v 28 vzorcih kontrolnega endometrija (Slika 10). Količina encima GSTP1 v tumorskem endometriju je statistično značilno večja kot v kontrolnem endometriju (1,7-krat, $p = 0,0002$). V 63 % parov vzorcev smo v tumorskem tkivu opazili večjo količino GSTP1 kot v kontrolnem tkivu ($T/K (GSTP1) > 1,2$), le v 17 % parov vzorcev je bilo GSTP1 v tumorskem tkivu manj kot v kontrolah ($T/K (GSTP1) < 0,8$). V preostalih 20 % parov vzorcev pa je bila njegova količina praktično nespremenjena ($0,8 \leq T/K (GSTP1) \leq 1,2$) (Slika 12).



Slika 10: ECL detekcija GSTP1 po prenosu western. Signali GSTP1 (A) in PPIA (B) po ECL detekciji, gel, barvan z raztopino barvila Coomassiejevo briljantno modro (C) in membrana, barvana z raztopino Ponceau (D). Nad slikami so oznake vzorcev.



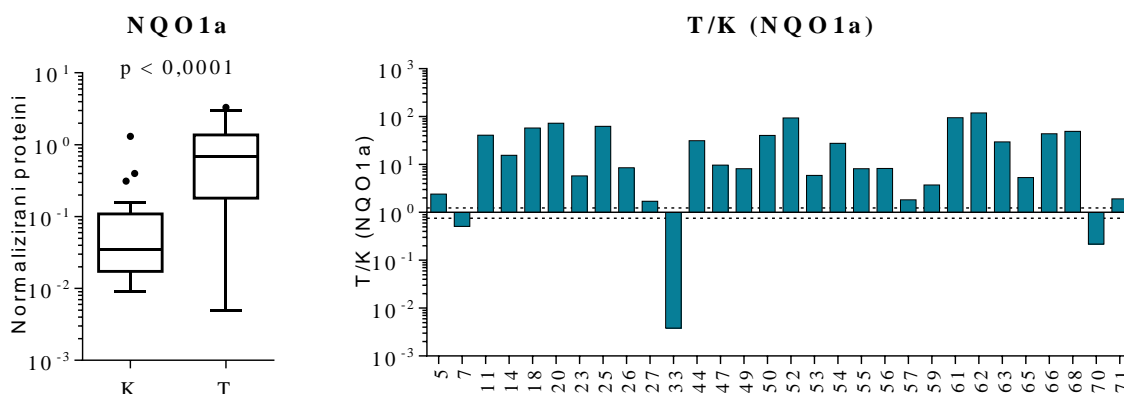
Slika 11: ECL detekcija NQO1 po prenosu western. Signali vseh treh izooblik NQO1 (A) in PPIA (B) po ECL detekciji, gel, barvan z raztopino barvila Coomassiejevo briljantno modro (C) in membrana, barvana z raztopino Ponceau (D). Nad slikami so oznake vzorcev.



Slika 12: GSTP1 pri raku endometrija. Okvir z ročaji (levo) prikazuje razlike v količini GSTP1 v vzorcih kontrolnega in rakavega endometrija. Histogram (desno) pa kaže razmerje T/K (GSTP1) za posamezne vzorce. Vrednosti na grafih so prikazane na logaritmski skali.

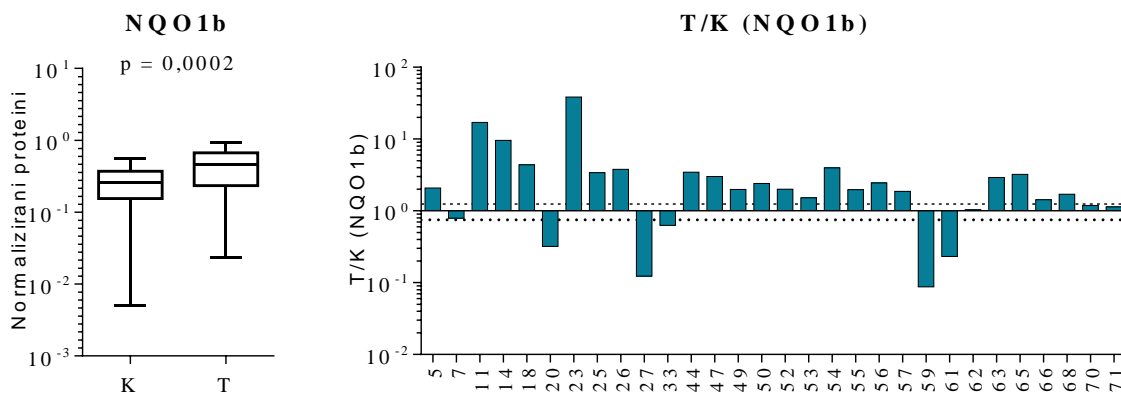
4.2.2 Spremenjena porazdelitev izooblik NQO1 pri raku endometrija

NQO1 smo zaznali v vseh vzorcih rakavega kot tudi kontrolnega endometrija. Detektirali smo tri izooblike encima: NQO1a, NQO1b in NQO1c. Njihova porazdelitev se je razlikovala med posameznimi vzorci, v nekaterih vzorcih posameznih izooblik nismo zaznali. Največje razlike med tumorskimi in kontrolnimi vzorci smo zaznali pri izoobliki NQO1a. Ta je bila prisotna v 27 vzorcih rakavega endometrija in le v 14 vzorcih kontrolnega nerakavega endometrija (Slika 11). Količina izooblike NQO1a je bila v rakavem endometriju v primerjavi s kontrolnim tkivom statistično značilno povečana (9,2-krat, $p < 0,0001$). Povišano raven NQO1a v tumorskem endometriju glede na kontrolni endometrijski smo zaznali kar v 90 % parov vzorcev, le v treh parih (10 %) vzorcev pa je bila raven NQO1a znižana (Slika 13).



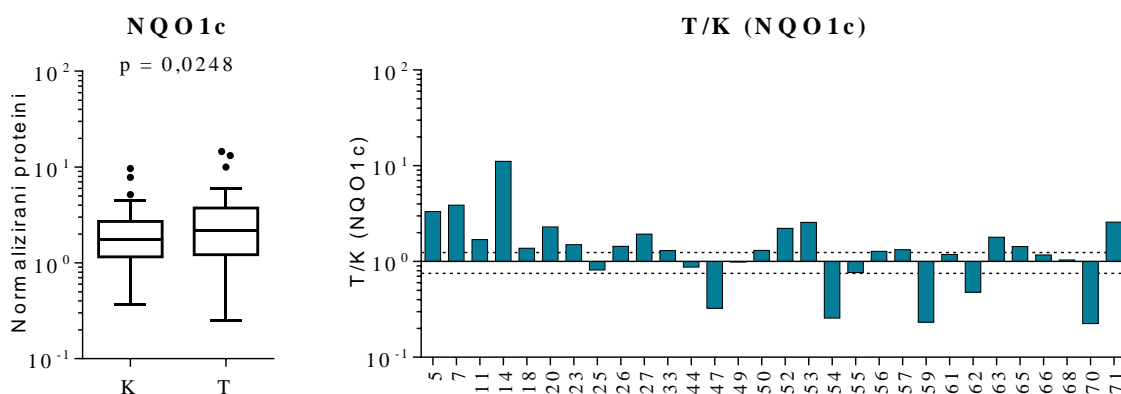
Slika 13: NQO1a pri raku endometrija. Okvir z ročaji (levo) prikazuje razlike v količini NQO1a v vzorcih kontrolnega in rakavega endometrija. Histogram (desno) pa kaže razmerje T/K (NQO1a) za posamezne vzorce. Vrednosti na grafih so prikazane na logaritmski skali.

Statistično značilno povečana je bila tudi količina izooblike NQO1b v tumorskem tkivu v primerjavi s kontrolnim endometrijem (2,0-krat, $p = 0,0002$). Povečano količino proteina smo zaznali v 70 % parov vzorcev, v 17 % je bila raven znižana, v preostalih 13 % parov vzorcev pa nismo zaznali bistvenih sprememb NQO1b (Slika 14).



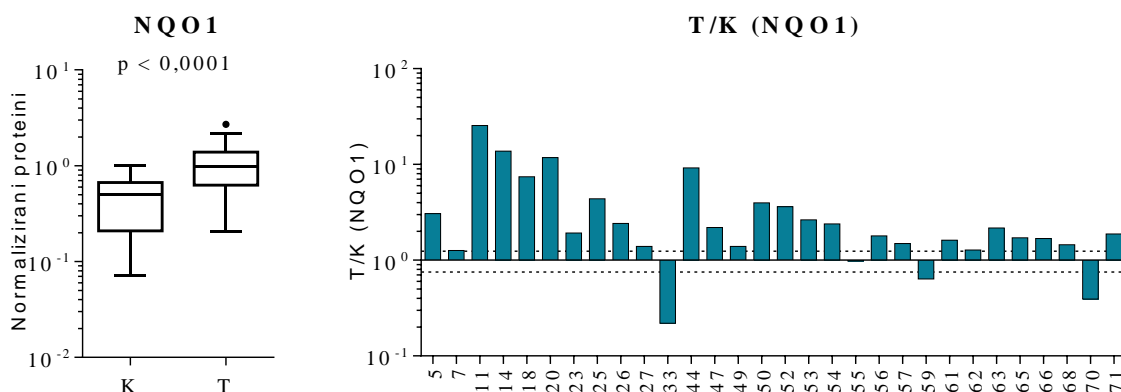
Slika 14: NQO1b pri raku endometrija. Okvir z ročaji (levo) prikazuje razlike v količini NQO1b v vzorcih kontrolnega in rakavega endometrija. Histogram (desno) pa kaže razmerje T/K (NQO1b) za posamezne vzorce. Vrednosti na grafih so prikazane na logaritemski skali.

Izoobliko NQO1c smo zaznali v vseh vzorcih rakavega in kontrolnega endometrija. Opazili smo statistično značilno povečano količino NQO1c v rakavem endometriju glede na kontrolno nerakavo tkivo (1,3-krat, $p = 0,0248$). Količina NQO1c je bila v 60 % parov vzorcev večja v tumorskem tkivu kot v kontrolnem endometriju, v ostalih vzorcih pa je bila v rakavem endometriju količina le-tega zmanjšana (17 %) ali nespremenjena (23 %) (Slika 15).



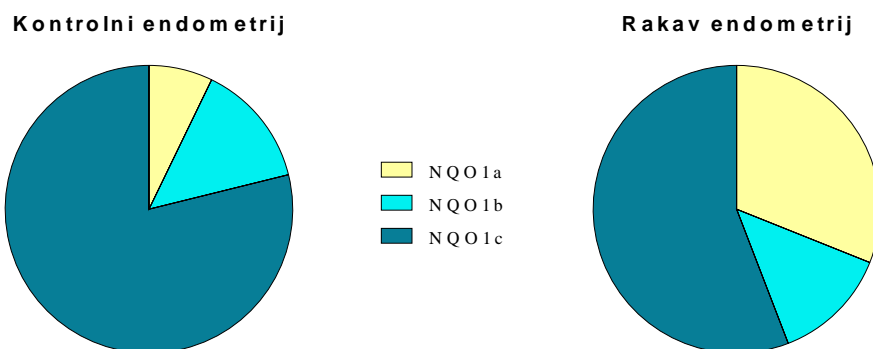
Slika 15: NQO1c pri raku endometrija. Okvir z ročaji (levo) prikazuje razlike v količini NQO1c v vzorcih kontrolnega in rakavega endometrija. Histogram (desno) pa kaže razmerje T/K (NQO1c) za posamezne vzorce. Vrednosti na grafih so prikazane na logaritemski skali.

Celokupna količina encima NQO1 je bila v rakavem endometriju 1,9-krat večja kot v kontrolnem nerakavem tkivu, razlika je bila statistično značilna ($p < 0,0001$). Povečano raven celokupnega NQO1 v rakavem endometriju glede na kontrolo smo opazili v 87 % parov vzorcev, zmanjšano pa v 10 % parov vzorcev. V preostalih 3 % vzorcev nismo zaznali bistvenih razlik med tumorskim in kontrolnim endometrijem v celokupni koncentraciji NQO1 (Slika 16).



Slika 16: Celokupni NQO1 pri raku endometrija. Okvir z ročaji (levo) prikazuje razlike v količini NQO1 v vzorcih kontrolnega in rakavega endometrija. Histogram (desno) pa kaže razmerje T/K (NQO1) za posamezne vzorce. Vrednosti na grafih so prikazane na logaritemski skali.

Med rakavim in kontrolnim nerakavim endometrijem smo zaznali pomembne razlike v porazdelitvi posameznih izooblik NQO1. V kontrolnem endometriju so izooblike NQO1a, NQO1b in NQO1c predstavljale 7 %, 14 % in 79 % celokupne NQO1, v rakavem endometriju pa 31 %, 13 % in 56 % (Slika 17). Opazili smo, da je bil v rakavem endometriju delež izooblike NQO1a veliko večji kot v kontrolah. Nasprotno je bil delež izooblike NQO1c v rakavem endometriju manjši. Le izooblika NQO1b je bila zastopana v podobnem deležu v rakavem in kontrolnem endometriju.



Slika 17: Delež izooblik NQO1 v kontrolnem (levo) in rakavem (desno) endometriju.

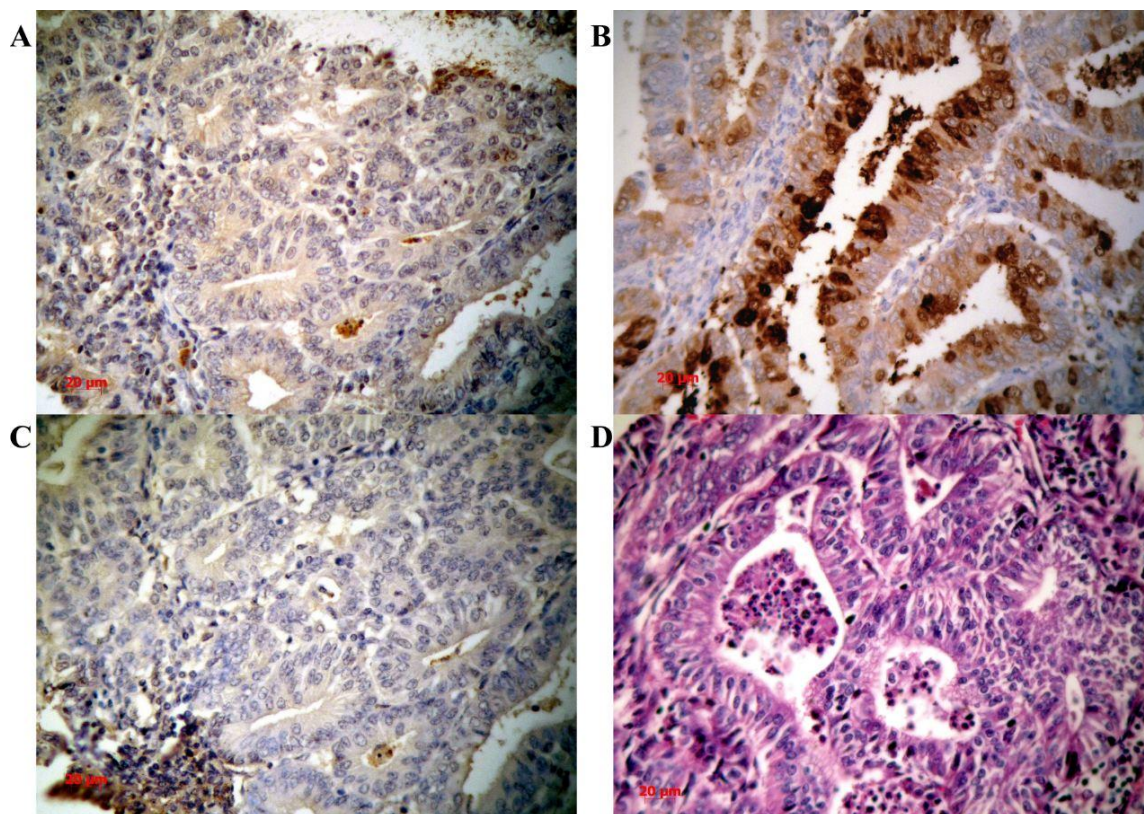
4.3 Rezultati barvanja tkivnih rezin

Prisotnost encimov GSTP1 in NQO1 smo želeli prikazati tudi na ravni celic. Z imunohistokemijskim barvanjem smo preverili lokacijo obeh encimov na 26 tkivnih rezinah raka endometrija. Na 5 preparatih smo imeli poleg rakavega endometrija tudi tkivo okolnega nerakavega endometrija. Intenziteto obarvanja v primerjavi z negativno kontrolo smo vizualno ocenili. Rezultati so zbrani v spodnji preglednici (Preglednica VIII).

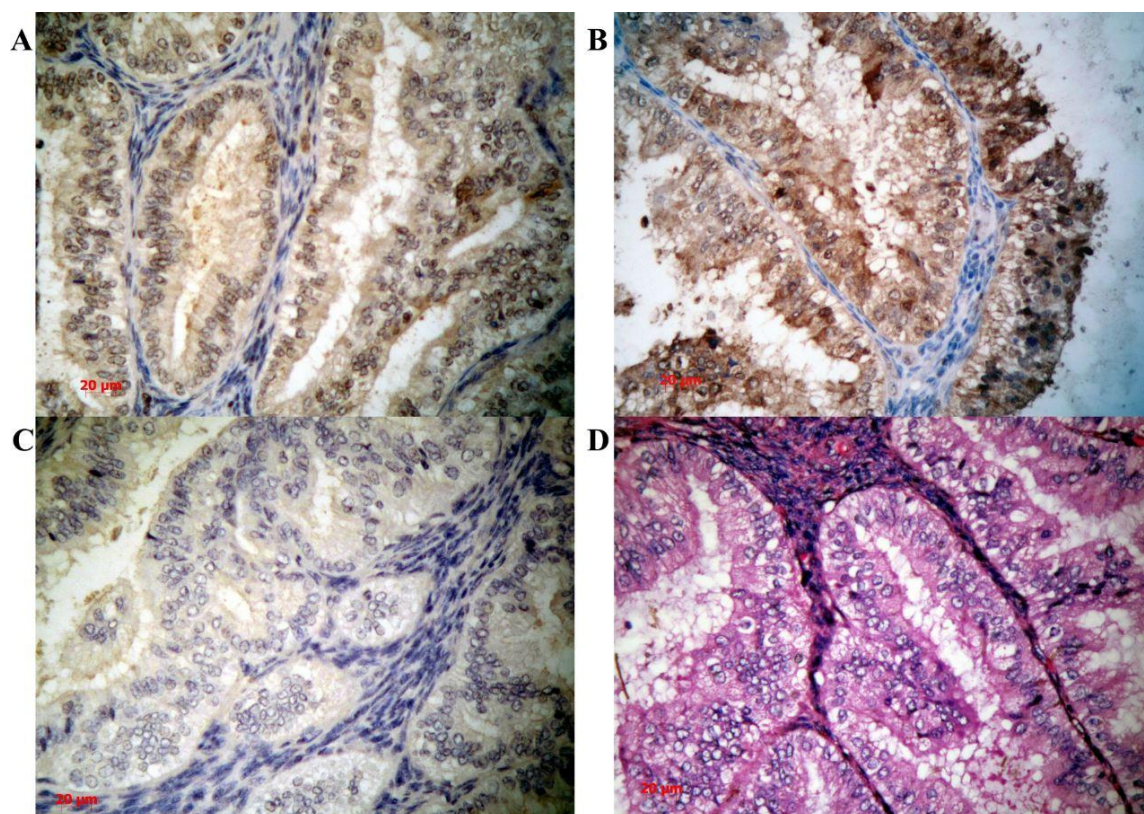
Preglednica VIII: Ocena intenzitete obarvanosti tkivnih rezin po imunohistokemijskem barvanju. Obarvanje je ocenjeno na lestvici od – (ni obarvanja) do +++ (intenzivno obarvanje).

Vzorec	NQO1 1:200		GSTP1 1:20		Vzorec	NQO1 1:200		GSTP1 1:20	
	T	K	T	K		T	K	T	K
5	-	/	-	/	25	+	/	+	/
7	++	/	+	/	26	++	/	+	/
8	++	/	-/+	/	27	+	/	+	/
10	++	/	+	/	30	+++	/	++	/
11	+++	/	-	/	31	+++	/	++	/
13	+	/	-/+	/	32	++	/	++	/
18	+++	/	+	/	33	+++	/	++	/
19	+++	/	++	/	34	+++	/	+	/
20	+++	/	-/+	/	35	+	+ / +++	- / +	+ / +++
21	++	/	+	/	38	+	++	+++	+++
22	++	/	-/+	/	40	- / +	++	- / +	+
23	+	/	-	/	42	+	++	+	+
24	++	/	-	/	44	+++	+	-	- / +

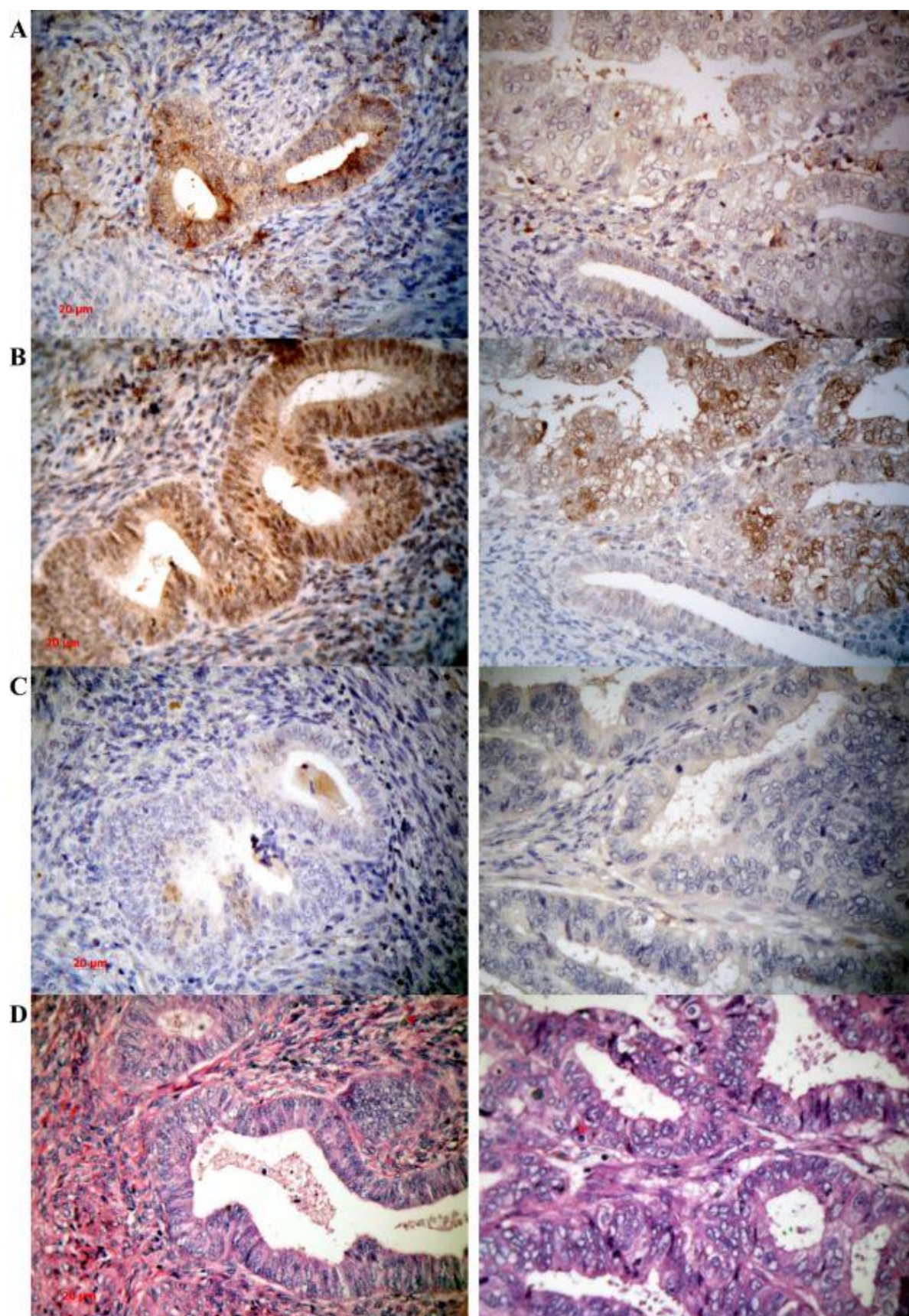
Z barvanjem smo pokazali, da se oba encima nahajata tako v rakavem kot tudi v kontrolnem endometriju. NQO1 smo zaznali v 25 od 26 vzorcev raka endometrija, prav tako pa tudi v vseh 5 nerakavih rezinah. Obarvanje je bilo večinoma precej intenzivno, zaznali pa smo ga predvsem v celicah endometrijskih žlez, ne pa tudi v stromalnih celicah. Pri GSTP1 je bilo obarvanje manj intenzivno, vendar ni bilo omejeno le na celice endometrijskih žlez, ampak so se rahlo obarvale tudi celice strome. GSTP1 smo sicer zaznali v 21 od 26 tumorskih vzorcev in v vseh 5 kontrolnih tkivnih rezinah. Izbrani izseki nekaterih reprezentativnih preparatov so prikazani na spodnjih slikah (Slika 18, Slika 19, Slika 20).



Slika 18: Barvanje histološkega preparata T21. Imunohistokemijsko barvanje GSTP1 (A), NQO1(B) in kontrole (barvanje brez primarnih protiteles; C) ter barvanje z eozinom in hematoksilinom (D). Slikano ob 400x povečavi.



Slika 19: Barvanje histološkega preparata T30. Imunohistokemijsko barvanje GSTP1 (A), NQO1(B) in kontrole (barvanje brez primarnih protiteles; C) ter barvanje z eozinom in hematoksilinom (D). Slikano ob 400x povečavi.



Slika 20: Barvanje histoloških preparatov K40 (levo) in T40 (desno). Imunohistokemijsko barvanje GSTP1 (A), NQO1(B) in kontrole (barvanje brez primarnih protiteles; C) ter barvanje z eozinom in hematoksilinom (D). Slikano ob 400x povečavi.

Pri preparatih 35, 38, 40, 42 in 44, kjer smo razpolagali z rakavim in okolnim endometrijem, smo opazili nekoliko manjšo intenziteto obarvanja rakavih preparatov tako za GSTP1 kot tudi za NQO1. Pri treh od petih preparatov s parnimi tkivnimi rezinami je bilo obarvanje za GSTP1 nekoliko šibkejše v tumorskem tkivu, pri dveh vzorcih pa ni bilo bistvenih razlik v intenziteti obarvanja. Tudi pri NQO1 smo v štirih od petih parov preparatov opazili manjšo intenziteto obarvanja v rezini rakavega endometrija, v enem preparatu pa je bilo v rakavem tkivu obarvanje bistveno močnejše kot v kontrolnem tkivu. Ob tem je potrebno omeniti, da pri imunohistokemijskem barvanju z uporabljenimi protitelesi ne razlikujemo med posameznimi izooblikami NQO1.

5 RAZPRAVA

Oksidativni metabolizem estrogenov je pri raku endometrija moten. Hevir in sodelavci so poročali o zmanjšanem izražanju encimov prve faze metabolizma in povečanem izražanju encimov druge faze metabolizma v rakavem endometriju. Postavili so hipotezo, da so metaboliti estrogenov pomembni v fazi iniciacije kancerogeze, medtem ko so v nadaljnjem razvoju raka endometrija estrogeni odgovorni predvsem za proliferacijo celic (29). Na podlagi te hipoteze smo želeli natančneje raziskati detoksifikacijo estrogenkinonov. Zato smo v okviru te diplomske naloge proučili prisotnost encimov GSTP1 in NQO1 v rakavem in okolnem kontrolnem endometriju.

GSTP1 je encim, ki katalizira reakcijo številnih elektrofilov, tudi estrogenkinonov, z glutationom in tako pomembno prispeva k detoksifikaciji v celicah. Njegovo količino smo z metodo prenosa western raziskali na 30 parih vzorcev raka endometrija in pripadajočega kontrolnega nerakavega tkiva maternične sluznice. Zaznali smo statistično značilno povečano raven GSTP1 v rakavem tkivu glede na kontrolni endometriji. Skladno z našimi rezultati so Hevir in sodelavci tudi na ravni mRNA zaznali povečano izražanje *GSTP1* v tumorskem endometriju na 38 parih vzorcev (29). V nasprotju z omenjeno raziskavo in našimi rezultati pa so Chan in sodelavci poročali o zmanjšanem izražanju *GSTP1* na ravni mRNA, vendar so izvedli študijo na manjšem številu vzorcev (25 parov), hkrati pa razlika ni bila statistično značilna (39). Z imunohistokemijskim barvanjem smo GSTP1 zaznali v 81 % tumorskih preparatov in v vseh kontrolnih preparatih. Barvanje je bilo večinoma šibko, kar je nenavadno, saj je tega proteina v celicah veliko. Nizka intenziteta ali odsotnost barvanja bi bila lahko povezana s starostjo preparatov, saj je bila precej pogostejša pri starejših vzorcih. Možnost za izboljšanje barvanja pa bi bila tudi uporaba drugih protiteles. GSTP1 smo zaznali tako v celicah endometrijskih žlez kot tudi v stromalnih celicah, kar je precej pričakovano glede na funkcijo encima GSTP1 in z njo povezano široko izraženostjo encima v številnih različnih tkivih in celicah.

Raziskali smo tudi prisotnost encima NQO1, ki katalizira redukcijo kinonov v hidrokinone v enem koraku in tako sodeluje v detoksifikaciji v celicah. Detektirali smo tri izooblike NQO1: NQO1a, NQO1b in NQO1c. Količina vseh treh izooblik NQO1 je bila v tumorskem endometriju statistično značilno povečana, posledično je bila povečana tudi raven celokupnega NQO1. Najbolj izrazito povečanje količine smo opazili pri izoobliki NQO1a, manjše pa pri ostalih dveh izooblikah. Posledica teh sprememb je bila razlika v porazdelitvi

izooblik NQO1. Vloge posameznih izooblik NQO1 še niso pojasnjene, a morda je prav razmerje med njimi ključnega pomena pri obrambni funkciji NQO1 pred oksidativnim stresom. Tako v rakavem kot v kontrolnem endometriju je med izooblikami NQO1 prevladovala NQO1c, vendar je bil njen delež izrazito večji v kontrolnem (79 %) kot v rakavem tkivu (56 %). Po drugi strani je v kontrolnem endometriju izooblika NQO1a predstavljala le 7 % celokupne NQO1, v rakavem endometriju pa kar 31 %. Zanimivo je, da je porazdelitev izooblik v normalnem endometriju žensk, ki nimajo raka endometrija ali katere druge ginekološke bolezni, povsem drugačno. Hevir in sodelavci so pokazali, da v normalnem endometriju žensk pred menopavzo (povprečna starost 41 let) prevladuje NQO1a (75 %), medtem ko NQO1c predstavlja le 5 % celokupne NQO1 (58). Ker so bile v študijo Hevir in sodelavcev vključene le ženske pred menopavzo, smo preverili, če se razmerje izooblik NQO1 v vzorcih tkiva žensk z rakom endometrija pred in po menopavzi razlikuje, vendar nismo opazili značilnih razlik (podatki niso prikazani). Da bi lahko pojasnili vlogo posamezne izooblike NQO1, bi morali poznati njihovo katalitično učinkovitost, vendar o tem nismo našli nobenega podatka. Iz proteinske podatkovne baze smo razbrali, da NQO1c ne vsebuje aminokislinskega zaporedja AYT_Y in s tem dveh ključnih tirozinskih preostankov (59), ki naj bi bila odgovorna za vezavo substrata (60, 61). V drugih dveh izooblikah je omenjeno vezavno mesto za substrat prisotno in zato domnevamo, da sta obe izoobliki katalitično aktivni, medtem ko NQO1c najverjetneje ne more ustrezno opravljati svoje naloge. Zaznane spremembe v deležu posameznih izooblik bi lahko vodile v moteno detoksifikacijo estrogenkinonov v tkivu kontrolnega endometrija in tako vplivale na razvoj raka endometrija. To nakazuje, da bi kontrolno tkivo, v katerem NQO1c predstavlja večinski delež in je tudi celokupna količina NQO1 zmanjšana, lahko predstavljalo predstopnjo raka endometrija. Prisotnost NQO1 pri raku endometrija smo potrdili tudi z imunohistokemijskim barvanjem tkivnih rezin, pri tem smo encim zaznali kar v 96 % tumorskih preparatov. Obarvanje je bilo prisotno predvsem v celicah endometrijskih žlez, stromalne celice so ostale praktično neobarvane.

Hevir in sodelavci so predlagali, da porušeno ravnovesje med oksidativnim metabolizmom in konjugacijami v kontrolnem endometriju favorizira nastajanje kancerogenih kateholestrogenov in estrogenkinonov (29). Tudi naši podatki o povečani količini encimov GSTP1 in NQO1 v rakavem tkivu endometrija kažejo, da bi lahko bila detoksifikacija estrogenkinonov v tumorskih celicah boljša kot v celicah kontrolnega endometrija. Predpostavljamo lahko, da estrogenkinoni v tumorskem tkivu nimajo več bistvenega vpliva,

lahko pa bi bili pomembni kot iniciatorji kancerogeneze v okolnem kontrolnem endometriju. V tem smo namreč zaznali manjše količine GSTP1 in NQO1 (predvsem NQO1a), kar nakazuje slabšo detoksifikacijo estrogenkinonov in možnost njihovega kopičenja. Glede na to, da je bil kot kontrolno tkivo uporabljen endometrij iz neposredne bližine rakavega tkiva, so tudi v njem že možne neoplastične spremembe.

6 SKLEP

Na razvoj raka endometrija imajo močan vpliv estrogeni. Preko receptorjev za estrogene stimulirajo proliferacijo celic endometrija, poleg tega pa produkti oksidativnega metabolizma estrogenov povzročajo poškodbe DNA. Raziskali smo prisotnost encimov GSTP1 in NQO1, ki imata pomembno vlogo pri detoksifikaciji metabolitov estrogenov. V rakavem endometriju smo zaznali povečano količino obeh proučevanih encimov, GSTP1 in NQO1. Pri slednjem smo zaznali povečano raven vseh treh izooblik encima: NQO1a, NQO1b in NQO1c; najbolj je bila povečana količina izooblike NQO1a. Tudi razmerje med izooblikami v tumorskem endometriju je bilo spremenjeno glede na kontrolno tkivo. Vloge posameznih izooblik NQO1 še niso pojasnjene, a morda je prav razmerje med njimi ključnega pomena pri obrambni funkciji NQO1 pred oksidativnim stresom in s tem tudi v patogenezi raka endometrija. Zdi se, da je vloga GSTP1 in NQO1 pomembnejša v nerakavem endometriju kot v rakavem. Okolno tkivo bi lahko predstavljalo predstopnjo raka, moten metabolizem estrogenov v njem pa bi lahko povzročil kopičenje kateholestrogenov in estrogenkinonov ter tako vplival na iniciacijo rakavega obolenja.

Vlogo GSTP1 pri raku endometrija sta predhodno proučevali le dve raziskovalni skupini (29, 39), medtem ko smo pomen NQO1 pri tej bolezni raziskali kot prvi. Naši rezultati pomembno prispevajo k razumevanju biokemije raka endometrija, ob tem pa odpirajo nova vprašanja o vlogi GSTP1 in NQO1 pri nastanku in nadaljnjem razvoju raka endometrija, kar ostaja izziv prihodnjim raziskavam.

7 LITERATURA

1. Ferlay J., Shin H. R., Bray F., Forman D., Mathers C. and Parkin D. M.: GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Dostopno na <http://globocan.iarc.fr> (20.8.2012)
2. Bösze P. et al.: European Practice in Gynaecology and Obstetrics: Endometrial Cancer. Elsevier; Mayenne, France, 2003; 15-34
3. Amant F., Moerman P., Neven P., Timmerman D., Van Limbergen E., Vergote I.: Endometrial cancer. *Lancet* 2005; 366: 491-505
4. Zadnik V., Primic Žakelj M.: SLORA: Slovenija in rak. *Epidemiologija in register raka*. Onkološki inštitut Ljubljana. www.slora.si (13.7.2012)
5. ECO, European Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer <http://eu-cancer.iarc.fr> (13.7.2012)
6. Tekač I.: Etiologija, epidemiologija in histopatologija raka endometrija. *Medicinski razgledi* 2000; 39: 191-198
7. Emons G., Fleckenstein G., Hinney B., Huschmand A., Heyl W.: Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2000; 7: 227-242
8. Lanišnik Rižner T., Šinkovec J.: Vloga hidrokosteroid-dehidrogenaz pri uravnavanju aktivnosti estrogenov in progestagenov: primer raka endometrija in endometrioze. *Medicinski razgledi* 2004; 43: 419-428
9. Sherman M. E.: Theories of Endometrial Carcinogenesis: A Multidisciplinary Approach. *Modern Pathology* 2000, 13(3): 295-308
10. Berstein L., Zimarina T., Imyanitov E., Kovalevskij A., Maximov S., Pujol P., Thijssen J.: Hormonal imbalance in two types of endometrial cancer and genetic polymorphism of steroidogenic enzymes. *Maturitas* 2006, 54: 352-355
11. Hecht J. L., Mutter G. L.: Molecular and Pathologic Aspects of Endometrial Carcinogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 2006, 24: 4783-4791
12. Liu F.-S.: Molecular Carcinogenesis of Endometrial Cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2007; 46(1): 26-32
13. Rose P. G.: Endometrial Carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 1996; 335: 640-649

14. Linkov F., Edwards R., Balk J., Yurkovetsky Z., Stadterman B., Lokshin A., Taioli E.: Endometrial hyperplasia, endometrial cancer and prevention: Gaps in existing research of modifiable risk factors. *European Journal of Cancer* 2008; 44: 1632-1644
15. American Cancer Society: www.cancer.org
16. Tekáč I.: Diagnostični postopki pri raku endometrija. *Medicinski razgledi* 2001; 40: 325-333
17. Parl F. F., Dawling S., Roodi N., Crooke P. S.: Estrogen Metabolism and Breast Cancer, A Risk Model. *Steroid Enzymes and Cancer: Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1155: 68-75
18. Cavalieri E., Chakravarti D., Guttenplan J., Hart E., Ingle J., Jankowiak R., Muti P., Rogan E., Russo J., Santen R., Sutter T.: Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1766: 63-78
19. Yager J. D., Davidson N. E.: Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2006; 354: 270-282
20. Bolton J. L., Thatcher G. R. J.: Potential Mechanisms of Estrogen Quinone Carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology* 2008; 21(1): 93-101
21. Yager J. D.: Endogenous Estrogens as Carcinogens Through Metabolic Activation. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2000; 27: 67-73
22. Lanišnik Rižner T.: Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 307: 8-18
23. Hevir N.: Študije metabolizma estrogenov in progesterona pri raku endometrija in ovarijski endometriozi. Doktorska disertacija, 2011
24. Tsuchiya Y., Nakajima M., Yokoi T.: Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Letters* 2005; 227: 115-124
25. Hevir N., Trošt N., Debeljak N., Lanišnik Rižner T.: Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. *Chemico-Biological Interactions* 2011; 191: 206-216
26. Šmuc T., Hevir N., Ribič-Pucelj M., Husen B., Thole H., Lanišnik Rižner T.: Disturbed estrogen and progesterone action in ovarian endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 301: 59-64
27. Raftogianis R., Creveling C., Weinshilboum R., Weisz J.: Estrogen Metabolism by Conjugation. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2000; 27: 113-124

28. Zhu B. T., Conney A. H.: Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 1998; 19(1): 1-27
29. Hevir N., Šinkovec J., Lanišnik Rižner T.: Disturbed expression of phase I and phase II estrogen-metabolizing enzymes in endometrial cancer: Lower levels of CYP1B1 and increased expression of S-COMT. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 331: 158-167
30. Hevir N., Ribič-Pucelj M., Lanišnik Rižner T.: Disturbed balance between phase I and II metabolizing enzymes in endometriosis may lead to excessive hydroxy-estrogen and ROS formation. Abstract book/9th Congress of the Slovenian Biochemical Society, Maribor 12-15 October 2011; Maribor, Zavod za zdravstveno varstvo, 2011
31. Cavlieri E. L., Rogan E. G.: Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 125: 169-180
32. Lépine J., Audet-Walsh E., Grégoire J., Têtu B., Plante M., Ménard V., Ayotte P., Brisson J., Caron P., Villeneuve L., Bélanger A., Guillemette C.: Circulating Estrogens in Endometrial Cancer Cases and Their Relationship with Tissue Expression of Key Estrogen Biosynthesis and Metabolic Pathways. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95: 2689-2698
33. Hachey D. L., Dawling S., Roodi N., Parl F. F.: Sequential Action of Phase I and II Enzymes Cytochrome P450 1B1 and Glutathione S-Transferase P1 in Mammary Estrogen Metabolism. *Cancer Research* 2003; 63: 8492-8499
34. Cavalieri E., Rogan E.: Catechol Quinones of Estrogens in the Initiation of Breast, Prostate, and Other Human Cancers, Keynote Lecture. *Annals New York Academy of Sciences* 2006; 1089: 286-301
35. Avberšek Lužnik I., Čelhar T., Karas Kuželički N., Milek M., Pajič T.: Vaje iz klinične kemije I: Študijsko gradivo za študente UŠ farmacije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Ljubljana, 2010; 62
36. Drug metabolism: <http://www.drugmetabolism.co.uk>
37. Tew K. D., Townsend D. M.: Regulatory functions of glutathione S-transferase PI-1 unrelated to detoxification. *Drug Metabolism Reviews* 2011; 43 (2): 179-193
38. Wikipedia: <http://en.wikipedia.org>
39. Chan Q. K. Y., Khoo U.-S., Chan K. Y. K., Ngan H. Y. S., Li S.-S., Chiu P.-M., Man L.-S., Ip P. P. C., Xue W.-C., Cheung A. N. Y.: Promoter Methylation and Differential

- Expression of π -Class Glutathione S-Transferase in Endometrial Carcinoma. *Journal of Molecular Diagnostics* 2005; 7 (1): 8-16
40. Hayes J. D., Pulford D. J.: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1995; 30 (6): 445-600
41. Vasiliou V., Ross D., Nebert D. W.: Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Human Genomics* 2006; 2 (5): 329-335
42. Dinkova-Kostova A. T., Talalay P.: NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010, 501 (1): 116-123
43. Strassburg A., Strassburg C. P., Manns M. P., Tukey R. H.: Differential Gene Expression of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase and NRH:Quinone Oxidoreductase in Human Hepatocellular and Biliary Tissue. *Molecular Pharmacology* 2002; 61: 320-325
44. Gaikwad N. W., Rogan E. G., Cavalieri E. L.: Evidence from ESI-MS for NQO1-catalyzed reduction of estrogen ortho-quinones. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43: 1289-1298
45. Sigma –Aldrich: www.sigma-aldrich.com
46. Kuhelj R.: Biokemij v praksi: načela in tehnike. Navodila za eksperimentalno delo pri laboratorijskih vajah iz biokemije. 3. izdaja, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani; Ljubljana, 2003; 54 in 67-74
47. Quick Start™ Bradford Protein Assay Instruction Manual, BioRad. Dostopno na www.bio-rad.com
48. BioRad: www.bio-rad.com
49. Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual, BioRad. Dostopno na www.bio-rad.com
50. Slovenski Medicinski e-Slovar, Lek d.d., 2. izdaja
51. Kricka L. J., Thorpe G. H. G., Stott R. A. W.: Enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay. *Pure and Applied Chemistry* 1987; 59 (5): 651-654
52. Iba: <http://www.iba-lifesciences.com/strep-tag.html>
53. Bioradiations: www.bioradiations.com
54. Bratthauer G. L.: The Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Method. *Methods in Molecular Biology: Immunocytochemical Methods and Protocols* 1994; 34: 165-173

55. Thermo Scientific: <http://www.thermoscientific.com>
56. Li Z., Zhao X., Bai S., Wang Z., Chen L., Wei Y., Huang C.: Proteomics Identification of Cyclophilin A as a Potential Prognostic Factor and Therapeutic Target in Endometrial Carcinoma. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008; 7(10): 1810-1823
57. IHC World: www.ihcworld.com
58. Hevir N., Ribič-Pucelj M., Lanišnik Rižner T.: Disturbed balance between phase I and II metabolizing enzymes in ovarian endometriosis: A source of excessive hydroxy-estrogens and ROS? *Molecular and Cellular Endocrinology* 2013; 367 (1-2): 74-84
59. National Center for Biotechnology Information (Protein database): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
60. Winski S. L., Faig M., Bianchet M. A., Siegel D., Swann E., Fung K., Duncan M. W., Moody C. J., Amzel L. M., Ross D.: Characterization of a Mechanism-Based Inhibitor of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 by Biochemical, X-ray Crystallographic, and Mass Spectrometric Approaches. *Biochemistry* 2001; 40: 15135-15142
61. Asher G., Dym O., Tsvetkov P., Adler J., Shaul Y.: The Crystal Structure of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1 in Complex with Its Potent inhibitor Dicumarol. *Biochemistry* 2006; 45: 6372-6378