

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**DAVID ZINRAJH**

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DAVID ZINRAJH

**PROUČEVANJE IZRAŽANJA GENA ZA  
FOSFATIDILETANOLAMIN-N-METILTRANSFERAZO V  
NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

**STUDY OF PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE N-  
METHYLTRANSFERASE GENE EXPRESSION IN NON-  
SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Medicinski univerzi v Gradcu pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černeta. Vse meritve sem opravil v laboratorijih Inštituta za fiziološko kemijo in Inštituta za biokemijo in molekularno biologijo Medicinske univerze v Gradcu.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se svojemu mentorju, izr. prof. dr. Darku Černetu, za številne strokovne nasvete, prijazno pomoč in vzpodbudo pri nastajanju diplomskega dela. Hvaležen sem tudi vsem, ki so mi omogočili izvedbo eksperimentalnega dela na Medicinski univerzi v Gradcu.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černeta.

David Zinrajh

# KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	III
POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	V
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VI
1. UVOD.....	1
1.1 Pljučni rak .....	1
1.1.1 Epidemiološki podatki o pljučnem raku.....	1
1.1.2 Etiologija in dejavniki tveganja za nastanek pljučnega raka.....	1
1.1.3 Histološka razvrstitev in patološke značilnosti pljučnih tumorjev .....	2
1.1.4 TNM-klasifikacija .....	4
1.1.5 Zdravljenje pljučnega raka .....	6
1.2 Pomen in mehanizmi preskrbe rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami ....	7
1.2.1 Lipoproteinska lipaza .....	8
1.2.2 Sintaza višjih maščobnih kislin .....	9
1.3 Fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaza (PEMT).....	9
1.3.1 <i>PEMT</i> .....	9
1.3.2 Osnovne značilnosti encima PEMT .....	10
1.4 Fosfatidilholin.....	12
1.5 Holin .....	14
1.6 Fiziološka vloga metabolizma fosfolipidov.....	15
1.7 Kancerogeneza, PEMT in metabolizem fosfolipidov.....	17
2. NAMEN DELA.....	19
3. MATERIALI IN METODE .....	20
3.1 Vzorci.....	20
3.2 Meritve encimske aktivnosti FASN in LPL .....	20
3.3 Izolacija RNA .....	21
3.4 Prepis RNA v cDNA.....	21
3.5 Kvantifikacija mRNA PEMT v vzorcih .....	21
3.5.1 Materiali in aparature .....	21
3.5.2 PCR v realnem času.....	22
3.5.3 Analiza vzorcev s PCR v realnem času.....	25

3.6	Analiza rezultatov .....	26
3.7	Statistična analiza .....	27
4.	REZULTATI .....	28
4.1	Statistična analiza podatkov o bolnikih .....	28
4.2	Statistična analiza izražanja <i>PEMT</i> .....	30
5.	RAZPRAVA .....	41
6.	SKLEP IN IZHODIŠČA NADALJNJIH RAZISKAV .....	49
7.	LITERATURA .....	50

## KAZALO SLIK

Slika 1: Histološke značilnosti glavnih štirih vrst pljučnega raka.....	4
Slika 2: Položaj <i>PEMT</i> na kromosomu 17 .....	9
Slika 3: Na shemi je prikazano različno spajanje eksonov 1, 2 ali 3 z eksonom 4 .....	10
Slika 4: Reakcija metilacije PE v PC, ki jo katalizira <i>PEMT</i> .....	10
Slika 5: Predpostavljena struktura obeh izooblik encima <i>PEMT</i> .....	11
Slika 6: Delež posameznih lipidov v membranah podganjih hepatocitov.....	13
Slika 7: Struktura fosfatidilholina .....	13
Slika 8: Sintezna shema PC in PE ter povezanost z metabolizmom maščobnih kislin.....	14
Slika 9: Struktura holina.....	14
Slika 10: Če se vrednost razmerja PC/PE zniža, postane membrana bolj prepustna .....	16
Slika 11: Shematični prikaz vseh treh stopenj PCR.....	22
Slika 12: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času .....	23
Slika 13: Princip detekcije produktov PCR v realnem času s SYBR Green I.....	24
Slika 14: Zastopanost bolnikov po spolu in glede na kajenje .....	29
Slika 15: Delež posameznih histoloških tipov tumorja .....	29
Slika 16: Zastopanost bolnikov po stadiju bolezni.....	30
Slika 17: Izražanje <i>PEMT</i> v rakavem in kontrolnem tkivu .....	31
Slika 18: Izražanje <i>PEMT</i> v rakavem tkivu pri različnih stadijih .....	31
Slika 19: Izražanje <i>PEMT</i> v rakavem tkivu glede na histološke tipe raka .....	32
Slika 20: Izražanje <i>PEMT</i> v rakavem tkivu glede na hujšanje bolnikov pred operacijo.....	33
Slika 21: Izražanje <i>PEMT</i> v rakavem tkivu glede na uživanje alkohola.....	33
Slika 22: Razmerje izražanja <i>PEMT</i> (v rakavem tkivu proti kontrolnemu tkivu).....	34
Slika 23: Razmerje izražanja <i>PEMT</i> pri različnih stadijih .....	35
Slika 24: Razmerje izražanja <i>PEMT</i> glede na histološke tipe raka .....	35
Slika 25: Razmerje izražanja <i>PEMT</i> glede na hujšanje bolnikov pred operacijo.....	36
Slika 26: Razmerje izražanja <i>PEMT</i> glede na uživanje alkohola.....	37
Slika 27: Razmerje izražanja <i>PEMT</i> glede na 4-letno preživetje bolnikov po operaciji.....	37
Slika 28: Hidroliza PC.....	46

## POVZETEK

Pljučni rak je med najpogostejšimi raki na svetu in najpogostejši vzrok smrti zaradi rakavih obolenj. Nedrobnocelični pljučni rak predstavlja več kot 75-odstotkov vseh primerov pljučnega raka. Že objavljene študije kažejo, da je razvoj raka povezan s povečanim metabolizmom maščobnih kislin, ki so vir za sintezo lipidov. Tumorske celice lipide v glavnem vgradijo v celične membrane, glavni predstavnik fosfolipidov v celičnih membranah pa je fosfatidilholin. Fosfatidilholin se sintetizira po dveh poteh, v eni sodeluje tudi encim fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaza (PEMT), ki katalizira pretvorbo fosfatidiletanolamina v fosfatidilholin. Do zdaj so raziskovali vlogo PEMT predvsem v jetrih, ki so glavno mesto izražanja *PEMT*, in pri nastanku jetrnega raka, o vlogi PEMT pri pljučnem raku pa ni bila objavljena še nobena študija. Postavili smo hipotezi, da je izražanje *PEMT* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu povečano in da povečano izražanje gena napoveduje krajše preživetje bolnikov.

V raziskavo smo vključili 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Vsakemu bolniku so odvzeli vzorec rakavega in vzorec sosednjega, navidezno zdravega pljučnega tkiva (kontrolno tkivo). Iz vzorcev so izolirali RNA in jo prepisali v komplementarno DNA. Izražanje gena v rakavem in kontrolnem tkivu smo izmerili z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času.

Ugotovili smo, da je izražanje *PEMT* v rakavem tkivu enako izražanju *PEMT* v kontrolnem tkivu. Izražanje gena v rakavem tkivu ne korelira z izražanjem gena v kontrolnem tkivu in ni odvisno od kliničnih podatkov bolnika. Z analizo preživetja s Coxovo regresijsko analizo pa smo ugotovili, da zvišano izražanje *PEMT* v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) napoveduje krajše preživetje bolnikov neodvisno od ostalih prognostičnih dejavnikov, kot so stadij, hujšanje ter zvišani aktivnosti lipoproteinske lipaze in sintaze višjih maščobnih kislin.

Ugotovitev o prognostični uporabnosti izražanja *PEMT* kaže, da je metabolizem fosfolipidov ključnega pomena za rast tumorjev. Hkrati pa lahko PEMT v proces kancerogeneze umestimo tudi širše, saj igra pomembno vlogo pri endogeni sintezi holina, celičnem signaliziranju in celični smrti. Vendar bo potrebno te domneve potrditi v okviru nadaljnjih raziskav.

**Ključne besede:** nedrobnocelični pljučni rak, fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaza, ekspresija gena, analiza preživetja

## ABSTRACT

Lung cancer is one of the most frequent cancer diseases and the leading cause of cancer deaths worldwide. Non-small cell lung cancer accounts for more than 75% of all lung cancer cases. It was shown previously that lipid mobilization is of great importance for tumour growth and progression. Cancer cells use lipids mainly for the membrane assembly. Phosphatidylcholine is the most abundant phospholipid in the cell membranes. In several studies it was shown that cancer cells exhibit abnormal choline phospholipid metabolism and elevated concentrations of phosphatidylcholine and its metabolites. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) is an enzyme that synthesizes phosphatidylcholine via phosphatidylethanolamine methylation. Most studies focus mainly on the role of PEMT in the liver and liver cancer progression, but, to the best of our knowledge, PEMT has not been studied in non-small cell lung cancer tissue yet. We tested the hypothesis that PEMT gene expression is increased in non-small cell lung cancer tissue and that increased gene expression can act as a predictor of shorter patient survival.

42 patients with non-small cell lung cancer were enrolled in the study. Paired samples of lung cancer tissue and adjacent, non-cancer lung tissue were collected from each patient. RNA was isolated from each sample and reverse transcribed to cDNA. SYBR Green-based real-time PCR was used for quantification of PEMT mRNA in selected samples.

We found out that *PEMT* expression in the cancer tissue is equal to its expression in non-cancer tissue. *PEMT* expression in the cancer tissue does not correlate with its expression in non-cancer tissue neither with patient's clinical data. Cox regression analysis revealed that increased *PEMT* expression ratio (expression in cancer tissue vs. expression in non-cancer tissue) predicts shorter patient survival independently of standard prognostic factors and also independently of increased lipoprotein lipase and fatty acid synthase activity.

The finding that *PEMT* expression is a predictor of shorter patient survival strengthens the evidence that phospholipid metabolism is important in tumour growth and progression. Furthermore, PEMT may have an important role also in the choline synthesis, signal transduction, and cell survival. But these speculations have yet to be evaluated in the following studies.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, gene expression, survival analysis



## SEZNAM OKRAJŠAV

acetil-CoA	acetil-koencim A
BMI	indeks telesne mase
cDNA	komplementarna DNA
CDP-holin	citidindifosfoholin
Cp, Cq	obe oznaki označujeta prag kvantifikacije (Cq je splošna oznaka, oznaka Cp se uporablja pri aparaturi Roche LightCycler 480)
CTP	citidintrifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid-trifosfat
ER	endoplazemski retikulum
FASN	sintaza višjih maščobnih kislin
<i>GUSB</i>	gen, ki kodira encim $\beta$ -glukuronidazo ( <i>GUSB</i> )
Hcy	homocistein
LPL	lipoproteinska lipaza
MAM	z mitohodriji povezane membrane endoplazemskega retikuluma
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
PC	fosfatidilholin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PDME	fosfatidildimetiletanolamin
PE	fosfatidiletanolamin
PEMT	encim fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaza
<i>PEMT</i>	gen, ki kodira encim fosfatidiletanolamin-N-metiltransferazo
PME	fosfatidilmetiletanolamin
RNA	ribonukleinska kislina
SAH	S-adenozil homocistein
SAM	S-adenozil metionin
Sp1	protein specifičnosti 1
TNM	tumor, bezgavke, metastaze
VLDL	lipoprotein zelo nizke gostote
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

# **1. UVOD**

## **1.1 Pljučni rak**

### **1.1.1 Epidemiološki podatki o pljučnem raku**

Pljučni rak je po številu novih primerov med najpogostejšimi raki na svetu. Leta 2008 so diagnosticirali 12,7 milijona novih primerov raka; pljučni rak je predstavljal 1,61 milijona oz. 12,7 % vseh novih primerov (1). V Sloveniji je po podatkih Registra raka Republike Slovenije za leto 2009 incidenca pljučnega raka 1189 primerov letno, kar ga uvršča na 4. mesto med vsemi rakavimi obolenji. Pri moških je pljučni rak z 12,7 % novih primerov na leto na 4. mestu, takoj za rakom prostate, debelega črevesja in kožnimi raki brez melanoma. Pri ženskah je med novimi primeri raka največ raka dojke, sledijo kožni raki brez melanoma, rak debelega črevesja in danke, pljučni rak s 6,3 % pa je prav tako na 4. mestu (2). Med vsemi ljudmi, ki so umrli za rakom, jih je leta 2008 v svetovnem merilu največ (18,2 %) umrlo za pljučnim rakom (3). Tudi epidemiološki kazalci v Sloveniji kažejo, da pljučni rak predstavlja najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri moških (738 primerov smrti od skupnih 3260) in drugi najpogostejši pri ženskah (297 primerov od skupnih 2527). V Sloveniji je petletno preživetje žensk s pljučnim rakom 17 %, pri moških pa 11,9 %, kar pljučni rak uvršča na 4. mesto po agresivnosti rakavih obolenj (2).

### **1.1.2 Etiologija in dejavniki tveganja za nastanek pljučnega raka**

Kancerogeneza pljučnega raka je pravzaprav motnja v celičnem ciklu in je posledica več genskih in molekularnih sprememb, ki jih povzročijo tako zunanji kot notranji dejavniki. Med zunanjimi dejavniki je najpomembnejše dolgotrajno kajenje, saj je v primerjavi z nekadilci verjetnost za nastanek raka pri moških kadilcih 8–15-krat večja, pri kadilkah 3–10-krat, pri pasivnih kadilcih pa je tveganje do 2-krat večje kot pri osebah, ki niso izpostavljene cigaretnemu dimu. V tobačnem dimu so dokazali najmanj 60 kancerogenih snovi. Mednje uvrščamo policiklične aromatične ogljikovodike kot sprožilce kancerogeneze, ki povzročijo mutacije in trajno okvaro DNA, derivate fenola kot promotorje kancerogeneze, nitrozamine in druge. Za nastanek raka so pomembne kadilske navade, kot so število in vrsta pokajenih cigaret, trajanje kajenja, inhalacijske navade kadilca. Ker se rak razvije le pri 10–20 % kadilcev, to kaže tudi na druge, predvsem notranje vzročne dejavnike. Pomembna je presnova kancerogenov, njihova odstranitev ali

pretvorba v aktivno obliko. Spojine citokroma P450 aktivirajo policiklične ogljikovodike, glutation-S-transferaze pa jih inaktivirajo. Strastni kadilci, ki ne zbolijo za pljučnim rakom, verjetno niso sposobni presnavljati kancerogenov v aktivne oblike. Ogroženi kadilci pa so najverjetneje brez omenjenih transferaz.

Poleg kajenja je med zunanji dejavniki nevarna poklicna izpostavljenost kancerogenim dejavnikom, kot so azbest, težke kovine (nikelj, svinec, baker, kadmij, krom, arzen) in druge kemične spojine (policiklični ogljikovodiki, vinilklorid, premogov katran, izpostavljenost razpadnim produktom, vse vrste sevanja). Omenjajo tudi vpliv hormonov, raznih zdravil, hrano z veliko maščobami, virusne okužbe (Epstein-Barr virus, humani papiloma virusi) in dolgotrajno uživanje marihuane. Določen vpliv ima onesnaženost zraka, saj je pljučni rak do 2-krat pogostejši v velikih mestih ali v krajih z zelo onesnaženim zrakom.

Med notranji vzroki lahko omenimo kronične pljučne bolezni (tuberkuloza, kronična obstruktivna pljučna bolezen, pljučna fibroza). Tudi bolniki, ki so že bili uspešno zdravljeni zaradi pljučnega raka ali raka dihalnih poti, pogosteje znova zbolijo zaradi novega primarnega raka pljuč. Gotovo pa sta med najpomembnejšimi notranji dejavniki aktivacija onkogenov in utišanje genov, ki zavirajo rast tumorja (antionkogenov). Med onkogeni sta pomembni skupini *RAS* in *MYC* (mutacije onkogene *KRAS* so povezane s kajenjem). Med antionkogeni so v patogenezo pljučnih tumorjev vpleteni *FHIT*, *APC* in *CDKN2*, najbolj pomemben pa je *TP53*, pri katerem so mutacije prav tako povezane s kajenjem oz. z metaboliti benzopirena (4, 5).

### **1.1.3 Histološka razvrstitev in patološke značilnosti pljučnih tumorjev**

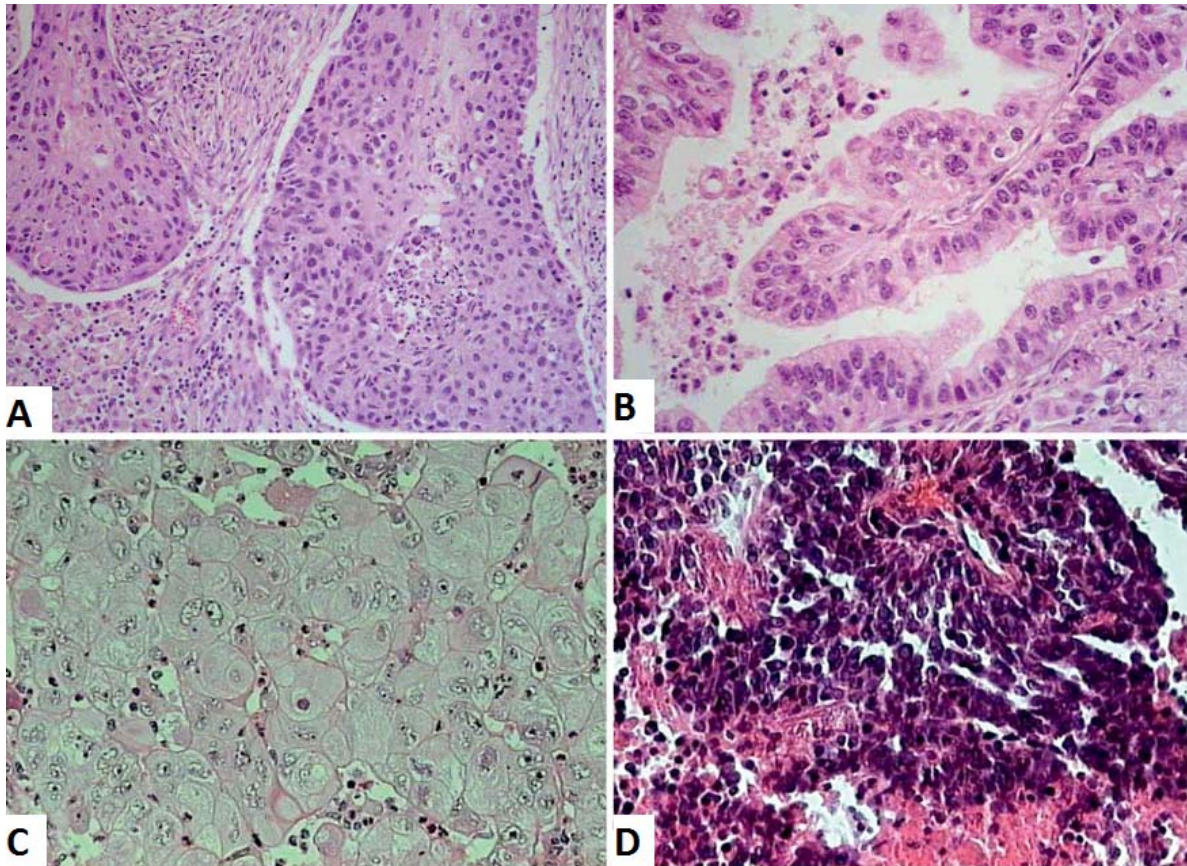
Izraz pljučni rak se v strokovni terminologiji uporablja za tumorje, ki izhajajo iz respiratornega epitelija (bronhiji, bronhioli in alveoli). Pljučni rak je najpogostejši med malignimi tumorji, ki se pojavljajo na pljučih. Na pljučih se pogosto pojavljajo tudi metastaze različnih tumorjev drugih organov, ostali primarni maligni tumorji na pljučih (primarni pljučni limfomi, sarkomi v pljučnem parenhimu) pa so izjemno redki. V praksi ločimo dve skupini pljučnega raka – drobnocelični karcinom, ki predstavlja 15–25 % pljučnih rakov, in nedrobnocelične karcinome, katerih delež je 75–85 %.

Značilnosti **drobnoceličnega pljučnega raka** so majhne, drobne tumorske celice s pičlo citoplazmo in hiperkromnimi jedri (slika 1D). Pojavi se po dolgotrajnem kajenju, zato je pogost v dihalnih poteh. Primarni tumor je večinoma zelo majhen, zato ga večkrat odkrijejo šele zaradi pojava zasevkov. Celične lastnosti drobnoceličnega karcinoma so zelo kratek čas podvojevanja, hiter vdor v žilne prostore in posledično zelo zgodnje metastaziranje. Ta vrsta raka proizvaja in izloča nekatere specifične peptidne hormone (kortikotropin, arginin-vazopresin, gastrin sproščajoči peptid), kar lahko uporabimo v diagnostične namene.

**Nedrobnocelične pljučne rake** glede na histološke in citološke značilnosti v grobem razvrstimo v tri skupine:

- **Ploščatocelični rak** ali **karcinom skvamoznih celic** se zaradi kajenja razvije predvsem v glavnih dihalnih poteh. Tumorske celice so polimorfne, velike, z obilno citoplazmo in jasnimi celičnimi mejami (slika 1A). Prisotni sta žariščno poroževanje in močna nekroza. Tumor raste počasi in relativno pozno zaseva v bezgavke.
- **Žlezni rak** ali **adenokarcinom** je danes najpogostejša histološka vrsta pljučnega raka. Večinoma zraste na periferiji pljuč, lahko pa se pojavi kjerkoli v dihalnih poteh ali pljučih. Histološko ga spoznamo po značilno oblikovanih žlezah in/ali po izločanju sluzi. Celična citoplazma je obilna, nežno granulirana, občasno so prisotne vakuole s sluzjo (slika 1B). Žlezni rak zaseva v bezgavke hitreje kot ploščatocelični, a počasneje kot drobnocelični rak. Petina adenokarcinomov ima že pri postavitvi diagnoze metastaze.
- **Velikocelični rak** ali **makrocelularni karcinom** je skupina tistih tumorjev, ki so brez citoloških značilnosti žleznega, ploščatoceličnega in drobnoceličnega raka. Navadno gre za velike tumorske lezije, ki rastejo periferno. Običajno so tumorji slabo diferencirani, grajeni iz gnezd velikih celic z izrazitimi nukleoli, prisotne so obsežne krvavitve in nekroze (slika 1C). Rak metastazira v bezgavke, jetra, kosti, možgane, tudi v osrčnik. V splošnem je prognoza slabša kot pri ostalih nedrobnoceličnih rakih.

Od omenjenih histoloških tipov nedrobnoceličnega raka se nekoliko razlikujeta bronhioloalveolarni karcinom, ki je podvrsta žleznega raka, in karcinoid. Pri kadilcih lahko najdemo vse omenjene histološke tipe raka, čeprav sta s kajenjem povezana predvsem ploščatocelični in drobnocelični pljučni rak. Pri nekadilcih se najpogosteje razvije žlezni rak, čeprav se tudi pri njih lahko pojavijo vsi histološki tipi raka (4–8).



**Slika 1:** Histološke značilnosti glavnih štirih vrst pljučnega raka: A: ploščatocelični rak, B: žlezni rak, C: velikocelični rak, D: drobnocelični pljučni rak (9).

#### 1.1.4 TNM-klasifikacija

TNM (ang. Tumor-Node-Metastasis; slov. tumor-bezgavke-metastaze)-klasifikacija je mednarodno uveljavljen sistem za določanje razširjenosti raka glede na stanje primarnega tumorja (T), stanje področnih bezgavk (N) in pojav zasevkov v oddaljenih organih (M) (4, 10). TNM-klasifikacija se je prvotno uporabljala samo za razvrščanje bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Pri drobnoceličnem pljučnem raku se je uveljavilo preprosto razvrščanje bolnikov v dve skupini glede na razširjenost bolezni: omejena bolezen (bolezen, omejena na polovico prsnega koša in področne bezgavke) in razširjena bolezen (bolezen sega izven predelov, omenjenih pri omejeni bolezni). Po najnovejših priporočilih pa naj bi se zadnja, 7. izdaja TNM-klasifikacije uporabljala tudi za določanje razširjenosti drobnoceličnega pljučnega raka (preglednica I). Na osnovi TNM-klasifikacije bolnike s pljučnim rakom razvrstimo v stadije, kot je prikazano v preglednici II. Poznavanje stadija je potrebno za izbiro in spremljanje zdravljenja ter daje natančnejše podatke o prognozi (10, 11).

**Preglednica I:** 7. izdaja TNM-klasifikacije za pljučni rak. Besedilo v poševnem tisku prikazuje dopolnila 7. izdaje TNM-klasifikacije glede na 6. izdajo (11, 12).

<b>Kategorija/Podkategorija</b>	<b>Opis</b>
<b>T – primarni tumor</b>	
TX	Primarnega tumorja ne moremo dokazati, tumorske celice so prisotne v izpljunku ali bronhialnem izpirku.
T0	Ni znakov primarnega tumorja.
TIS	Karcinom in situ.
T1	Tumor $\leq 3$ cm v premeru, brez vraščanja prek lobarnega bronha.
<i>T1a</i>	<i>Premer <math>\leq 2</math> cm.</i>
<i>T1b</i>	<i>Premer med 2 in 3 cm.</i>
T2	Premer med 3 in 7 cm; zajema glavni bronhij $\geq 2$ cm od glavne karine; vrašča v visceralno plevro; atelektaza ali obstruktivski pnevmonitis, vendar ne celotnega pljučnega krila.
<i>T2a</i>	<i>Premer med 3 in 5 cm.</i>
<i>T2b</i>	<i>Premer med 5 in 7 cm.</i>
T3	Premer $> 7$ cm; neposredno vraščanje v steno prsnega koša, prepono, mediastinalno plevro, parietalni perikard; tumor v glavnem bronhu, vendar brez zajetja glavne karine; atelektaza ali obstruktivski pnevmonitis celotnega pljučnega krila; od tumorja ločen zasevek v istem pljučnem režnju.
T4	Direktno vraščanje v mediastinum, srce, velike žile, glavno karino, trahejo, požiralnik, hrbtenico; zasevek v parenhimu v drugem režnju istega krila.
<b>N – bezgavke</b>	
NX	Zajetja bezgavk ni mogoče določiti.
N0	Brez zajetja bezgavk.
N1	Zajetje istostranskih bronhopulmonalnih ali hilusnih bezgavk.
N2	Zajetje istostranskih mediastinalnih ali subkarinalnih bezgavk.
N3	Zajetje bezgavk nasprotne strani mediastinuma ali pljučnega hilusa; zajetje skalenskih ali supraklavikularnih bezgavk na isti ali nasprotni strani.

---

**M – oddaljeni zasevki**

---

M0	Ni oddaljenih zasevkov.
M1	Oddaljeni zasevki.
<i>M1a</i>	<i>Zasevki v parenhimu nasprotnega pljučnega krila; zasevki na plevri in/ali maligni plevralni ali perikardialni izliv.</i>
<i>M1b</i>	<i>Oddaljeni zasevki v drugih organih.</i>

**Preglednica II:** Stadiji pljučnega raka glede na TNM-klasifikacijo in 5-letno preživetje (13).

<b>Stadij</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>5-letno preživetje</b>
<b>Prikriti</b>	TX	N0	M0	
<b>0</b>	T IS	N0	M0	
<b>IA</b>	T1a–T1b	N0	M0	<b>50–80 %</b>
<b>IB</b>	T2a	N0	M0	<b>47 %</b>
<b>IIA</b>	T1a–T2a	N1	M0	<b>36 %</b>
	T2b	N0	M0	
<b>IIB</b>	T2b	N1	M0	<b>26 %</b>
	T3	N0	M0	
<b>IIIA</b>	T1a–T3	N2	M0	<b>19 %</b>
	T3	N1	M0	
	T4	N0–N1	M0	
<b>IIIB</b>	T4	N2	M0	<b>7 %</b>
	T1–T4	N3	M0	
<b>IV</b>	vsi T	vsi N	M1a–M1b	<b>2 %</b>

### 1.1.5 Zdravljenje pljučnega raka

#### Nedrobnocelični pljučni rak

- **operabilni pljučni rak (stadiji T1–T2, N0–N2, M0)**

Pri takem raku je kirurško zdravljenje prva izbira. Bolniki s patološko potrjenim stadijem IA ne potrebujejo dopolnilne terapije. Pri ostalih bolnikih se zaradi velikega tveganja

lokalne in/ali sistemske ponovitve raka odločijo tudi za dopolnilno citostatsko in/ali obsevalno zdravljenje. Za natančno shemo zdravljenja je potreben individualen pristop.

- **neoperabilni, nemetastatski pljučni rak (stadiji T3–T4 ali N2–N3, M0 in nižji, če bolnik nima pogojev za kirurško zdravljenje)**

Potrebno je individualno odločanje, pri čemer se upoštevajo anatomska razširjenost bolezni, bolnikovo splošno stanje in spremljajoče bolezni. Če je tumor potencialno operabilen in gre za stadij N2 z zajetjem le ene regije bezgavk, je indicirana uvodna kemoterapija s ponovno oceno operabilnosti. Pri ostalih bolnikih zdravljenje izberemo med: paliativnim obsevanjem; radikalnim obsevanjem; uvodno kemoterapijo in radikalnim obsevanjem; uvodno kemoterapijo, radikalnim obsevanjem in sočasno kemoterapijo.

- **razširjeni pljučni rak (stadiji T4 z malignim pleuralnim izlivom ter vsi M1)**

Za dobro poučene bolnike z zadovoljivim splošnim stanjem je osnovno zdravljenje citostatska terapija. Pri redkih bolnikih z razširjenim pljučnim rakom in zasevkom v centralnem živčevju, v nadledvičnici in drugje sta indicirana tudi kirurško zdravljenje ali radiokirurgija. Po prvi citostatski terapiji je najpogosteje primerno podporno in simptomatsko zdravljenje, ki vključuje paliativno obsevanje primarnega tumorja, kostnih metastaz ali metastaz v centralnem živčevju.

### **Drobnocelični pljučni rak**

Osnovno zdravljenje je citostatska terapija. Pri bolnikih z boleznijo, omejeno na prsni koš, dodajo še obsevanje ali (zelo redko in le pri stadiju N0 M0) kirurško zdravljenje. Ker je drobnocelični rak občutljiv na različne kombinacije citostatikov, je ob ponovitvi bolezni pogosto indicirano dodatno citostatsko zdravljenje (12).

## **1.2 Pomen in mehanizmi preskrbe rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami**

Spremenjen metabolizem je ena izmed glavnih značilnosti raka. Prvi, ki se je že v 30. letih 20. stoletja ukvarjal z metabolizmom v rakavih tkivih, je bil Otto Warburg. Odkril je, da imajo rakava tkiva tudi ob prisotnosti kisika zmanjšano oksidativno fosforilacijo in povečano glikolizo, zato govorimo o učinku aerobne glikolize. Te metabolične spremembe naj bi rakavim celicam omogočale proliferacijo v hipoksičnih razmerah in izognitev apoptozi (14). Povišan katabolizem glukoze ustvarja presežek piruvata, končnega produkta glikolize. Nekaj piruvata se preko laktata pretvori v acetil-koencim A (acetil-CoA), ta pa se



uporabi pri *de novo* sintezi maščobnih kislin. *De novo* sinteza maščobnih kislin je v rakavih celicah navadno povišana in od nje je zelo odvisna celična oskrba z maščobnimi kislinami (15). V 50. letih 20. stoletja je Medes odkril, da imajo rakava tkiva nekoliko povečano lipogenezo. V 90. letih pa je Kuhajda ugotovil, da je gen za sintazo višjih maščobnih kislin (FASN), ki je ključni encim v endogeni sintezi višjih maščobnih kislin, povezan s slabšo prognozo pri raku na dojki. Danes je t.i. lipogeni fenotip značilen za veliko večino rakavih bolezni (16).

Metabolizem maščobnih kislin je ključni vir energije in sestavin za proliferacijo celic in celično signaliziranje. Tumorske celice pridobijo višje maščobne kisline na dva načina: lahko jih pridobivajo eksogeno (iz krvi ali okoliškega netumorskega tkiva) ali endogeno (jih sintetizirajo same). V nerakavih celicah se maščobne kisline pretvorijo v trigliceride, ki predstavljajo zalogo energije, v fosfolipide za sintezo membran, ali pa oksidirajo v CO<sub>2</sub>. V hitro delečih se rakavih celicah se maščobne kisline ne pretvorijo v trigliceride, ampak se v glavnem uporabijo za sintezo fosfolipidov, ki so potrebni za sintezo membran in za posttranslacijske lipidne modifikacije proteinov. Vstop maščobnih kislin v β-oksidacijo pa zagotavlja rakavi celici dodatni vir energije, kadar metabolizem glukoze ni zadosten. V novejših študijah ugotavljajo, da so lipidi tudi pomembne signalne molekule. Torej ima vsaka sprememba v sintezi, sestavi in lokalizaciji lipidov in fosfolipidov odločilen vpliv na celotno celično obnašanje (16, 17). V nadaljevanju bomo predstavili dva pomembna encima, ki oskrbuje tkivo z maščobnimi kislinami, in encim, ki sodeluje v metabolizmu fosfolipidov.

### **1.2.1 Lipoproteinska lipaza**

Lipoproteinska lipaza (LPL) je poglobitni encim znotrajžilne presnove trigliceridov. Skrbi za eksogeno preskrbo tkiva z višjimi maščobnimi kislinami. Sintetizira se v parenhimskih celicah mnogih tkiv, od koder se prenese na površino endotelija (18). Fiziološka funkcija LPL je hidroliza trigliceridov na hilomikronih in lipoproteinih nizke gostote (VLDL), s čimer zagotavlja oskrbo tkiva z višjimi maščobnimi kislinami. LPL ima tudi sposobnost interagiranja z lipoproteini neodvisno od svoje lipolizne aktivnosti, kar omogoči encimu, da veže lipoproteine na steno žilja. Prav tako vpliva na privzem estrov holesterola in lipofilnih vitaminov (vitamina A in E) v celice brez hkratnega privzema ostalih sestavin lipoproteina (19).

Tkivno specifično uravnavanje sinteze in s tem aktivnosti LPL omogoča tkivom z velikimi presnovnimi potrebami učinkovito črpanje maščob iz krvi (17). Z nekaterimi raziskavami so že nakazali povezavo med LPL in rastjo rakavega tkiva. Pri bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom so ugotovili, da je aktivnost LPL v rakavem tkivu višja kot v sosednjem, navidezno zdravem tkivu, in da zvišana aktivnost LPL napoveduje krajše preživetje (20).

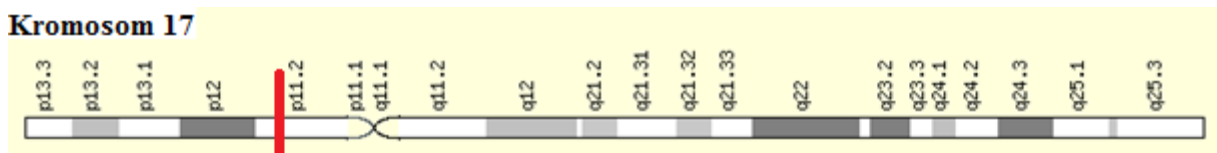
### 1.2.2 Sintaza višjih maščobnih kislin

FASN je edini encim v človeškem genomu, ki je sposoben *de novo* sinteze višjih maščobnih kislin in tako sodeluje pri endogeni preskrbi tkiva z višjimi maščobnimi kislinami (17). FASN sintetizira maščobne kisline iz acetyl-CoA in malonil-koencima A, glavni produkt pa je palmitat. Večina normalnih človeških celic in tkiv za sintezo novih strukturnih lipidov uporablja s hrano (eksogeno) pridobljene maščobne kisline, zato je izražanje gena za FASN zavrto. Hitro deleče se rakave celice imajo večje potrebe po višjih maščobnih kislinah (21), tumorji pa za sintezo membran prednostno uporabljajo *de novo* sintetizirane maščobne kisline (22). Skladno s tem je izražanje gena za FASN povečano pri večini človeških karcinomov in je povezano s slabšo prognozo. Pri bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom so pokazali, da je zvišana aktivnost FASN povezana s krajšim preživetjem bolnikov (23).

## 1.3 Fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaza (PEMT)

### 1.3.1 PEMT

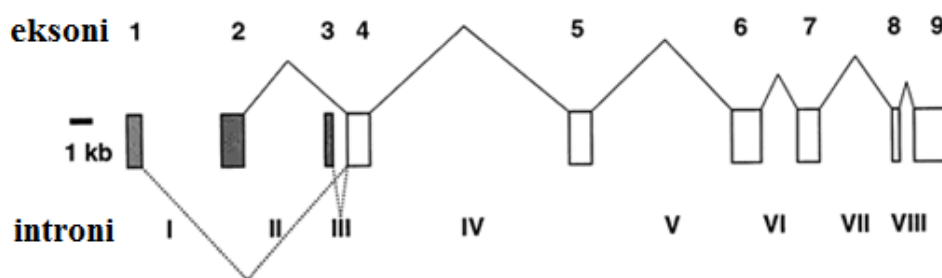
*PEMT* je v človeškem genomu lociran na kromosomu 17p11.2 (slika 2). Nahaja se med baznimi pari 17408877 in 17495022. Velikost gena je 86146 baznih parov. Obsega 9 eksonov in 8 intronov.



**Slika 2:** Z rdečo črto je označen položaj *PEMT* na kromosomu 17 (24).

Pri človeku so odkrili tri različne mRNA *PEMT*. Do razlik med temi tremi transkripti pride v 5' regiji, 15 nukleotidov pred kodonom za začetek translacije (25). Sklepajo, da so razlike

posledica različnega spajanja eksonov (26). Tako nastanejo transkript 1, ki vključuje ekson 1, transkript 2 z eksonom 2 in transkript 3 z eksonom 3 (slika 3) (27). Druga možna razlaga za različne transkripte je, da se pri prepisovanju gena v različnih človeških tkivih uporabi drugačen promotor. Transkripti *PEMT* so namreč po človeških tkivih različno razporejeni. Transkripta 1 in 2 sta prisotna v jetrih zarodka in odraslega, transkript 3 pa se nahaja v zarodku, glasilkah, vranici, placenti, prostati ter v jetrih zarodka in odraslega (28). Transkripti *PEMT* so prisotni tudi v možganih, testisih, srcu in skeletnih mišicah. Jetra so glavno mesto ekspresije gena (26), v telesu najbolj zastopan in hkrati glavni transkript v jetrih pa je transkript 2 (27). Vzrok za različno razporeditev transkriptov po človeških tkivih je lahko tudi tkivno specifično spajanje eksonov (28).

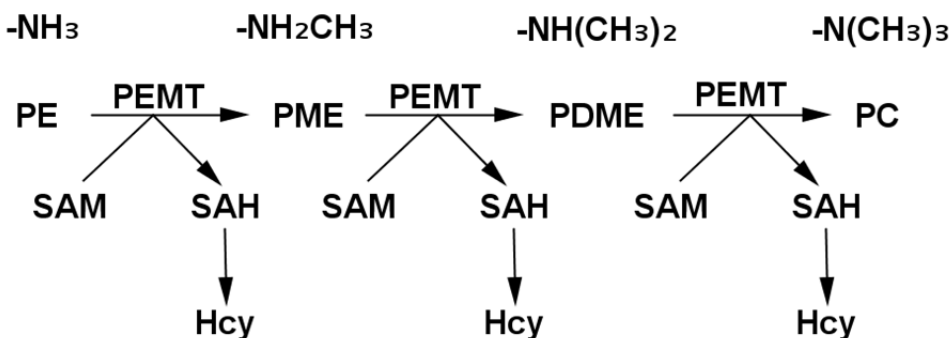


**Slika 3:** *PEMT* ima 9 eksonov in 8 intronov. Na shemi je prikazano različno spajanje eksonov 1, 2 ali 3 z eksonom 4 (26).

### 1.3.2 Osnovne značilnosti encima *PEMT*

#### Vloga *PEMT*

*PEMT* kodira encim *PEMT* (E.C. 2.1.1.17), ki katalizira reakcijo pretvorbe fosfatidiletanolamina (PE) v fosfatidilholin (PC) (slika 4). V tej reakciji se 3 metilne skupine prenesejo s S-adenozilmetionina (SAM) na PE. Pri tem nastanejo vmesna produkta fosfatidilmetiletanolamin (PME), fosfatidildimetiletanolamin (PDME) in končni produkt PC. Iz SAM nastane S-adenozilhomocistein (SAH), iz katerega nastane homocistein (Hcy).



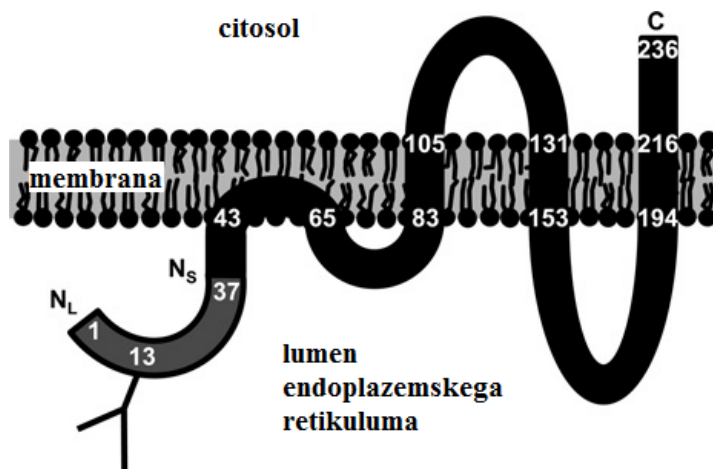
**Slika 4:** Reakcija metilacije PE v PC, ki jo katalizira *PEMT*.

PEMT je posredno pomemben tudi za sintezo holina. Hidroliza PC, ki nastane z metilacijo PE, je namreč edina znana *de novo* sinteza holina pri ljudeh (29).

Prvo omembo encimske reakcije nastanka PC preko metilacije PE v znanstveni literaturi zasledimo leta 1960. 1988 pa sta Ridgway in Vance ugotovila, da PEMT katalizira vse tri stopnje metilacije PE in da v tej encimski reakciji ostale metiltransferaze (v ožjem izboru sta bili še dve drugi metiltransferazi) niso prisotne (30). Optimalni pogoji za delovanje PEMT so v bazičnem pH 10,0–10,5. Katalitska aktivnost PEMT pri fiziološkem pH 7,4 je samo 10 % aktivnosti pri optimalnih pogojih (31).

### Strukturne značilnosti in lokacija PEMT

Ridgway je leta 1987 prvi izoliral encim iz podganjih jeter (25). S pomočjo meritev aktivnosti in imunoreaktivnosti so pri miših in podganah odkrili dve izoobliki PEMT, ki ju kodira isti gen (30, 32). Izoobliko, ki se nahaja v endoplazemskem retikulumu (ER) in predstavlja večji delež celotne aktivnosti PEMT, so poimenovali PEMT1, izooblika PEMT2 pa se nahaja na z mitohondriji povezanih membranah ER (MAM) (32). Nahajanje izooblik v specifičnih celičnih strukturah naj bi bilo značilno le za glodalce, saj so pri človeku ugotovili, da se različne izooblike encima nahajajo tako v ER kot v MAM (33). Vendar so tudi pri človeku zaradi treh različnih transkriptov gena odkrili dve izoobliki encima. Transkript 1 kodira encim PEMT-L (daljša izooblika), transkripta 2 in 3 pa encim PEMT-S (krajša izooblika). Velikost PEMT-S je 199 aminokislin oziroma približno 19 kDa, velikost PEMT-L pa 236 aminokislin oziroma približno 26 kDa. Aminokislinsko zaporedje PEMT-L je v N-terminalnem delu za 37 aminokislin daljše kot pri PEMT-S. Na mestu 13 je daljša izooblika za razliko od krajše N-glikozilirana (slika 5) (27).



**Slika 5:** Predpostavljena struktura obeh izooblik encima PEMT (27).

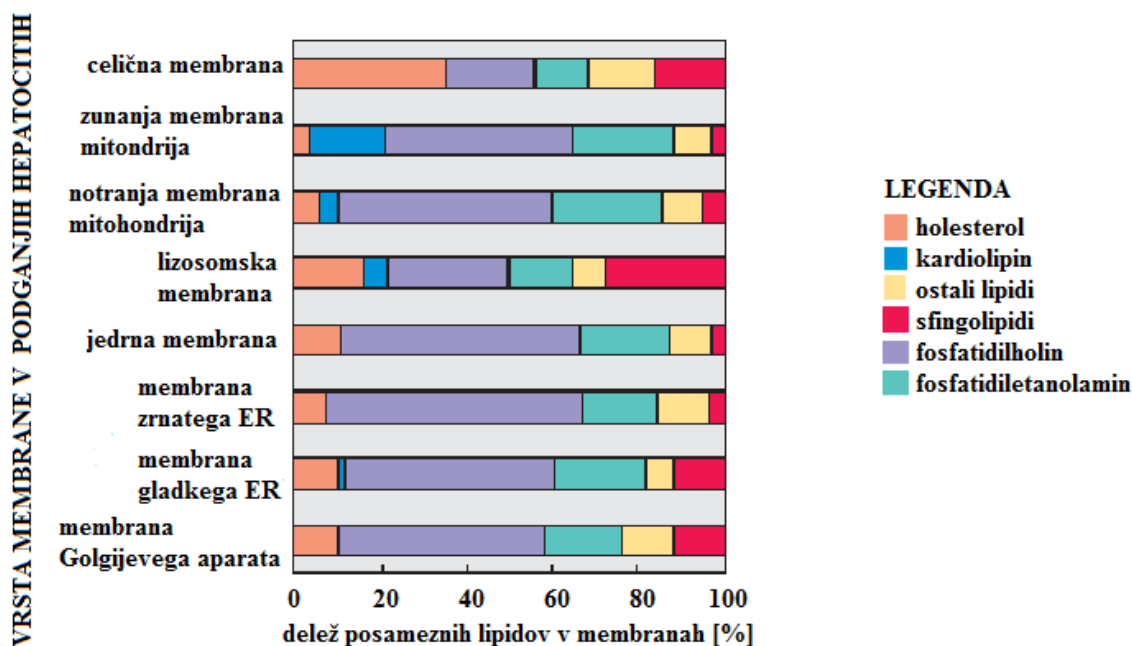
Do danes še niso objavili kristalografske strukture PEMT. Iz topografskih raziskav pa predpostavljajo, da je encim sestavljen iz štirih transmembranskih domen, ki prebadajo membrano ER (25), tako N-terminalni kot C-terminalni del naj bi bila v citosolu (33). Po najnovejših raziskavah pa naj bi bil encim sestavljen iz treh transmembranskih in ene membranske domene, ki pa ne prebada membrane. N-terminalni del naj bi se končal v lumnu ER, C-terminalni del pa v citosolu (slika 5). Aktivnost PEMT-L je zgolj 12,2 % aktivnosti PEMT-S. Vzrok za manjšo aktivnost daljše izooblike je N-glikozilacija, ki otežuje vezavo substratov v aktivno mesto encima (27). S kinetičnimi študijami so ugotovili, da naj bi imel encim skupno vezavno mesto za vse tri fosfolipidne substrate, v tretji in četrti transmembranski domeni pa sta dve ločeni vezavni mesti za SAM (25, 34).

### **Regulacija izražanja *PEMT***

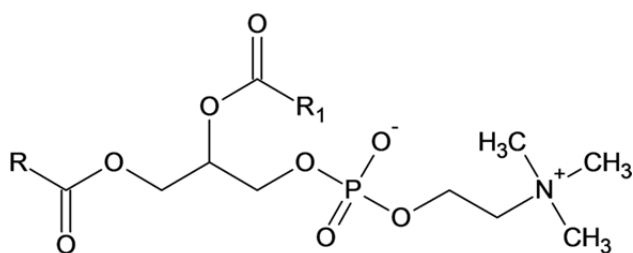
Glavni regulatorji aktivnosti PEMT so substrati in produkt SAM. Na nivoju regulacije transkripcije *PEMT* so se po proučevanju vezavnih mest kot potencialni transkripcijski faktorji izkazali jetrni jedrni faktor, aktivacijski protein 1 (AP-1) in protein specifičnosti 1 (Sp1). Ugotovili so, da je Sp1 negativen regulator izražanja *PEMT*. To potrjujejo študije diferenciacije celične linije 3T3-L1 v adipocite, kjer se raven Sp1 zniža, tik preden se poveča ekspresija *PEMT* (25). Estrogen, ki se veže na promotorsko regijo gena, je pozitiven transkripcijski faktor *PEMT*. Vpliv estrogena na izražanje gena potrjujejo raziskave na mišjih in človeških hepatocitih, pri katerih se ekspresija *PEMT* po dodatku estrogena poveča (35). Ženske pred menopavzo imajo manj možnosti za mišične in jetrne poškodbe zaradi pomanjkanja holina kot moški in ženske po menopavzi, ki imajo nižje ravni estrogena (25). Tudi polimorfizmi vplivajo na izražanje *PEMT*. Ugotovili so, da polimorfizem -774G>C v promotorski regiji *PEMT* onemogoča vezavo estrogena. Predvsem ženske pred menopavzo, pri katerih je polimorfizem prisoten, imajo pri pomanjkanju holina večje tveganje za odpoved organov (36).

## **1.4 Fosfatidilholin**

Gradniki membran evkariontskih celic so pretežno proteini, lipidi in v manjši meri ogljikovi hidrati, ki so del glikoproteinov in glikolipidov. Lipidni gradniki so fosfolipidi, sfingolipidi, holesterol, kardiolipin in drugi. Glavni predstavnik fosfolipidov je PC, katerega delež v celotnih lipidih variira glede na tip celične membrane (slika 6) (37). Molekula PC je sestavljena iz glicerola, v katerem sta dve hidroksilni skupini zaestreni z



Slika 6: Delež posameznih lipidov v membranah podganjih hepatocitov (37).

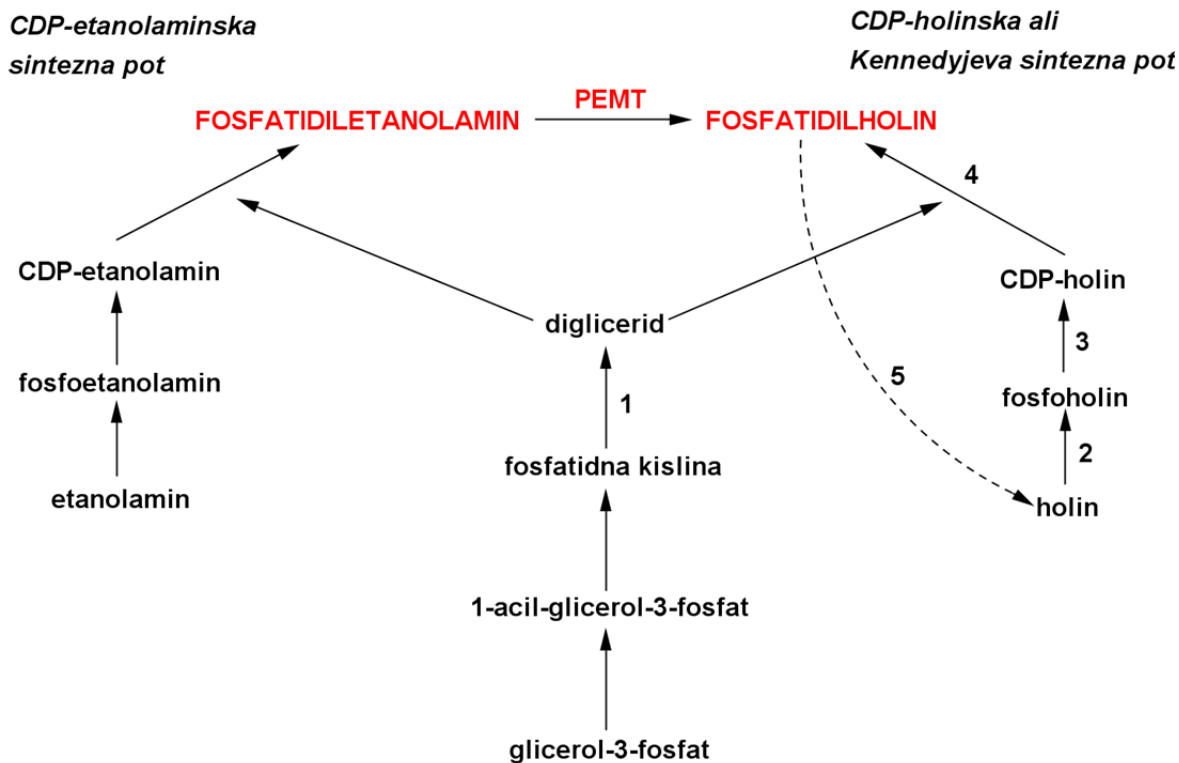


Slika 7: Struktura fosfatidilholina.

višjimi maščobnimi kislinami, ena hidroksilna skupina pa je zaestrena s fosfoholinom (slika 7). Sinteza PC poteka po dveh poteh. V vseh celicah z jedrom se PC sintetizira po citidindifosfoholinski (CDP-holinski) poti ali Kennedyjevi poti. V tej sintezni

poti v treh encimskih reakcijah iz holina preko vmesnih produktov fosfoholina in CDP-holina nastane PC. Za to sintezo je nujno potreben holin (slika 8) (29). PEMT sintezna pot pa je pomembna predvsem v hepatocitih, kjer predstavlja 30 % sinteze PC (26). Sinteza PE, iz katerega pod vplivom encima PEMT nastane PC, poteče po analogni reakcijski shemi kot za PC. Sinteza PC po PEMT sintezni poti je neodvisna od holina (29).

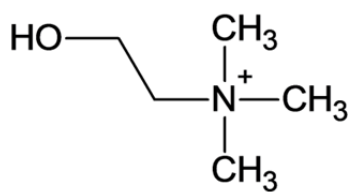
Obe sintezni poti za gradnike potrebujejo digliceride, ki nastanejo z mobilizacijo maščobnih kislin. Najprej poteče aciliranje glicerol-3-fosfata, nato še aciliranje 1-acilglicerol-3-fosfata in nastane fosfatidna kislina. Pod vplivom encima fosfataza fosfatidne kisline s hidrolizo iz fosfatidne kisline nastane diglicerid. Digliceridi se vgradijo v CDP-holin oz. CDP-etanolamin in nastaneta PC oz. PE (slika 8) (30, 38).



**Slika 8:** Sinteza shema PC in PE ter povezanost z metabolizmom maščobnih kislin.

Pomembni encimi so označeni s številčkami, črtkane puščice predstavljajo katabolizem. 1, fosfataza fosfatidne kisline; 2, holin-kinaza; 3, citidintrifosfat (CTP):fosfoholin-citidiltransferaza; 4, CDP-holin:1,2-diacilglicerol-holinfosfotransferaza; 5, fosfolipaze.

## 1.5 Holin



**Slika 9:** Struktura holina.

Holin je esencialna biološka molekula z etanolaminskim skeletom in trikrat metilirano amino skupino (slika 9). Priporočen dnevni vnos holina je 550 mg za moške in 425 mg za ženske (39). Človek pridobiva holin po dveh poteh. Prva je vnos holina s hrano, druga pa je edina znana *de novo* sinteza holina, kjer se PE najprej pretvori v PC, nato pa iz PC pod

vplivom različnih fosfolipaz nastane holin (slika 8, pot 5) (29). *PEMT* sintezna pot je zelo pomembna predvsem pri nezadostnem vnosu holina s hrano. Ekspresija *PEMT* v jetrih podgan, ki so na brezholinski dieti, se poveča kar 2-krat, celotna vsebnost *PEMT* pa 5-krat v primerjavi s kontrolnimi podganami (40). Z razvojem miši z izbitim genom za *PEMT* (*PEMT*<sup>-/-</sup> miši) so nedvoumno dokazali, da je holin esencialno hranilo. *PEMT*<sup>-/-</sup> miši na brezholinski dieti so namreč po treh dneh poginile (29), raven vseh holinskih spojin pa se

je pri *PEMT*<sup>-/-</sup> miših znižala ne glede na to, ali so bile na brezholinski dieti ali ne (41). Torej igra PEMT v sintezi holina pomembno vlogo kljub vnosu holina s hrano.

Holin je ključna spojina za normalno delovanje celic, saj je prekurzor več pomembnih spojin: SAM je donor metilnih skupin, PC je pomembna komponenta celičnih membran, acetilholin je nevrottransmitter (29). SAM, endogeni donor metilnih skupin, ki v več reakcijskih stopnjah lahko nastane tudi iz holina, sodeluje v procesu metilacije DNA. Pri pomanjkanju holina je manj SAM, kar vodi v hipometilacijo DNA, pri povišanih vrednostih holina pa je več SAM in rezultat tega je hipermetilirana DNA. Za rakavo tkivo sta značilni spremenjena metilacija DNA in odsotnost mehanizmov poprave DNA (42). Če je stopnja metilacije v promotorski regiji gena spremenjena, se spremeni izražanje gena (43). Raziskava o nastanku raka prostate je pokazala, da je promotorska regija gena za glutation-S-transferazo p1 hipermetilirana. Zaradi tega se gen proteina, ki sodeluje pri odstranjevanju reaktivnih kemijskih spojin in na ta način zavira nastanek raka, izraža v manjši meri. Ker so pri raku prostate hkrati odkrili tudi zvišane vrednosti holinskih spojin, sklepajo, da ima holin kot donor metilne skupine pomembno vlogo v procesu kancerogeneze (42).

## 1.6 Fiziološka vloga metabolizma fosfolipidov

### Vloga fosfatidilholina in PEMT v jetrih

PEMT je pretežno jetrno-specifični encim; aktivnost PEMT v ostalih tkivih je največ 2 % jetrne aktivnosti (44). Ugotovili so, da imata PEMT in PC zelo pomembno vlogo pri transportu trigliceridov iz hepatocitov v kri. PC je glavni predstavnik lipidov na zunanji površini VLDL delcev, s katerimi se trigliceridi izločijo iz jeter, in pomemben gradnik celičnih membran, preko katerih se vrši izločanje VLDL delcev iz hepatocitov v kri (45). Pri *PEMT*<sup>-/-</sup> miših na tritedenski brezholinski dieti se je vsebnost trigliceridov v jetrih povečala do 6-krat in je prišlo do jetrne odpovedi. Pri *PEMT*<sup>-/-</sup> miših, ki so jih 3 tedne hranili s hrano, bogato z maščobami, so na koncu raziskave v jetrih mišjih samcev izmerili kar 4–6-krat višje vrednosti trigliceridov in estrov holesterola v primerjavi s *PEMT*<sup>+/+</sup> mišmi. Skladno s tem so bile vrednosti trigliceridov v krvi mišjih samcev *PEMT*<sup>-/-</sup> 60 % nižje (46). Najverjetneje pride do zmanjšane izločanja VLDL, ko vsebnost PC v jetrih pade pod določeno mejo (45). Ker je bilo pri *PEMT*<sup>+/+</sup> in *PEMT*<sup>-/-</sup> miših pri normalnih pogojih izločanje VLDL neprizadeto (46), Kennedyjeva pot sinteze PC zadostuje za

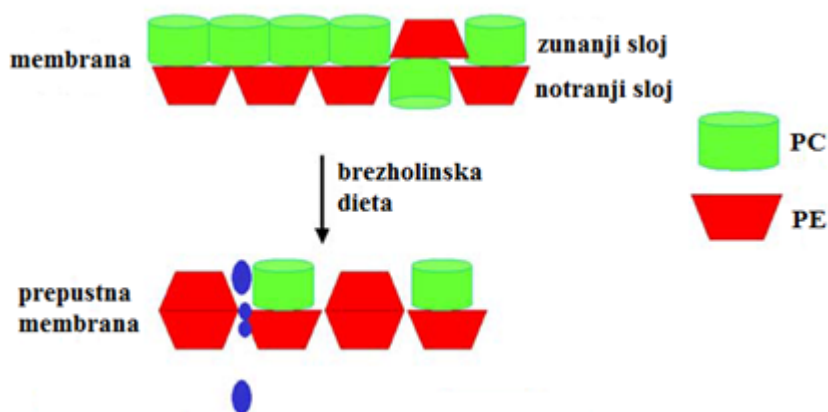


normalno delovanje hepatocitov. Do kopičenja trigliceridov pride pri *PEMT*<sup>-/-</sup> miših na brezholinski dieti ali na dieti z veliko maščobami. Izgleda, da PEMT znatno pripomore k sintezi PC in/ali holina v primeru povečanih potreb po PC in/ali holinu, saj CDP-holinska pot ne nadomesti izpada PEMT sintezne poti v celoti.

V hepatocitih ima PEMT pomembno vlogo tudi pri endogeni sintezi holina, ki je izhodna spojina sinteze PC po CDP-holinski poti. Če pri nezadostnem vnosu holina PEMT ni aktiven, raven PC upade. *PEMT*<sup>-/-</sup> mišim na tritedenski brezholinski dieti je namreč vsebnost PC v jetrih padla za več kot 56 % (46).

### Vloga fosfatidilholina in PEMT pri zagotavljanju integritete bioloških membran

PC in PE sta glavna predstavnika fosfolipidov v celičnih membranah sesalcev, njuno razmerje pa vpliva na integriteto membran. Za zagotavljanje integritete membran mora biti vrednost razmerja PC/PE 1,5–1,8. Če vrednost razmerja pade pod 1, se poruši integriteta in poveča prepustnost membran. PC ima cilindrično obliko in se nahaja predvsem v zunanji plasti membranskega fosfolipidnega dvosloja. PE ima obliko prisekanega stožca in je v večji meri zastopan v notranjem sloju. Če se PE v povečanem obsegu vgrajuje v membrane, membrana zaradi stožčaste strukture PE ne tesni več (slika 10). PEMT ima lahko pomembno vlogo v uravnavanju razmerja PC/PE, ker v primeru povečanih potreb po PC pretvarja PE v PC, ko pa v celicah primanjkuje holina, je edini vir PC.



**Slika 10:** Če se vrednost razmerja PC/PE zniža, postane membrana bolj prepustna (47).

Pri *PEMT*<sup>-/-</sup> miših na brezholinski dieti se je razmerje PC/PE v membrani hepatocita znižalo že po dveh dneh – vsebnost PC je upadla, vsebnost PE pa se je močno povečala –, zato se je razvil steatohepatitis. Ker je bila PEMT sintezna pot zavrta, hkrati pa miši niti z

endogeno sintezo niti s hrano niso dobile zadostnih količin holina za sintezo PC po CDP-holinski poti, je sinteza PC v hepatocitih popolnoma izostala. PE je nastajal v normalnih količinah, saj za njegovo sintezo holin ni potreben. Razmerje PC/PE je ključno tudi za preživetje drugih celic. Zaradi povečane vsebnosti PE glede na PC so se poškodovale membrane miocitov, ki so postale bolj prepustne. V celicah celične linije PC12 pa je znižanje razmerja PC/PE izzvalo celično smrt (47).

### **Vloga fosfatidilholina in PEMT pri sintezi maščobnih kapljic**

Adipociti so specializirane celice za skladiščenje maščob, največji volumen teh celic pa zavzemajo maščobne kapljice (48). Maščobne kapljice so zgrajene iz lipidne sredice, ki jo obdaja enojna plast fosfolipidov, sestavljena pretežno iz PC in PE. V procesu nastanka adipocitov se v maščobno kapljico vgrajuje PE, v procesu stabilizacije maščobne kapljice pa z metiliranjem že vgrajenega PE nastane PC. Z imunskim odtisom so ugotovili, da predstavlja ekspresija *PEMT* v mišjem belem maščobnem tkivu 20 % ekspresije v jetrih, višjo ekspresijo *PEMT* pa so opazili tudi v človeškem belem maščobnem tkivu. Izražanje *PEMT* v adipocitih doseže vrh prav ob koncu diferenciacije adipocitov, močno pa se je povečalo tudi v belem maščobnem tkivu miši, ki so jih 3 tedne hranili z mastno hrano. Torej lahko povečano ekspresijo *PEMT* povežemo s povečanim kopičenjem trigliceridov v adipocitih. Če je izražanje gena zmanjšano, potem že prisotni PC ne zadostuje za normalni nastanek adipocitov. Po 90-odstotnem zmanjšanju ekspresije *PEMT* je namreč v adipocitih prišlo do znatnega upada trigliceridov in PC ter do povečanega sproščanja maščobnih kislin (49).

## **1.7 Kancerogeneza, PEMT in metabolizem fosfolipidov**

Tumorsko tkivo ima zaradi hitre proliferacije in rasti celic povečane potrebe po maščobnih kislinah, ki jih celice med drugim pretvorijo v lipide za sintezo membran. Ker je PC glavni predstavnik fosfolipidov v celičnih membranah, lahko pri povečanih potrebah po PC pričakujemo zvišano aktivnost encimov, udeleženih v sintezi PC. Ugotovili so, da je pri večini rakov debelega črevesja raven PC v membranah tumorskih celic zvišana. Z medsebojno primerjavo malignih tumorjev pa se je izkazalo, da je za maligne novotvorbe z velikim številom metastaz značilno povečano razmerje PC/PE v primerjavi z malignimi novotvorbami z malo metastazami. Raziskave še kažejo, da so pri različnih vrstah rakov

zvišane tudi aktivnosti encimov CDP-holinske poti. Hkrati so zvišane aktivnosti encimov, ki hidrolizirajo PC v holin in na ta način omogočajo hitro obnavljanje zalog PC (50).

Raziskav, ki bi proučevale vlogo PEMT v procesu nastanka raka, je malo, pa še te so v glavnem povezane z jetrnim rakom. Tessitore in sodelavci so ugotovili, da je v jetrnem rakavem tkivu aktivnost PEMT znižana, v 62 % tumorjev celo nezaznavna. Preživetje rakavih bolnikov, pri katerih se mRNA PEMT2 v vzorcih jetrnega raka ni izražala, je značilno krajše kot pri bolnikih z večjim izražanjem mRNA PEMT2 (51). Do podobnih zaključkov so prišli tudi v drugi raziskavi. V napredovalih jetrnih nodulih se je raven mRNA PEMT2 zmanjšala za 60 % v primerjavi z normalnimi jetri. V vzorcih jetrnega karcinoma, napredovalega jetrnega raka in metastazah pa mRNA PEMT2 sploh niso zaznali. Skladno z manjšim izražanjem *PEMT2* se je zmanjšala tudi celotna aktivnost PEMT (ki vključuje PEMT1 in PEMT2). Zaključimo lahko, da je zmanjšano izražanje *PEMT2* povezano z razvojem jetrnega raka, saj naj bi encim zaviral rast in diferenciacijo celic. Sklepajo namreč, da povečana aktivnost PEMT2 vodi v zmanjšano aktivnost Kennedyjeve poti sinteze PC, kar pa zavira rast celic (52).

Spremenjeno izražanje *PEMT* je povezano tudi z razvojem raka na dojkah. Ko so pri ženskah na nadomestni hormonski terapiji raziskovali vzroke za raka na dojkah, se je izkazalo, da je za večje tveganje za nastanek raka na dojkah odgovoren polimorfizem -774G>C v promotorski regiji *PEMT*. Največje tveganje imajo ženske, ki so homozigoti za polimorfizem, heterozigoti imajo manjše tveganje v primerjavi z mutiranimi homozigoti in večje tveganje v primerjavi z nemutiranimi homozigoti (53). Zaradi polimorfizma naj bi bilo izražanje *PEMT* manjše, vrednosti holina nižje, to pa vodi v nastanek raka. Po tej raziskavi je torej količina holina v organizmu obratnosorazmerna z nastankom raka.

## 2. NAMEN DELA

Pljučni rak je med najpogostejšimi rakavimi obolenji, po smrtnosti pa je na prvem mestu med vsemi vrstami raka. Ker predstavlja velik javnozdravstveni problem, je pri pljučnem raku smiselno proučevati molekularne in genetske značilnosti nastanka in napredovanja raka. Vsa nova spoznanja lahko uporabimo za razvoj novih metod diagnostike, zdravljenja in za napovedovanje prognoze pljučnega karcinoma. Pri nedrobnoceličnem pljučnem karcinomu so že odkrili zvišane ekspresije genov in aktivnosti encimov, ki sodelujejo pri oskrbi rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami. Za sintezo PC, glavnega predstavnika fosfolipidov v membranah, so prav tako potrebne višje maščobne kisline. Ker je PC končni produkt encimske reakcije PEMT, je smiselno povezati PEMT in nastanek raka. V raziskavah so pri različnih vrstah rakov ugotovili, da so za karcinome značilne zvišane vrednosti holinskih spojin. PEMT igra pomembno vlogo tudi pri povečanih potrebah po PC in holinu ter pri zagotavljanju integritete membran. Nasprotno nekatere študije kažejo na znižano aktivnost PEMT pri hepatokarcinomu. PEMT v nedrobnoceličnem pljučnem raku pa do zdaj še ni bil proučevan.

Namen raziskave diplomskega dela je izmeriti izražanje gena za encim PEMT v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu in v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika. Predvidevamo, da je v tumorskih celicah potreba po fosfatidilholinu in holinu povečana, zato pričakujemo tudi višje izražanje *PEMT* v rakavem tkivu. Dokazati želimo naslednji hipotezi:

- Izražanje *PEMT* je višje v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu kot v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika.
- Višje izražanje *PEMT* v rakavem tkivu napoveduje krajše preživetje bolnika.

V raziskavo bomo vključili vzorce 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Iz vzorcev pljučnega tkiva bolnikov so predhodno že izolirali celokupno RNA in jo prepisali v komplementarno DNA (cDNA). Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v realnem času bomo izmerili izražanje *PEMT* v rakavem in sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu vseh 42 bolnikov. Rezultate meritev bomo primerjali s kliničnimi podatki bolnika in določili prognostični pomen izražanja *PEMT*. Prognostično vrednost bomo primerjali tudi z drugimi znanimi prognostičnimi kazalci, kot so hujšanje bolnika pred operacijo, zvišan stadij bolezni ter zvišani aktivnosti LPL in FASN v pljučnem rakavem tkivu.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Vzorci**

V raziskavo smo vključili 42 preiskovancev, ki so jim kirurško odstranili nedrobnocelično pljučno rakavo tkivo v stadijih I, II in III. Vzorce rakavega tkiva in sosednjega, navidezno zdravega tkiva so odrezali od odstranjenega pljučnega režnja v roku 15 minut po operaciji. Rakavo tkivo je bilo odvzeto s periferije najbolj tumorsko aktivnega predela, navidezno zdravo tkivo pa je bilo odvzeto s periferije pljučnega režnja, daleč stran od tumorskega predela. Vsakemu bolniku so odvzeli oba vzorca, navidezno zdravo pljučno tkivo služi kot kontrolno tkivo. Vzorce tkiv so do nadaljnjih analiz shranili v tekočem dušiku. Stadij nedrobnoceličnega pljučnega raka so določili v skladu s 6. izdajo TNM-klasifikacije rakavih obolenj (54). Rakavo tkivo so histološko opredelili v skladu s histološko klasifikacijo Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) (55). Študijo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko. Od vseh bolnikov, vključenih v raziskavo, so pridobili pisno soglasje.

Bolnike so spremljali 4 leta. Prvi 2 leti so bolnike pregledali vsake 3 mesece, zadnji 2 leti pa vsakih 6 mesecev. Ob vsakem pregledu so rutinsko ocenili klinično stanje in rezultate rentgenskega slikanja. V primeru suma na napredovanje bolezni so opravili tudi bronhoskopijo, scintigrafijo in slikanje z računalniško tomografijo. Bolnike v III. stadiju bolezni so po operaciji zdravili s kemoterapijo (56).

#### **3.2 Meritve encimske aktivnosti FASN in LPL**

V teh istih vzorcih bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom so v predhodnih raziskavah izmerili encimski aktivnosti FASN in LPL. Meritve aktivnosti FASN so opravili v tkivnih ekstraktih, ki so jih s pomočjo celične lize pridobili iz pljučnega rakavega in kontrolnega tkiva. Aktivnost FASN so določili v supernatantu tkivnih ekstraktov s pomočjo postopka, ki temelji na nastanku fluorescenčnega produkta po reakciji s tiolno skupino koencima A (CoA). Fluorescenco so izmerili z aparaturo Tecan GENios Microplate Reader (MTX Lab Systems, Virginija, ZDA) (23).

Za meritve aktivnosti LPL so najprej izvedli izluževanje LPL iz pljučnega rakavega in kontrolnega tkiva z izluževalno raztopino (sestavljeno iz modificirane Krebs-Ringerjeve

raztopine, heparina in albumina). Encimsko aktivnost LPL v eluatu so izmerili z encimskim fluorimetričnim postopkom s pomočjo reagenčnega kompleta LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA) (18, 20).

### **3.3 Izolacija RNA**

Za izolacijo celokupne RNA iz vzorcev pljučnega rakavega in kontrolnega tkiva so uporabili približno 30 mg vzorca tkiva, predhodno hranjenega v tekočem dušiku. RNA so iz vzorcev izolirali s kompletom RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) glede na priporočen protokol. Količino izolirane RNA v vsakem alikvotu so določili spektrofotometrično z NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, ZDA), za oceno kakovosti izolirane RNA pa so uporabili RNA 6000 Nano LabChips (Agilent, Palo Alto, Kalifornija) na bioanalizatorju Agilent 2100 Bioanalyzer (56).

### **3.4 Prepis RNA v cDNA**

Za reverzno transkripcijo RNA v cDNA so uporabili High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). Prepis so izvedli v raztopini, sestavljeni iz pufra, 250 U reverzne transkriptaze, raztopine deoksinukleozid-trifosfatov (dNTP-jev), naključnih oligonukleotidnih začetnikov in 10 µg celotne RNA. Raztopino so z destilirano vodo brez ribonukleaz (RNaz) dopolnili do 100 µL. Prepis so začeli z 10 minutno inkubacijo pri 25 °C, sledila je 120 minutna inkubacija pri 37 °C, po končanem prepisu so encim uničili s 5 minutno inkubacijo pri 95 °C. Inkubacijo reakcijskih raztopin so izvedli v termobloku aparature za PCR (56).

### **3.5 Kvantifikacija mRNA PEMT v vzorcih**

#### **3.5.1 Materiali in aparature**

##### **Laboratorijski material**

- pipete Eppendorf Research 1000, 100 in 10 µL
- nastavki za pipete SafeSeal Tips Professional 1000, 100 in 10 µL (Biozym Scientific, Hesisch Oldendorf, Nemčija)
- mikroeprovete Eppendorf Safe-Lock Tubes 500 µL
- ploščica PCR s 384 vdolbinami s prozorno folijo (LightCycler 480 Multiwell Plate 384, clear plates with sealing foil)

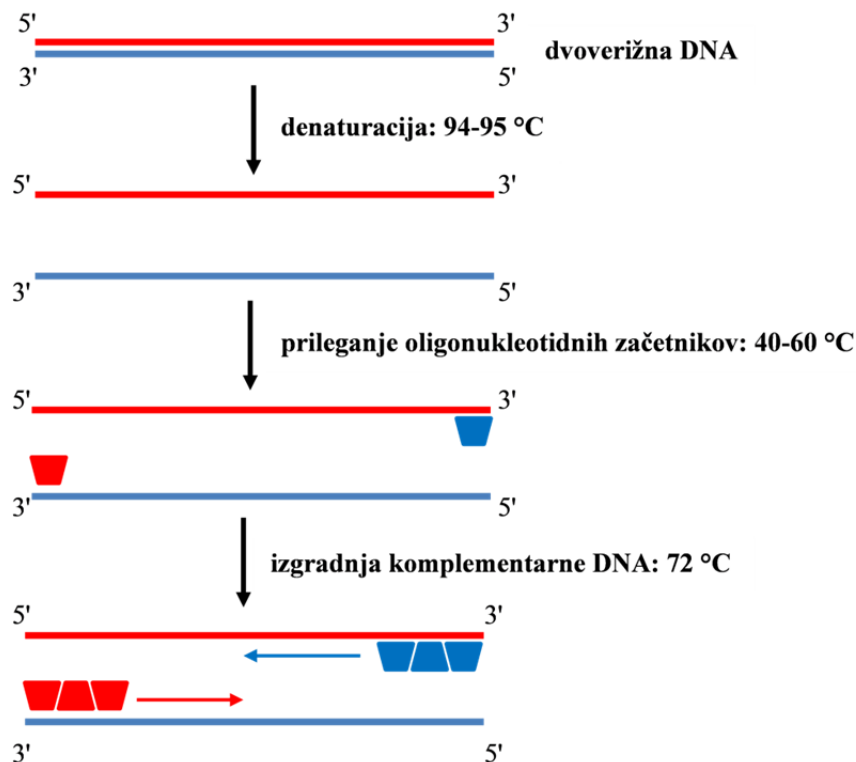
- stojalo za mikropruvete

### Aparature

- brezprašna komora Holten Laminar Air
- vibracijska mešalnica za epruvete Vortex MS2 Minishaker, Vortex MS3 basic (IKA-Werke, Staufen, Nemčija)
- centrifuga za mikorepruvete Heraeus Fresco 17 Centrifuge Thermo Scientific
- centrifuga za ploščico PCR Eppendorf Centrifuge 5810 R
- aparatura za PCR v realnem času LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics, Dunaj, Avstrija)

### 3.5.2 PCR v realnem času

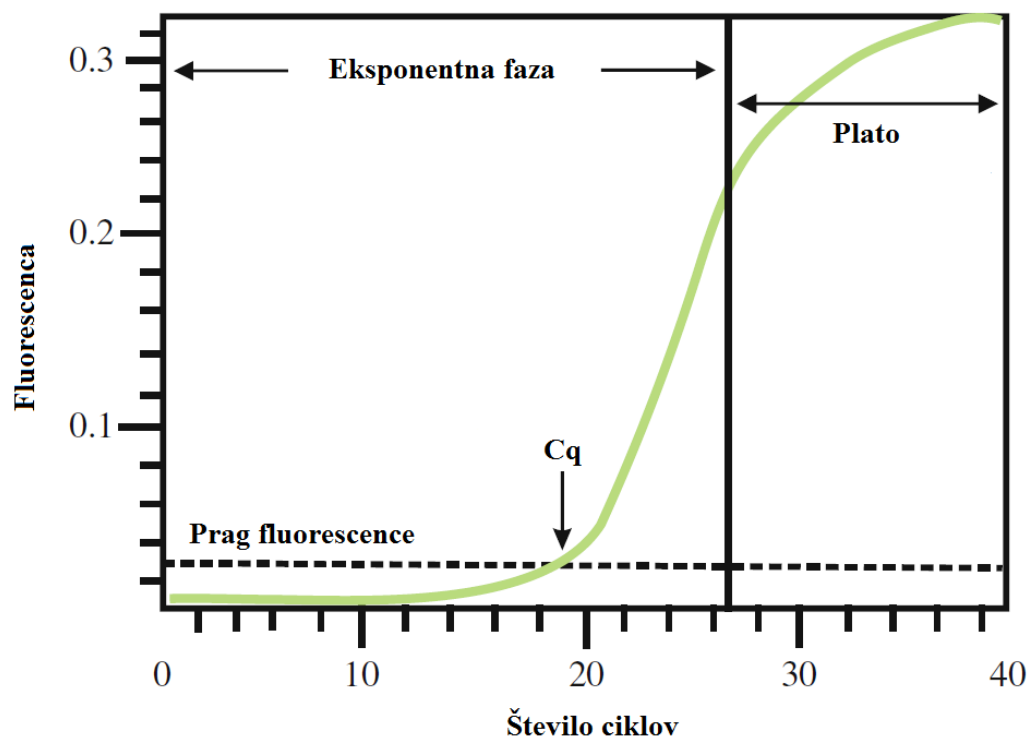
PCR je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA. Za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar je bistvena prednost PCR metode pred ostalimi tehnikami molekularne biologije. Reakcijsko zmes za PCR sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek DNA, ki ga želimo pomnožiti, dNTP-ji, ki predstavljajo gradnike nove verige DNA,  $Mg^{2+}$  ioni, reakcijski



Slika 11: Shematični prikaz vseh treh stopenj PCR.

pufer in termostabilna DNA-polimeraza (najpogosteje Taq DNA-polimeraza). Vsak cikel reakcije je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidnih začetnikov in izgradnje komplementarne verige DNA (slika 11). V stopnji denaturacije pri 94–95 °C razklenemo dvoverižno DNA in dobimo enoverižno DNA. Prileganje oligonukleotidnih začetnikov na enoverižno DNA poteka pri 40–60 °C. Zatem temperaturo dvignemo na 72 °C, ki je optimalna temperatura za delovanje Taq DNA-polimeraze. Encim se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' proti 3' izgradi komplementarno verigo DNA. Novozgrajena veriga DNA služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih kopij DNA v drugem ciklu. Teoretično se torej v vsakem ciklu število kopij želenega odseka DNA podvoji.

PCR v realnem času je nadgradnja konvencionalnega PCR. Pri konvencionalnem PCR poteka detekcija produktov po končanem pomnoževanju, pri PCR v realnem času pa potekata pomnoževanje in detekcija produktov sočasno. Tako lahko v vsakem ciklu izmerimo količino produkta, ko je reakcija še v eksponentni fazi, v kateri lahko iz količine produkta zanesljivo sklepamo na število kopij v vzorcu. Na osnovi izmerjenih podatkov za vsak vzorec narišemo krivuljo, ki ponazarja jakost fluorescence v odvisnosti od števila ciklov (slika 12).



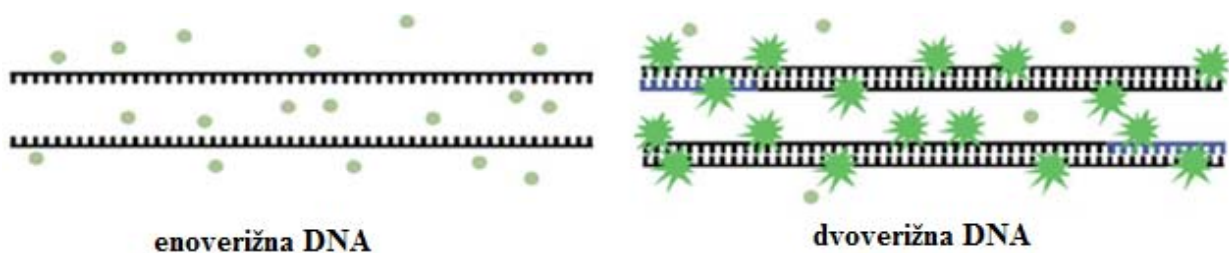
**Slika 12:** Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (57).



Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, kjer je intenziteta fluorescence značilno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikl, ko fluorescenca preseže ta prag – prag kvantifikacije (Cq). Vrednosti Cq so obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice in na osnovi njih primerjamo vzorce med seboj. Če Cq vrednosti vzorcev primerjamo s Cq vrednostmi standardov z znanim številom kopij, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu. Ponavadi pa nas zanima le relativna razlika med vzorci, kjer rezultate podajamo kot razmerje med mRNA v preiskovanem in nekem drugem vzorcu.

Načinov za detekcijo produktov PCR v realnem času je več, razdelimo jih na specifične načine detekcije in na nespecifične načine detekcije. Pri **specifičnih načinih detekcije** uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotidne sonde, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo fluorescenčni prenos energije z donorske na akceptorsko molekulo. Najpogosteje uporabljamo hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila.

Med **nespecifične načine detekcije** spadajo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNA. Primer je etidijev bromid, ki se danes skoraj ne uporablja več. Nadomestil ga je SYBR Green I. Prost ima nezaznavno fluorescenco, vgrajen v dvoverižno DNA pa ob ekscitaciji močno fluorescira (slika 13). V stopnji prileganja je DNA enoverižna, SYBR Green I je prost in ne fluorescira. V stopnji podaljševanja se vgradi v dvoverižno DNA in fluorescira. Količina fluorescence je sorazmerna s količino dvoverižne DNA. Ta način detekcije ima manjšo specifičnost od ostalih načinov, saj z njim detektiramo vsako dvoverižno DNA, ki je prisotna v zmesi (58).



**Slika 13:** Princip detekcije produktov PCR v realnem času s SYBR Green I. SYBR Green I se vgradi v dvoverižno DNA in fluorescira (59).

### 3.5.3 Analiza vzorcev s PCR v realnem času

Za kvantifikacijo mRNA *PEMT* v vzorcih pljučnega rakavega in kontrolnega tkiva smo uporabili metodo PCR v realnem času z nespecifičnim načinom detekcije, barvilom SYBR Green I. Postopek priprave vzorcev smo izvajali v brezprašni komori, predhodno očiščeni s 70 % etanolom in obsevani z UV-svetlobo.

Najprej smo manjši volumen vseh originalnih vzorcev cDNA, ki smo jih hranili v zamrzovalniku pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , razredčili z vodo za PCR v razmerju 1:4. Te razredčene vzorce cDNA, ki smo jih med posameznimi meritvami hranili v zamrzovalniku pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , smo uporabljali za vse nadaljnje meritve. S tem smo se izognili vsakokratnemu odtajanju in zamrzovanju originalnih vzorcev cDNA. V skladu z navodili proizvajalca in številom analiziranih vzorcev smo si pred meritvijo pripravili tudi reagente za kvantifikacijo mRNA. V razmerju 1:5 smo medsebojno zmešali raztopino oligonukleotidnih začetnikov in raztopino DNA-polimeraze, reakcijskega pufra, dNTP-jev,  $\text{MgCl}_2$  in barvila SYBR Green I. Razredčene vzorce cDNA in mešanico reagentov za PCR v realnem času smo zmešali neposredno v PCR ploščici s 384 vdolbinami. Končni volumen reakcijske zmesi za eno analizo je bil  $5\text{ }\mu\text{l}$ . Pred uporabo smo vse vzorce in reagente premešali na vrtničnem mešalniku za epruvete in jih nato še centrifugirali. Seznam uporabljenih reagentov in volumni za analizo enega vzorca so prikazani v preglednici III. Po nanosu vzorcev in reagentov v PCR ploščico smo to centrifugirali 2 minuti pri 1500 obratih. V primeru, da so bili prisotni zračni mehurčki, smo centrifugiranje ponovili. Zatem smo ploščico vložili v aparaturo za PCR v realnem času, LightCycler 480 Instrument. Reakcijske raztopine smo inkubirali 10 minut pri  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nato je sledilo 40 ciklov, sestavljenih iz 15 s denaturacije pri  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  in iz 30 s prileganja oligonukleotidnih začetnikov ter podaljševanja verige pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na koncu je aparat izvedel še analizo talilnih krivulj produktov PCR reakcije s predhodno inkubacijo vzorcev 10 s pri  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sledilo je 20 s prileganja oligonukleotidnih začetnikov ter podaljševanja verige pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  in zatem postopno segrevanje vzorcev do  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Naredili smo dve neodvisni seriji analiz vseh vzorcev. V vsaki od teh serij smo analizo posameznega vzorca izvedli v duplikatu. Na isto ploščico smo nanесли tako vzorce rakavega kot vzorce kontrolnega tkiva istega bolnika in jih istočasno analizirali z oligonukleotidnimi začetniki za tarčni gen *PEMT* in za referenčni gen *GUSB* (gen, ki kodira encim  $\beta$ -glukuronidazo (*GUSB*)). *GUSB* so predhodno izbrali za referenčni gen

izmed 11 kandidatnih genov za referenčni gen s pomočjo Taq-Man Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems). Izbrali so 4 pare vzorcev (rakavi, kontrolni) in določili izražanje vseh 11 kandidatnih genov. Referenčni gen so izbrali na podlagi najmanjšega geometričnega povprečja Cq vrednosti posameznih kandidatnih genov (56). Prav tako smo pri vsakem merjenju na PCR ploščico nanесли negativno kontrolo, pri kateri smo vzorec cDNA nadomestili z vodo za PCR.

**Preglednica III:** Seznam uporabljenih reagentov in volumni za analizo enega vzorca.

Ime reagenta/vzorca	Sestava	Pogoji shranjevanja	Volumen
vzorec cDNA ( $C_{cDNA} = 0,1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$ )	cDNA rakavega oz. kontrolnega tkiva	-70 °C	0,4 $\mu\text{L}$
PCR Grade Water (Roche Diagnostics)	voda za PCR	-20 °C	1,6 $\mu\text{L}$
QuantiTect Primer Assays PEMT ali GUSB (Qiagen)	oligonukleotidni začetniki za <i>PEMT</i> ali <i>GUSB</i>	-20 °C, med posameznimi meritvami 2–8 °C	0,5 $\mu\text{L}$
FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics)	Taq DNA-polimeraza, reakcijski pufer, dNTP-ji, MgCl <sub>2</sub> , barvilo SYBR Green I	-20 °C, med posameznimi meritvami 2–8 °C	2,5 $\mu\text{L}$

### 3.6 Analiza rezultatov

Podatke, pridobljene z reakcijo PCR v realnem času, smo analizirali s programom LightCycler 480 Software. Ta program je s pomočjo maksimuma 2. odvoda krivulje jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov določil vrednost Cp za vsak vzorec. S pomočjo programa Microsoft Excel smo znotraj posamezne serije za vsak duplikat izračunali povprečno vrednost Cp. Vse nadaljnje izračune smo opravili s povprečnimi vrednostmi dveh serij. Stopnjo izražanja *PEMT* smo normalizirali glede na izražanje *GUSB*. Zatem smo vse rezultate še standardizirali glede na vzorec, kjer je bilo izražanje *PEMT*

(normalizirano glede na izražanje *GUSB*) najmanjše. Relativno količino mRNA *PEMT* smo izračunali po enačbi:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

RQ.....relativna količina mRNA *PEMT*

C<sub>p</sub>....prag kvantifikacije

$\Delta C_p = C_p \text{ } PEMT - C_p \text{ } GUSB$  v istem vzorcu

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_p - \Delta C_p \text{ } max$$

$\Delta C_p \text{ } max$ .... najvišja  $\Delta C_p$  med vsemi vzorci

Za vsakega bolnika smo izračunali tudi razmerje izražanja *PEMT* v rakavem tkivu proti kontrolnemu tkivu z enačbo:

$$\text{razmerje izražanja } PEMT = \frac{2^{-\Delta\Delta C_p} (\text{rakavo tkivo})}{2^{-\Delta\Delta C_p} (\text{kontrolno tkivo})}$$

### 3.7 Statistična analiza

S Shapiro-Wilkovim testom smo preverili normalnost porazdelitve vrednosti izražanja *PEMT*. Ker se vrednosti izražanja *PEMT* v rakavem tkivu in vrednosti razmerja izražanja *PEMT* niso porazdeljevale normalno, smo pri statistični analizi uporabili neparametrične teste. Za primerjavo izražanja *PEMT* med rakavim in kontrolnim tkivom smo uporabili Wilcoxonov test predznačenih rangov. Za primerjave izražanja *PEMT* in razmerja izražanja *PEMT* med skupinami bolnikov (stadij bolezni, histološki tip, hujšanje, alkohol, kajenje, preživetje) smo uporabili Mann-Whitneyev U test in Kruskal-Wallisov test. Korelacije med parametri smo izračunali s pomočjo koeficienta korelacije ranga po Spearmanu. Za oceno prognostičnega pomena opazovanih parametrov smo uporabili Coxovo regresijsko analizo. Vse statistične analize smo naredili s programom IBM SPSS v.21.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ZDA).  $p < 0,05$  pri vseh testih predstavlja statistično značilno vrednost.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Statistična analiza podatkov o bolnikih

V raziskavo smo vključili 42 bolnikov. Klinični podatki vseh 42 bolnikov so prikazani v preglednici IV. V času trajanja raziskave je eden izmed bolnikov umrl zaradi nerakavega vzroka, zato smo ga izključili iz vseh statističnih izračunov, povezanih s preživetjem bolnikov. Tekom štiriletne raziskave je 21 od preostalih 41 bolnikov umrlo zaradi napredovanja raka. Povprečen čas preživetja po operaciji je bil  $24,6 \pm 16,4$  mesecev.

**Preglednica IV:** Klinični podatki 42 bolnikov, vključenih v raziskavo.

Parameter	Podatki
Število	42
Spol (ženske/moški)	11/31
Starost (v letih)	62,5 {53,0/67,0} (44–77)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )*	24,9 {22,2/28,3} (16,4–46,5)
Hujšanje v zadnjih 3 mesecih pred operacijo (ne/da)	25/17
Kajenje (nikoli/trenutni ali bivši kadilec)	5/37
Stadij bolezni (I/II/III) <sup>†</sup>	16/14/12
Histološki tip tumorja (ploščatocelični/žlezni/velikocelični/drugi) <sup>‡</sup>	19/13/5/5

Vrednosti: mediana {25. percentil/75. percentil} (najnižja vrednost–najvišja vrednost) ali kot število osebkov.

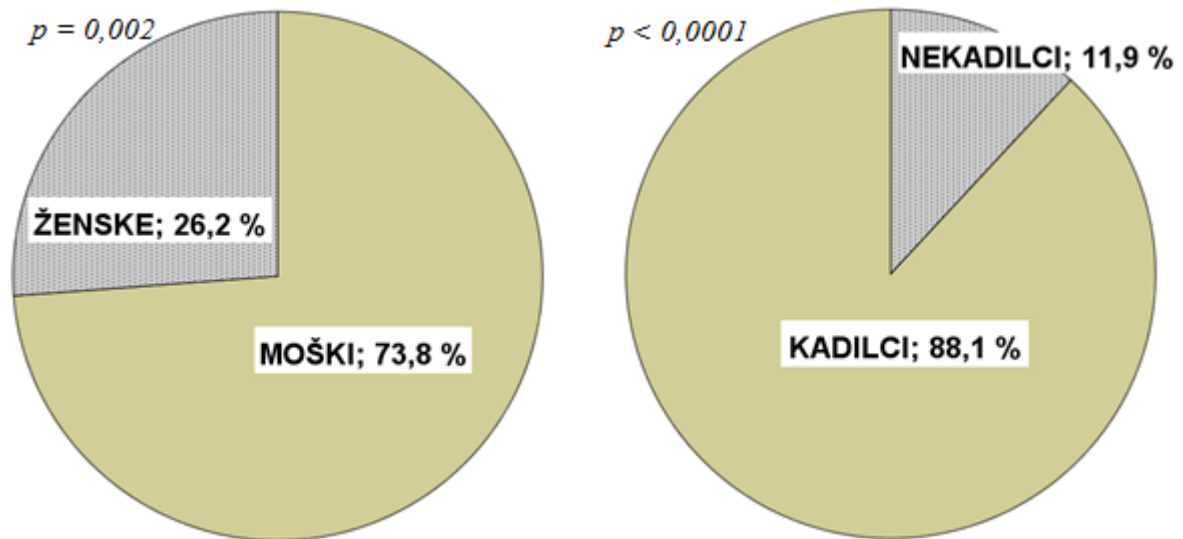
\*BMI – indeks telesne mase

<sup>†</sup>Stadij je določen v skladu s 6. izdajo TNM-klasifikacije (54).

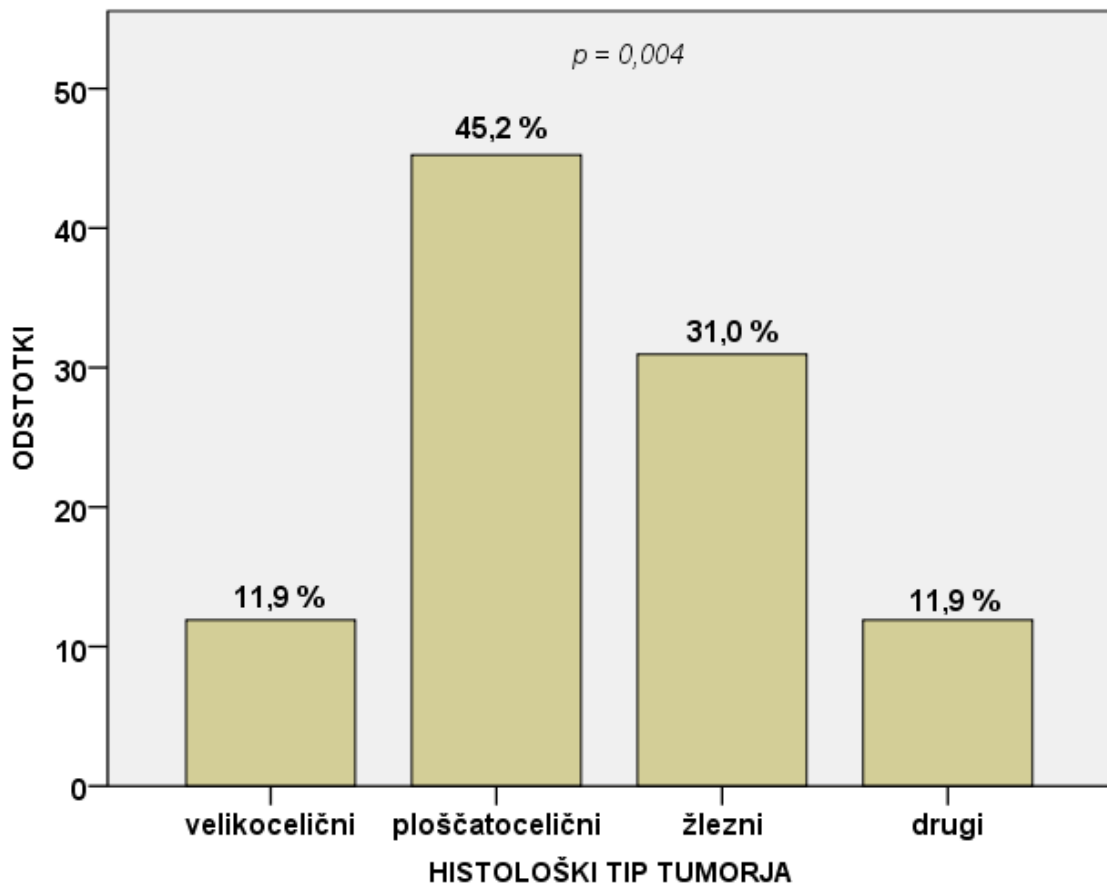
<sup>‡</sup>Histološki tip tumorja je opredeljen v skladu z WHO histološko klasifikacijo (55).

Kot je razvidno s slike 14, so bili bolniki s pljučnim rakom v glavnem moški (73,8 %). Večina bolnikov, vključenih v našo raziskavo, je bila kadilcev (88,1 %). S  $\chi^2$ -testom enega vzorca smo potrdili, da je za naš vzorec statistično značilno, da je bilo moških več kot žensk ( $p = 0,002$ ) in kadilcev več kot nekadilcev ( $p < 0,0001$ ). Ti podatki so skladni tudi s splošnimi statističnimi podatki, ki kažejo, da za pljučnim rakom pogosteje obolevajo moški in da so med bolniki v glavnem kadilci. Najpogostejši histološki tip pljučnega tumorja med analiziranimi vzorci je bil ploščatocelični rak (45,2 %), sledi mu žlezni rak (31,0 %) (slika 15). Takšna zastopanost histoloških tipov je za naš vzorec statistično značilna ( $p = 0,004$ ),

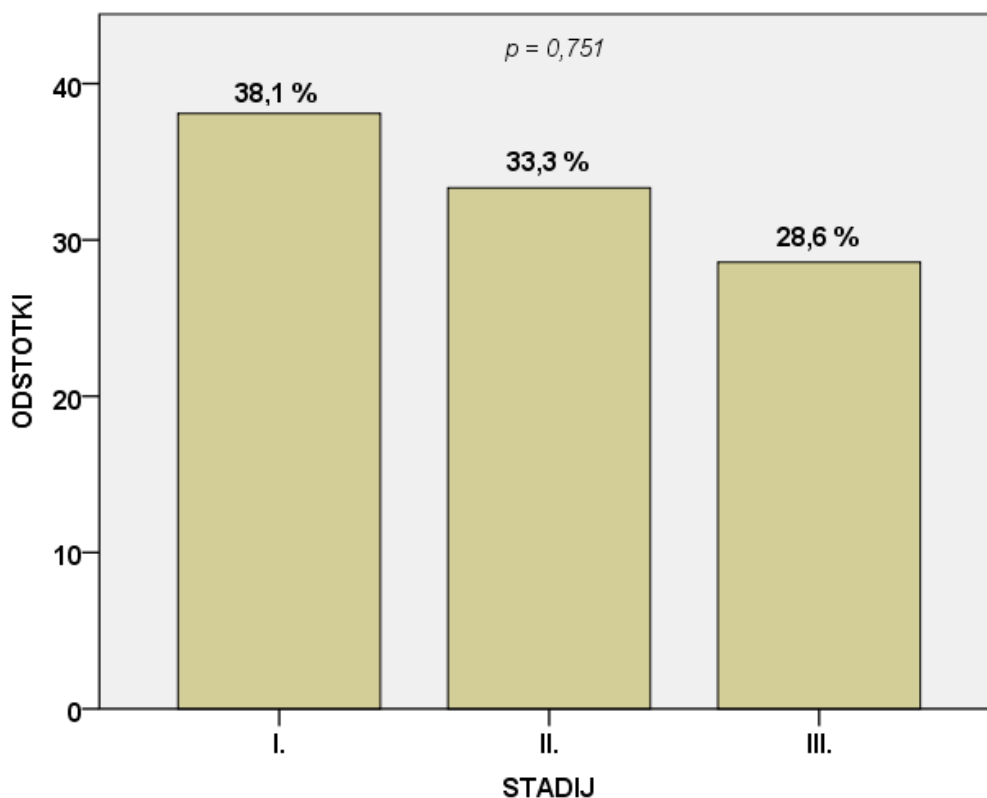
čprav je po splošnih statističnih podatkih najpogostejši tip raka žlezni rak. S slike 16 razberemo, da je največ bolnikov imelo raka v stadiju I, sledijo bolniki z rakom v stadiju II in III. Statistično gledano pa so bili v naši skupini bolnikov vsi stadiji raka zastopani v enakem deležu ( $p = 0,751$ ).



**Slika 14:** Zastopanost bolnikov po spolu (levo) in glede na kajenje (desno).



**Slika 15:** Delež posameznih histoloških tipov tumorja.



**Slika 16:** Zastopanost bolnikov po stadiju bolezni.

#### 4.2 Statistična analiza izražanja *PEMT*

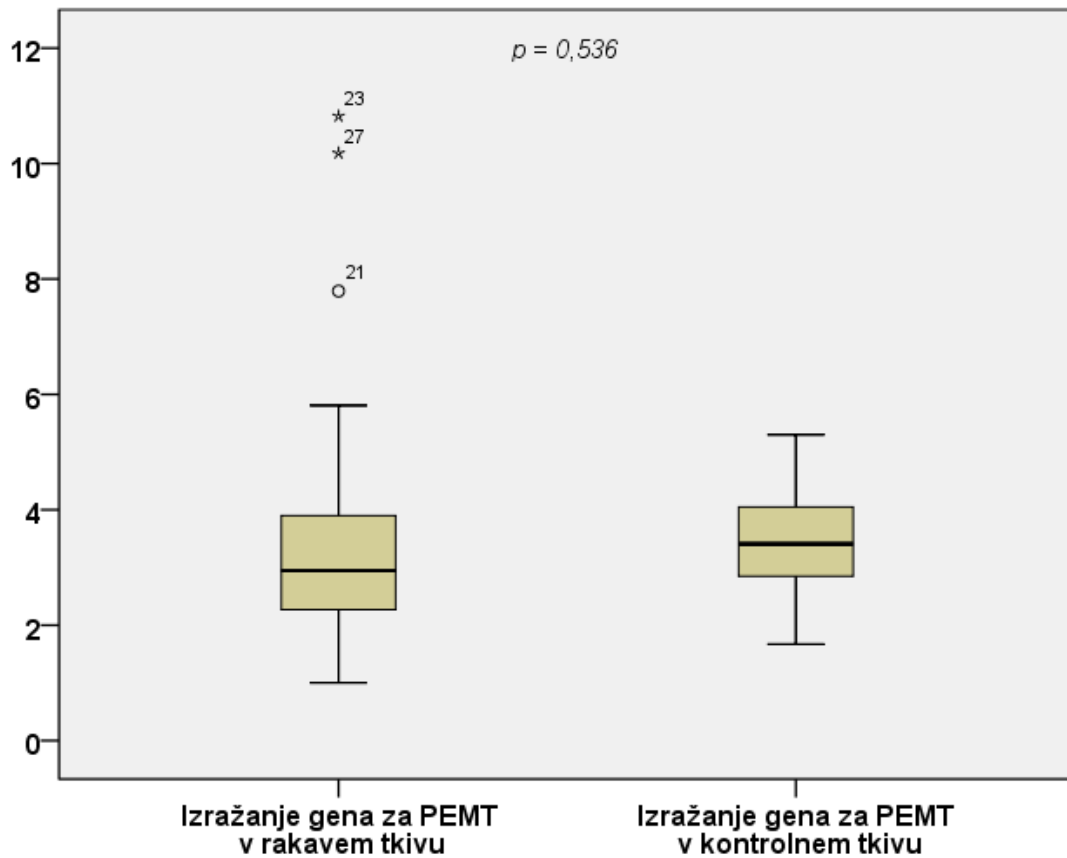
Izmerili smo nivo izražanja *PEMT* v rakavem tkivu in v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu, ki je služilo kot kontrolno tkivo. Deskriptivna statistika izražanja *PEMT* v rakavem in kontrolnem tkivu je prikazana v preglednici V in na sliki 17.

**Preglednica V:** Deskriptivna statistika izražanja *PEMT*.

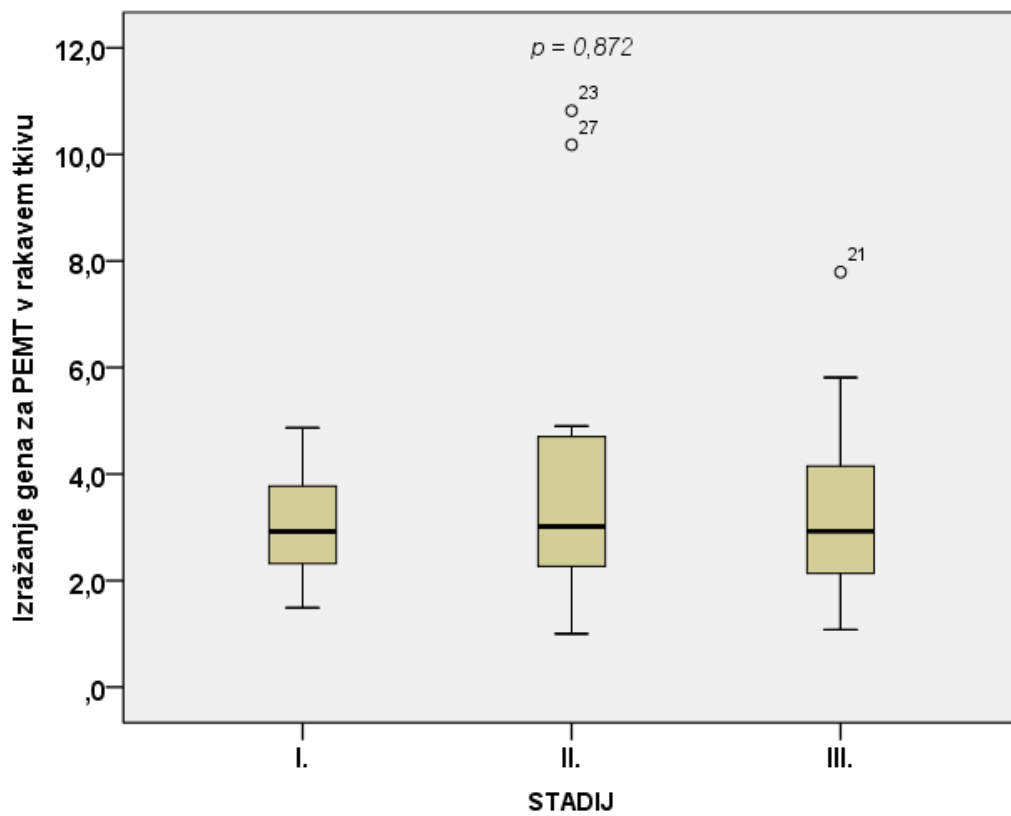
Parameter	Podatki
Izražanje <i>PEMT</i> v rakavem tkivu	2,95 {2,27/3,90} (1,00–10,82)
Izražanje <i>PEMT</i> v kontrolnem tkivu	3,41 {2,85/4,05} (1,67–5,30)

Vrednosti: mediana {25. percentil/75. percentil} (najnižja vrednost–najvišja vrednost).

Izražanje *PEMT* v rakavem tkivu je bilo enako izražanju *PEMT* v kontrolnem tkivu (mediana 2,95 proti mediani 3,41;  $p = 0,536$ ) in ni koreliralo z izražanjem *PEMT* v kontrolnem tkivu ( $r = 0,044$ ;  $p = 0,782$ ). Nato smo preverili, ali se izražanje *PEMT* v rakavem tkivu razlikuje med skupinami bolnikov z različnim stadijem bolezni in ugotovili, da je bilo izražanje *PEMT* pri skupinah bolnikov z različnim stadijem enako ( $p = 0,872$ ) (slika 18).



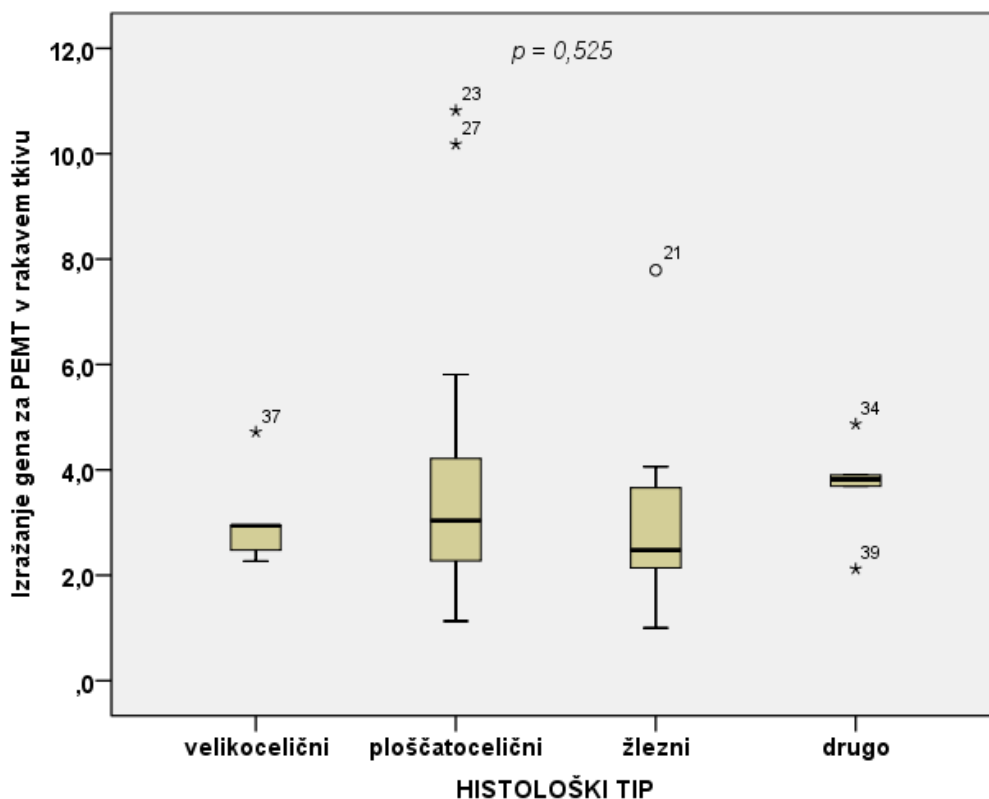
Slika 17: Izražanje *PEMT* v rakavem (levo) in kontrolnem tkivu (desno).



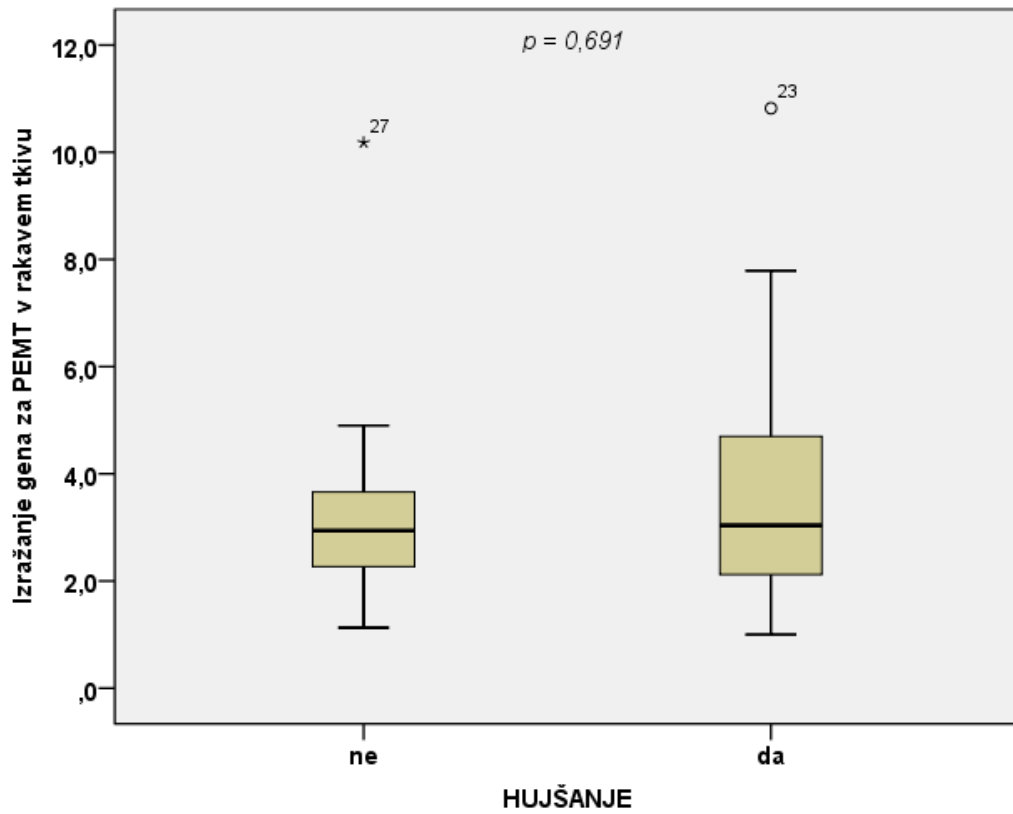
Slika 18: Izražanje *PEMT* v rakavem tkivu pri različnih stadijih.



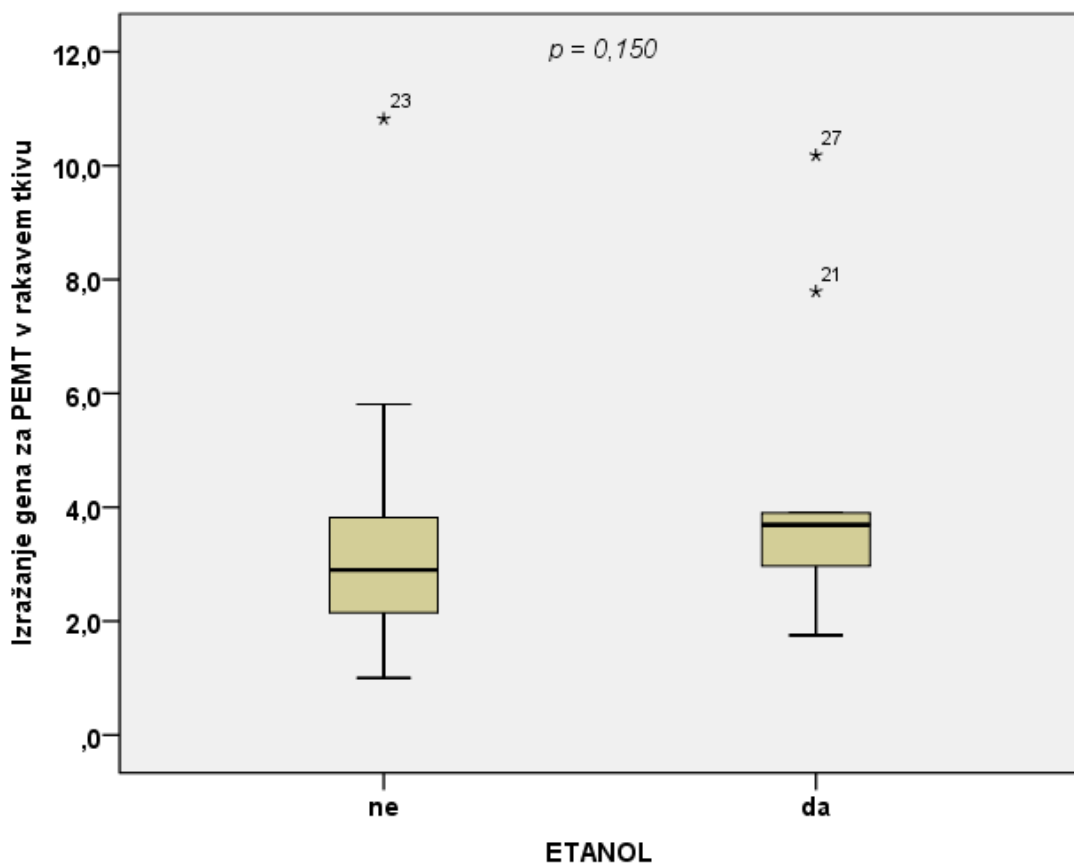
Zanimalo nas je tudi, ali na izražanje *PEMT* v rakavem tkivu vplivajo različni histološki tipi raka. Statistična analiza je pokazala, da je bilo izražanje *PEMT* enako pri vseh histoloških tipih ( $p = 0,525$ ) (slika 19). Ker je bilo bolnikov z velikoceličnim rakom in ostalimi raki malo, je ta statistična analiza nezanesljiva. Nam je pa dokaj visoko število ploščatoceličnih in žleznih tipov raka omogočalo zanesljivo primerjavo izražanja *PEMT* v rakavem tkivu med omenjenima histološkima tipoma raka. Izkazalo se je, da je bilo izražanje *PEMT* pri bolnikih s ploščatoceličnim karcinomom enako kot pri bolnikih z žleznim karcinomom (mediana 3,04 proti mediani 2,48;  $p = 0,258$ ). Naredili smo tudi statistične analize, s katerimi smo primerjali izražanje *PEMT* v rakavem tkivu med bolniki, ki so v zadnjih 3 mesecih pred operacijo shujšali, in bolniki, ki niso shujšali, med bolniki, ki so uživali alkohol, in tistimi, ki ga niso, ter med kadilci in nekadilci. Ugotovili smo, da je bilo izražanje *PEMT* pri bolnikih, ki so v 3 mesecih pred operacijo shujšali, enako kot pri bolnikih, ki niso shujšali (mediana 3,04 proti mediani 2,94;  $p = 0,691$ ) (slika 20). Izražanje *PEMT* je bilo enako tudi med skupinama bolnikov, ki so uživali alkohol, in tistih bolnikov, ki ga niso (mediana 3,69 proti mediani 2,90;  $p = 0,150$ ) (slika 21). Tudi med kadilci in nekadilci ni bilo razlik v izražanju *PEMT* (mediana 2,95 proti mediani 2,90;  $p = 0,294$ ), vendar je bilo nekadilcev samo 5, zato ta analiza ni zanesljiva.



**Slika 19:** Izražanje *PEMT* v rakavem tkivu glede na histološke tipe raka.



Slika 20: Izražanje *PEMT* v rakavem tkivu glede na hujšanje bolnikov pred operacijo.



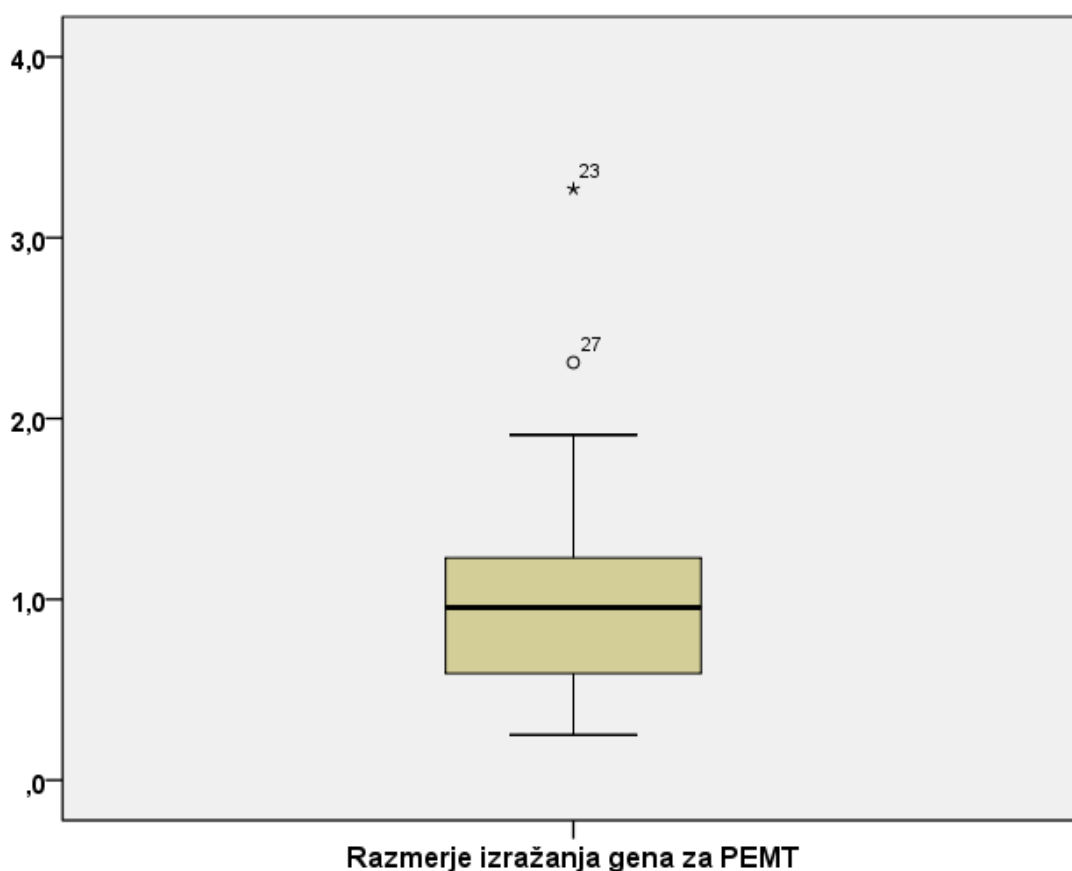
Slika 21: Izražanje *PEMT* v rakavem tkivu glede na uživanje alkohola.

V nadaljevanju smo za vsakega bolnika izražanje *PEMT* zapisali kot razmerje izražanja *PEMT* v rakavem tkivu proti izražanju v kontrolnem tkivu. Deskriptivna statistika razmerja izražanja *PEMT* je prikazana preglednici VI in na sliki 22.

**Preglednica VI:** Deskriptivna statistika razmerja izražanja *PEMT*.

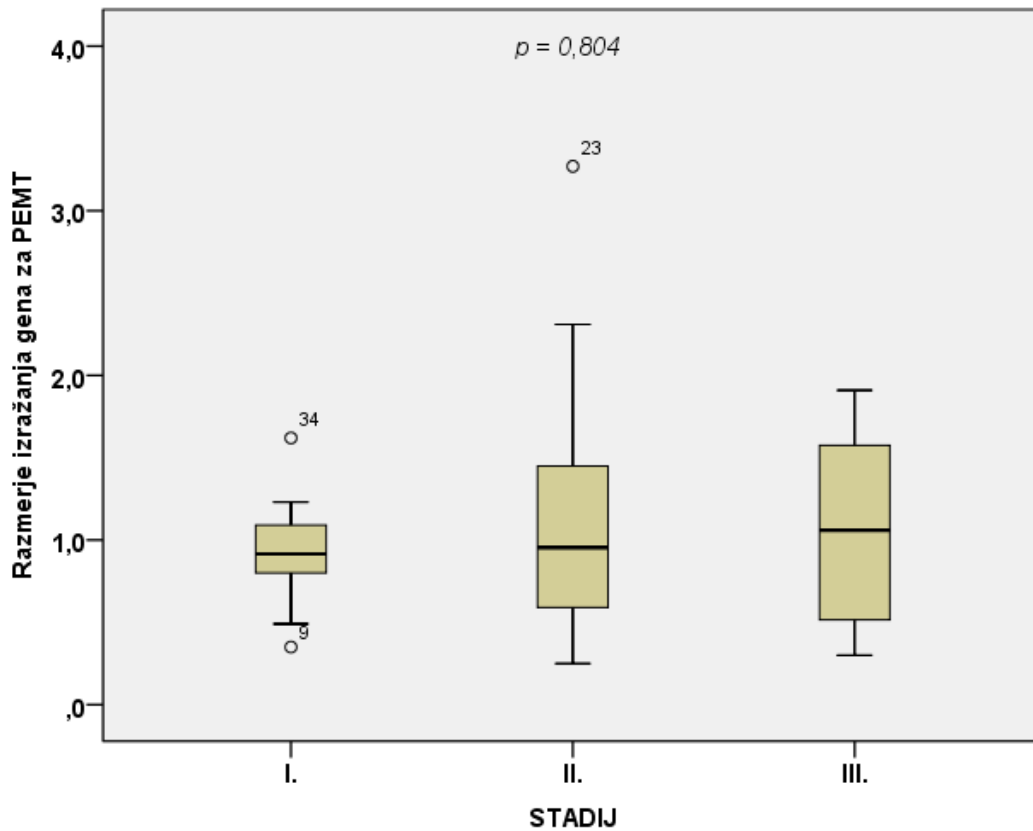
Parameter	Podatki
Razmerje izražanja <i>PEMT</i> (izražanje v rakavem tkivu proti izražanju v kontrolnem tkivu)	0,93 {0,59/1,22} (0,25–3,27)

Vrednosti: mediana {25. percentil/75. percentil} (najnižja vrednost–najvišja vrednost).

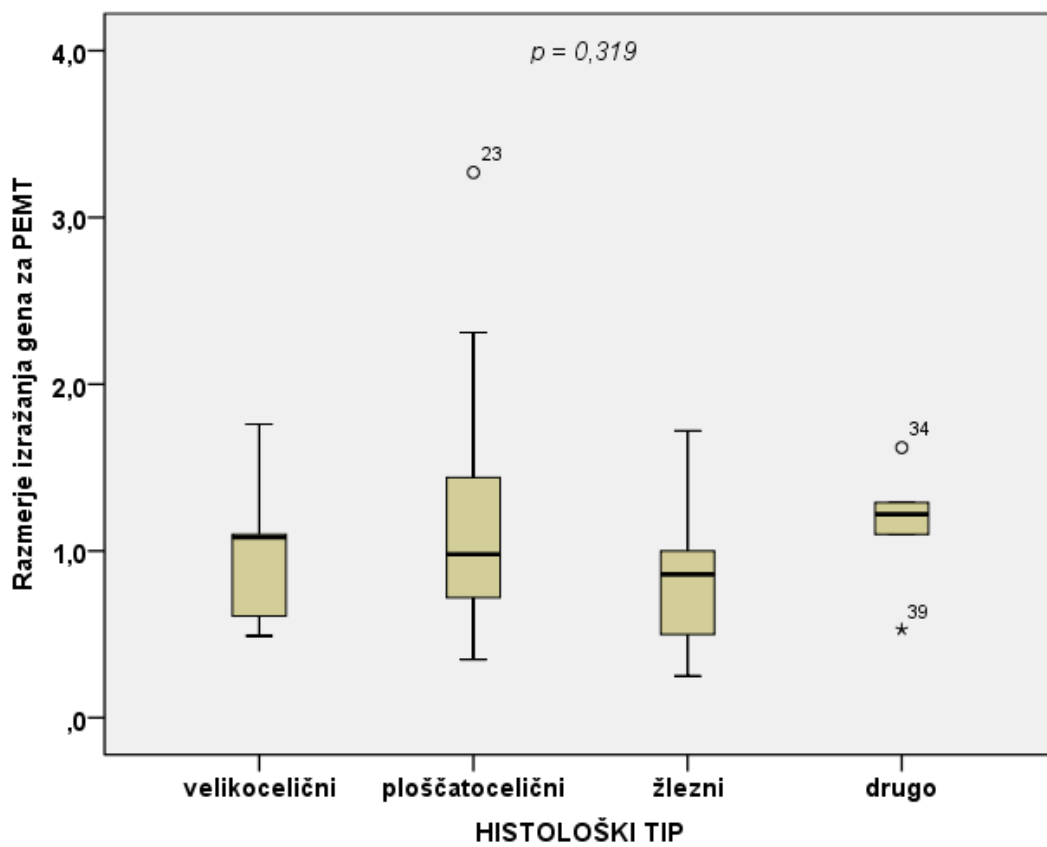


**Slika 22:** Razmerje izražanja *PEMT* (v rakavem tkivu proti kontrolnemu tkivu).

Tudi pri razmerju izražanja *PEMT* nas je zanimalo, ali so kakšne razlike med bolniki z različnim stadijem. Statistična analiza je pokazala, da je bilo razmerje izražanja *PEMT* med skupinami bolnikov z različnim stadijem enako ( $p = 0,804$ ) (slika 23). Razmerje izražanja *PEMT* se ni razlikovalo niti med bolniki s ploščatoceličnim tipom raka in bolniki z žleznim karcinomom (mediana 0,980 proti mediani 0,860;  $p = 0,173$ ) (slika 24). Naj omenimo, da je bilo razmerje izražanja *PEMT* enako pri vseh histoloških tipih raka ( $p = 0,319$ ), čeprav ta analiza zaradi majhnega števila preiskovancev z ostalimi histološkimi tipi ni zanesljiva.

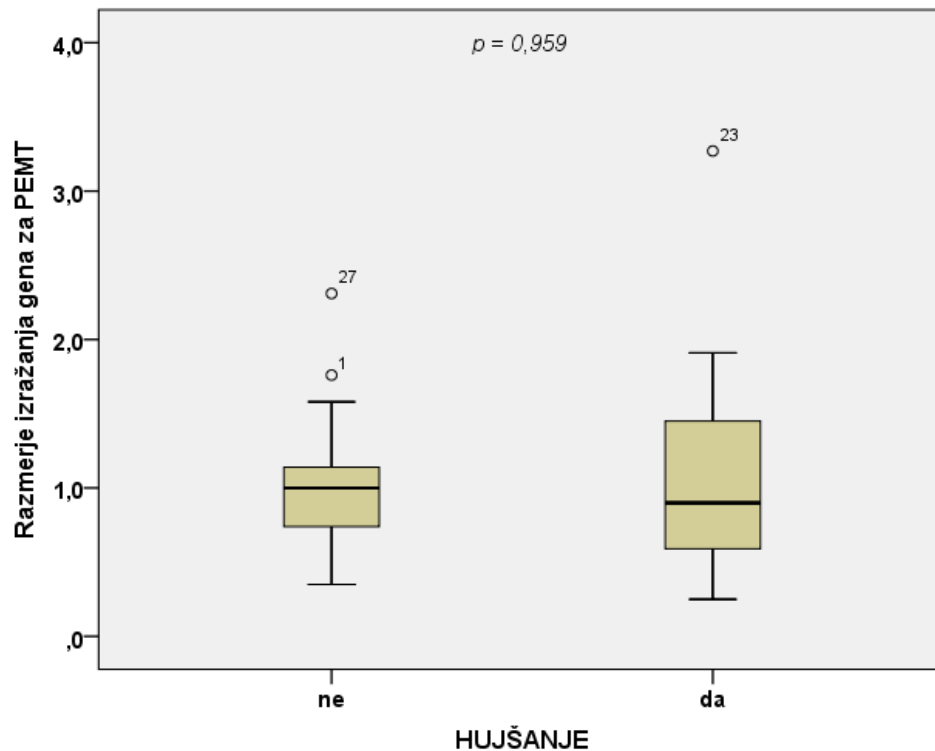


Slika 23: Razmerje izražanja *PEMT* pri različnih stadijih.



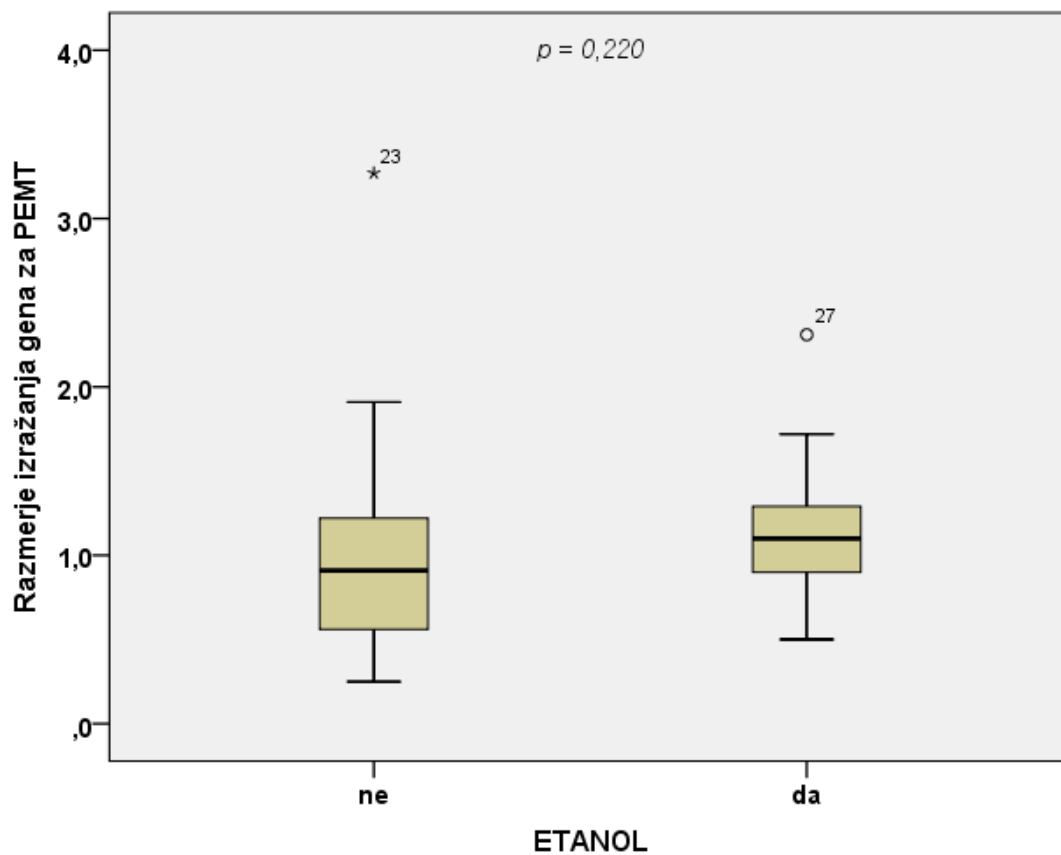
Slika 24: Razmerje izražanja *PEMT* glede na histološke tipe raka.

Razmerje izražanja *PEMT* je bilo enako tudi med skupinama bolnikov, ki so v 3 mesecih pred operacijo shujšali, in tistih bolnikov, ki niso shujšali (mediana 0,900 proti mediani 1,000;  $p = 0,959$ ) (slika 25). Razmerje izražanja *PEMT* se ni razlikovalo niti med bolniki, ki so uživali alkohol, in tistimi, ki ga niso (mediana 1,100 proti mediani 0,910;  $p = 0,220$ ) (slika 26), niti med kadilci in nekadilci (mediana 1,000 proti mediani 0,740;  $p = 0,145$ ). Statistična analiza s kadilci ni zanesljiva zaradi majhnega vzorca nekadilcev.

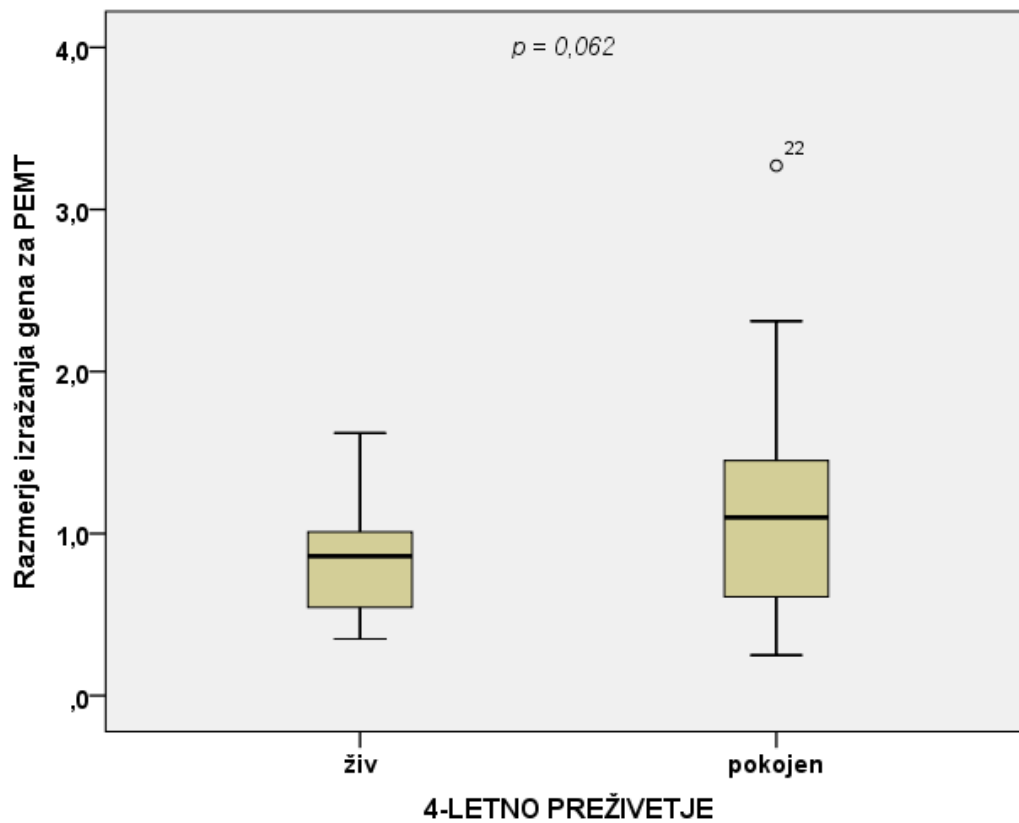


**Slika 25:** Razmerje izražanja *PEMT* glede na hujšanje bolnikov pred operacijo.

Ugotavljali smo tudi, ali je razmerje izražanja *PEMT* povezano s preživetjem bolnikov. Najprej nas je zanimalo, ali obstaja korelacija razmerja izražanja *PEMT* s časom preživetja bolnikov po operaciji (izraženo v letih na eno decimalno natančno). Razmerje izražanja *PEMT* ni koreliralo s krajšim časom preživetja bolnikov po operaciji ( $r = -0,246$ ;  $p = 0,122$ ). V naslednji analizi smo bolnike razdelili v dve skupini glede na to, ali so bili 4 leta po operaciji še živi ali so tekom trajanja raziskave umrli. Statistična analiza je pokazala, da so imeli pokojni bolniki 27,9 % višje razmerje izražanja *PEMT* v primerjavi s preživelimi bolniki (mediana 1,100 proti mediani 0,860) (slika 27). Razlika med obema skupinama je bila na meji statistične signifikantnosti (Mann-Whitneyev U test;  $p = 0,076$ ). Ker so se vrednosti razmerja izražanja *PEMT* znotraj obeh skupin porazdeljevale normalno, smo za enak izračun uporabili še parametričen t-test neodvisnih vzorcev ( $p = 0,062$ ).



Slika 26: Razmerje izražanja *PEMT* glede na uživanje alkohola.



Slika 27: Razmerje izražanja *PEMT* glede na 4-letno preživetje bolnikov po operaciji.

Da smo lahko opredelili prognostični pomen opazovanih spremenljivk za 4-letno preživetje bolnikov po operaciji, smo uporabili Coxovo regresijsko analizo. Najprej smo naredili univariatno Coxovo regresijsko analizo z vsemi spremenljivkami v raziskavi: spol (ženske/moški), starost (nizka/visoka glede na mediano), BMI (nizek/visok glede na mediano), kadilski status (ne/da), hujšanje pred operacijo (ne/da), histološki tip raka (ostalo/adenokarcinom), stadij bolezni (I/II in III) in razmerje izražanja *PEMT* (nizko/visoko glede na mediano). V statistični model smo naenkrat vstavili le eno spremenljivko. Ta analiza je pokazala, da so hujšanje pred operacijo, napredovali stadij bolezni in zvišano razmerje izražanja *PEMT* povezani s krajšim preživetjem bolnika. Ostale analizirane spremenljivke pa nimajo prognostičnega pomena za 4-letno preživetje. Nato smo naredili multivariatno Coxovo regresijsko analizo. V statistični model smo hkrati vstavili tiste spremenljivke, ki so se pri univariatni analizi izkazale za pomembne. Multivariatna analiza je pokazala, da zvišano razmerje izražanja *PEMT* napoveduje krajše preživetje bolnikov, in sicer neodvisno od napredovalega stadija bolezni in hujšanja pred operacijo, ostalih dveh prognostičnih kazalcev krajšega preživetja bolnikov (preglednica VIII, model 1).

Za to isto skupino bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom so že v predhodnih raziskavah proučevali povezave med aktivnostjo encimov FASN in LPL v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) in časom preživetja bolnikov po operaciji. V ta namen so za vsakega bolnika izmerili aktivnosti LPL in FASN v istih vzorcih rakavega in kontrolnega tkiva, kot so bili uporabljeni v naši raziskavi (deskriptivna statistika je prikazana v preglednici VII). Z univariatno Coxovo regresijsko analizo so ugotovili, da zvišani aktivnosti LPL in FASN v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) prav tako napovedujeta krajše preživetje bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom (20, 23).

**Preglednica VII:** Deskriptivna statistika razmerja aktivnosti FASN in LPL.

Parameter	Podatki
Razmerje aktivnosti FASN (aktivnost v rakavem tkivu proti aktivnosti v kontrolnem tkivu)	1,48 {0,77/2,79} (0,04–54,07)
Razmerje aktivnosti LPL (aktivnost v rakavem tkivu proti aktivnosti v kontrolnem tkivu)	1,91 {1,08/2,42} (0,10–19,27)

Vrednosti: mediana {25. percentil/75. percentil} (najnižja vrednost–najvišja vrednost).

FASN in LPL sta pomembna encima v metabolizmu lipidov in fosfolipidov, saj rakavo tkivo oskrbujeta z višjimi maščobnimi kislinami. Zato nas je zanimalo, ali pri nastanku in napredovanju pljučnega raka obstaja kakšna povezava med *PEMT* in FASN ter LPL. Najprej smo z analizo korelacije pokazali, da izražanje *PEMT* v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) ne korelira z aktivnostjo FASN niti z aktivnostjo LPL v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo). Da smo lahko ocenili prognostični pomen spremenljivk za 4-letno preživetje bolnikov, smo ponovno naredili multivariatno Coxovo regresijsko analizo. V statistični model smo v različnih kombinacijah poleg hujšanja, stadija in razmerja izražanja *PEMT* vstavili še aktivnosti FASN in LPL v rakavem tkivu (glede na kontrolno tkivo). Najprej smo sočasno analizirali stadij bolezni, hujšanje, razmerje izražanja *PEMT* in razmerje aktivnosti FASN. Izkazalo se je, da višje razmerje izražanja *PEMT* korelira s krajšim preživetjem bolnikov kljub prisotnosti razmerja aktivnosti FASN v statističnem modelu (preglednica VIII, model 2). To pomeni, da višje izražanje *PEMT* v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) napoveduje krajše preživetje bolnikov neodvisno od zvišanega razmerja aktivnosti FASN. Zatem smo v statistični model poleg stadija bolezni, hujšanja in razmerja izražanja *PEMT* vnesli še razmerje aktivnosti LPL. Tudi v tem primeru je multivariatna analiza razkrila, da višje razmerje izražanja *PEMT* korelira s krajšim preživetjem bolnikov kljub sočasni prisotnosti razmerja aktivnosti LPL (preglednica VIII, model 3). Torej smo pokazali, da višje izražanje *PEMT* v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) napoveduje krajše preživetje bolnikov neodvisno od zvišanega razmerja aktivnosti LPL. Zaključimo lahko z ugotovitvijo, da zvišano razmerje izražanja *PEMT* napoveduje krajše preživetje bolnikov neodvisno od zvišanega razmerja aktivnosti FASN in tudi neodvisno od zvišanega razmerja aktivnosti LPL, ki sta prav tako prognostična kazalca krajšega preživetja bolnikov.



**Preglednica VIII:** Prognostični dejavniki 4-letnega preživetja bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.

Št. modela	Spremenljivke v modelu (Coxova regresijska analiza)	Relativno tveganje (95 % interval zaupanja)	p
Model 1	Stadij bolezni (I/II in III)	5,87 (1,64–20,96)	0,006
	Hujšanje v zadnjih treh mesecih (ne/da)	3,83 (1,45–10,15)	0,007
	Razmerje izražanja <i>PEMT</i> (nizko/visoko)	3,55 (1,35–9,33)	0,010
Model 2	Stadij bolezni (I/II in III)	4,42 (1,23–15,95)	0,023
	Hujšanje v zadnjih treh mesecih (ne/da)	3,50 (1,27–9,70)	0,016
	Razmerje izražanja <i>PEMT</i> (nizko/visoko)	3,08 (1,16–8,15)	0,023
	Razmerje aktivnosti FASN (nizko/visoko)	2,36 (0,85–6,57)	0,101
Model 3	Stadij bolezni (I/II in III)	3,39 (0,94–12,24)	0,063
	Hujšanje v zadnjih treh mesecih (ne/da)	2,51 (0,88–7,15)	0,084
	Razmerje izražanja <i>PEMT</i> (nizko/visoko)	3,00 (1,09–8,25)	0,033
	Razmerje aktivnosti LPL (nizko/visoko)	4,18 (1,26–13,87)	0,019

## 5. RAZPRAVA

V okviru raziskave diplomske naloge smo ugotovili, da je izražanje *PEMT* v vzorcih nedrobnoceličnega pljučnega raka statistično enako izražanju *PEMT* v kontrolnih vzorcih. S tem nismo potrdili naše prve hipoteze, da je izražanje *PEMT* v rakavem tkivu višje kot v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu. Smo pa z našo raziskavo prvi pokazali, da se *PEMT* izraža v človeškem pljučnem rakavem tkivu in v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu in da izražanje gena lahko kvantificiramo z metodo PCR v realnem času. V predhodnih raziskavah, kjer so proučevali izražanje *PEMT* v različnih človeških tkivih, namreč mRNA *PEMT* v človeškem pljučnem tkivu niso zaznali (26). Vzrok temu bi lahko bil manjša občutljivost postopka detekcije produktov PCR z metodo prenosa po Southernu v primerjavi z našim postopkom z uporabo metode PCR v realnem času. Tudi aktivnost *PEMT* v pljučnem tkivu so do zdaj zaznali le v pljučnem tkivu ovc, podgan in primatov (60–62).

V okviru proučevanja izražanja *PEMT* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu nas je tudi zanimalo, ali se izražanje *PEMT* razlikuje med posameznimi skupinami bolnikov glede na stadij bolezni, histološki tip raka, kajenje in hujšanje pred operacijo. Izražanje *PEMT* smo zapisali še kot razmerje izražanja gena v rakavem tkivu proti kontrolnemu tkivu in tudi s to spremenljivko naredili zgoraj omenjene statistične analize.

(i) Najprej smo analizirali, kako se izražanje *PEMT* v rakavem tkivu in razmerje izražanja *PEMT* razlikujeta pri bolnikih z različnim stadijem bolezni. Pričakovali bi, da bosta tako izražanje *PEMT* kot razmerje izražanja *PEMT* višji pri bolnikih z napredovalim stadijem bolezni. V stadiju I je namreč tumor lokaliziran na pljuča in brez vdora v limfatični sistem, v višjih stadijih pa se tumor lokalno razširi ter vdre v limfatični in žilni sistem. V stadiju IV so prisotne metastaze v oddaljenih organih (10). Pri tumorjih z napredovalim stadijem zaradi večje intenzivnosti nastanka in rasti tumorskih celic torej pričakujemo večje potrebe po PC in s tem tudi višje izražanje *PEMT*. Za raka na debelem črevesju so npr. pokazali, da je vrednost razmerja PC/PE v tumorjih z veliko metastazami višja v primerjavi s tumorji z malo metastazami (52), kar nakazuje na povečano aktivnost *PEMT* pri napredovalih rakavih obolenjih. Statistična analiza v naši raziskavi pa je pokazala, da se izražanje *PEMT* in razmerje izražanja *PEMT* ne razlikujeta med skupinami bolnikov z različnim stadijem bolezni. Razlog za takšno ugotovitev bi lahko bil ta, da smo v raziskavo vključili samo bolnike s stadiji I-III. Bolniki s stadijem IV niso bili vključeni v raziskavo, saj po kirurških

smernicah zdravljenja nedrobnoceličnega pljučnega raka stadij IV (pa tudi stadij IIIB) ni operabilen (63). Ker pa je tumor v stadiju IV najbolj agresiven in je razširjen tako lokalno kot sistemske, bi ravno pri teh bolnikih pričakovali višje izražanje *PEMT* v pljučnem rakavem tkivu. Če bi vzorce pljučnega tkiva pridobili tudi od bolnikov s stadijem IV, bi se mogoče izražanje *PEMT* razlikovalo med stadijem IV in ostalimi tremi stadiji.

(ii) Izražanje *PEMT* v rakavem tkivu in razmerje izražanja *PEMT* se ne razlikujeta niti med skupinama bolnikov z različnima histološkima tipoma raka – ploščatoceličnim rakom in žleznim rakom. Glede na patološke značilnosti ploščatoceličnega in žleznega karcinoma bi v nasprotju z našo ugotovitvijo pričakovali, da bo pri bolnikih z žleznim karcinomom izražanje *PEMT* v rakavem tkivu višje kot pri bolnikih s ploščatoceličnim karcinomom. Žlezni karcinom namreč raste hitreje in se lahko po zračnih poteh širi v ostale pljučne režnje. Ploščatocelični karcinom pa je lokaliziran in raste počasneje. Žlezni rak tudi veliko hitreje metastazira ter ima slabšo prognozo in krajše 5-letno preživetje kot ploščatocelični rak (4, 7). Z raziskavo, v kateri so proučevali sestavo lipidov žleznega in ploščatoceličnega nedrobnoceličnega pljučnega raka, so ugotovili bistvene razlike med vsebnostjo lipidov pri obeh vrstah raka. Za več različnih molekul PC (glede na sestavo maščobnih kislin) so pokazali, da so v večji meri zastopane pri žleznem kot pri ploščatoceličnem raku (64). Iz vsega tega lahko sklepamo, da bi lahko *PEMT* odigral pomembnejšo vlogo v kancerogenezi žleznega raka. Eden od razlogov, zakaj tega nismo dokazali v naši raziskavi, bi lahko bil histološka pestrost posameznih tipov nedrobnoceličnih pljučnih tumorjev. Znotraj posameznega histološkega tipa se karcinomi razlikujejo glede na morfološke značilnosti, kot so različni vzorci rasti tumorjev, diferenciacija tumorja in mitotski indeks, še posebej pri žleznem raku pa tudi glede na genetske značilnosti. Vse to vpliva tudi na različne prognoze pri istem histološkem tipu (7). Zaradi omenjenih morfoloških in genetskih razlik lahko znotraj žleznega in ploščatoceličnega raka pride do razlik v izražanju *PEMT*, saj so potrebe po PC različne. Mogoče je prav prevelika razpršenost rezultatov v posamezni skupini bolnikov vzrok, da nismo dokazali različnega izražanja *PEMT* v rakavem tkivu in razmerja izražanja *PEMT*.

(iii) Pri analizi izražanja *PEMT* v rakavem tkivu in razmerja izražanja *PEMT* glede na pitje alkohola se je izkazalo, da ni razlik med skupinama bolnikov, ki uživajo alkohol, in bolnikov, ki alkohola ne uživajo. Objavljene raziskave o vplivu etanola na *PEMT* in raven PC v različnih tkivih dajejo nasprotujoče si rezultate. Etanol je velik vir redukcijskih ekvivalentov v obliki nikotinamid adenin dinukleotidov (NADH), kar pospeši sintezo

višjih maščobnih kislin. Zaradi metabolizma etanola je v organizmu tudi več glicerol-3-fosfata in acetil-CoA, ki sta substrata v sintezi trigliceridov. V podganjih hepatocitih so pokazali, da kratkotrajno uživanje alkohola povzroči zvišano sintezo tako PC kot PE. Kronično uživanje alkohola pa zavre sintezo PC in poveča sintezo PE. Sklepajo, da etanol inhibira encime CDP-holinske poti, na drugi strani pa naj bi aktiviral metilacijo PE v PC. Tudi višja vsebnost PE, ki pri uživanju alkohola v večjih količinah nastaja iz etanola, dokazano aktivira PEMT (65). Hkrati druga raziskovalna skupina poroča, da so izmerili povečano aktivnost PEMT kot posledico kronične izpostavljenosti etanolu tudi v membranah ščetkastega obrobka v tankem črevesju podgan (66). Nasprotno pa v nekaterih člankih poročajo, da se aktivnost PEMT v podganjih hepatocitih pod vplivom etanola zmanjša. Posledica je zmanjšana sinteza PC po PEMT poti in nastanek jetrne steatoze. Zmanjšano aktivnost PEMT razlagajo z manjšo razpoložljivostjo SAM, ki je vir metilnih skupin v reakciji metilacije PE v PC, saj etanol zavre obnavljanje zalog SAM (67, 68). Razlogov, zakaj v naši raziskavi ni razlik glede na uživanje alkohola, je več. Prvič, etanol bi lahko imel pomemben vpliv na PEMT le v jetrih, saj je tam aktivnost PEMT najvišja. Kako naj bi etanol vplival na PEMT v pljučih, iz objavljenih študij težko sklepamo. Drugič, rakavo tkivo ima spremenjene metabolične poti in mogoče etanol nima takega vpliva na aktivnost PEMT v rakavem tkivu. Sicer pa tudi v kontrolnem tkivu nismo zaznali razlik v izražanju *PEMT* med obema skupinama bolnikov. Tretjič, mogoče razlik med obema skupinama bolnikov nismo dokazali zaradi prenizke statistične moči testa. Bolnikov, ki so uživali etanol, je bilo namreč v raziskavi samo 9.

(iv) Preverili smo tudi, kakšni sta izražanje *PEMT* v rakavem tkivu in razmerje izražanja *PEMT* pri bolnikih, ki so pred operacijo shujšali, in tistih, ki niso, in med skupinama nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Raziskav o neposrednih povezavah med PEMT in hujšanjem bolnikov pri rakavih boleznih ni. Vemo pa, da je hujšanje pred operacijo prognostičen kazalec krajšega 4-letnega preživetja bolnikov in je povezano z napredovanjem in agresivnostjo bolezni. Ker naj bi bile v tumorskih celicah napredovalih rakov potrebe po PC večje, bi pri bolnikih, ko so shujšali, pričakovali višje izražanje *PEMT*. Ker pa v raziskavi te povezave nismo dokazali, lahko sklepamo, da PEMT in hujšanje v kancerogenezi nedrobnoceličnega pljučnega raka delujeta po različnih poteh. To smo navsezadnje pokazali tudi s Coxovo regresijsko analizo, s katero smo ugotovili, da višje razmerje izražanja *PEMT* napoveduje krajše preživetje bolnikov neodvisno od hujšanja bolnikov pred operacijo, a o tem več v nadaljevanju.

S spremenljivko razmerje izražanja *PEMT* smo naredili tudi statistične analize v povezavi s preživetjem bolnikov. Razmerje izražanja *PEMT* sicer ni koreliralo s krajšim preživetjem bolnikov (izraženo v letih na decimalno natančno). Se je pa pri analizi razmerja izražanja *PEMT* med skupinama bolnikov, ki so tekom raziskave umrli, in bolnikov, ki so preživeli, nakazal trend, da je razmerje izražanja *PEMT* povezano s preživetjem. Razmerje izražanja *PEMT* je namreč skoraj statistično značilno višje pri tistih bolnikih, ki so tekom raziskave umrli. Z analizo preživetja s Coxovo regresijsko analizo pa smo ugotovili, da zvišano razmerje izražanja *PEMT* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu proti kontrolnemu tkivu napoveduje krajše preživetje bolnikov, in sicer neodvisno od ostalih znanih prognostičnih kazalcev, kot sta napredovali stadij bolezni in hujšanje pred operacijo. S tem smo potrdili našo drugo hipotezo, da povečano izražanje *PEMT* napoveduje krajše preživetje bolnikov.

To odkritje je pravzaprav presenetljivo, saj je bilo do zdaj o vlogi *PEMT* pri razvoju raka objavljenih zelo malo študij, ki se skoraj izključno nanašajo na jetrni rak. Pri jetrnih rakih pri človeku sta v nasprotju z našimi ugotovitvami izražanje *PEMT* in aktivnost *PEMT* znižana (52). Hepatociti, v katerih so s transfekcijo cDNA dosegli prekomerno izražanje *PEMT2*, imajo manjši tumorski potencial *in vivo*. Ko so te hepatocite vnesli v poskusne miši, je bila verjetnost za razvoj tumorjev nižja, čas brez raka daljši, masa in volumen tumorjev pa manjša (69). Zvišana aktivnost *PEMT2* naj bi zavirala encim citidintrifosfat (CTP):fosfoholin-citidiltransferazo v CDP-holinski poti, zato se sintetizira manj PC (70). Ker je PC pomemben gradnik celičnih membran, se pri pomanjkanju PC celice počasneje delijo. V skladu s temi razlagami naj bi mišje jetrne celice v času rasti in delitve celic za sintezo PC aktivirale CDP-holinsko pot. V vmesnem času se aktivnost encimov CDP-holinske poti zmanjša, celice pa PC v glavnem pridobijo z metilacijo PE. Za recipročno regulacijo obeh encimov naj bi bil odgovoren transkripcijski faktor Sp1 (71), ki je pozitiven regulator izražanja gena za CTP:fosfoholin-citidiltransferazo in negativen regulator izražanja *PEMT* (25).

Ugotovili pa so, da je recipročna regulacija obeh poti značilna le za jetrne celice sesalcev. Tako so v popolnem nasprotju s prej omenjenimi raziskavami z eksperimenti na celicah jajčnikov kitajskega hrčka odkrili, da povečano izražanje *PEMT2* pospeši izražanje gena za CTP:fosfoholin-citidiltransferazo (72). Poleg tega večine meritev izražanja in aktivnosti *PEMT* niso opravili na človeških vzorcih, ampak na jetrnih vzorcih miši in podgan. V

primerjalnih študijah odprtega bralnega okvirja gena pri podganah in človeku so ugotovili 82-odstotno podobnost (26), tudi mišji gen ima za razliko od človeškega le 7 eksonov (73). Prav tako je različno spajanje eksonov značilno le za človeški gen (26). Zaradi mogočih razlik v izražanju in delovanju *PEMT* torej ne moremo sklepati na izražanje gena in na aktivnost encima v ostalih organih zgolj na podlagi raziskav na jetrih.

Našo ugotovitev, da zvišano razmerje izražanja *PEMT* napoveduje krajše preživetje bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom, lahko v luči že znanih dejstev o PC in holinu razložimo na več načinov.

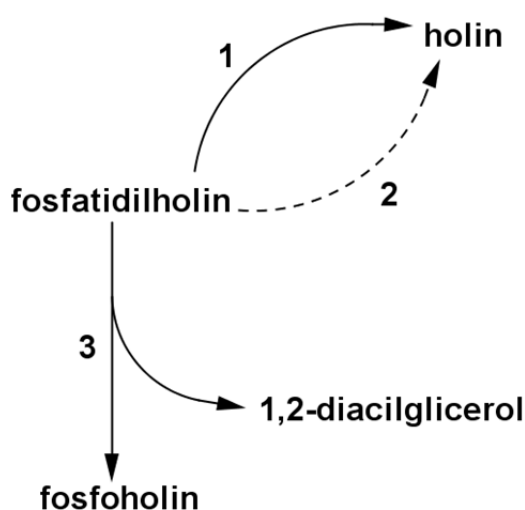
(i) Povečana lipogeneza je ključna za nastanek in rast tumorjev (74). Rakave celice uporabljajo maščobne kisline v glavnem za sintezo fosfolipidov, ki jih vgradijo v celične membrane, v katerih PC predstavlja največji delež fosfolipidov (16). Po dosedanjih raziskavah je CDP-holinska pot sinteze pravzaprav edini vir PC v nejetrnih celicah, saj je aktivnost *PEMT* v vseh tkivih razen v jetrih zanemarljiva. V primeru povečanih potreb po PC, npr. pri hitro delečih se rakavih celicah, pa CDP-holinska pot verjetno ne zmore zagotavljati vsega PC. Za belo maščobno tkivo pri miših je znano, da je v procesu nastanka maščobnih kapljic, katerih membrane so sestavljene iz fosfolipidov, ekspresija *PEMT* povečana (49). Tako bi lahko tudi rakave celice za zagotavljanje dodatnega vira PC aktivirale *PEMT*. Prav tako je za karcinome debelega črevesja in danke pri ljudeh značilno zvišano razmerje PC/PE (50). Zvišane vrednosti PC lahko nakazujejo na povečano aktivnost *PEMT*, ki uravnava razmerje PC/PE v celicah in s tem zagotavlja integriteto membran ter preprečuje celično smrt. Potemtakem lahko sklepamo, da je PC nujen za rast in preživetje celic ter s tem tudi za razvoj raka.

(ii) PC je z več kot 70-odstotki tudi glavna sestavina pljučnega surfaktanta, ki se sintetizira v podvrsti alveolnih epiteljskih celic, pnevmocitih tipa II. V pnevmocitih tipa II je sinteza PC močno odvisna od višjih maščobnih kislin – v pljučih zarodka endogena sinteza maščobnih kislin zadostuje za sintezo PC, že razvita pljuča pa za sintezo PC potrebujejo tako endogeni kot eksogeni vir maščobnih kislin (75). Sploh za bronhioloalveolarni karcinom, podvrsto žleznega nedrobnoceličnega pljučnega raka, je znano, da vznikne iz pnevmocitov tipa II (4). Omenjajo pa tudi, da ima žlezni rak zvišano vsebnost PC, kar je skladno z izvorom žleznega raka (64). Tako bi naj pnevmociti tipa II pri pljučnem raku proizvajali večje količine surfaktanta in PC. Za dodatne potrebe po PC pa bi lahko aktivirali tudi dodatno *PEMT* sintezno pot.

(iii) PC, ki nastane z metilacijo PE, ima drugačno strukturo kot PC, ki se sintetizira po CDP-holinski poti. PC, ki nastane z metilacijo PE, je sestavljen iz daljših in večkrat nenasičenih maščobnih kislin. PC, ki nastane po CDP-holinski poti, pa sestavljajo srednjedolge in nasičene maščobne kisline (76). Ker je v vseh celicah razen v hepatocitih aktivnost PEMT nizka, sklepajo, da celice v membrane vgrajujejo v glavnem PC z nasičenimi maščobnimi kislinami (77). V rakavih celicah se lahko potreba po vrsti PC spremeni in zato se poveča ekspresija *PEMT*. PC, ki nastane z reakcijo encima PEMT, vsebuje tudi večji odstotek arahidonske kisline (76). V celice s tako vrsto PC se po hidrolizi PC sprosti več arahidonske kisline, ki bi po nekaterih sicer kontroverznih ugotovitvah lahko sodelovala pri nastanku raka prostate (78, 79). Vsekakor pa so v procese nastanka in razvoja raka vključeni metaboliti arahidonske kisline in encimi, ki so vpleteni v razgradnjo arahidonske kisline (80).

(iv) Sinteza PC po PEMT poti je neodvisna od holina, torej bi lahko v primeru pomanjkanja holina – kar se v tumorjih lahko zgodi – več PC nastalo z reakcijo encima PEMT. Argument za tak sklep je poskus, v katerem sta se tako ekspresija *PEMT* kot celotna količina PEMT v jetrih podgan, ki so na brezholinski dieti, statistično značilno povečali v primerjavi s kontrolnimi podganami (40).

(v) Hkrati je sinteza PC po PEMT sintezni poti edini endogeni vir holina v organizmu. Pri endogeni sintezi holina se najprej sintetizira PC, nato pa poteče hidroliza PC do holina oz.



**Slika 28:** Hidroliza PC. Fosfolipaze so označene s številkami: 1, fosfolipaza D; 2, fosfolipaza A2; 3, fosfolipaza C. Črtkana puščica predstavlja več reakcijskih stopenj.

do vmesnih produktov CDP-holinske poti. Pod vplivom fosfolipaze A2 najprej poteče hidroliza PC, nato pa preko vmesnih produktov v dveh zaporednih reakcijah nastane holin. V encimski reakciji fosfolipaze C se PC pretvori v fosfoholin, ki je vmesni produkt Kennedyjeve sinteze PC. Fosfolipaza D pa PC pretvori direktno v holin (slika 28) (81). Endogena sinteza holina s pomočjo PEMT bi lahko bila pomembna predvsem pri povečanih celičnih potrebah po holinu, kar pri tumorskih celicah verjetno drži. Pri velikem številu rakov so odkrili zvišane vsebnosti spojin s holinom (82). Tudi

povečana endogena sinteza holina je značilna za različne vrste rakov, npr. za rak prostate, ledvic, jajčnikov, endometrija in prebavil (83–86). Vloga holina pri raku dojke še ni razjasnjena, saj naj bi pomanjkanje holina pomenilo večje tveganje za raka na dojki (53), po drugih študijah pa je tudi pri raku dojke vsebnost holina in metabolitov holina zvišana (87). Ker je holin donor metilne skupine, zvišane vrednosti holina vplivajo na metilacijo DNA in s tem tudi na mehanizme za odpravo poškodb DNA (42). Nekateri produkti hidrolize PC, kot sta fosfoholin in diacilglicerol, imajo vlogo sekundarnih obveščevalcev (81). Encimi, ki so vključeni v hidrolizo PC (predvsem fosfolipaza D), pa naj bi sodelovali v procesih celične proliferacije, prenosa signalov in nastanka malignih obolenj (42). Na podlagi vseh teh dejstev lahko encimu PEMT pripišemo pomembno in zelo široko vlogo pri razvoju tumorjev. PEMT namreč ni vključen samo v sintezo fosfolipidov, ampak je verjetno udeležen tudi v ostalih procesih kancerogeneze. Seveda pa so te razlage zgolj predvidevanja in špekulacije, ki jih je potrebno še raziskati.

V prejšnjih študijah so za iste vzorce nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva ugotovili, da zvišani aktivnosti FASN in LPL v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) napovedujeta krajše preživetje bolnikov. Mi pa smo z multivariatno Coxovo regresijsko analizo pokazali, da zvišano izražanje *PEMT* v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) napoveduje krajše preživetje bolnikov neodvisno od zvišanega razmerja aktivnosti FASN in neodvisno tudi od zvišanega razmerja aktivnosti LPL. Ta ugotovitev potrjuje že prejšnje raziskave, da je za rast in razvoj tumorjev potrebna preskrba tumorskega tkiva z lipidi. FASN in LPL oskrbujeta rakavo tkivo z višjimi maščobnimi kislinami, ki jih celice uporabijo za sintezo fosfolipidov. PEMT sodeluje v sintezi PC iz PE, ker celice za sintezo novih membran potrebujejo več PC. Da je izražanje *PEMT* neodvisni prognostični kazalec, lahko razložimo prav z njegovo širšo vlogo v kancerogenezi. Ostali metabolni procesi, ki naj bi bili povezani z encimom PEMT (endogena sinteza holina, hidroliza PC do sekundarnih obveščevalcev, motnja v metilaciji DNA), so namreč neodvisni od metabolizma višjih maščobnih kislin in s tem neodvisni tudi od aktivnosti encimov FASN in LPL.

Ob naši raziskavi se postavlja tudi vprašanje, ali ima naše odkritje o genskih mehanizmi nedrobnoceličnega pljučnega raka tudi uporabno vrednost. Raziskave o gensko-molekularnih mehanizmi kancerogeneze so namreč brez pomena, če vzporedno z raziskavami ne razmišljamo o možnostih uporabe v diagnostične, prognostične in



terapevtske namene. V literaturi je že omenjeno, da so spojine s holinom potencialno uporabne za diagnostične namene. Pri raku prostate je vsebnost metabolitov PC povečana v primerjavi z benigno hiperplazijo prostate, vsebnost etanolamina pa je v rakavem tkivu nižja (88). Z metaboliti PC lahko dodatno ločimo med rakom prostate v začetnem in napredovalem stadiju, z metaboliti etanolamina pa med benigno hiperplazijo in rakom prostate (89). Ukvarjali so se tudi z razvojem spojin, ki inhibirajo sintezo fosfolipidov. Heksadecilfosfoholin ali miltefozin, sintezni analog alkilfosfolipidov, je protitumorska učinkovina, ki deluje na nivoju celičnih membran in zavira proliferacijo celic (90). Zanj so ugotovili, da inhibira sintezo PC tako po CDP-holinski poti kot po PEMT sintezni poti (91). Torej že obstajajo spojine, ki inhibirajo encim PEMT in bi se potencialno lahko uporabljale v terapiji rakavih obolenj pri bolnikih, ki imajo zvišano razmerje izražanja *PEMT* v pljučnem tkivu. Glede na naše ugotovitve pa bi se razmerje izražanja *PEMT* vsekakor lahko uporabljalo v prognostične namene – za napovedovanje preživetja bolnikov.

Našo raziskavo moramo ovrednotiti tudi glede na tehnično izvedbo.

(i) Za detekcijo produktov PCR reakcije v realnem času smo uporabili barvilo SYBR Green I. Ker je to nespecifični način detekcije, moramo zagotoviti, da ne določimo morebitnih stranskih produktov z dvoverižno DNA, v katere se barvilo prav tako vgradi. To smo preverili z določitvijo talilne krivulje za vsak analiziran vzorec. V vzorcu, kjer smo določili več vrhov talilne krivulje, so bili razen preiskovanega produkta PCR reakcije tudi neželeni produkti. Meritve takih vzorcev smo izključili in jih ponovili.

(ii) S pomočjo  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  metode smo izračunali relativno količino mRNA v vzorcih. Pogoji za to metodo je, da je učinkovitost pomnoževanja tarčnega gena in referenčnega gena primerljiva. Mi smo po zagotovilih proizvajalca predpostavili, da sta učinkovitosti pomnoževanja približno enaki in uporabili  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  metodo. Da bi to domnevo potrdili, bi bilo smiselno preveriti učinkovitost pomnoževanja s pomočjo razredčitvene krivulje.

Kakorkoli, glavna ugotovitev diplomske naloge je, da zvišano razmerje izražanja *PEMT* napoveduje krajše preživetje bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom, in sicer neodvisno od drugih prognostičnih dejavnikov, kot so hujšanje pred operacijo, napredovali stadij bolezni ter zvišani aktivnosti encimov FASN in LPL v rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo).

## 6. SKLEP IN IZHODIŠČA NADALJNJIH RAZISKAV

V okviru diplomskega dela smo proučevali izražanje *PEMT* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu in v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika. Ker o vlogi *PEMT* pri pljučnem raku do sedaj še ni bila objavljena nobena študija, predstavlja naša raziskava pomemben doprinos k razumevanju genetskih mehanizmov v procesu nastanka in razvoja raka. Hkrati pa s to raziskavo tudi nadaljujemo z že začetim proučevanjem procesov lipogeneze v kancerogenezi nedrobnoceličnega pljučnega raka. Ugotovili smo, da je izražanje *PEMT* v rakavem tkivu enako kot v kontrolnem tkivu. S statističnimi analizami smo tudi pokazali, da izražanje *PEMT* v rakavem tkivu in razmerje izražanja *PEMT* (v rakavem tkivu proti kontrolnemu tkivu) ne korelirata s kliničnimi podatki, kot so stadij bolezni, histološki tip, uživanje alkohola, hujšanje pred operacijo in kajenje. Razmerje izražanja *PEMT* tudi ne korelira s časom spremljanja bolnikov, je pa razmerje izražanja *PEMT* skoraj statistično značilno višje pri bolnikih, ki so tekom 4-letne raziskave umrli, kot pri preživelih. Z analizo preživetja pa smo pokazali, da višje izražanje *PEMT* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu (relativno glede na kontrolno tkivo) napoveduje krajše preživetje bolnikov neodvisno od ostalih znanih prognostičnih dejavnikov. Ta ugotovitev kaže, da je oskrba rakavega tkiva z lipidi ključnega pomena za razvoj raka in da *PEMT* odigra pomembno vlogo ne samo pri sintezi PC ampak tudi širše.

Hkrati je lahko ta raziskava zelo zanimiva iztočnica za nadaljnje študije. Poleg izražanja gena bi lahko izmerili tudi aktivnost *PEMT* v pljučnem rakavem in kontrolnem tkivu, saj višje izražanje gena ne pomeni nujno zvišane aktivnosti encima. Da bi lahko potrdili predvidevanja o povezanosti *PEMT* s koncentracijami PC, holina in ostalih metabolitov PC, bi bilo smiselno izmeriti koncentracije teh analitov v pljučnem rakavem tkivu. Žal nam zasnova raziskave ni omogočala, da bi meritve opravili že z vzorci teh bolnikov. Vsekakor pa lahko raziskavo o fosfolipidih zastavimo še širše. Smiselno bi bilo izmeriti izražanje genov in aktivnost encimov v CDP-etanolaminski poti, po kateri se sintetizira PE, ki se z encimom *PEMT* lahko pretvori v PC. Pričakovati je, da bosta izražanje genov in aktivnost encimov v rakavem tkivu povečana. Raziskovalci še navajajo, da so pri rakah močno zvišane aktivnosti encimov CDP-holinske poti, ki je glavna pot za sintezo PC. Zanimivo bi bilo izmeriti aktivnost ključnega encima v tej poti, CTP:fosfoholin-citidiltransferaze. S pomočjo omenjenih raziskav bi mogoče odkrili gen in/ali encim, ki ima v metabolizmu fosfolipidov in procesu kancerogeneze še pomembnejšo vlogo kot *PEMT*.

## 7. LITERATURA

1. World Cancer Research Fund International. Cancer statistics: Worldwide. [http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/world\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php). Dostop: 30. 1. 2013.
2. Rak v Sloveniji 2009. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2013. Dostopno na spletu: [http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP\\_2009.pdf](http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2009.pdf). Dostop: 16. 4. 2013.
3. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. Dostop: 31. 1. 2013.
4. Rott T. Epidemiologija, etiopatogeneza in histološka klasifikacija pljučnih tumorjev. *Med Razgl* 2002; 41: 289–312.
5. Terčelj M. Zgodnje odkrivanje pljučnega raka. *Radiol Oncol* 2006; 40: S59–S66.
6. Horn L, Pao W, Johnson DH. Neoplasms of the Lung. V: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18. izdaja. New York: McGraw-Hill; 2012. Dostopno na spletu: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=9115512>. Dostop: 31. 1. 2013.
7. Jerše M. Epidemiologija, etiologija, preinvasivne lezije in klasifikacija primarnih pljučnih malignomov. *Med Razgl* 2012; 51: 375–408.
8. Debevec-Kodrič L. Tumorji pljuč. V: Košnik M, et. al. *Interna medicina*. 4. izdaja. Ljubljana: Littera Picta; 2011. Str. 412–419.
9. Petersen I. The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108: 525–31.
10. Lesničar H, Čufer T, Serša G, Sadikov A. Splošna načela klinične onkologije. V: Novaković S et. al. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Ljubljana: Mladinska knjiga; 2009. Str. 56–83.
11. Tanoue LT, Detterbeck FC. New TNM classification for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 4: 413–423.
12. Zwitter M. Tumorji torakalnih organov. V: Novaković S et. al. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Ljubljana: Mladinska knjiga; 2009. Str. 284–297.

13. Tsim S, O'Dowd CA, Milroy R, Davidson S. Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): A review. *Resp Med* 2010; 104: 1767–1774.
14. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1807: 568–576.
15. Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 2009; 100: 1369–1372.
16. Schug ZT, Frezza C, Galbraith LC, Gottlieb E. The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour. *Acta Oncol* 2012; 51: 301–310.
17. Kuhajda FP. Fatty Acid Synthase and Cancer: New Application of an Old Pathway. *Cancer Res* 2006; 66: 5977–5980.
18. Bilač-Krašnja M, Černe D. Optimizacija postopka za merjenje aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu. *Farm Vest* 2009; 60: 21–26.
19. Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hämmerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 471–481.
20. Trost Z, Sok M, Marc J, Cerne D. Increased lipoprotein lipase activity in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter patient survival. *Arch Med Res* 2009; 40: 364–368.
21. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 10: 763–777.
22. Barger JF, Plas DR. Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: R287–R304.
23. Cerne D, Zitnik IP, Sok M. Increased fatty acid synthase in non-small cell lung cancer tissue is a weaker predictor of shorter patient survival than increased lipoprotein lipase. *Arch Med Res* 2010; 41: 405–409.
24. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PEMT&search=PEMT>. Dostop: 17. 12. 2012.
25. Vance DE. Physiological roles of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 626–632.
26. Shields DJ, Agellon LB, Vance DE. Structure, expression profile and alternative processing of the human PEMT gene. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532: 105–114.
27. Morita S, Takeuchi A, Kitagawa S. Functional analysis of two isoforms of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Biochem J* 2010; 432: 387–398.

28. Walkey CJ, Shields DJ, Vance DE. Identification of three novel cDNAs for human phosphatidylethanolamine N-methyltransferase and localization of the human gene on chromosome 17p11.2. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1436: 405–412.
29. Vance DE, Li Z. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of Lipid Research* 2008; 49: 1187–1194.
30. Vance JE, Vance DE. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 113–128.
31. Vance DE, Walkey CH, Cui Z. PEMT from liver. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1348: 142–150.
32. Walkey CJ, Donohue LR, Bronson R, Agellon LB, Vance DE. Disruption of the murine gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12880–12885.
33. Shields DJ, Lehner R, Agellon LB, Vance DE. Membrane topography of human phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 2003; 278: 2956–2962.
34. Vance DE. Hepatic Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase, Unexpected Roles in Animal Biochemistry and Physiology. *J Biol Chem* 2007; 282: 33237–33241.
35. Resseguie M, Song J, Niculescu MD, da Costa KA, Randall TA, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. *FASEB J* 2007; 21: 2622–2632.
36. da Costa KA, Kozyreva OG, Song J, Galanko JA, Fischer LM, Zeisel SH. Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. *FASEB J* 2006; 20: 1336–1344.
37. Nelson LD, Cox MM. *Biological Membranes and Transport*. V: Nelson LD, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 5. izdaja. New York: W. H. Freeman and Company; 2008. Str. 371–381.
38. Hermansson M, Hokynar K, Somerharju P. Mechanisms of glycerophospholipids homeostasis in mammalian cells. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 240–257.
39. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998. 12, Choline. Dostopno na spletu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114308/>. Dostop: 24. 1. 2013.

40. Cui Z, Vance DE. Expression of phosphatidylethanolamine *N* methyltransferase-2 is markedly enhanced in long term choline-deficient rats. *J Biol Chem* 1996; 271: 2839–2843.
41. Zhu X, Song J, Mar MH, Edwards LJ, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J* 2003; 370: 987–993.
42. Awwad HM, Geisel J, Obeid R. The role of choline in prostate cancer. *Clin Biochem* 2012; 45: 1548–1553.
43. Ziesel SH. Genetic polymorphisms in methyl-group metabolism and epigenetics: Lessons from humans and mouse models. *Brain Res* 2008; 1237: 5–11.
44. Vance DE, Vance JE. Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. V: Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5. izdaja. Amsterdam: Elsevier; 2008. Str. 213–244.
45. Noga AA Vance DE. A gender-specific role for phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase-derived phosphatidylcholine in the regulation of plasma high density and very low density lipoproteins in mice. *J Biol Chem* 2003; 278: 21851–21859.
46. Vance JE, Vance DE. Metabolic insights into phospholipid function using gene-targeted mice. *J Biol Chem* 2005; 280: 10877–10880.
47. Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A, Vance DE. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab* 2006; 3: 321–331.
48. Boyer RF. *Temelji biokemije*. Ljubljana: Študentska založba; 2005. Str. 215.
49. Hörl G, Wagner A, Cole LK, Malli Roland, Reicher H, Kotzbek P, Köfeler H, Höfler G, Frank S, Bogner-Strauss JG, Sattler W, Vance DE, Steyrer E. Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo. *J Biol Chem* 2011; 286: 17338–17350.
50. Izabela Dobrzynska I, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2005; 276: 113–119.
51. Tessitore L, Marengo B, Vance DE, Papotti M, Mussa A, Daidone MG, Costa A. Expression of phosphatidylethanolamine *n*-methyltransferase in human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 2003; 65: 152–158.

52. Tessitore L, Dianzani I, Cui Z, Vance DE. Diminished expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase 2 during hepatocarcinogenesis. *Biochem J* 1999; 337: 23–27.
53. Xu X, Gammon MD, Zeisel SH, Lee YL, Wetmur JG, Teitelbaum SL, Bradshaw PT, Neugut AI, Santella RM, Chen J. Choline metabolism and risk of breast cancer in a population-based study. *FASEB J* 2008; 22: 2045–2052.
54. Sobin LH, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2002.
55. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, et al. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon, France: IARC Press; 2004.
56. Trost Z, Marc J, Sok M, Cerne D. Increased apolipoprotein E gene expression and protein concentration in lung cancer tissue do not contribute to the clinical assessment of non-small cell lung cancer patients. *Arch Med Res* 2008; 39: 663–667.
57. Pestana EA, Belak S. *Real-Time PCR - The Basic Principles*. V: Pestana EA, et. al. *Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR application*. Dordrecht: Springer Science and Business Media; 2010. Str. 27–46.
58. Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vest* 2004; 55: 215–220.
59. Fraga D, Meulia T, Fenster S. *Real-Time PCR*. V: Gallagher S, Wiley EA. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. New Jersey (ZDA): John Wiley and Sons; 2008. 10.3.1–10.3.34.
60. Rooney SA, Motoyama EK. Studies on the biosynthesis of pulmonary surfactant. The role of the methylation pathway of phosphatidylcholine biosynthesis in primate and non-primate lung. *Clin Chim Acta* 1976; 69: 525–531.
61. Yost RW, Chander A, Dodia C, Fisher AB. Stimulation of the methylation pathway for phosphatidylcholine synthesis in rat lungs by choline deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1986; 875: 122–125.
62. Robinson BS, Snoswell AM, Runciman WB, Kuchel TR. Choline biosynthesis in sheep. Evidence for extrahepatic synthesis. *Biochem J* 1987; 244: 367–373.
63. Zwitter M, Antonič J, Bavčar-Vodovnik T, Cerar O, Cesar R, Crnjac A et al. *Smernice za diagnostiko in zdravljenje bolnikov z rakom pljuč*. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2006. Dostopno na spletu:

[http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/PLJUCA-doktrina\\_2006.pdf](http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/PLJUCA-doktrina_2006.pdf)

Dostop: 30. 1. 2013.

64. Lee GK, Lee HS, Park YS, Lee JH, Lee SC, Lee JH, Lee SJ, Shanta SR, Park HM, Kim HR, Kim IH, Kim YH, Zo JI, Kim KP, Kim HK. Lipid MALDI profile classifies non-small cell lung cancers according to the histologic type. *Lung Cancer* 2012; 76: 197–203.
65. Carrasco MP, Jiménez-López JM, Segovia JL, Marco C. Comparative study of the effects of short- and long-term ethanol treatment and alcohol withdrawal on phospholipid biosynthesis in rat hepatocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002; 131: 491–497.
66. Furtado VC, Takiya CM, Braulio VB. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase activity is increased in rat intestinal brush-border membrane by chronic ethanol ingestion. *Alcohol Alcohol* 2002; 37: 561–565.
67. Kharbanda KK, Mailliard ME, Baldwin CR, Beckenhauer HC, Sorrell MF, Tuma DJ. Betaine attenuates alcoholic steatosis by restoring phosphatidylcholine generation via the phosphatidylethanolamine methyltransferase pathway. *J Hepatol* 2007; 46: 314–321.
68. Kharbanda KK, Todero SL, Ward BW, Cannella JJ, Tuma DJ. Betaine administration corrects ethanol-induced defective VLDL secretion. *Mol Cell Biochem* 2009; 327: 75–78.
69. Tessitore L, Sesca E, Vance DE. Inactivation of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 in aflatoxin-induced liver cancer and partial reversion of the neoplastic phenotype by PEMT transfection of hepatoma cells. *Int J Cancer* 2000; 86: 362–367.
70. Cui Z, Houweling M, Vance DE. Expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 in McArdle-RH7777 hepatoma cells inhibits the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine biosynthesis via decreased gene expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochem J* 1995; 312: 939–945.
71. Cole LK, Vance DE. A role for Sp1 in transcriptional regulation of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in liver and 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2010; 285: 11880–11891.



72. Lee MW, Bakovic M, Vance DE. Overexpression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase 2 in CHO-K1 cells does not attenuate the activity of the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochem J* 1996; 320: 905–910.
73. Walkey CJ, Cui Z, Agellon LB, Vance DE. Characterization of the murine phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 gene. *J Lipid Res* 1996; 37: 2341–2350.
74. Mulligan HD, Tisdale MJ. Effect of the lipid-lowering agent bezafibrate on tumour growth rate in vivo. *Br J Cancer* 1991; 64: 1035–1038.
75. Agassandian M, Mallampalli RK. Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 612–625.
76. DeLong CJ, Shen YJ, Thomas MJ, Cui Z. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 29683–29688.
77. Cui Z, Houweling M. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 87–96.
78. Sakai M, Kakutani S, Horikawa C, Tokuda H, Kawashima H, Shibata H, Okubo H, Sasaki S. Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. *BMC Cancer* 2012; 12: 606–632.
79. Patel MI, Kurek C, Dong Q. The arachidonic acid pathway and its role in prostate cancer development and progression. *J Urol* 2008; 179: 1668–1675.
80. Speed N, Blair IA. Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30: 437–447.
81. Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 835–848.
82. Ackerstaff E, Glunde K, Bhujwala ZM. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? *J Cell Biochem* 2003; 90: 525–533.
83. Qi C, Park JH, Gibbs TC, Shirley DW, Bradshaw CD, Ella KM, Meier KE. Lysophosphatidic acid stimulates phospholipase D activity and cell proliferation in PC-3 human prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 1998; 174: 261–272.
84. Foster DA, Xu L. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 789–800.

85. Stewart JD, Marchan R, Lesjak MS, et al. Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 8155–8160.
86. Kang DW, Choi KY, Min do S. Phospholipase D meets Wnt signaling: a new target for cancer therapy. *Cancer Res* 2011; 71: 293–297.
87. Cao MD, Döpkins M, Krishnamachary B, Vesuna F, Gadiya MM, Lønning PE, Bhujwalla ZM, Gribbestad IS, Glunde K. Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5) expression correlates with malignant choline phospholipid metabolite profiles in human breast cancer. *NMR Biomed* 2012; 25: 1033–1042.
88. Swanson MG, Keshari KR, Tabatabai ZL, Simko JP, Shinohara K, Carroll PR, Zektzer AS, Kurhanewicz J. Quantification of choline- and ethanolamine-containing metabolites in human prostate tissues using <sup>1</sup>H HR-MAS total correlation spectroscopy. *Magn Reson Med* 2008; 60: 33–40.
89. Keshari KR, Tsachres H, Iman R, Delos Santos L, Tabatabai ZL, Shinohara K, Vigneron DB, Kurhanewicz J. Correlation of phospholipid metabolites with prostate cancer pathologic grade, proliferative status and surgical stage - impact of tissue environment. *NMR Biomed* 2011; 24: 691–699.
90. Jiménez-López JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine synthesis via both the methylation of phosphatidylethanolamine and CDP-choline pathways in HepG2 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 153–161.
91. Jiménez-López JM, Ríos-Marco P, Marco C, Segovia JL, Carrasco MP. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis* 2010; 9: 33–42.