

Analiza ekspresije cirkadijalnih PERIOD gena u tkivima planocelularnog karcinoma larinksa

Mihelčić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:161457>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-05**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
(Biotehnologija u medicini)

Matea Mihelčić

**Analiza ekspresije cirkadijalnih *PERIOD* gena u tkivima
planocelularnog karcinoma larinksa**

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
(Biotehnologija u medicini)

Matea Mihelčić

**Analiza ekspresije cirkadijalnih *PERIOD* gena u tkivima
planocelularnog karcinoma larinksa**

Diplomski rad

Mentor rada: Doc.dr.sc. Elitza Petkova Markova Car

Rijeka, 2018.

Diplomski rad obranjen je dana

pod povjerenstvom:

1. Izv.prof.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić – predsjednica
2. Izv.prof.dr.sc. Mirela Sedić
3. Doc.dr.sc. Elitza Petkova Markova Car

Rad ima 35. stranica, 6 slika, 3 tablice i 39 literaturnih navoda

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem mentorici Doc.dr.sc. Elitza Petkova Markova
Car na trudu, razumijevanju i angažiranosti pri izradi mog diplomskog
rada.

Najviše se zahvaljujem Beti i Moniki na ljubavi i potpori.

SAŽETAK

Godišnje se dokumentira oko 100000 novo oboljelih osoba od karcinoma larinksa, od kojih su najčešći planocelularni karcinomi larinksa (engl. LSCC ili Larengial Squamous Cell Carcinoma). Procjenjuje se da je postotak petogodišnjeg preživljavanja pacijenata 60%, a podaci o smrtnosti o LSCC ostaju isti već godinama. Zadnjih godina raste interes za istraživanje veze cirkadijalnog ritma i razvojem raznih tumora poput leukemije, karcinoma dojke, pluća, endometrija, bubrega, kože, želuca, jetre te oralnih karcinoma i karcinoma glave i vrata, no u literaturi nisu objavljeni podaci o povezanosti LSCC i cirkadijalnog sustava. Cirkadijalni sustav regulira razne fiziološke i bihevioralne procese poput aktivnosti, apetita, metabolizma i ekspresije gena. Njegov molekularni mehanizam temelji se na kompleksnoj autoregulacijski transkripcijsko-translacijske povratnoj sprezi čiji su akteri mnogi geni, uključujući i negativno regulirajuće satne gene *PERIOD* (*PER1*, *PER2* i *PER3*). Sa svrhom boljeg razumijevanja cirkadijalne ekspresiji u tumorima, analizirali smo ekspresijski profil cirkadijalnih satnih *PER* gena u tkivima pacijenta sa dijagnosticiranim planocelularnim karcinomom larinksa. Tkiva oboljelih pacijenata smo homogenizirali nakon čega smo izolirali RNA i proveli reverznu transkripciju, kako bi kvantificirali ekspresiju *PER1*, *PER2* i *PER3* gena pomoću metode lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu. Usporedbom genske ekspresije *PER* gena u tumorskom i tumoru pridruženom tkivu, dobili smo rezultate koji pokazuju kako sva tri *PER* gena imaju smanjenu relativnu ekspresiju, gdje *PER1* i *PER3* imaju statistički značajno smanjenu ekspresiju ($p < 0,05$), od čega *PER3* ima najnižu ekspresiju. Navedeni rezultati impliciraju korelaciju smanjene ekspresije cirkadijalnih *PER* gena sa patogenezo LSCC i to posebice gena *PER3*.

Ključne riječi: Planocelularni karcinom grkljana (LSCC), cirkadijalan ritam, satni geni, *PER1*, *PER2*, *PER3*

ABSTRACT

Every year there is about 100 000 new cases of laryngeal cancer and most of them belong to the laryngeal squamous cell carcinoma or LSCC subgroup. The 5-year survival rate is 60%, and the data about the lethality of LSCC stays the same for years. Many studies link the disruption of circadian rhythm with development and tumour progression of different types of cancers like leukaemia, endometrial cancer, breast, lung, kidney, skin, stomach, liver, oral and head and neck cancers. However, there is no literature that connects circadian rhythm and LSCC in particular. Circadian system regulates many physiological and behavioural processes like activity, appetite, metabolism and gene expression. Its molecular mechanism is based on complex autoregulatory transcriptional-translational feedback loops composed of different clock genes including negatively regulating PERIOD genes (*PER1*, *PER2* and *PER3*). With the purpose of better understanding the circadian gene expression in cancer and adjacent non-cancer tissues, we analysed the gene expression profile of circadian clock *PER* genes in LSCC patients. After homogenization of patient's tissues, and the RNA isolation, the reverse transcription was performed. The Real Time PCR method was used to quantify and analyse the expression of *PER1*, *PER2* and *PER3* genes. Our results showed downregulation of all three *PER* genes. *PER1* and *PER3* have statistically significant downregulation ($p < 0,05$), and *PER3* has the strongest downregulation. These results indicate correlation of downregulation of circadian *PERIOD* genes, especially the *PER3*, with the LSCC pathogenesis.

Key words: Laryngeal squamous cell carcinoma(LSCC), circadian rhythm, clock genes, *PER1*, *PER2*, *PER3*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Planocelularni karcinom larinksa	1
1.2. Cirkadijalni sustav	3
1.3. Molekularni mehanizam cirkadijalnih oscilatora.....	5
1.4. Deregulacija ekspresije PER gena i njihova implikacija kod različitih karcinoma	8
1.4.1. Gen <i>PER1</i>	8
1.4.2. Gen <i>PER2</i>	9
1.4.3. Gen <i>PER3</i>	9
2. CILJ RADA.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Uzorci i pacijenti	11
3.2. Homogenizacija tkiva	13
3.3. Izolacija RNA.....	14
3.4. Reverzna transkripcija RNA.....	15
3.5. RT-PCR.....	16
3.6. Analiza podataka	16
4. REZULTATI	18
4.1. Promijenjena ekspresija cirkadijalnih <i>PER</i> gena u pacijenata s planocelularnim karcinomom larinksa	18
4.2. Analiza ekspresije PER gena za pojedinačne pacijente	20
5. DISKUSIJA	22
6. ZAKLJUČAK	27
7. LITERATURA.....	29
8. ŽIVOTOPIS.....	33

1. UVOD

1.1. Planocelularni karcinom larinksa

Planocelularni ili skvamozni karcinom glave i vrata (engl. HNSCC ili Head and neck squamous cell carcinoma) se sastoji od heterogene grupe tumora koji nastaju iz gornjeg dišnoprobavnog sustava obuhvaćajući usnu i nosnu šupljinu, nazofarinks, orofarinks, hipofarinks te grkljan¹. Radi se o jednom od najčešćih karcinoma u svijetu koji je odgovoran za preko 550000 novodijagnosticiranih pacijenata i oko 300000 smrtnih slučajeva godišnje². Od ukupnog broja zloćudnih HNSCC slučajeva, 25% se odnosi na karcinom grkljana, dok na karcinom grkljana otpada 2.4% sveukupnih zloćudnih karcinoma u svijetu. Također, više od 95% karcinoma grkljana su planocelularni karcinomi larinksa (engl. LSCC ili laryngeal squamous cell carcinoma). Kod mnogih oboljelih, uznapredovali LSCC se širi i na limfne čvorove ili na druge organe što opisuje i poznata TNM klasifikacija. TNM definira tumore i tumorske agregate uzimajući u obzir njegovu poziciju i određene kvalitete primarnog tumora (T), infiltrirajuće regionalne limfne čvorove (N) te postojanje metastaza (M) (Tablica 1). Rani stadij karcinoma je u većini slučajeva moguće izliječiti operativnim zahvatom ili radioterapijom, dok je napredni oblik karcinoma puno teže liječiti³. Naime, petogodišnja stopa preživljavanja kod naprednih oblika karcinoma larinksa je 60%. Svake godine dijagnosticira se oko 100000 novooboljelih od karcinoma larinksa i neovisno o napredcima u medicini, podaci o smrtnosti uzorkovanih karcinom larinksa ostaju isti već godinama⁴.

Rizični faktori karcinoma larinksa podrazumijevaju okolišne čimbenike poput konzumacija duhana, alkohola, kave, izloženost štetnim kancerogenim kemikalijama poput silijske prašine, infekcija virusom HPV (humanopapiloma virus) i EBV (Epstein Barr virus)⁵. Također, osim okolišnih, i razni genetski čimbenici se povezuju sa LSCC, a oni uključuju polimorfizme u određenim genima uključenim u patogenezu (primjerice *kriptokrom P450*, *FAS*, *glutation S transferaza*, *metaloproteinaza MMP1* te

MMP2), inaktivaciju tumor supresora (npr. *p53*, *p16*), aktivaciju onkogeni (npr. *c-myc*) te deregulaciju različitih *ciklina*^{6–10}.

Tablica 1 (Po uzoru na ¹¹) *TNM je metoda za klasifikaciju tumora. Kriteriji za klasifikaciju su veličina tumora (T), prisutnost regionalnih metastaza u vratnim limfnim čvorovima (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M).*

T (tumor)		N (čvor, engl. node)		M (metastaza)	
Tis	Tumor "in situ". Vrlo rana faza tumora. Nalazi se na mukozni grkljana.	N0	Limfni čvorovi nemaju tumorske stanice.	M0	Tumor se nije proširio na druga tkiva u tijelu.
T1	Tumor se nalazi samo na jednom dijelu grkljana. Glasnice se mogu normalno pomicati.	N1	Limfni čvor sadrži tumorske stanice na istoj strani vrata gdje se nalazi i tumor. Veličine limfnog čvora je manja od 3 cm.		
T2	Tumor koji je započeo na glasnicama te ispod ili iznad glasnica se počinje širiti na ostale dijelove grkljana.	N2a	Limfni čvor sadrži tumorske stanice na istoj strani vrata gdje se nalazi i tumor. Veličine limfnog čvora je između 3 i 6 cm.		
T3	Tumor je zadobio na veličini te može onesposobiti pomicanje glasnica ili je prerastao u susjedna područja grkljana (ispred nepčane resice ili štitnjače).	N2b	Nekolicina limfnih čvorova sadrži tumorske stanice na istoj strani vrata gdje se nalazi i tumor. Veličina takvih čvorova ne prelazi veličinu od 6 cm.	M1	Tumor se proširio na druge dijelove tijela, primjerice na pluća.
T4	Tumor je prešao na druga tkiva osim grkljana, primjerice dušnik, jednjak ili štitnjača.	N2c	Nekolicina limfnih čvorova sadrži tumorske stanice na suprotnoj strani vrata gdje se nalazi tumor ili na objema stranama vrata gdje se nalazi tumor. Veličina takvih čvorova ne prelazi veličinu od 6 cm.		
		N3	Uključuje barem jedan limfni čvor sa tumorskim stanicama koji prelazi veličinu od 6 cm.		

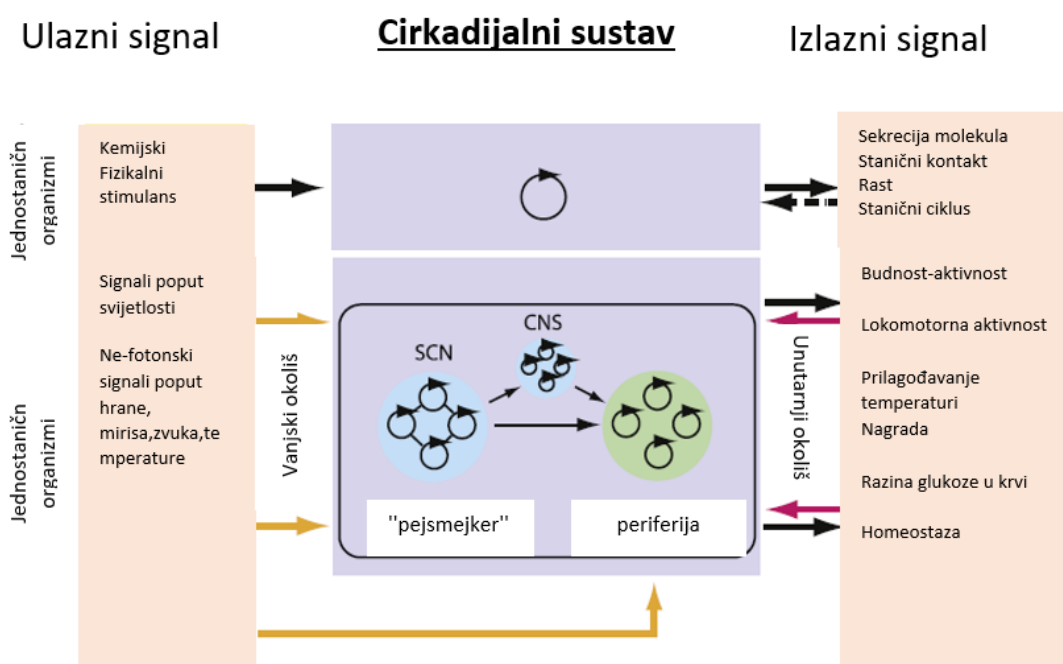
1.2. Cirkadijalni sustav

U mnogim stanicama i tkivima događaju se biološki procesi koji imaju sposobnost oscilacije tj. pokazuju intervale aktivnosti različitog intenziteta. Molekule, stanice i tkiva koja imaju svojstvo oscilacije nazivaju se oscilatorima i djeluju kao dio kompleksnog cirkadijalnog oscilatorskog sustava. Cirkadijalni oscilatori imaju, otprilike, 24 satnu periodičnost, unutar koje se stvaraju promjene u ekspresiji cirkadijalnih gena kako bi se kontrolirali i sinkronizirali kompleksni fiziološki procesi. Cirkadijalni oscilatori djeluju proaktivno i imaju mogućnost resetirati se pri promjeni vanjskih signala kako bi se organizam bolje prilagodio okolišu. Najpoznatiji vanjski signal je svjetlost i većina bioloških organizama imaju specijalizirane fotoreceptivne i fototransduktivne mehanizme koji djeluju u sklopu cirkadijalnog sustava¹². Upravo pomoću cirkadijalnih oscilatora i vanjskog signala svjetlosti organizam prilagođava svoj period aktivnosti i neaktivnosti ciklusnoj izmjeni svjetlosti i tame¹³.

Cirkadijalni sustav se uglavnom sastoji od tri glavna dijela: ulazni signal koji podešava vrijeme (*zeitgeber*), središnji oscilator koji generira cirkadijalni signal te izlazni signal koji predstavlja fiziološke procese i ponašanje poput hormonalne oscilacije, lokomotorne aktivnosti, uzimanje hrane, temperatura, itd. (*Slika 1*). U sisavaca, *zeitgeber* prolazi do glavnog oscilatora, suprahijazmatske jezgre (engl. SCN ili suprachiasmatic nucleus) u hipotalamusu, koji usklađuje djelatnost drugih perifernih oscilatora smještenih u različitim tkivima (primjerice retina, jetra, pluća, srce, tiroidna žlijezda, itd.)^{14,15}. Na ovaj način organizmi poput sisavaca efikasno organiziraju i koordiniraju svoje sustave u vremenskom okviru od 24 sata.

Jedan od dobro proučenih primjera tkiva na koje utječe cirkadijalni oscilatorski sustav su jetra. Naime, SCN registrira *zeitgeber* hranjenja/gladovanja u obliku metabolita hrane (npr. glukoza, kolesterol, itd.), hormona (npr. grelin, leptin, itd.) ili intracelularnog redoks stanja (omjer NAD(P)H/NAD(P)+) te šalje signal perifernom cirkadijalnom tkivu,

jetri, da uskladi djelatnost stanica i molekula zaslužnih za metaboličke signalne puteve, energetska homeostazu, procesiranje hrane i detoksikaciju. Ovako cirkadijalni ritam doprinosi optimizaciji procesiranja hrane (npr. enzimi glikogen sintaza i glikogen fosforilaza djeluju u različitim vremenski periodima) te limitiranju metaboličkih procesa koji proizvode štetne nusprodukte (npr. slobodni radikali) u specifičnom vremenskom okviru¹⁵.



Slika 1 (Po uzoru na ¹⁴) Shematska organizacija cirkadijalnog sustava na sistemskoj razini. Cirkadijalni sustav sastoji se od ulaznog signala, cirkadijalnog centralnog oscilatora te izlaznog signala. U višestaničnim organizmima cirkadijalni sustav je kompleksniji nego kod jednostaničnih. U višestaničnim organizmima ulazni signal (zeitgeber) može biti različit te može uključivati temperaturu i svjetlost ili čak socijalne interakcije¹⁶. SCN prenosi dobivene informacije pomoću raznih signalnih molekula drugim perifernim oscilatorima. Dolazi do konačnog izlaznog signala u obliku lokomotorne aktivnosti, temperaturne prilagodbe, razine glukoze u krvi, itd. Također, primarno vanjski izlazni signal (zeitgeber) može postati i novi unutarnji signal (zeitgeber) koji može ponovno angažirati cirkadijalni satni

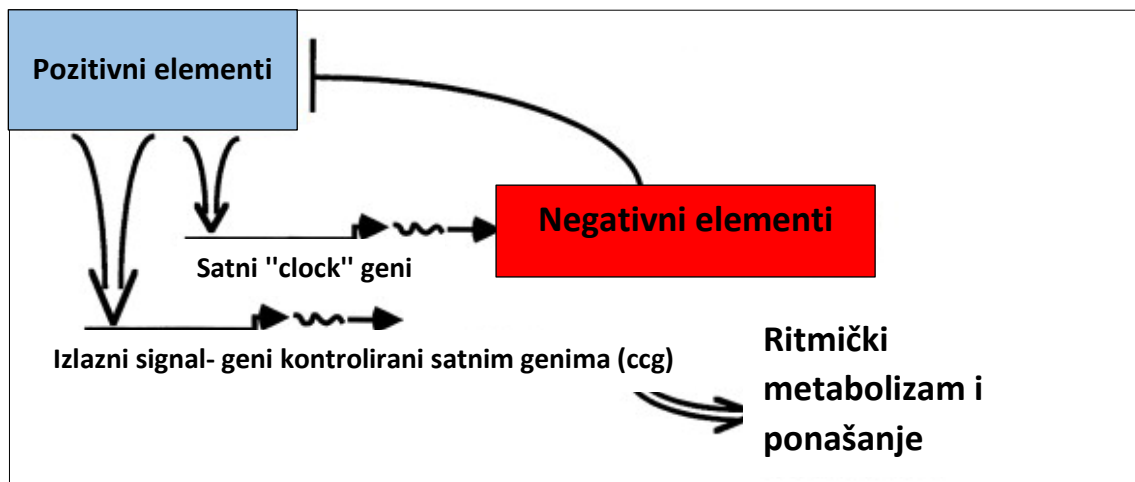
mehanizam. Nadalje, u višestaničnih organizama, neki periferni sustavi pokazuju autonomnost i neovisnost o SCN-u te vanjski ulazni signal može direktno utjecati na periferne oscilatore.

1.3. Molekularni mehanizam cirkadijalnih oscilatora

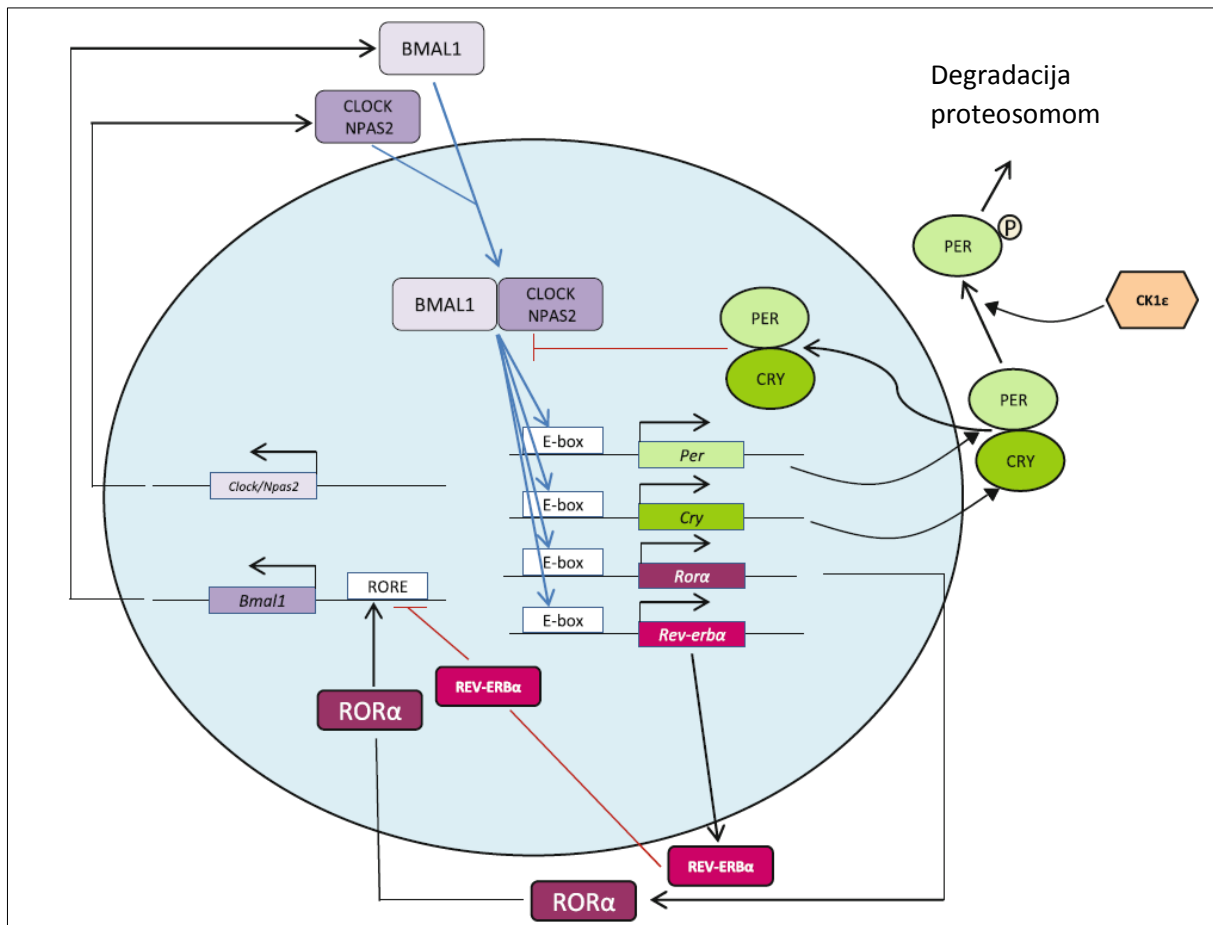
Skoro svaka stanica organizma posjeduje sposobnost cirkadijalne oscilacije za koju je zaslužan specifični cirkadijalni molekularni mehanizam. Takav mehanizam se sastoji od transkripcijsko-translacijskih povratnih petlji koje uključuju oko desetak prepoznatih cirkadijalnih takozvanih satnih (engl. clock) gena (*PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *CK1ε*, *NPAS2*, *REV-ERBa* i *RORa*)¹⁷. Transkripcijsko-translacijske povratne petlje se oslanjaju na pozitivno regulirajuće satne gene poput *CLOCK* i *BMAL1* i negativno regulirajuće satne gene poput *PER1,2,3* i *CRY1,2* (Slika 2).

Tijekom dana geni *CLOCK* i *BMAL1* stvaraju heterodimere koji se vežu na E kutije promotora negativno regulirajućih gena *PER* i *CRY* kako bi se potaknulo njihovo prepisivanje. Prepisani geni *PER* i *CRY* se prevode u proteine, akumuliraju i dimeriziraju u *PER-CRY* proteinski kompleks u citoplazmi stanice. Navedeni kompleks se potom translocira u jezgru preko noći gdje supresira aktivnost *BMAL1-CLOCK* kompleksa zaustavljajući vlastitu transkripciju. Također, postoji i sekundarna transkripcijsko-translacijska povratna petlja koja uključuje elemente *REV-ERBa* i *RORa*. Naime, u jezgri *BMAL1-CLOCK* kompleks se veže za E kutije promotora *REV-ERBa* i *RORa* čime se ostvaruje njihovo prepisivanje. *REV-ERBa* i *RORa* se potom natječu u vezanju za *ROR* element na *BMAL1* promotorskoj regiji. Ako se *REV-ERBa* veže za *BMAL1* promotor zaustavlja se *BMAL1* prepisivanja, ipak, ako se *RORa* veže za *BMAL1* promotor dolazi do prepisivanja *BMAL1* (Slika 3).

Ovakva autoregulacijska transkripcijska povratna sprega traje otprilike 24 sata. Ciklična ekspresija cirkadijalnih satnih gena te posljedična nizvodna cirkadijalnim genima kontrolirana ekspresija gena i proteina je način djelovanja karakterističan za cirkadijalni sustav^{1,18}. Na ovaj način cirkadijalni geni generiraju ritam vlastite transkripcije. Mnogo gena prati ritam cirkadijanog sustava, zapravo cirkadijalni satni geni kontroliraju 2%-10% gena u genomu sisavaca. Takvi geni se nazivaju CCG (od engl. Clock Controled Genes) i zaslužni su za bitne fiziološke i bihevioralne procese¹⁷; npr. c-myc, gen s ulogom poticanja proliferacije stanica ili ciklin D1 koji inicira tranziciju stanice kroz G1 fazu staničnog ciklusa^{19,20}.



Slika 2 (Po uzoru na ¹²) Shematski prikaz transkripcijsko translacijske autoregulatorne povratne sprege cirkadijalnih oscilatora. Cirkadijalni sustav se oslanja na pozitivne (potiču transkripciju) i negativne elemente (zaustavljaju transkripciju). Uloga negativnih elemenata je blokiranje djelovanja pozitivnih elemenata koji imaju ulogu aktivacije satnih gena i CCG (od engl. Clock Controled Genes).



Slika 3 (Preuzeto iz ²¹) Shematski prikaz molekularnog sata u sisavaca. Primarna autoregulacijska petlja se sastoji od negativnih elemenata (PER i CRY) koji reagiraju sa pozitivnim elementima (BMAL1 i CLOCK). BMAL1-CLOCK dimer aktivira transkripciju PER i CRY gena. PER i CRY proteini dimeriziraju i reagiraju sa CLOCK-BMAL1 kompleksom inhibirajući njegovo djelovanje. Nakon nekog vremena dolazi do degradacije PER proteina preko CK1ε te započinje novi cirkadijalni ciklus. Sekundarna autoregulacijska petlja uključuje REV-ERBα i RORα gene koji su mjesto ciljnog djelovanja CLOCK-BMAL1 aktivatorskog kompleksa. Prepisan i preveden REV-ERBα natječe se sa RORα u vezanju za BMAL1 promotorsku regiju. REV-ERBα inhibira prepisivanje BMAL1, dok RORα potiče prepisivanje BMAL1.

1.4. Deregulacija ekspresije PER gena i njihova implikacija kod različitih karcinoma

PER geni su negativno regulirajući satni geni sa mogućnosti regulacije vlastite ekspresije. *Per* je prvi otkriveni „clock gen“, gdje je karakteriziran kao mutacija gena *Drosophila* koji utječe na dužinu cirkadijalnog perioda kod modelnog organizma vinske mušice²². U sisavaca postoje 3 *PERIOD* gena *PER1*, *PER2* i *PER3* koji su bitni dijelovi cirkadijalnog molekularnog sustava čija ispravna aktivnost određuje normalno fiziološko funkcioniranje organizma. Deregulacija cirkadijalnog sustava i njegovih molekularnih *PER* komponenti vodi do razvoja različitih bolesti²³.

1.4.1. Gen *PER1*

PER1 je gen koji kodira za istoimeni protein, a lociran je na ljudskom kromosomu 17 (17p13.1)²⁴ i igra važnu ulogu u regulaciji cirkadijalnog ritma. Mnoge studije, stoga, pokazuju njegovu deregulaciju u različitim bolestima poput karcinoma. Produkt normalnog *PER1* gena inhibira rast karcinoma prostate i debelog crijeva, dok abnormalna ekspresija *PER1* gena vodi do razvoja karcinoma dojke, leukemije, karcinoma endometrije, karcinoma pluća, oralnog karcinoma^{25,26}. Nadalje, poremećaj u staničnom ciklusu je jedan od glavnih uzroka maligne transformacije stanica, a istraživanja pokazuju abnormalnu ekspresiju proteina ciklina i p53 uzorkovanih abnormalnom ekspresijom *PER1* gena. Upravo je poremećena ekspresija *PER1* povezana sa abnormalnim staničnim ciklusom i inhibicijom popravka DNA oštećenja, što su ujedno i glavna svojstva maligno transformiranih stanica^{17,27}. Također, kod karcinoma glave i vrata *PER1* ima smanjenu ekspresiju, a utišavanje *PER1* gena kod iste bolesti rezultira abnormalnom ekspresijom raznih gena zaslužnih za kontrolu staničnog ciklusa²⁶.

1.4.2. Gen *PER2*

PER2 koji kodira za istoimeni protein se nalazi na ljudskom kromosomu 2 na poziciji 2q37.3²⁸ te je važan čimbenik u progresiji stanice kroz stanični ciklus i održavanju ravnoteže između stanične proliferacije i apoptoze. Također, pošto je mnogo gena koje *PER2* regulira nizvodno, zaslužno za održavanje staničnog ciklusa, poremećaj u ekspresiji *PER2* uzrokuje i poremećaj u staničnom ciklusu. Kao što je spomenuto deregulacija staničnog ciklusa je jedan od glavnih uzroka maligne transformacije. *PER2* regulira bitne komponente staničnog ciklusa (cikline i p53) te ima tumor supresorsku ulogu, a istraživanja pokazuju kako promjena u njegovoj ekspresiji uzrokuje razne vrste karcinoma. Ekspresija *PER2* je snižena kod karcinoma dojke, kože, bubrega, jetre, debelog crijeva, želuca te glave i vrata²⁹.

1.4.3. Gen *PER3*

PER3 koji kodira za istoimeni protein se nalazi na ljudskom kromosomu 1 (1p36.23)³⁰. Snižena ekspresija *PER3* korelira sa manjim potencijalom diferencijacije stanica, metastazama na limfnim čvorovima, sa visokim TNM stadijem kod NSCLC (Non small cell lung carcinoma) te sa niskom stopom postoperativnog preživljavanja kod iste bolesti³¹. Slični rezultati su dobiveni i u istraživanjima na karcinomu dojke te na kolorektalnom karcinomu^{32,33}. Nadalje, u HNSCC pacijenata *PER3* ima sniženu ekspresiju te se povezuje sa niskim stupnjem postoperativnog preživljavanja, dubljom invazijom tumora u tkiva te sa većom masom tumora¹.

Cirkadijalni profil satnih gena u LSCC nije dovoljno istražen, stoga smo analizirali ekspresiju *PER1*, *PER2* i *PER3* gena u oboljelih pacijenta koristeći kvantitativne lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (RT-PCR, od engl. Real Time Polymerase Chain Reaction). Obzirom da nema dostupne literature vezane uz ovu temu, očekujemo da će rezultati ovog diplomskog rada doprinijeti boljem razumijevanju učinka deregulacije ekspresije cirkadijalnih *PERIOD* gena u planocelularnom karcinomu larinksa.

2. CILJ RADA

SVRHA:

Kako bi istražili razlike u cirkadijalnoj transkripcijskoj kontroli unutar tumorskog tkiva naspram tumorom-nezahvaćenog okolnog tkiva istih pacijenata, u ovom diplomskom radu ćemo analizirati ekspresijski profil cirkadijalnih satnih *PERIOD* gena u biopsijama tkivima pacijenata dijagnosticiranih s planocelularnim karcinomom larinksa.

CILJEVI:

1. Analizirat ćemo razlike u ekspresiji cirkadijalnih satnih *PER1*, *PER2* i *PER3* gena unutar tumorskog tkiva naspram tumorom-nezahvaćenog okolnog tkiva istih pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma larinksa.
2. Uspoređivat ćemo razlike u ekspresiji *PER1*, *PER2* i *PER3* gena unutar tumorskog tkiva naspram tumorom-nezahvaćenog okolnog tkiva istih pacijenata kako bismo razjasnili eventualno postojanje ovisnosti razlika u ekspresiji satnih gena i stadija bolesti.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci i pacijenti

Prikupili smo uzorke tkiva od 6 pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma larinksa. Uzorci uključuju tumorsko i pripadajuće tumorom-nezahvaćeno tkivo istih pacijenata. Navedene uzorke smo dobili nakon operativnog zahvata u bolnicama: "dr. Josip Benčević", Slavonski Brod, Klinički bolnički centar Osijek (KBC Osijek) i KBC Zagreba (Rebro) tijekom 2017. i 2018. godine. Glavne kliničke i patološke informacije o pacijentima su prikazane u tablici 1, a uključuju demografske (dob i spol) i patološke karakteristike (TNM klasifikacija). Svi pacijenti su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, a protokol istraživanja je odobren od strane Etičkog povjerenstva uključenih kliničkih centara . Prilikom dobivanja uzoraka, tkiva smo obilježili identifikacijskom šifrom i odmah pohranili u tekućem dušiku ili na -80°C.

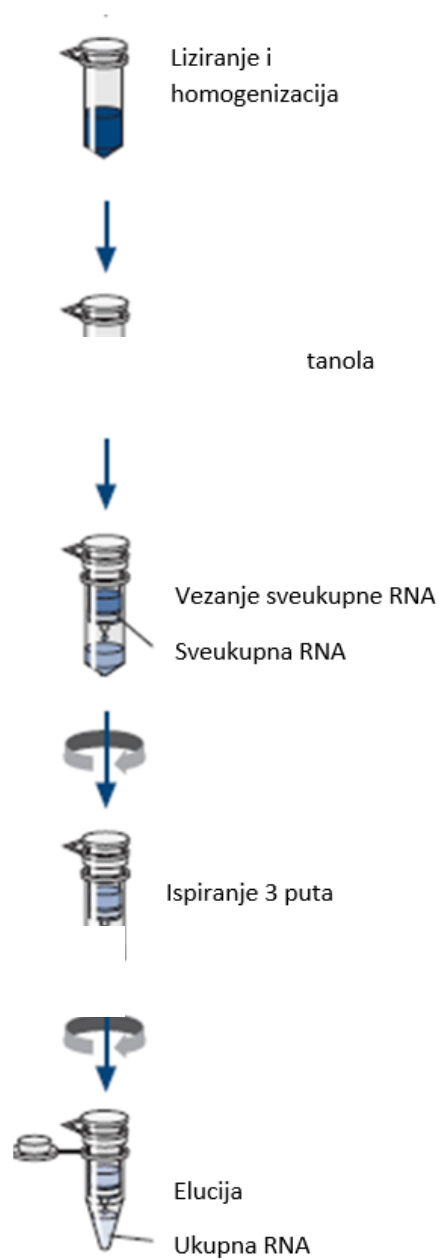
Tablica 2 Karakteristike pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma larinksa.

Pacijenti	Spol	Dob	Klasifikacija bolesnog tkiva
P1	M	64	T1N0M0
P2	M	60	T4N2aM0
P3	M	69	Displazija
P4	Ž	59	T3N2bM0
P5	M	59	T1N0M0
P6	Ž	63	Nedefinirana nakupina stanica u području larinksa

3.2. Homogenizacija tkiva

Tumorsko i pripadajuće tumorom nezahvaćeno tkivo iz 6 pacijenata smo homogenizirali pomoću *MagNa Lyser* (Roche) instrumenta i odgovarajućih *MagNa Lyser Green Beads*(Roche) tuba. Uzorke smo premjestili iz hladnjaka (-80°C) u prethodno ohlađene *MagNa Lyser Green Beads* tube (na $+4^{\circ}\text{C}$). U ohlađene *Green Beads* smo stavili 600 μL RLT lizirajućeg pufera i 2 μL beta-merkaptetanola za denaturaciju enzima RNaza. U pripremljenu otopinu smo uronili komadić tkiva te smo *Magna Lyser Green Beads* tuba postavili u *MagNa Lyser* instrument na centrifugiranje (6 500 rpm/50 sek). Centrifugiranje smo radili 2 puta, a između svakog smo uzorke hladili na prethodno ohlađenom željezno stalku (na -20°C). Inkubacija od 20 minuta se odvijala na sobnoj temperaturi nakon koje su uzorci centrifugirani u centrifugi *Centrifuge 5427 R* (Eppendorf) na 10 000 rpm/2 min.

3.3. Izolacija RNA



Slika 4 (Slika preuzeta iz Qiagen Rneasy kit protokola). Prikaz izolacije RNA.

Iz homogeniziranih tumorskih i tumorom nezahvaćenih tkiva smo izolirali RNA pomoću RNeasy Mini Kit (Qiagen). Na supernatant, dobiven postupkom homogenizacije, smo dodali jedan volumen 70%-tnog etanola za precipitaciju nukleinskih kiselina. Potom smo 700 µL uzorka prebacili na *Qiagen RNeasy mini kolonicu* nakon čega smo centrifugirali (11 000 rpm/20 sek). Nakon centrifugiranja, *Qiagen kolonica* smo prebacili u kolekcijsku tubicu te dodali 350 µL RWI pufera za ispiranje biomolekula. Uzorak smo ponovno centrifugirali (11 000 rpm/20 sek) nakon čega smo u *Qiagen kolonicu* s uzorkom dodali 80 µL miksa otopine DNaze i RDD pufera za razgradnju DNA (10 µL DNaze i 70 µL RDD-a). Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorak smo isprali s 350 µL RWI pufera te ga centrifugirali na 11 000 rpm/20 sek. Poslije smo na *Qiagen kolonu* dodali 500 µL RPE pufera (razrijeđen s etanolom prema uputama proizvođača) za ispiranje preostalih soli. Ispiranje smo proveli 2 puta, a između smo centrifugirali na 11 000 rpm (na 20 sekundi, potom na 2 minute). Uzorak smo prebacili u kolekcijsku tubicu te ga eluirali sa membrane pomoću 35 µL vode centrifugiranjem (11 000 rpm/1 min). Po završetku navedenog postupka smo provjerili koncentraciju i čistoću mjerenjem apsorpcije eluirane RNA na 260 i 280 nm. Za potonje smo koristili *BioDrop* uređaj. Uzorke smo pohranili u hladnjak na -80°C.

3.4. Reverzna transkripcija RNA

Sveukupnu izoliranu RNA (1 µg) iz tumorskog i tumorom nezahvaćenog tkiva smo prepisali u cDNA pomoću *High Capacity cDNA Reverse Transcription* kita (Applied Biosystems). Potom smo pripremili 10 µL RT master miks otopine prema uputama proizvođača. Master miks komponente uključuju: 2 µL RT pufera, 2 µL RT nasumičnih početnica, 0.8 µL dNTP miksa, 1 µL enzima reverzne transkriptaze, 1 µL inhibitora RNaze i 3.2 µL vode bez nukleaza. Miks se kontinuirano hladio na ledu. U pripremljen master miks smo dodali 10 µL uzorka. Proveli smo RT-PCR reakciju (u volumenu od 20 µL) na termalnom PCR instrumentu *ProFlex*

(Applied biosystems) sa sljedećim parametrima: 25°C 10 minuta, potom 37°C 120 minuta, 85°C 5 minuta te 4°C na neodređeno. Nakon provedene reakcije provjerili smo koncentraciju dobivene cDNA na *BioDrop* instrumentu. Na kraju smo uzorke skladištili na - 20°C.

3.5. RT-PCR

Za kvantifikaciju genske ekspresije cirkadijalnih *PER* gena tumorskog i tumorom nezahvaćenog tkiva koristili smo pre-dizajnirani esej *TaqMan Gene Expression* (Applied Biosystems) na instrumentu *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System*. Svaka reakcijska smjesa za PCR (20 µL) sadržavala je 10 µL *TaqMan Master Miksa*, 1 µL *TaqMan Gene Expression* eseja, 7 µL vode i 2 µL uzorka razrijeđenog 20 puta. Korišten *TaqMan Gene Expression* esej je obuhvaćao specifične pre-dizajnirane početnice za amplifikaciju *PER1*, *PER2* i *PER3* gena te gena za endogenu kontrolu *18S* i *GAPDH*. Uz navedeno, esej je imao i pre-dizajniranu *TaqMan* fluorescentno označenu probu sa vezanom FAM bojom i Q prigušivačem. Poslije pripreme reakcijske smjese postavili smo sljedeće uvjete ciklusa PCR reakcije na instrumentu *7500 Fast Real-Time PCR System*: inkubacija na 95 °C (10 min) za toplinsku aktivaciju *Taq* DNA polimeraze, zatim 95 °C (15 s) za DNA denaturaciju te 60 °C (1 min) za vezanje početnica i produljivanje. Uzorak se amplificirao u 40 ciklusa. Za esej smo koristili pločice od 96 jažica u koje smo pipetirali triplikate otopina za svaki geni te 5 kontrola bez predloška (*non-template control*) za gene *PER1*, *PER2*, *PER3*, *18S* i *GADPH*.

3.6. Analiza podataka

Analiza podataka relativne genske ekspresije tumorskog i tumorom nezahvaćenog tkiva smo proveli pomoću *REST 2009 V.1* programa. *REST* koristi *Pfaffl* metodu te spareni, fiksirani i nasumični test raspodjele (*Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test*) koji upućuje na

značajnost rezultata. Za normalizaciju ekspresije smo koristili humane gene *GAPDH* i *18S* (tzv. housekeeping genes).

Osim REST programa upotrijebili smo i SPSS V.22.0.0.0 program u kojem smo proveli statistički parametriski spareni t test i neparametriski Wilcoxonov test. U oba testa smo koristili ΔCT (*threshold cycle*) vrijednosti tumorskog i tumorom nezahvaćenog tkiva sa statističkom značajnosti postavljenom na 0.05.

U konačnici, rezultate dobivene iz REST programa, smo prezentirali kao aritmetičku sredinu $\pm$ interval pouzdanosti (confidence interval). P vrijednost manja od 0.05 se smatra statistički relevantnom.

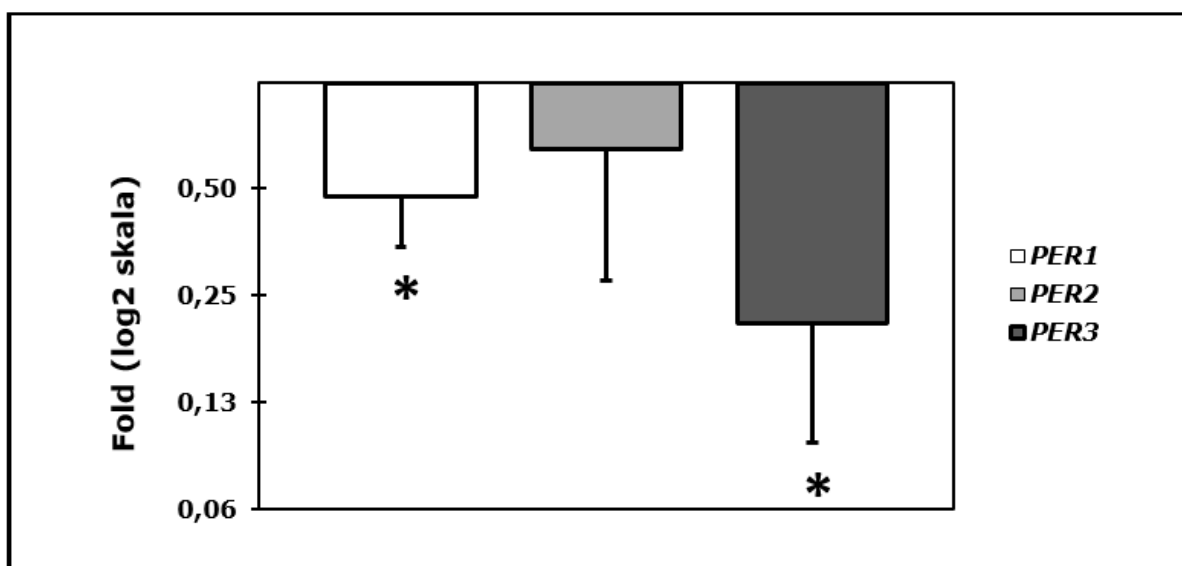
4. REZULTATI

4.1. Promijenjena ekspresija cirkadijalnih *PER* gena u pacijenata s planocelularnim karcinomom larinksa

U ovom istraživanju koristili smo metodu lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (Real Time PCR ili RT-PCR) za analizu genske ekspresije cirkadijalnih *PER* gena u tumorima i pripadajućim, tumorom-nezahvaćenim tkivima pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma larinksa. Odabrana metoda analize je izuzetno osjetljiva i reproducibilna zbog čega se često koristi za procjenjivanje ekspresije gena. Za određivanje genske ekspresije kvantificirala se mRNA, a kvantifikacija je izvršena RT PCR-om u dva koraka. Spomenuta RT PCR metoda podrazumijeva: *PCR za reverznu transkripciju* gdje se sintetizira cDNA i *PCR u Realnom Vremenu* u kojem se umnaža cDNA te se prikupljaju podaci o genskom izražaju. Detekciju i kvantifikaciju proučavanih gena smo proveli mjerenjem fluorescentnog signala specifično pre-dizajniranih TaqMan proba. Do fluorescencije dolazi nakon hibridizacije te hidrolize probe na ciljnom mjestu nukleinske kiseline, stoga razina fluorescencije predstavlja razinu umnoženih gena. Rezultati se detektiraju pomoću granične vrijednosti (threshold vrijednosti-Ct vrijednost, iz engl. *threshold cycle*) koja označava dovoljnu razinu fluorescencije nužnu za detekciju svakog uzorak te se uvijek postavlja u eksponencijalnoj fazi amplifikacije PCR produkta. Kada se umnoži dovoljno DNA detektira se fluorescentni signal, a Ct je ciklus umnažanje u kojem se ta detekcija dogodila. Što je Ct vrijednost veća to je početna količina kopija ciljnog gena u uzorku manja.

S ciljem određivanja razlike u ekspresiji cirkadijalnih *PER1*, *PER2* i *PER3* gena u analiziranim tkivima, proveli smo relativnu kvantifikaciju ekspresije gena iz uzoraka ukupno 6 pacijenata. Ekspresiju proučavanih *PER* gena smo normalizirali referentnim 'tzv. housekeeping' genima *GAPDH* i *18S* (endogena kontrola) te smo izračunali relativnu promjenu ekspresije

(engl. fold change) iz dobivenih Ct vrijednosti amplifikacije gena tumorskog i tumorom-nezahvaćenog pripadajućeg tkiva. Endogena kontrola odnosno 'housekeeping' geni podrazumijevaju gene koji imaju konstitutivnu tj. kontinuiranu ekspresiju. Kao prikaz relativne genske ekspresije *PER* gena odabrali smo fold promjenu koja prikazuje koliko je puta ekspresija određenog gena veća ili manja u uzorku u odnosu na kontrolu. Dobiveni rezultati upućuju na sniženu ekspresiju gena *PER1* i *PER3* u tumorskom tkivu u odnosu na pripadajuće, tumorom-nezahvaćeno tkivo (Slika 1). Od dva navedena *PER* gena, *PER3* ima nižu gensku ekspresiju. Promjena u ekspresiji oba gena je statistički značajna ($p < 0.05$), a iznosi svih fold promjena i odgovarajućih statističkih izračuna za sve *PER* gene su navedeni u Tablici 3. Rezultati genske ekspresije u pacijenata dobiveni su REST programom, a pri analizi podataka smo uzimali u obzir samo tkiva pacijenata sa definiranom TNM klasifikacijom.



Slika 5 Ekspresija *PER* gena u pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma larinksa određena metodom RT-PCR. Prikazana je relativna mRNA ekspresija 3 cirkadijalna gena: *PER1*, *PER2* i *PER3*. Relativna ekspresija (engl. fold change) kod svih pacijenata je izračunata uz pomoć REST programa. Razina mRNA

ekspresije nezahvaćenog tkiva je postavljena na 1, dok je razina mRNA ekspresije tumorskog tkiva postavljena kao izračunata promjena (fold change). Statistička značajnost iznosi $*p < 0.05$. Rezultati na grafu su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška na log2 skali.

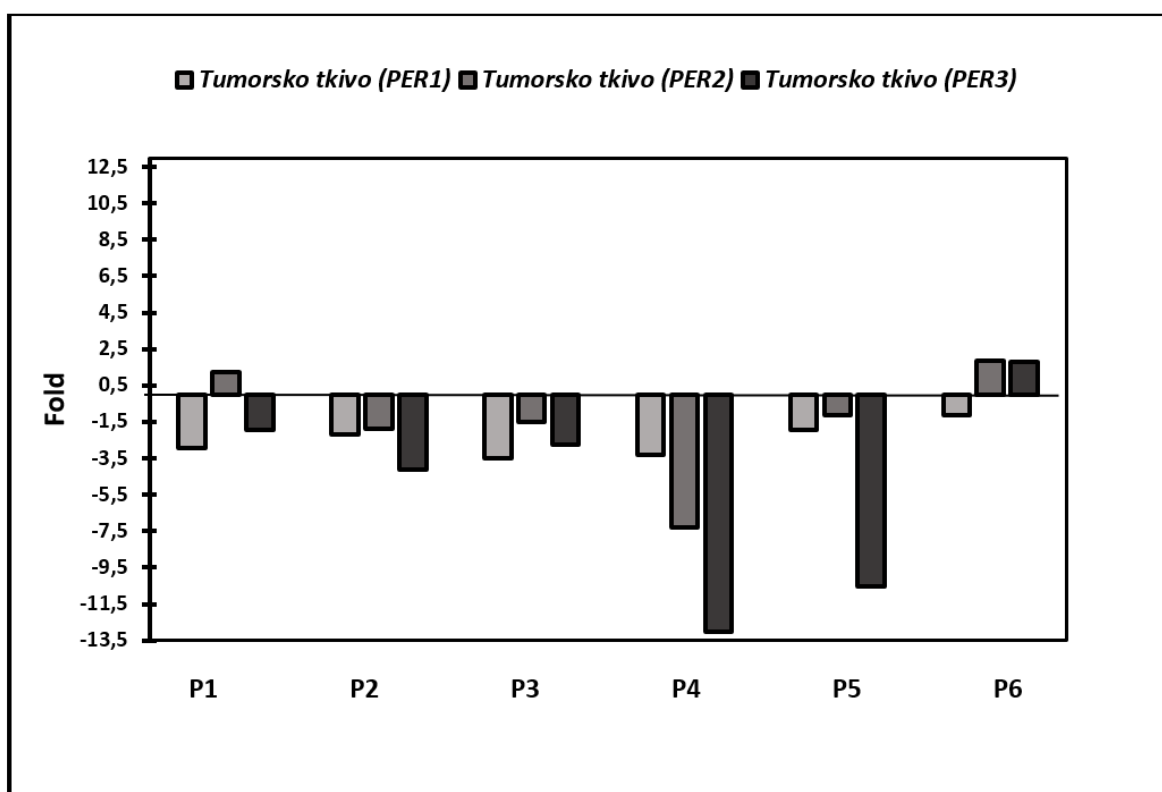
Tablica 2 Relativna ekspresija cirkadijalnih PER gena pacijenata određena uz pomoć RT-PCR. Podaci su dobiveni REST programom. Navedeni rezultati su srednja aritmetička vrijednost $\pm$ standardna pogreška dok se p vrijednosti ispod 0.05 smatra statistički relevantnim.

Gen	Relativna ekspresija	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti (CI)	P	Rezultat ekspresije
PER1	0,47900	0,346-0,692	0,272-0,826	0,027	<u>Snižena</u>
PER2	0,65000	0,279-1,985	0,150-3,275	0,397	Snižena
PER3	0,21000	0,097-0,437	0,065-0,901	0,01	<u>Snižena</u>

4.2. Analiza ekspresije PER gena za pojedinačne pacijente

Za uspoređivanje ekspresije PER gena između svakog pacijenta napravili smo relativnu kvantifikaciju podataka dobivenu uz pomoć RT-PCR. Relativna ekspresija PER1, PER2 i PER3 gena za tumorska i pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva smo odredili metodom izračuna Ct ($\Delta\Delta C_T$), a rezultate smo prikazali kao fold promjene (Slika 2). Uočena je, uglavnom,

snižena ekspresija svih *PER* gena s izuzetkom povišene ekspresije *PER2* gena u pacijentu 1 i *PER2* te *PER3* u pacijentu 6. Ipak, obzirom da se radi o prikazu po pacijentu navedena povišena ekspresija nije značajna. Najveći broj pacijenata ima sniženu ekspresiju *PER3* gena, a u pacijentu 4 i 5 ekspresija *PER3* gena je najniža. S druge strane *PER2* gen ima najmanje sniženu ekspresiju kod svih pacijenata.



Slika 6 Prikaz pojedinačnih razina relativne ekspresije *PER* gena tumorskog i tumorom nezahvaćenog pripadajućeg tkiva za 6 pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma (P1 – P6). Ordinata prikazuje relativnu ekspresiju predstavljenu kao relativnu promjenu (engl. fold change). Cirkadijalni geni su normalizirani housekeeping genima *GAPDH* i *18S* čime se dobila ΔCT vrijednost za svaki uzorak ($\Delta CT = CT \text{ PER gena} - CT \text{ housekeeping gena}$). Potom se normalizirana genska ekspresija (ΔCT) bolesnog tkiva oduzela od normaliziranog nezahvaćenog tkiva (ΔCT) kako bi se izračunala $\Delta\Delta CT$ vrijednost. Iz $\Delta\Delta CT$ se $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodom dobila razina relativne ekspresije (fold change). Razina ekspresije gena nezahvaćenog tkiva je postavljena na 0.

5. DISKUSIJA

Cirkadijalni sustav kontrolira mnoge različite biološke procese u živim organizmima koristeći transkripcijsko-translacijsku povratnu spregu vlastitih gena. Kao najočitije djelovanje cirkadijalnog sustava se često opisuje dnevno-noćni ciklus spavanja i budnosti. Ipak, i niz drugih fizioloških procesa su pod njegovim utjecajem, uključujući hormonalne oscilacije, uzimanje hrane, temperatura, metabolizam lijekova i kontrola staničnog ciklusa²³. Zato i ne začuđuje činjenica kako neispravno funkcioniranje ovakvog sveobuhvatnog sustava vodi do razvoja mnogih bolesti. Razna istraživanja povezuju deregulaciju cirkadijalnih gena sa tumorima poput leukemije, karcinoma dojke, pluća, endometrija, bubrega, kože, želuca, jetre te oralnih karcinoma i karcinoma glave i vrata^{1,25,26,29}. Međutim, malo je poznatih informacija o povezanosti planocelularnog karcinoma grkljana, vrsti karcinoma glave i vrata, sa deregulacijom cirkadijalnih gena poput *PER1*, *PER2* i *PER3*. U našoj studiji smo stoga proučavali razliku genske ekspresije navedenih gena u pacijenata oboljelih od LSCC-a. Analizirajući genetski ekspresijski profil tumorskog tkiva i tumorom nezahvaćenog pridruženog tkiva istih pacijenata dobili smo rezultate koji pokazuju sniženu relativnu ekspresiju svih *PER* gena u tumorskom tkivu usporedno sa pripadajućim, tumorom-nezahvaćenim tkivom (Slika 1). *PER1* i *PER3* imaju statistički značajno smanjenu ekspresiju u tumorskom tkivu, dok *PER2* nema. Mogući razlog statistički neznačajnosti snižene ekspresije *PER2* je mali broj analiziranih uzoraka sa definiranom TNM klasifikacijom (n=4).

Od analiziranih pacijenata, najviše njih ima sniženu ekspresiju *PER3* gena, gdje do izražaja dolazi pacijent 4 sa najnižim izražajem *PER3* gena. Isti pacijent ima uznapredovali oblik planocelularnog karcinoma u kojem su tumorske stanice zahvatile nekoliko limfnih čvorova. Također, uz pacijenta 4, pacijent 2 ima uznapredovali oblik karcinoma larinksa koji je manje invazivan te pokazuje sniženu ekspresiju *PER3* gena, međutim u manjoj

mjeri. S druge strane, pacijenti 1,3,6 s neuznapredovalim stadijem karcinoma imaju manju promjenu smanjene ekspresije *PER3* ili čak povišenu ekspresiju istog gena (Tablica 2). Navedeno upućuje na povezanost smanjene ekspresije *PER3* s uznapredovalim stadijem karcinoma te potencijalnu tumor supresorsku ulogu. S druge strane *PER1* pokazuje smanjenu relativnu ekspresiju u svih 6 pacijenata različitih stadija bolesti što ukazuje na njegov smanjeni utjecaj na razvojni stadij LSCC. Nadalje, od svih *PER* gena, *PER2* ima najmanje sniženu relativnu ekspresiju u svih 6 pacijenata, čak se u pacijenata 1 i 6 pokazuje njegova povišena relativna ekspresija implicirajući njegovu moguću ulogu onkogeno suprotno ulozi gena *PER3* (Slika 6). Valja, međutim, naglasiti kako obzirom na mali broj uzoraka navedena zapažanja s rezultatima prikazanim u Slici 2 nemaju statističku značajnost. Neovisno o ovim rezultatima, ranija istraživanja pokazuju povezanost smanjene ekspresije *PER* gena sa HNSCC i drugim oralnim karcinomima^{1,17,25,26,36}. Smanjena ekspresija *PER3* se povezuje sa uznapredovalim stadijem HNSCC te sa većom masom i dubljom invazijom tumora. Također kod iste bolesti smanjena ekspresija *PER1* i *PER3* korelira sa smanjenom stopom preživljavanja oboljelih¹. Daljnja istraživanja na oralnom planocelularnom karcinomu (OSCC) pokazuju sniženu ekspresiju *PER1* mRNA i proteina u humanom tumorskom tkivu naspram tumoru pridruženom tkivu. Također ekspresija *PER1* proteina je niža u pacijenata s uznapredovalim karcinomom²⁵. Stoga, moglo bi se potencijalno povezati snižena ekspresija *PER* gena sa uznapredovalim stadijem planocelularnog karcinoma larinksa, naravno uz napomenu za potrebom daljnjih istraživanja sa većim brojem uzoraka.

Maligni potencijal stanice se može mjeriti preko čimbenika poput staničnog rasta, proliferacije, apoptoze, invazije, metastaze i angiogeneze¹⁷. Određivanje genetskog izražaja satnih *PER1,2,3* gena u mnogim istraživanjima korelira sa izražajem raznih gena odgovornih upravo za malignu transformaciju stanica. Ekspresija *PER1* gena utječe

na povišenu razinu proliferaciju i staničnog rasta te na smanjenu razinu apoptoze OSCC stanica^{17,25,26}. Također, istraživanja pokazuju povećanu razinu migracije i invazije tumorskih stanica te povećanje veličine i volumena tumora pri smanjenoj ekspresiji *PER1* mRNA^{1,17}. U OSCC stanica *PER1* pokazuje ritmičku ekspresiju sa *VEGF*, *C-MYC* te *P53* genima bitnima u procesima maligne transformacije¹⁹. Drugo istraživanje ukazuje kako pri njenoj smanjenoj ekspresiji geni zaslužni za proliferaciju, anti-apoptotičko djelovanje, invaziju i metastaziranje (*KI-67*, *MDM2*, *BCL-2*, *MMP2*, *MMP9*) pokazuju povišenu ekspresiju, dok geni zaslužni za apoptozu, DNA popravljjanje, inhibiciju migracije stanica (*p53*, *Bax*, *TIMP-2*) pokazuju sniženu ekspresiju kod OSCC stanica hrčka¹⁷. Nadalje, smanjena ekspresija *PER2* u stanica OSCC upućuje, također, na povišenu razinu stanične proliferacije, tumorske invazije i migracije te na smanjenu razinu apoptotičke aktivnosti^{29,34,35}. Studija korelira promijenjeni izražaj gena odgovornih za metastazu, invaziju i angiogenezu sa smanjenom ekspresijom *PER2* također u humanih OSCC stanica. Pri sniženoj ekspresiji *PER2*, javlja se povišena ekspresija *KI-67*, *MDM2*, *C-myc*, *Bcl-2*, *MMP2*, *VEGF* te snižena ekspresija *p53*, *Bax*, *TIMP-2*³⁶. Valja komentirati kako navedeni geni imaju fluktuacije izražaja kroz 24 satni period karakteristične za cirkadijalni ritam, no ipak nije potvrđeno kako su oni pod direktnom kontrolom *PER* gena. Neovisno, promjena ekspresije *PER1* i *PER2* gena korelira s promjenom u ekspresiji gena koji reguliraju procese odgovorne za formiranje i progresiju tumora. U istraživanju humanog karcinoma desni pokazano je kako *PER3* ima nižu ekspresiju u tumorskom tkivu, nego u tumoru pridruženom tkivu za razliku od *PER1* koji ima povišenu ekspresiju. Također, istraživači ukazuju na antiapoptotičko djelovanje *PER1* i na proapoptotičko djelovanje *PER3* gena te ideju o balansiranju izražaja *PER1* i *PER3* gena za regulaciju apoptoze³⁷. Ipak naša studija pokazuje sniženi genetski izražaj oba, *PER1* i *PER3* gena. Iste rezultate pokazuje i studija Hsu i suradnika¹. Mogući razlog neslaganja naših rezultata sa rezultatima prethodno navedenog istraživanja karcinoma desni je malen broj uzoraka korištenih u našem istraživanju te

drugačija lokalizacija tumora analiziranih tkiva (tkivo larinksa usporedno s tkivom desni).

Razna istraživanja povezuju poremećaje u *PER* genima i sa poremećenim staničnim ciklusom, ciklusom koji procjenjuje ako stanica ulazi u apoptozu ili prolifera. Upravo je poremećaj u biološkim aspektima proliferacije, apoptoze i staničnog rasta jedan od glavnih odrednica karcinogeneze²⁶. Na molekularnoj razini, mehanizam staničnog ciklusa i cirkadijalnog sata su slični u principu djelovanja jer uključuju povratnu spregu gena i proteina koji pokazuju periodičnu aktivaciju i represiju³⁸. Stanični ciklus se sastoji od 4 faze (G1-S-G2-M) strogo kontrolirane regulatornom mrežom ciklin-CDK (Cyclin dependent kinases)-CKI (CDK inhibitors). *PER* geni su zaslužni za regulaciju mnogih važnih ciklina odgovornih za regulaciju i progresiju kroz stanični ciklus. Istraživanje na humanim tumorskim stanicama OSCC sa sniženom razinom *PER1* i *PER2* gena pokazuje povišenu razinu molekula koje potiču tranziciju kroz stanični ciklus (*ciklin D1*, *ciklin E*, *cikin B1*) te sniženu razinu molekula koje potiču apoptozu ili popravak DNA i molekula koje usporavaju ili inhibiraju prolazak kroz faze staničnog ciklusa (*p53*, *p16*, *p21*). Prema istraživanjima, u tumorskim stanicama je poremećen balans apoptoze i proliferacije, za koje su zaslužne mnoge molekule pod kontrolom *PER1* i *PER2* gena^{27,29}. Za oba gena se smatra da imaju tumor-supresorsku ulogu. Deregulacija ekspresije *PER3* gena se također povezuje sa poremećenim staničnim ciklusom. Naime, njegova snižena ekspresija u humanih stanica snižava ekspresiju molekule *CHK2* (engl. Checkpoint kinase 2), kontrolne točke staničnog ciklusa. *CHK2* je tumor supresor koji se aktivira samo pri oštećenju DNA, stoga je zanimljivo kako se pri povišenoj ekspresiji *PER3* povećava i razina *CHK2* neovisno o oštećenju DNA. Ovakvi rezultati upućuju na bitnu ulogu *PER3* gena u bitnim kontrolnim točkama staničnog ciklusa³⁹.

Mnoge studije pokazuju povezanost nastajanja i razvoja raznih tumora sa poremećenom ekspresijom *PER1,2,3* gena. Naša studija je pokazala kako

postoji razlika u ekspresiji cirkadijalnih satnih gena *PER1*, *PER2* i *PER3* između tumorskog i tumorom-nezahvaćenog tkiva pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma larinksa. Ekspresija sva tri gena je snižena u oboljelom tkivu pacijenata, osobito ekspresija *PER3*. Zbog malog broja uzoraka daljnja analiza povezanosti smanjene ekspresije *PER* gena sa stadijem tumora nije bila moguća te bi analiza većeg broja uzoraka mogla rasvijetliti korelaciju ekspresije *PER* gena s veličinom tumora, smanjenom apoptozom, povećanom proliferacijom, angiogenezom te migracijom i invazijom tumorskih stanica.

6. ZAKLJUČAK

Protokol RT-PCR pokazao se dobrim za analizu ekspresije cirkadijalnih gena u tumorskim i tumorom nezahvaćenih pripadajućih tkiva oboljelih od LSCC.

Rezultati istraživanja pokazuju promijenjenu ekspresiju cirkadijalnih *PER* gena u pacijenata s planocelularnim karcinomom larinksa. Ekspresija gena *PER1* i *PER3* je statistički značajno snižena u tumorskom tkivu pacijenata s LSCC u usporedbi s tumorom nezahvaćenim, pridruženim tkivom istih pacijenata. *PER3* ima najsniženiju ekspresiju u tumorskom tkivu pacijenata s LSCC u usporedbi s tumorom nezahvaćenim, pridruženim tkivom istih pacijenata. Pri međusobnom uspoređivanju ekspresije svih *PER* gena za pojedinačne pacijente, pacijenti sa uznapredovalim oblikom planocelularnog karcinoma imaju vrlo smanjenu *PER3* ekspresiju dok pacijenti sa TNM neklasificiranim tumorom imaju povišenu relativnu ekspresiju *PER3* gena. Ovakvo zapažanje korelira uznapredovali stadijem LSCC-a sa smanjenom razinom *PER3* gena. Dobiveni rezultati pokazuju kako je poremećeni *PER* sustav cirkadijalnog ritma povezan sa LSCC.

Zahvala:

Zahvaljujem na pristupu opremi koju posjeduje Sveučilište u Rijeci, a koja je dobivena u sklopu projekta "Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci" sufinanciranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (ERDF).

7. LITERATURA

- 1 Hsu C-M, Lin S-F, Lu C-T, Lin P-M, Yang M-Y. Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biology* 2012; **33**: 149–155.
- 2 Conway DI, Hashibe M, Boffetta P, Wunsch-Filho V, Muscat J, Vecchia CL *et al.* Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE – The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncology* 2009; **45**: 743–746.
- 3 Boeker M, França F, Bronsert P, Schulz S. TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours. *J Biomed Semantics* 2016; **7**. doi:10.1186/s13326-016-0106-9.
- 4 Laryngeal Cancer - Cancer Stat Facts. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/laryn.html> (accessed 4 Sep2018).
- 5 PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Oral Cavity, Pharyngeal, and Laryngeal Cancer Prevention (PDQ®): Health Professional Version. In: *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US): Bethesda (MD), 2002<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65979/> (accessed 21 Jul2018).
- 6 Chen J, Long S. Tea and Coffee Consumption and Risk of Laryngeal Cancer: A Systematic Review Meta-Analysis. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0112006.
- 7 Wang J, Gao J, Li Y, Zhao X, Gao W, Peng L *et al.* Functional polymorphisms in FAS and FASL contribute to risk of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx in a Chinese population. *Gene* 2013; **524**: 193–196.
- 8 Jahnke V, Matthias C, Fryer A, Strange R. Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *Am J Surg* 1996; **172**: 671–673.
- 9 Olejniczak I, Fendler W, Borowiec M, Młynarski W, Pietruszewska W. [Polymorphism of metalloproteinases MMP-1 and MMP-2 in risk of laryngeal cancer]. *Otolaryngol Pol* 2012; **66**: 30–35.
- 10 Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003; **442**: 1–7.

- 11 TNM Stages | Laryngeal Cancer | Cancer Research UK.
<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/laryngeal-cancer/stages-types-grades/stages/TNM-staging> (accessed 11 Sep2018).
- 12 Dunlap JC. Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* 1999; **96**: 271–290.
- 13 Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL *et al.* Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 544–556.
- 14 Albrecht U. Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. *Neuron* 2012; **74**: 246–260.
- 15 Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology* 2010; **72**: 517–549.
- 16 Elmore SK, Betrus PA, Burr R. Light, social zeitgebers, and the sleep-wake cycle in the entrainment of human circadian rhythms. *Res Nurs Health* 1994; **17**: 471–478.
- 17 Li H-X, Fu X-J, Yang K, Chen D, Tang H, Zhao Q. The clock gene PER1 suppresses expression of tumor-related genes in human oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; **7**: 20574.
- 18 Huang N, Chelliah Y, Shan Y, Taylor CA, Yoo S-H, Partch C *et al.* Crystal Structure of the Heterodimeric CLOCK:BMAL1 Transcriptional Activator Complex. *Science* 2012; **337**: 189–194.
- 19 Yang K, Ye H, Tan X-M, Fu X-J, Li H-X. Daily rhythm variations of the clock gene PER1 and cancer-related genes during various stages of carcinogenesis in a golden hamster model of buccal mucosa carcinoma. *Oncotargets and Therapy* 2015; : 1419.
- 20 Rana S, Munawar M, Shahid A, Malik M, Ullah H, Fatima W *et al.* Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Biol Rep* 2014; **41**: 95–103.
- 21 Markova-Car EP, Jurišić D, Ilić N, Kraljević Pavelić S. Running for time: circadian rhythms and melanoma. *Tumour Biol* 2014; **35**: 8359–8368.
- 22 Konopka RJ, Benzer S. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; **68**: 2112–2116.

- 23 Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics* 2008; **9**: 764–775.
- 24 PER1 period circadian regulator 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5187> (accessed 10 Jul2018).
- 25 Kai Yang K, Chen, Zhao N, Zhao, Chen D, Zhao *et al.* Abnormal expression of PER1 circadian-clock gene in oral squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy* 2012; : 403.
- 26 Zhao Q, Zheng G, Yang K, Ao Y, Su X, Li Y *et al.* The clock gene PER1 plays an important role in regulating the clock gene network in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget* 2016; **7**: 70290.
- 27 Yang K, Fu X-J, Li H-X, Chen D, Tang H. The important tumor suppressor role of PER1 in regulating the cyclin–CDK–CKI network in SCC15 human oral squamous cell carcinoma cells. *OncoTargets and Therapy* 2016; : 2237.
- 28 PER2 period circadian regulator 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8864> (accessed 10 Jul2018).
- 29 Wang Q, Ao Y, Yang K, Tang H, Chen D. Circadian clock gene Per2 plays an important role in cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 2016; **35**: 3387–3394.
- 30 PER3 period circadian regulator 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?linkname=protein_gene&from_uid=8567388 (accessed 10 Jul2018).
- 31 Liu B, Xu K, Jiang Y, Li X. Aberrant expression of Per1, Per2 and Per3 and their prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; **7**: 7863–7871.
- 32 Cadenas C, van de Sandt L, Edlund K, Lohr M, Hellwig B, Marchan R *et al.* Loss of circadian clock gene expression is associated with tumor progression in breast cancer. *Cell Cycle* 2014; **13**: 3282–3291.
- 33 Hong Z, Feng Z, Sai Z, Tao S. PER3, a novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer in vitro. *BMB Rep* 2014; **47**: 500–505.

- 34 Ao Y, Zhao Q, Yang K, Zheng G, Lv X, Su X. A role for the clock period circadian regulator 2 gene in regulating the clock gene network in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncology Letters* 2018. doi:10.3892/ol.2018.7825.
- 35 Su X, Chen D, Yang K, Zhao Q, Zhao D, Lv X *et al.* The circadian clock gene PER2 plays an important role in tumor suppression through regulating tumor-associated genes in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 2017; **38**: 472–480.
- 36 Su *et al.* - 2017 - The circadian clock gene PER2 plays an important role in tumor suppression through regulating tumor-associated genes in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 2017; **38**: 472–480.
- 37 Sato F, Wu Y, Bhawal UK, Liu Y, Imaizumi T, Morohashi S *et al.* PERIOD1 (PER1) has anti-apoptotic effects, and PER3 has pro-apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer CA9-22 cells. *European Journal of Cancer* 2011; **47**: 1747–1758.
- 38 Soták M, Sumová A, Pácha J. Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer. *Annals of Medicine* 2014; **46**: 221–232.
- 39 Im J-S, Jung B-H, Kim S-E, Lee K-H, Lee J-K. Per3, a circadian gene, is required for Chk2 activation in human cells. *FEBS Letters* 2010; **584**: 4731–4734.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Matea Mihelčić

📍 Andrije Mohorovičića 22, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

☎ 0915356838

✉ matea94mihelcic@gmail.com

Datum rođenja 25/12/1994 | Državljanstvo hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- 2016–2018 **Magistar biotehnologije u medicini**
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju i istraživanje lijekova
Ul. Radmile Matejčić, 51 000 Rijeka (Hrvatska)
- 2013–2016 **Prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova**
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)
- 2009–2013 **Srednjoškolsko obrazovanje**
Prva hrvatska riječka gimnazija (PRHG)
Ul. Frana Kurelca 1, 51 000 Rijeka (Hrvatska)
-jezični smjer

RADNO ISKUSTVO

- 01/2018 **Rad u laboratoriju sistemske medicine**
- Izrada diplomskog rada kod mentorice dr.sc. Elitza Markova-Car, Rijeka (Hrvatska)
-Naziv diplomskog rada: Analiza ekspresije cirkadijalnih *PERIOD* gena planocelularnog karcinoma larinksa
- Baratanje automatskom mikropipetom, izolacija genskog materijala, korištenje MagnaLyser instrumenta, centrifuge, PCR instrumenata (Real Time PCR i PCR za reverznu transkripciju), BioDrop instrumenta za spektrometriju
-Rad u Applied bioscience programu za analizu genske ekspresije te u REST programu
- 2016–2016 **Demonstrator organske kemije**
dr. sc. Nela Malatesti, Rijeka (Hrvatska)
- Pomaganje studentima kod vježba pročišćavanja krutine ekstrakcijom i prekristalizacijom, kromatografije, izolacije različitih proteina i šećera iz

mlijeka, sinteza različitih spojeva (tert-butil-klorida, p-nitrozofenola, acetilsalicilne kiseline, benzojeve kiseline i benzil alkohola, dibenzilidenacetona)

2016–2016 Stručna praksa

Jadran galenski laboratorij JGL d.d.
Pulac 4A, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

Djelatnost ili sektor Prerađivačka industrija

2016–2017 Prodavačica cipela

CCC. d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

- Prodavanje cipela
- Komuniciranje s kupcima
- Održavanje i čišćenje dućana

20/03/2018–30/03/2018 Rad u skladištu

Hamax d.o.o
Emilija Randića 20, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

- Organiziranje prodajnih artikla

Djelatnost ili sektor Prijevoz I Skladištenje

03/2018–03/2018 Profesorica joge

Carolina 3, 2, 1
Nehajska ul. 8, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

- Volontiranje

Djelatnost ili sektor Umjetnost, Zabava i Rekreacija

01/05/2018–01/05/2018 Sudac na biciklističkom poligonu

Autoklub Rijeka, Rijeka (Hrvatska)

Djelatnost ili sektor Ostale Uslužne Djelatnosti

2011–2013 Sudjelovanje u gradskom vijeću

Korzo 16, Rijeka (Hrvatska)

- Diskusija aktualnih socijalnih problema u Rijeci

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
talijanski	A2	A2	A2	A2	A2

Komunikacijske vještine

- Spremna na timski rad i vrlo kooperativna osoba
- Mogućnost prilagodbe novim situacijama
- Dobre komunikacijske vještine

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

- Rukovoditeljske vještine dobivene zahvaljujući demonstraturi organske kemije
- Organizacijske vještine stvorene radom u laboratoriju

Poslovne vještine

- Rad sa tkivima i osjetljivim RNA materijalima
- Rad na PCR instrumentima
- Rad sa kitovima za izolaciju genetskih materijala
- Sakupljanje korisnih informacija čitajući relevantne istraživačke radove

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik	Temeljni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

- Dobro znanje MS Office-a
- Solidno poznavanje alata Word Press-a za razvoj web stranica
- Dobro znanje bioinformatičkih programa (Marvin, Avogadro, PyMol, NAMD, Cresset, UCF-Chimera, VMD, APBS)

Vozačka dozvola B