

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

**STRUKTURNA I FUNKCIONALNA ANALIZA 5' REGULATORNOG
REGIONA GENA SMAD4 U KARCINOMU PANKREASA ČOVEKA**

- DOKTORSKI RAD -

Aleksandra Nikolić

Beograd, 2010

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТСЛАВ МАРКОВИЋ" БЕОГРАД
И. Бр. 161 001

FF005

УНИВЕРЗИТЕТ БЕОГРАД
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

РЕПУБЛИКА СРБИЈА
УНИВЕРЗИТЕТ БЕОГРАД
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ



Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, gde sam došla i ostala zahvaljujući profesorki Ani Savić, kojoj i ovom prilikom želim da se od srca zahvalim za presudan pozitivan uticaj koji je imala na moju karijeru.

Mentor ovog rada je bila Dragica Radojković, kojoj zahvaljujem što mi je omogućila potpunu slobodu i samostalnost u izradi ove doktorske teze.

Snežani Kojić zahvaljujem na idejama kojima je doprinela konceptu ovog rada, materijalu i metodologiji koje mi je stavila na raspolaganje i dragocenom vremenu koje mi je posvetila.

Komentoru Svetlani Radović veliko hvala na svemu što je prošla, uradila i istrpela da bi postala i ostala član svih mojih komisija.

Večnu zahvalnost dugujem Jeleni Kušić, mojoj prvoj i jedinoj mentorki, kakva je nekada bila (a bila je meda, krokodil, duh i član šumske družine), na najlepšem i najpuštenijem uvodu u eksperimentalni rad koji diplomac može da poželi.

Posebnu zahvalnost dugujem mojim diplomcima, koji su svojom kreativnošću, originalnošću i lucidnošću od mog mentorskog rada napravili najlepši i najdragoceniji deo moje karijere:

☺ Aleksandri Divac, mom prvom diplomcu, za svu prijateljsku, eksperimentalnu i tehničku podršku tokom uzbudljivih deset godina koliko smo zajedno provele u laboratoriji

☺ Mariji Stanković, mom najmlađem diplomcu, za sve inspirativne razgovore o filozofiji života koje smo obavile u njenim kolima, često na najčudnijim mogućim putevima ovoga sveta

☺ Jeleni Dinić, mom najnaprednijem diplomcu, na uvek dobrom raspoloženju i spremnosti na akciju, a posebno na tome što je ostala privrženi član laboratorije i kada je iz nje otišla

☺ Branku Tomiću, mom najdražem diplomcu, za lakoću koegzistencije i kooperacije u potpunosti lišenih suviše komunikacije

☺ Mili Ljujić, mom najuspešnijem diplomcu, za zadovoljstvo uživanja u ubedljivo najvećem količniku postignutog uspeha diplomca i uloženog truda mentora

☺ Ivanu Niševiću, mom najzahtevnijem diplomcu, za najluđu radnu svesku koju je laboratorijski svet ikada video i kojom ću se bavljati do penzije, a verovatno i posle toga

☺ Aleksandri Vančevskoj, mom budućem diplomcu, za primerenu i primernu odanost, pripadnost i posvećenost laboratoriji čiji će član tek postati

Ljiljani Rakićević hvala za ogromnu količinu podrške koju mi pruža, u čemu vrlo često ostaje usamljena, a što moju zahvalnost čini još većom.

Valentini Đorđević hvala za sve male i velike stvari koje radi sa mnom, umesto, zbog i/ili za mene.

Ivi Pruner sam duboko zahvalna što je svojim dolaskom u laboratoriju obnovila i osvežila karakteristični duh našeg malog kolektiva u kome posebno uživam.

Aleksandri Nestorović hvala za osmehe i radost koje unosi u našu laboratoriju i večiti optimizam koji je prati.

Od kolega u Institutu specijalnu zahvalnost dugujem Aleksandru Krstiću, koji je za moju tezu dao mnoge korisne savete, brojne sugestije, eksperimentalnu pomoć, bakterije, humane ćelije, proteine, ili, kraće rečeno, sve od sebe.

Posebnu zahvalnost dugujem mom direktorskom tandemu, Branki Vasiljević i Gordani Nikčević, za beskrajan priliv ljubavi i podrške, koji neskromno očekujem i u godinama koje dolaze.

Od ostalih kolega u Institutu posebnu zahvalnost zaslužuju oni sa kojima sam imala čast i zadovoljstvo da saučestvujem i sarađujem u raznim neobičnim, zanimljivim i često ne baš sasvim naučnim poduhvatima: Miloje Savić, čije je duhovno prisustvo u Institutu sasvim neokrnjeno udaljenošću na kojoj se nalazi, moja 3 praseta za osmeh, osmeh, osmeh, Branka Zukić, najdraži od svih pacijenata, i moja Mileva, jedna u milion.

Članovima biljkaške laboratorije hvala za razdragane godine koje smo proveli zajedno, a posebno njihovoj šefici Vesni Maksimović na pažljivom praćenju i podršci od prvog dana u laboratoriji.

Beskrajnu zahvalnost za uzorke i podatke bez kojih ove teze ne bi bilo dugujem kolegi Momčilu Ristanoviću, koji se bavio njihovim sakupljanjem po Kliničkom centru, disciplinom koja zaslužuje status ekstremnog sporta.

Snežani Lukić hvala na uspešnoj dugogodišnjoj poslovnoj saradnji, koja je odavno prerasla u iskreno prijateljstvo.

Nataši Petrović i Marini Anđelić-Jelić hvala što su me u ovih deset godina mazile, pazile i (sa)čuvala mi zdravlje.

Mojim dragim kolegicama i prijateljicama u rasejanju širom sveta, Jovani Banković, Jeleni Urošević i Ani Kostić, iskreno sam zahvalna za prijateljstvo, pomoć i podršku na koje sam uvek mogla da računam.

Mojoj porodici Brkljačić, Anji, Bojanu, Jelki i Luki, hvala što su zdušno bili uz mene, čak i kada su bili van zemlje i/ili van sebe.

Mojoj porodici Stanković, Snežani, Draganu i Dodi, hvala na bezrezervnoj ljubavi i podršci koje ništa ne može ugroziti.

Mojoj porodici Strojčić, Vanesi i Alisi, hvala za konačnu i neospornu potvrdu teorije da rodbina može i treba da bude izborna funkcija.

Najboljem prijatelju na svetu, Jeleni Arnautović (AKA Oskaru) hvala na naporu koji ulaže da bi to i ostala, jer i pokušaji se računaju.

Beskrajno hvala mojim roditeljima, Mališi i Miloradu, što su mi omogućili da budem baš ovakva kakva sam, na radost nekih, a na užas nekih drugih...

ABSTRACT

Pancreatic carcinoma is one of the most invasive and progressive human malignant neoplasms. This malignancy is characterized by activation of KRAS oncogene and inactivation of p16, p53 and SMAD4 tumor suppressor genes. Recent results show association between KRAS activation and SMAD4 inactivation in pancreatic carcinogenesis. The structure of the SMAD4 gene promoter has not been clearly defined and little is known about the transcription regulatory mechanisms of this gene. This study was aimed at analyzing genetic and epigenetic changes in the 5' regulatory region as potential mechanisms of SMAD4 gene inactivation in pancreatic carcinoma and their coexistence with KRAS codon 12 mutation in malignant tissues.

Structural analysis of SMAD4 gene promoter has shown that two mononucleotide repeat elements, -462T(15) and -4T(12), are polymorphic in pancreatic carcinoma and colorectal cancer tissues, while functional analysis indicated that -4T(12) element may be important for transcriptional regulation. The haplotype 14/10 was the most common haplotype in pancreatic carcinoma tissue, present in 88% of cases. Haplotypes 10/12 and 9/12 were detected in 4% of colorectal cancer tissues each. In majority of pancreatic carcinoma cases (98%) either KRAS codon 12 mutation or SMAD4 gene promoter haplotype 14/10 was present.

These findings suggest that haplotypes 14/10, 10/12 and 9/12 in the SMAD4 gene promoter represent genetic markers that might be associated with specific malignancy and potentially exploited for diagnostics and monitoring of disease, alone or in combination with KRAS codon 12 mutation testing.

ABSTRACT

Pancreatic carcinoma is one of the most invasive and progressive human malignant neoplasms. This malignancy is characterized by activation of KRAS oncogene and inactivation of p16, p53 and SMAD4 tumor suppressor genes. Recent results show association between KRAS activation and SMAD4 inactivation in pancreatic carcinogenesis. The structure of the SMAD4 gene promoter has not been clearly defined and little is known about the transcription regulatory mechanisms of this gene. This study was aimed at analyzing genetic and epigenetic changes in the 5' regulatory region as potential mechanisms of SMAD4 gene inactivation in pancreatic carcinoma and their coexistence with KRAS codon 12 mutation in malignant tissues.

Structural analysis of SMAD4 gene promoter has shown that two mononucleotide repeat elements, -462T(15) and -4T(12), are polymorphic in pancreatic carcinoma and colorectal cancer tissues, while functional analysis indicated that -4T(12) element may be important for transcriptional regulation. The haplotype 14/10 was the most common haplotype in pancreatic carcinoma tissue, present in 88% of cases. Haplotypes 10/12 and 9/12 were detected in 4% of colorectal cancer tissues each. In majority of pancreatic carcinoma cases (98%) either KRAS codon 12 mutation or SMAD4 gene promoter haplotype 14/10 was present.

These findings suggest that haplotypes 14/10, 10/12 and 9/12 in the SMAD4 gene promoter represent genetic markers that might be associated with specific malignancy and potentially exploited for diagnostics and monitoring of disease, alone or in combination with KRAS codon 12 mutation testing.

ABSTRAKT

Karcinom pankreasa spada u najinvazivnije i najprogresivnije humane maligne bolesti. Genetske promene karakteristične za ovu bolest su aktivacija onkogena KRAS i inaktivacija tumor supresor gena p16, p53 i SMAD4. Novija istraživanja ukazuju na povezanost aktivacije onkogena KRAS i inaktivacije tumor supresor gena SMAD4 u pankreasnoj karcinogenezi. Struktura promotora gena SMAD4 nedovoljno je proučena i malo se zna o mehanizmima regulacije transkripcije ovog gena. Ova studija je imala za cilj da istraži genetske i epigenetske promene u 5' regulatornom regionu gena SMAD4 kao potencijalne mehanizme njegove inaktivacije u karcinomu pankreasa, kao i njihovu udruženost sa prisustvom mutacije u kodonu 12 gena KRAS u malignom tkivu.

Strukturalna analiza promotora gena SMAD4 je pokazala da su dva mononukleotidna ponovka, -462T(15) and -4T(12), polimorfna u karcinomu pankreasa i kolorektalnom kanceru, dok je funkcionalna analiza pokazala da broj timina u elementu -4T(12) može biti od značaja za regulaciju transkripcije. Haplotip 14/10 je bio najčešći haplotip u tkivu karcinoma pankreasa, prisutan u 88% slučajeva. Haplotipovi 10/12 i 9/12 su otkriveni u po 4% slučajeva u tkivu kolorektalnog kancera. U najvećem broju tkiva karcinoma pankreasa (98%) bila je prisutna ili mutacija u kodonu 12 gena KRAS ili haplotip 14/10 u promotoru gena SMAD4.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da haplotipovi 14/10, 10/12 i 9/12 u promotoru gena SMAD4 predstavljaju genetičke markere koji mogu biti povezani sa specifičnom malignom bolešću, a njihova analiza potencijalno iskorišćena za dijagnostikovanje i praćenje bolesti, pojedinačno ili u kombinaciji sa analizom mutacije u kodonu 12 gena KRAS.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1. 1.	KARCINOM PANKREASA	1
1. 1. 1.	Pankreas	1
1. 1. 2.	Epidemiologija karcinoma pankreasa	3
1. 1. 3.	Biologija karcinoma pankreasa	4
1. 1. 4.	Molekularna genetika karcinoma pankreasa	6
1. 2.	SMAD4	10
1. 2. 1.	Gen SMAD4	10
1. 2. 2.	Struktura proteina SMAD4	10
1. 2. 3.	Funkcija proteina SMAD4	12
1. 2. 4.	Regulacija ekspresije gena SMAD4	15
1. 2. 5.	Fiziološka uloga proteina SMAD4	16
1. 2. 6.	Inaktivacija gena SMAD4 u patofiziološkim stanjima	17
1. 2. 7.	Mehanizmi inaktivacije gena SMAD4 u karcinomu pankreasa	18
1. 3.	CILJ RADA	20
2.	MATERIJAL I METODE	22
2. 1.	ISPITANICI	22
2. 2.	MATERIJAL	27
2. 2. 1.	Uzorci tkiva karcinoma pankreasa	27
2. 2. 2.	Uzorci periferne krvi	27
2. 2. 3.	Uzorci DNK	27
2. 2. 4.	Vektori	28
2. 2. 5.	Bakterijski sojevi	28
2. 2. 6.	Ćelijske linije	29
2. 2. 7.	Oligonukleotidi	29
2. 3.	METODE	30
2. 3. 1.	Deparafinizacija kalupa tkiva pankreasa	30

2. 3. 2.	Izolacija DNK iz tkiva pankreasa	30
2. 3. 3.	Izolacija DNK iz periferne krvi	31
2. 3. 4.	Elektroforeza DNK u gelu od agaroze	31
2. 3. 5.	Amplifikacija genoma	32
2. 3. 6.	Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)	32
2. 3. 7.	Digestija DNK restrikcionim enzimima	34
2. 3. 8.	Elektroforeza DNK u gelu od poliakrilamida	34
2. 3. 9.	Bojenje DNK u gelu od poliakrilamida srebro-nitratom	35
2. 3. 10.	Kapilarna elektroforeza DNK	35
2. 3. 11.	Prečišćavanje DNK fragmenata	36
2. 3. 12.	Sekvenciranje DNK	37
2. 3. 13.	Ligacija	38
2. 3. 14.	Kultivacija bakterija	39
2. 3. 15.	Priprema kompetentnih ćelija za transformaciju toplotnim šokom	39
2. 3. 16.	Transformacija bakterija toplotnim šokom	39
2. 3. 17.	Izolacija plazmidne DNK	40
2. 3. 18.	Prečišćavanje DNK fragmenata iz gela od agaroze	40
2. 3. 19.	Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi	41
2. 3. 20.	Kultivacija humanih ćelijskih linija	42
2. 3. 21.	Transfekcija humanih ćelijskih linija	42
2. 3. 22.	Priprema ćelijskih ekstrakata	43
2. 3. 23.	Luciferazni esej	43
2. 3. 24.	Izolacija jedarnih proteina	44
2. 3. 25.	Dezoksiribonukleazni esej	45
2. 3. 26.	Statistička analiza	45
3.	REZULTATI	46
3. 1.	Izolacija DNK iz tkiva pankreasa i periferne krvi	46
3. 2.	Analiza mutacije u kodonu 12 gena KRAS	47
3. 3.	Analiza gena SMAD4	49

3. 3. 1.	Analiza metilacije u nekodirajućem egzonu 1 gena SMAD4	50
3. 3. 2.	Analiza strukture promotora gena SMAD4	51
3. 3. 3.	Analiza polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u promotoru gena SMAD4	52
3. 3. 4.	Analiza haplotipova varijanti -462T(15) i -4T(12) u promotoru gena SMAD4	59
3. 3. 5.	Analiza aktivnosti varijanti promotora gena SMAD4	62
3. 3. 6.	Analiza vezivanja proteina za varijante promotora gena SMAD4	63
3. 4.	Korelacija karakteristika ispitanika i promena u genima SMAD4 i KRAS	65
3. 5.	Rezultati analize gena SMAD4 i KRAS u grupama ispitanika	68
4.	DISKUSIJA	72
4. 1.	Analiza DNK iz tumorskog tkiva pankreasa	73
4. 2.	Analiza mutacije u kodonu 12 gena KRAS u karcinomu pankreasa	75
4. 3.	Analiza metilacionog statusa promotora gena SMAD4	77
4. 4.	Strukturna i funkcionalna analiza promotora gena SMAD4	78
4. 5.	Funkcionalni značaj mononukleotidnih ponovaka u promotoru gena SMAD4	83
4. 6.	Mononukleotidni ponovci u promotoru gena SMAD4 kao potencijalni molekularni markeri u karcinomu pankreasa	88
5.	ZAKLJUČCI	93
6.	LITERATURA	95

1. UVOD

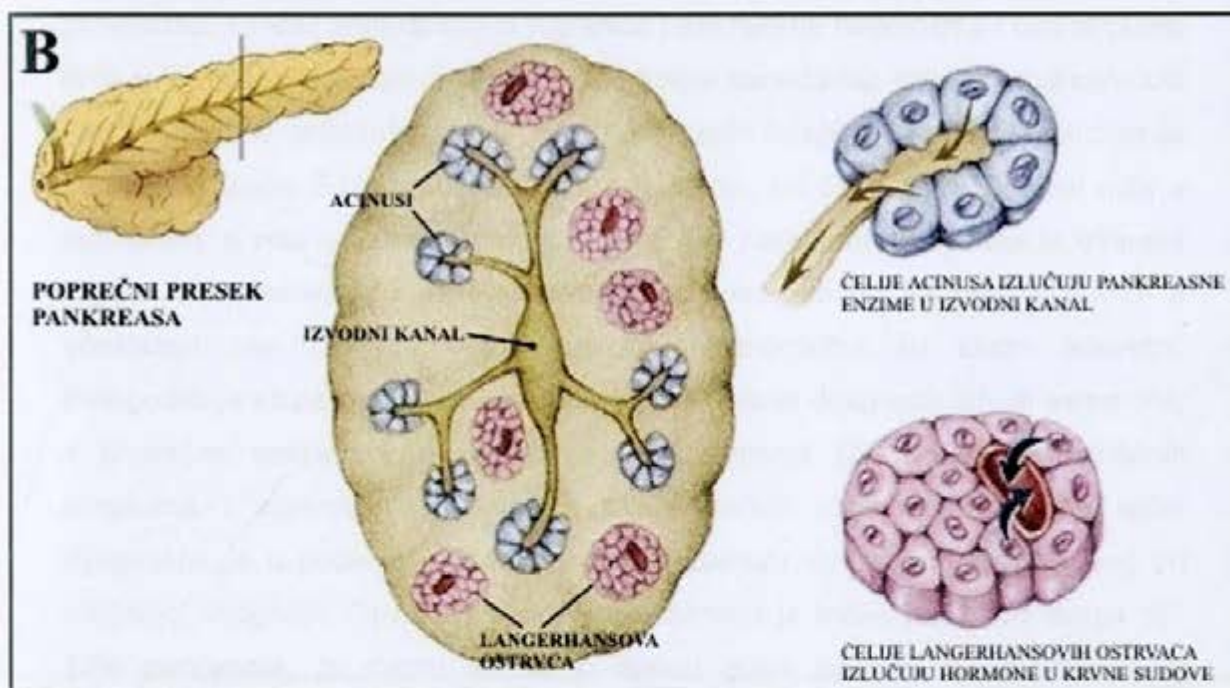
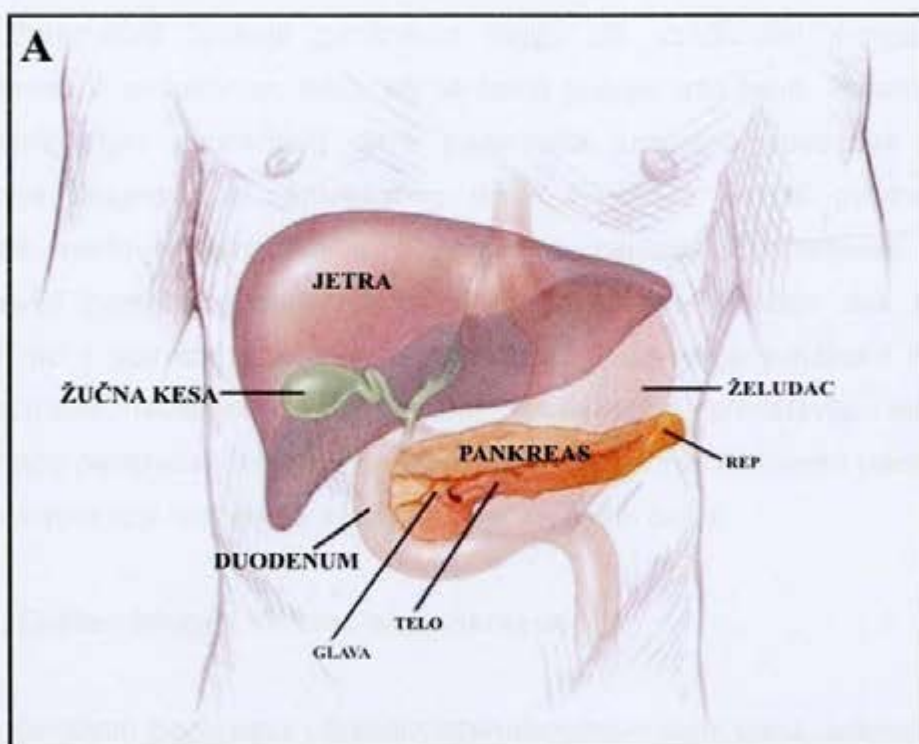
1. 1. Karcinom pankreasa

1. 1. 1. Pankreas

Pankreas je organ digestivnog sistema smešten u abdomenu posteriorno u odnosu na želudac i povezan je sa duodenumom (slika 1A). Morfološki se može podeliti u tri regiona: glavu, telo i rep. Prema funkciji koju vrši tkivo pankreasa se deli na egzokrini i endokrini pankreas (1).

Egzokrini pankreas ima ulogu u procesu varenja. Njega čine acinusi, grupacije ćelija čiji se izvodni kanalići spajaju u zajednički izvodni kanal, a koji se uliva u duodenum (slika 1B). Acinarne ćelije čine veći deo pankreasnog tkiva i proizvode zimogene, neaktivne forme pankreasnih enzima, koji se izlučuju u izvodne kanaliće. Epitelne ćelije kanalića alkalizuju enzimsku mešavinu dodavanjem mukusa, vode i bikarbonata i tako se formira pankreasni sok koji se izlučuje u duodenum. U intestinalnom sistemu enteropeptidaza prevodi zimogene u aktivne enzime odsecanjem aktivacionog peptida.

Endokrini pankreas vrši regulaciju metabolizma glukoze lučenjem hormona u krvotok. Endokrino tkivo pankreasa čine četiri specijalizovana tipa ćelija (a, b, d i PP) koje su organizovane u kompaktna Langerhansova ostrvca okružena acinarnim egzokrinim tkivom (slika 1B). Endokrine ćelije pankreasa se međusobno ne razlikuju morfološki, već su klasifikovane po tipu hormona koje luče: tip a - glukagon, tip b - insulin, tip d - somatostatin, tip PP - pankreasni polipeptid. Ćelije tipa a i b regulišu metabolizam glukoze, a ćelije tipa PP i d moduliraju sekretorna svojstva drugih tipova pankreasnih ćelija.



Slika 1. Pankreas

A - položaj pankreasa u organizmu

B - građa pankreasnog tkiva

Poremećaji funkcije pankreasa mogu biti uzrokovani promenama u egzokrinom ili endokrinom tkivu, ali se često javljaju udruženo. Poremećaj bilo egzokrinog, bilo endokrinog tkiva pankreasa značajno povećava rizik za oštećenje drugog tipa pankreasnog tkiva. Najčešće bolesti pankreasa su diabetes mellitus, pankreatitis i karcinom pankreasa. Diabetes mellitus predstavlja poremećaj endokrine funkcije pankreasa. Postoje dva tipa ove bolesti: tip 1 koji podrazumeva nemogućnost proizvodnje insulina i tip 2 koji podrazumeva rezistenciju na insulin. Pankreatitis predstavlja inflamaciju egzokrinog pankreasa, koja može biti akutna ili hronična. Karcinom pankreasa je maligni tumor koji nastaje od egzokrinih pankreasnih ćelija.

1. 1. 2. Epidemiologija karcinoma pankreasa

Karcinom pankreasa (duktalni adenokarcinom pankreasa, adenokarcinom pankreasa, kancer pankreasa) je najčešća pankreasna neoplazma i čini približno 80% svih maligniteta pankreasa (2). Ovu bolest karakterišu izrazita progresivnost i invazivnost, a rezistentna je na većinu dostupnih terapija. Učestalost karcinoma pankreasa iznosi 3-9 na 100000 osoba godišnje, pri čemu je učestalost niža u razvijenim, a viša u nerazvijenim zemljama (3). Karcinom pankreasa je trinaesti kancer po učestalosti i osmi vodeći uzrok smrtnosti od kancera u svetu, a učestalost ove bolesti i njom uzrokovan mortalitet su skoro istovetni. Petogodišnja stopa preživljavanja nakon postavljanja dijagnoze iznosi samo 3%, a prosečno preživljavanje je manje od 6 meseci (2). Usled nespecifičnih simptoma i ograničenja dostupnih dijagnostičkih metoda bolest se retko dijagnostikuje u početnim stadijumima i metastaze su obično prisutne već pri inicijalnoj dijagnozi. Operativno uklanjanje tumora je indikovano kod svega 15-20% pacijenata, pri čemu su samo tumori glave pankreasa resektabilni, a petogodišnja stopa preživljavanja nakon ove intervencije iznosi samo 20% (2). Hemioterapija ima slab efekat usled snažne otpornosti ovog kancera na postojeće terapijske protokole. Primenom dostupnih terapijskih protokola za

karcinom pankreasa kod većine pacijenata se postiže samo olakšavanje simptoma bolesti.

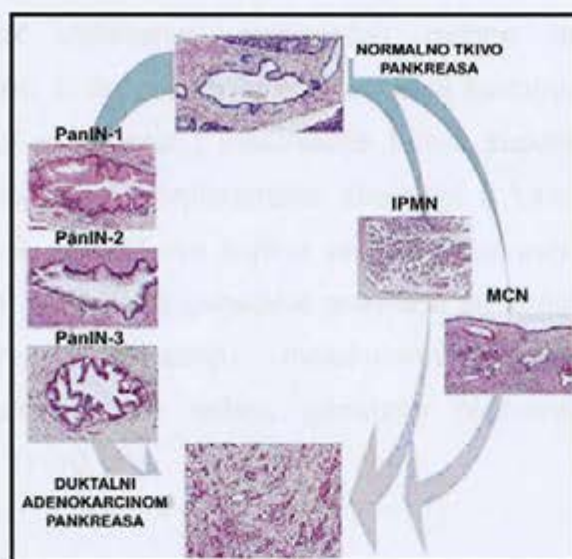
Etiologija karcinoma pankreasa je nedovoljno poznata. U faktore koji mogu da moduliraju rizik za pojavu ove bolesti spadaju godine starosti, pol, pušenje, nepravilna ishrana, dugotrajno izlaganje izvesnim karcinogenima, hronični pankreatitis, diabetes i nasledni pankreatitis (4, 5). Glavni epidemiološki faktor koji utiče na nastanak i razvoj karcinoma pankreasa su godine starosti. Bolest se retko javlja pre 40. godine, a sa starenjem se povećava i rizik, koji kulminira oko 80. godine, kada je 40 puta povećan. Bolest se nešto češće javlja kod muškaraca nego kod žena. Pušenje je povezano sa dvostrukim povećanjem rizika za nastanak karcinoma pankreasa, usled prisustva karcinogenih supstanci u duvanskom dimu. Ishrana bogata mastima povećava rizik za nastanak karcinoma pankreasa, dok ga ishrana koja se uglavnom sastoji od povrća i voća smanjuje. Pretpostavlja se da intenzivno dugogodišnje konzumiranje alkohola takođe predstavlja faktor rizika. Dugotrajno izlaganje karcinogenim supstancama u okviru profesije se smatra odgovornim za manje od 5% slučajeva karcinoma pankreasa. Kod osoba obolelih od hroničnog pankreatitisa rizik je povećan za 30-40%, kod diabetesa tipa 2 dva puta, a kod hereditarnog oblika hroničnog pankreatitisa, koji je uzrokovan mutacijama u genu za katjonski tripsinogen, čak 50 puta (2). Smatra se da je 3-10% slučajeva karcinoma pankreasa posledica nasledne predispozicije.

1. 1. 3. Biologija karcinoma pankreasa

Ćelije karcinoma pankreasa su fenotipski slične duktalnim ćelijama i duktalnog su porekla, ali nije poznato od kog tipa ćelija nastaje ovaj malignitet. Pretpostavlja se da karcinom pankreasa može nastati od pankreasnih stem ćelija ili transdiferenciranih egzokrinih ili endokrinih ćelija (4). Najnoviji podaci ukazuju na mogućnost da karcinom pankreasa nastaje od pankreasnih stielatnih ćelija, subpopulacije ćelija normalnog pankreasnog tkiva sa karakteristikama fibroblasta (6). Kod ovih ćelija su u eksperimentalnim modelima kao odgovor na oštećenje

pankreasnog tkiva zapažene proliferacija, migracija na mesta oštećenja, kontraktilnost, fagocitoza i sinteza komponenti ekstraćelijskog matriksa, pa je verovatno da ove ćelije u aktiviranom stanju mogu imati bitnu ulogu u fibrozi kod hroničnog pankreatitisa i karcinoma pankreasa.

Kroz brojne histopatološke i kliničke studije pankreasnih neoplazmi identifikovana je serija karakterističnih lezija u pankreasnom tkivu koje imaju potencijal da dovedu do invazivnog maligniteta (7, 8). Ovi patološki stadijumi se nazivaju pankreasna intraepitelijalna neoplazma (PanIN, pancreatic intraepithelial neoplasm), mucinozna cistična neoplazma (MCN, mucinous cystic neoplasm) i intraduktalna papilarna mucinozna neoplazma (IPMN, intraductal papillary mucinous neoplasm) (slika 2).



Slika 2. Stadijumi razvoja duktalnog adenokarcinoma pankreasa

PanIN-1, 2, 3 – stadijumi pankreasne intraepitelijalne neoplazme

MCN – stadijum mucinozne cistične neoplazme

IPMN – stadijum intraduktalne papilarne mucinozne neoplazme

Najbolje proučen i najčešći tip prekursorne lezije u karcinomu pankreasa su PanIN stadijumi, koji se odlikuju nizom morfoloških razlika u odnosu na

normalno tkivo. Okarakterisana su tri PanIN stadijuma, pri čemu se PanIN I odlikuje pojavom mucinoznog epitela, dok kroz stadijume PanIN II i PanIN III dolazi do sve intenzivnije ćelijske i jedarne dezorganizacije. Tkivo u višim PanIN stadijumima može da se transformiše u invazivni karcinom pankreasa. Pretpostavlja se da se proces maligne transformacije tkiva u stadijumima MCN i IPMN odvija na sličan način kao i u PanIN lezijama.

1. 1. 4. Molekularna genetika karcinoma pankreasa

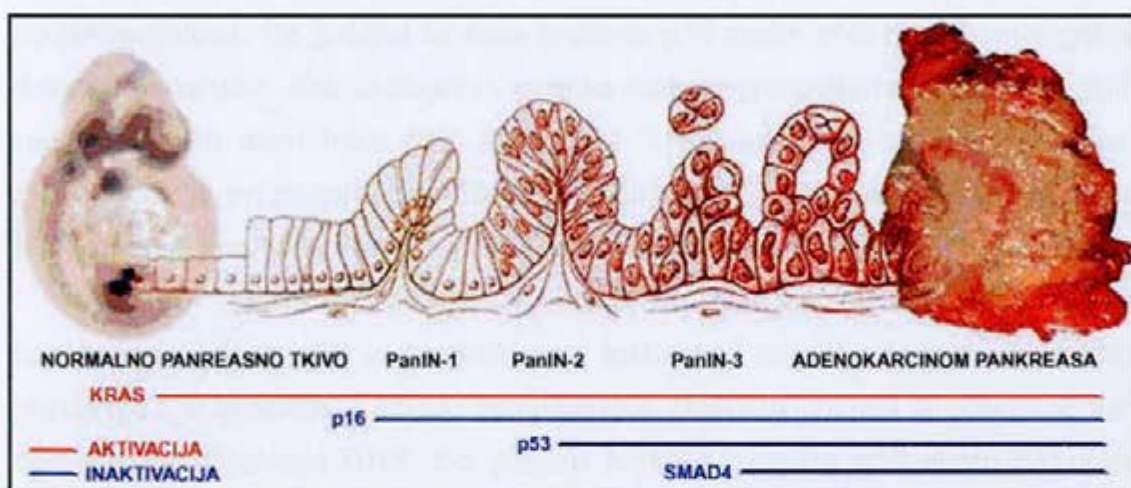
Progresija premalignih lezija u invazivni pankreasni adenokarcinom objašnjava se povećanjem broja genetskih oštećenja sa progresijom PanIN stadijuma (9, 10). Najčešći poremećaji genomske DNK u karcinomu pankreasa su hromozomske aberacije, aktivacija onkogeni, inaktivacija tumor supresor gena, epigenetsko utišavanje, poremećaji dužine telomera i mutacije mitohondrijalne DNK. U najvećem broju slučajeva karcinoma pankreasa dolazi do aktivacije KRAS onkogeni i inaktivacije tumor supresor gena p16, p53 i SMAD4 (9, 10). Najčešće hromozomske aberacije u karcinomu pankreasa su gubici hromozoma 9, 17 i 18, na kojima se nalaze upravo tumor supresor geni p16, p53 i SMAD4. Navedene genetske promene se zbog visoke učestalosti u karcinomu pankreasa smatraju molekularnim markerima pankreasne karcinogeneze, dok su sve ostale genetske promene relativno retke ili sporadične (tabela 1) (10, 11).

Tabela 1. Učestalost genetskih promena u karcinomu pankreasa

GEN	UČESTALOST MUTACIJA (%)
p16 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, inhibits CDK4))	80-95
p53 (TP53, tumor protein p53)	50-75
SMAD4 (SMAD family member 4)	55
KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)	75-90
BRAF (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)	5-10
hMLH1 (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli))	4
hMSH2 (mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli))	
BRCA2 (breast cancer 2, early onset)	7-10

Važnu ulogu u karcinogenezi pankreasa može imati i poremećena ekspresija malih RNK, koje učestvuju u regulaciji ekspresije drugih gena na nivou translacije. Na njihov potencijalni značaj ukazuje podatak da je preko 50% gena za male RNK lokalizovano u regionima za koje se zna da su genetski nestabilni i da su često pogođeni rearanžmanima u kanceru (12). U karcinomu pankreasa od gena za male RNK najčešće je prekomerno ekspimiran gen za miR-221, a poznato je da ova i druge male RNK mogu da utiču na ekspresiju gena KRAS i p53.

Tipičan profil mutacija u karcinomu pankreasa obuhvata mutacije u genima za KRAS, p53 i p16, dok se inaktivacija gena SMAD4 najčešće javlja u kombinaciji sa sve tri prethodno navedene mutacije (13). Do pomenutih genetskih promena u karcinomu pankreasa najčešće dolazi određenim redosledom, pri čemu se aktivacija KRAS onkogene i inaktivacija p16 tumor supresor gena mogu smatrati ranim, a inaktivacija tumor supresor gena za p53 i SMAD4 kasnim događajima u pankreasnoj karcinogenezi (slika 3).



Slika 3. Hronologija molekularnih događaja u karcinomu pankreasa



Onkogen KRAS se aktivira u skoro svim slučajevima karcinoma pankreasa i mutacije u genu KRAS predstavljaju najčešći genetski poremećaj u ovoj bolesti. Mutacije koje aktiviraju onkogen KRAS javljaju se u 75-90% slučajeva karcinoma pankreasa i najčešće pogađaju kodon 12, a u manjem broju slučajeva kodone 13 i 61 gena KRAS. Gen KRAS kodira membranski GTP-vezujući protein koji učestvuje u signalnoj transdukciji posredovanoj faktorima rasta. Mutacije dovode do pojave konstitutivno aktivne forme proteina, koja se permanentno nalazi u GTP-vezanom stanju, i time do konstitutivne aktivacije intraćelijske signalne transdukcije. Mutacije koje dovode do aktivacije onkogena KRAS predstavljaju jedan od najranijih molekularnih događaja u benignim i ranim malignim lezijama u pankreasnom tkivu. Prisutne su u približno 30% PanIN I lezija (10).

Tumor supresor p16 je inaktiviran u 80-95% slučajeva karcinoma pankreasa. Ciklin-zavisna kinaza p16 (CDKN2A/INK4A) učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa i najčešće je inaktiviran tumor supresor u karcinomu pankreasa. Ovaj protein interaguje sa CDK4/CDK6 kompleksom, čime sprečava formiranje aktivnog ciklin D-CDK4/CDK6 kompleksa i time sprečava ulazak u S-fazu ćelijskog ciklusa. Do gubitka funkcije proteina p16 može doći zbog homozigotne delecije gena (oko 40% slučajeva), gubitka heterozigotnosti praćenog mutacijom na preostalom alelu (oko 40% slučajeva) ili epigenetskim utišavanjem usled hipermetilacije promotora (oko 10-15% slučajeva). Gubitak nuklearnog proteina p16 uočen je kod 30% PanIN I, 55% PanIN II i 70% PanIN III lezija (10).

Tumor supresor p53 je inaktiviran u 50-75% slučajeva karcinoma pankreasa. Protein p53 je transkripcioni faktor koji reguliše ćelijski ciklus kroz regulaciju transkripcije u smeru zaustavljanja ćelijskog ciklusa ili apoptoze kao odgovor na oštećenja DNK. Do gubitka funkcije proteina p53 skoro isključivo dolazi usled gubitka heterozigotnosti praćenog mutacijom na preostalom alelu. Inaktivaciju gena p53 najčešće uzrokuje mutacija u egzonima 5-8 koji kodiraju DNK-vezivni domen ovog proteina. Akumulacija mutiranog proteina p53 u jedru uočena je u PanIN III lezijama, pa se gubitak funkcije p53 smatra kasnim događajem u patogenezi karcinoma pankreasa (10).

Tumor supresor SMAD4 se inaktivira visoko specifično u karcinomu pankreasa, pa se njegova inaktivacija smatra genetskim događajem koji je karakterističan za ovu bolest. Na osnovu dosadašnjih istraživanja procenjeno je da je gen SMAD4 inaktiviran u 55% slučajeva karcinoma pankreasa, pri čemu se u 30% slučajeva radi o homozigotnoj deleciji, a u 25% slučajeva o gubitku heterozigotnosti praćenom mutacijom na preostalom alelu. Inaktivacija gena SMAD4 je verovatno u većini maligniteta kasni molekularni događaj, što je, osim za karcinom pankreasa, pokazano i za kolorektalni kancer (14). Gubitak funkcije proteina SMAD4 se dešava relativno kasno tokom patogeneze karcinoma pankreasa i uočen je i u nekim tipovima nemalignih lezija u pankreasu (15, 16, 17). Pacijenti kod kojih je potvrđena ekspresija SMAD4 u pankreasnom tkivu imaju višu stopu preživljavanja od onih kod kojih je gen SMAD4 inaktiviran (18, 19).

Inaktivacija tumor supresor gena SMAD4 u kombinaciji sa aktivacijom onkogeno KRAS karakteristična je za većinu slučajeva karcinoma pankreasa. Selektivna delecija gena SMAD4 u epitelu pankreasa nema značajan efekat na razviće ili fiziologiju pankreasa. Međutim, eksperimenti na miševima su pokazali da deficijencija SMAD4 omogućava brzu progresiju neoplazmi u kojima je već prisutna jedna od nekoliko različitih mutacija otkrivenih u genu KRAS, G12D (20, 21). Dok samo prisustvo mutacije KRAS G12D dovodi do nastanka premaligne PanIN lezije, koja laganom progresijom dovodi do adenokarcinoma, kombinacija mutacije KRAS G12D i deficijencije SMAD4 dovodi do brzog razvoja tumora nalik IPMN leziji, koja predstavlja prekursor adenokarcinoma. Protein SMAD4 kao tumor supresor karcinoma pankreasa blokira progresiju neoplazmi koje su indukovane KRAS G12D mutacijom, pa gubitak proteina SMAD4 u tkivu koje je već pogođeno mutacijom KRAS G12D dovodi do progresije bolesti. Kombinovani efekat aktivacije onkogeno KRAS i inaktivacije tumor supresor gena SMAD4 zapažen je i u MCN lezijama (22). Njihovo kombinovano prisustvo je uočeno i u tkivu pankreasa zahvaćenom hroničnim pankreatitisom, koji često predstavlja osnovu za razvoj karcinoma pankreasa (23).

1. 2. SMAD4

1. 2. 1. Gen SMAD4

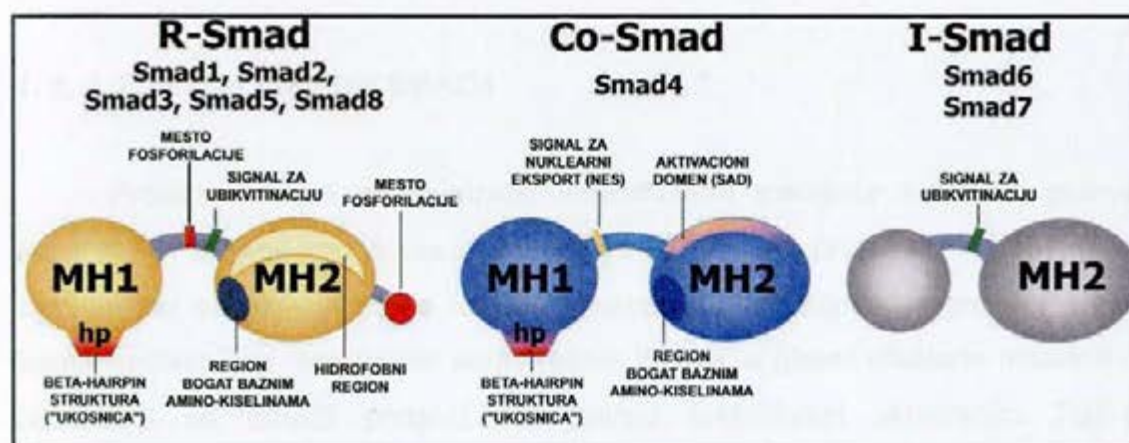
Gen SMAD4 je otkriven 1996. godine, kao genski lokus koji je deletiran u tkivu karcinoma pankreasa, zbog čega je izvorno označen kao gen DPC4 (homozygously deleted in pancreatic carcinoma, locus 4) (24). Analiza tkiva karcinoma pankreasa je pokazala da u oko 90% slučajeva dolazi do homozigotne delecije regiona q21.1 na hromozomu 18, u kome je potom mapiran gen veličine 54803bp, koji se sastoji od 11 egzona (25, 26). Utvrđeno je da je gen DPC4 strukturni homolog gena *Mad Drosophila melanogaster* i gena *sma-2*, *sma-3* i *sma-4 Caenorhabditis elegans* (27, 28). Geni *Mad* i *sma* u navedenim organizmima predstavljaju važne učesnike signalnog puta koji je nalik humanom signalnom putu familije TGF- β (transforming growth factor- β), na osnovu čega je pretpostavljeno, a kasnije i potvrđeno, da i gen DPC4 vrši sličnu funkciju (29). Na osnovu strukturne i funkcionalne homologije predložena je važeća nomenklatura, pa kojoj je svim pripadnicima ove familije gena dat naziv SMAD, nastao spajanjem naziva gena *sma* i *Mad*, pa je gen DPC4 preimenovan u SMAD4 (30). Oznaka ovog gena po važećoj nomenklaturi (SMAD4) u upotrebi je tek od nedavno, zbog čega njegovo obeležavanje u literaturi još uvek nije uniformno.

1. 2. 2. Struktura proteina SMAD4

Protein SMAD4 pripada familiji SMAD proteina, intracelularnih proteina visoko konzervirane strukture koji učestvuju u signalnim putevima familije TGF- β . Ove proteine kodira osam gena u humanom i mišjem genomu, četiri gena u genomu *Drosophila melanogaster* i tri gena u genomu *Caenorhabditis elegans* (31). Od osam sisarskih SMAD proteina pet su supstrati za kinaze iz familije TGF- β receptora i označeni su kao receptorom regulisani ili R-SMAD proteini. U ovu grupu SMAD proteina spadaju SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 i SMAD8. Proteini SMAD6 i SMAD7 su označeni kao inhibitorni ili I-SMAD proteini, jer

interferiraju sa interakcijom SMAD proteina i TGF- β receptora ili sa međusobnim interakcijama SMAD proteina (32). Protein SMAD4, označen kao zajednički SMAD ili Co-SMAD (common SMAD), je ključni intermedijerni molekul u svim signalnim putevima familije TGF- β i ostvaruje ligand-zavisnu interakciju sa svim R-SMAD proteinima (33, 34).

Svi SMAD proteini su molekuli od oko 500 amino-kiselina, koje karakterišu dva visoko konzervirana globularna domena razdvojena linker regionom (slika 4). Protein SMAD4 ima visok stepen primarne strukturne homologije sa drugim SMAD proteinima, ali se značajno razlikuje u sekundarnoj strukturi sva tri domena i njihovim funkcionalnim karakteristikama.



Slika 4. Shematski prikaz strukture SMAD proteina

Aminoterminalni MH1 (Mad-homology 1) domen proteina SMAD4 ima ulogu u interakciji sa DNK i autoinhibiciji, a stabilizuje se čvrstim vezivanjem atoma cinka. Kontakt MH1 domena sa DNK se ostvaruje preko visoko konzervirane "beta-hairpin" strukture ("ukosnice"), koja se nalazi u regionu L43-R135. Mutacije u ovom regionu dovode do promena u afinitetu vezivanja proteina SMAD4 za DNK (35).

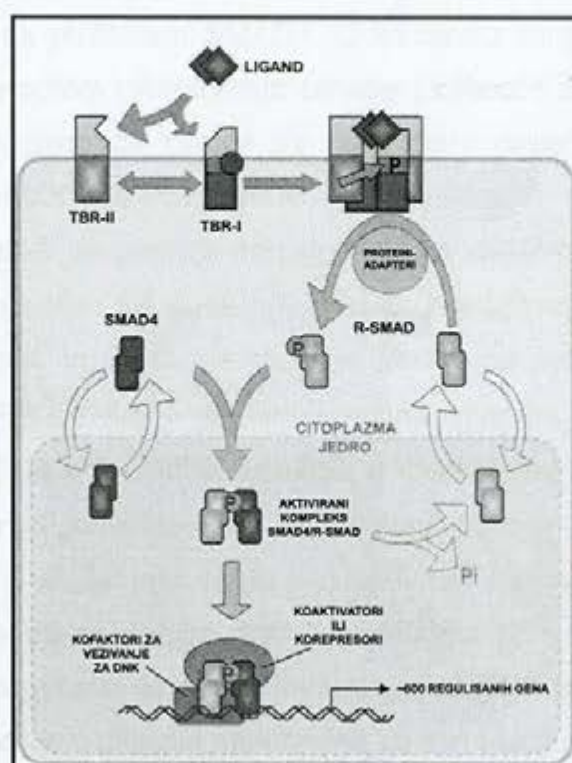
Linker region je fleksibilni segment proteina SMAD4 sa visokim sadržajem amino kiseline prolina. Ovaj region sadrži signal za nuklearni eksport (nuclear export signal, NES).

Karboksiterminalni MH2 (Mad-homology 2) domen je visoko konzerviran u svim SMAD proteinima. Efektorska funkcija proteina SMAD4 je locirana u ovom domenu, a omogućava je region bogat baznim amino-kiselinama, koji interaguje sa fosforilisanim regionom R-SMAD proteina.

Aktivacioni domen, SAD (SMAD4 activation domain), zahvata delove linker regiona i MH2 domena, a čini ga 47 amino-kiselina. Ovaj domen je ključan za signalni odgovor proteina SMAD4, jer posreduje interakcije sa aktivatorima i represorima transkripcije (34). Region koji omogućava ligand-zavisnu aktivaciju SAD nalazi se u MH1 domenu proteina SMAD4.

1. 2. 3. Funkcija proteina SMAD4

Protein SMAD4 je zajednički intracelularni medijator signalnih puteva familije TGF- β , koji kod čoveka obuhvataju ukupno 42 proteina (31, 36). Ovaj signalni put se aktivira preko familije citokina TGF- β . Signal se prenosi preko transmembranskih receptornih serin/treonin kinaza, a glavni efektorni molekuli u citoplazmi su SMAD proteini, koji bivaju fosforilisani aktiviranim TGF- β receptorima i prenose signal kroz međusobne homooligomerne i heterooligomerne interakcije (37) (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz molekularnih događaja u signalnom putu TGF- β

TBR-I – TGF- β receptor tipa I

TBR-II – TGF- β receptor tipa II

P – mesto fosforilacije

R-SMAD – regulatorni SMAD protein

Članovi familije citokina TGF- β su dimerni ligandi koji se po aktivaciji signalnog puta vezuju za homodimere TGF- β receptora i promovišu stvaranje heterotetramernih kompleksa. Kinaza TBR-II (TGF- β type II receptor) po aktivaciji ligandom fosforiliše molekul TBR-I (TGF- β type I receptor), koji indukuje fosforilaciju R-SMAD proteina, njihovu translokaciju u jedro i nastanak heterooligomernih kompleksa između fosforilisanih proteina R-SMAD i SMAD4 (38, 39) (slika 5). Protein SMAD4 je konstitutivno fosforilisan u citoplazmi i nivo njegove fosforilacije se ne menja nakon stimulacije ćelija sa TGF- β (38). Fosforilacija R-SMAD proteina, koji se u neaktivnom nefosforilisanom stanju neprekidno kreću između citoplazme i jedra, dovodi do njihove akumulacije u

jedru i interakcije sa proteinom SMAD4. U kompleks formiran od proteina R-SMAD i SMAD4 se potom inkorporiraju određeni kofaktori za vezivanje za DNK, koji vrše selekciju gena za čiji će se regulatorni region kompleks vezati i regrutaciju odgovarajućih transkripcionih koaktivatora ili korepresora. Dejstvo signalnog puta TGF- β se prekida defosforilacijom R-SMAD proteina, ali tačan mehanizam ovog procesa još uvek nije poznat. Na opisani način je regulisano nekoliko stotina gena, pri čemu se oko dve trećine od ovog broja po aktivaciji signalnog puta TGF- β aktivira, a oko jedne trećine reprimira (36).

Protein SMAD4 ima centralnu ulogu u svim signalnim putevima familije TGF- β , kao heterooligomizacioni inetrakcioni partner svih drugih SMAD molekula. Protein SMAD4 ima ulogu i u aktivaciji transkripcije u jedru, koju ostvaruje u kompleksu sa drugim SMAD proteinima (29). Preko domena MH1 protein SMAD4 omogućava vezivanje kompleksa za DNK molekul, dok se preko domena MH2 ostvaruje aktivacija neophodna za stimulaciju transkripcije (40, 41, 42, 43, 44). Overekspresija gena SMAD4 je dovoljna da indukuje aktivaciju ekspresije gena koji dovode do zastoja u ćelijskom ciklusu, što predstavlja karakterističnu posledicu aktivacije TGF- β signalnog puta (45, 46, 47).

Nukleotidne sekvence za koje se vezuju SMAD proteini označene su kao SBE (SMAD binding element) sekvence. Nije precizno određeno koja mesta u genomskoj DNK prepoznaju SMAD proteini, ali se smatra da se uglavnom vezuju za sekvencu GTCTG i komplementarnu CAGAC, a često i za regione bogate GC parovima nukleotida (48). Za visok afinitet i selektivnost proteina TGF- β signalnog puta odgovorno je prisustvo mesta vezivanja za odgovarajuće kofaktore u blizini SBE sekvence (49). Određene mutacije koje mapiraju u domenu MH1 proteina SMAD4 dovode do smanjenja ili potpunog odsustva ekspresije gena koji sadrže SBE, usled narušavanja vezivanja proteina SMAD4 za DNK (50).

1. 2. 4. Regulacija ekspresije gena SMAD4

Bazalni nivo ekspresije proteina SMAD4 je utvrđen u svim tkivima. Sa ovog gena se prepisuje informaciona RNK dužine 8789 nukleotida, a protein je veličine 552 amino-kiseline (25, 26).

O regulaciji ekspresije gena SMAD4 u literaturi postoji vrlo malo podataka. Promotor gena SMAD4 okarakterisan je 1998. godine, ali su njegova struktura i funkcija još uvek nedovoljno izučene (51) (slika 6). Mesto sa kog otpočinje transkripcija mapirano je 132bp uzvodno od mesta sa kog otpočinje translacija, a bazalni promotor obuhvata oko 1,4kb, od -1,2kb do +0,2kb u odnosu na mesto sa kog otpočinje transkripcija. Ovaj promotor ne sadrži TATA boks i GC ostrvca, ali sadrži strukturu nalik TATA boksu (TAAAAT), koja se nalazi 32bp uzvodno od mesta sa kog otpočinje transkripcija. Softverska analiza promotora gena SMAD4 ukazala je da se u okviru ovog regiona nalaze potencijalna mesta vezivanja za proteine AP-1, Pit-1, F2F i HoxA-5, koji učestvuju u regulaciji ćelijskih signalnih puteva. Protein AP-1 (aktivator protein 1) je univerzalni transkripcioni faktor koji učestvuje u regulaciji diferencijacije, proliferacije i apoptoze ćelija u odgovoru na raznovrsne ćelijske stimuluse (25). Proteini Pit-1 (pituitary-specific positive transcription factor 1) i F2F (prolactin receptor) su tkivno-specifični transkripcioni faktori koji imaju ulogu u razviću endokrinog sistema i sintezi hormona (25). Protein HoxA-5 (homeobox protein A5) spada u grupu Hox proteina koji imaju važnu ulogu u morfogenezi, segmentaciji i diferencijaciji embriona, a za koje je karakteristična tkivno- i vremenski-specifična ekspresija u embrionalnom razviću (25). U promotoru gena SMAD4 prisutno je više od deset TAAT boksova za koje se mogu vezati mnogi proteini iz Hox familije, pa se pretpostavlja da se i drugi proteini osim HoxA-5 vezuju u ovom regionu i regulišu ekspresiju gena SMAD4 tokom embrionalnog razvića.

```

...TATTGAA ATA[TAAT]TTC CATAACATAA AATTCACTAT TTGAAGTGA CAATTCAGTG GPTTTTACTA TAGTCAGAGT -1206
TGTGCAACCA TCACCATTAT CAATTTTTAG GACTTTTTCA TTATAACAAA AAAACACCAT ACCCATTAGC AGTCATTCTT -1126
CATTCCCCTT CCTCCCAGGC CCTGGCAACC ACTGATTAC TTCTGTCTC TGTGGATTG AATATTCTGT ATATTTTATA -1046
TAAATCGGGA TTATA[TAAT]T TGTGACCTTT TGTCACTGAC TTCTTTCACT TAGCATGTGT TTCCGAGGCT TATCCATGTA -966
[TAAT]TTGTT TAGTACTTTA TTCTTTTTTA TGGTTGAA[TA AT]TTTCGGT GTATGGAATT TTATCTATGC ATTTCATCAGT -886
TGATGGACAT TTGAGTTGTA TCCATTATGA ACAACGCTGC TATGAACATT CATGTACAGG TTTGTGTGGA CATGGGTTTT -806
CATTTCCCTC AAGTACAAGT GTGAAGAGTA CAATTGCTGG GTCATATTTA CTCTGTTTAA CATTTTGTAT [TAAT]CCAGA -726
CTGTTTCCCA AAGTACCTGT GCCATTTTGT [AAT]CCAGCA CCAAGGAGTG ASGGTCCAAT TTCTGGCTT CTTCATACT -646
TATTATTGTC TTTTGTATAT ATCCATCTCA GTAGGTATGA AGTAGCAGCT CATTGTGGTT TTGATTTTCA TTTCCA[TAAT] -566
GTC[TAAT]GTC GAGCATCTTT CATGTGCTTA TTGGCCATCG TCTTTGGAGA AGTGTCTTT AAATCTTTT GTTCATTTCT -486
AAATTGGGGT TTTTTTTTTT TTTT[TAAT]TG GTCCTTTTA ACAAAGGTGA GTGTAACTG CTAGGTAGAA TTTCATACCA -406
GGCGATGTA AATTTTTCAT AAATATTAGT AATAGACTTT TAGGTTTAACTAGTCTGAT CCTCATAAG[TAAT]CTTTAA -326
AAAAGTCTG GTAAGATTTT CCTTTAAGGT GACCAGTAAA GCCAGTAAGA CTTGATTGAG CATGCCACTA TCG[TAAT]GAG -246
AAGACCTAAC TT[TAAT]TTT TTGGAATGTC AAAACAGTG ACATTTTAA TAAG[TAAT]TT TATTTTTAAA AATTATTTT -166
AATGGC[TAAT] ATTTTGTAAAG AATTTTAAAGT AATTTTCAAC TCTGAGCATC AAATTTTAA TATGTGCATT GAATCTCTGA -86
CTTAACCAGA GCAATTTTCT CTTTTCCCAA GTAGTCAGAT CTACTTCGTA AAATGTGTTT TGATGTGTGT CTTTTTTTTT -6
TTCTTTTATA GGTATCTCTG AATACATGTC TAACAATTTT CCTTGCAACG TTAGCTGTTG TTTTTCCTG TTTCCAAAGG +75
ATCAAAATTG CTTCAGAAAT TGGAGACATA TTTGATTTAA AAGGAAAAAC TTGAACAAAT GGACAATATG TCTATTA... +155

```

Slika 6. Prikaz sekvence DNK promotora gena SMAD4

[TAAT] – potencijalna mesta vezivanja proteina Hox familije

AP-1, Pit-1, F2F i HoxA-5 – potencijalna mesta vezivanja proteina

+1 – mesto sa kog otpočinje transkripcija

TATA-like box – struktura nalik TATA boks

Nedavno je pokazano da region od 655bp uzvodno od prvog nekodirajućeg egzona gena SMAD4 i 16kb uzvodno od mesta sa kog otpočinje translacija takođe ima promotorsku aktivnost, ali njegova uloga još uvek nije razjašnjena (52). Ovaj region sadrži TATA boks i GC ostrvca, kao i potencijalno mesto vezivanja za transkripcioni faktor SP1.

1. 2. 5. Fiziološka uloga proteina SMAD4

Signalni putevi familije TGF- β regulišu važne ćelijske procese: deobu, diferencijaciju, migraciju, adheziju i umiranje ćelija. Kao učesnik signalnog puta

TGF- β protein SMAD4 ima veoma važnu ulogu u razviću, što je potvrđeno eksperimentima na miševima, čiji protein SMAD4 ima 88% homologije sa humanim (53). Signali posredovani molekulom SMAD4 su kod miša neophodni za proliferaciju epiblasta, formaciju jajnog cilindra i indukciju mezoderma (54). Miševi koji su homozigoti za mutacije u genu SMAD4 umiru sedmog dana embriogeneze, dok heterozigotni mutanti razvijaju gastrointestinalne polipe i tumore u periodu od 6 do 12 meseci starosti (55, 56, 57).

Molekuli familije TGF- β su potentni inhibitori ćelijske proliferacije i mnoge maligne ćelije imaju smanjenu osetljivost na inhibiciju rasta posredovanu ovim molekulima. Gubitak funkcije proteina SMAD4 dovodi do gubitka inhibicije procesa rasta i povećanja proliferacije ćelija kroz povećanu aktivnost TGF- β signalnog puta (58). Uloga gena SMAD4 kao tumor supresora je potvrđena u eksperimentima na miševima (59). Da je protein SMAD4 deo signalnog puta TGF- β i da posreduje njime indukovanu inhibiciju rasta dokazano je i eksperimentima na humanim ćelijama u kulturi (60). Uvođenje proteina SMAD4 u ćelijsku liniju humanog karcinoma pankreasa, iako ne dovodi do obnavljanja senzitivnosti na TGF- β , suprimira formiranje tumora *in vivo* i utiče na angiogenezu kroz smanjenje ekspresije vaskularnog endotelijalnog faktora rasta i povećanje ekspresije trombospondina-1 (61). Ćelije sa homozigotnom delecijom gena SMAD4 mogu delimično da prevaziđu nedostatak proteina SMAD4 u signalizaciji kroz još uvek neobjašnjen mehanizam, što ukazuje na verovatno postojanje i SMAD4-nezavisnog TGF- β signalnog puta (62).

1. 2. 6. Inaktivacija gena SMAD4 u patofiziološkim stanjima

Inaktivacija gena SMAD4 je karakteristična za karcinom pankreasa, pri čemu se češće javlja u ćelijskim linijama u odnosu na primarni adenokarcinom (24, 63). Mutacije u genu SMAD4 nisu otkrivene u slučajevima familijarnog karcinoma pankreasa, čija se genetska osnova razlikuje u odnosu na nefamilijarni oblik bolesti (64).

Familijarni juvenilni poliposis je oboljenje koje se nasleđuje autozomno-dominantno i uzrokovano je prisustvom mutacija u genu SMAD4. Ovu bolest karakterišu razvoj polipa gornjeg i donjeg gastrointestinalnog trakta u ranoj mladosti, kao i povišeni rizik za razvoj gastrointestinalnih kancera (65). Kod pacijenata obolelih od ove bolesti mutacije gena SMAD4 prisutne su u germinativnim ćelijama i uglavnom dovode do nekompletne transkripcije i do skraćivanja proteina SMAD4 u karboksiterminalnom regionu, čime je oštećena njegova normalna funkcija (66, 67, 68).

Mutacije u genu SMAD4 se javljaju i u drugim malignitetima, ali u relativno malom broju slučajeva (<10%) (69). Osim u karcinomu pankreasa, do inaktivacije gena SMAD4 najčešće dolazi u kolorektalnom kanceru (70, 71, 72, 73, 74, 75). Mutacije u genu SMAD4 su takođe otkrivene, ali sa vrlo malom učestalošću, u tumorima prostate, dojke, jajnika, pluća, bilijarnog trakta, štitne žlezde, vrata i glave (71, 76, 77, 78, 79, 80). Otkriveno je da su mutacije u genu SMAD4 takođe prisutne u neoplazijama udruženim sa hroničnim ulceroznim kolitisom i Kronovom bolešću (81). U neuroblastomu transkript gena SMAD4 može da se iskraja na različite načine i uočene su dve varijante kojima nedostaju egzoni 5 i 6, odnosno egzoni 4-6 (82). Inaktivacija gena SMAD4 je vrlo redak događaj u tumorima endokrinog pankreasa, što ukazuje na njihovo različito genetičko poreklo (83, 84, 85).

1. 2. 7. Mehanizmi inaktivacije gena SMAD4 u karcinomu pankreasa

Funkcija tumor supresor gena u malignoj ćeliji može biti poremećena usled genetskih i epigenetskih promena. Genetske promene podrazumevaju deleciju kompletnog gena ili prisustvo genskih mutacija, dok epigenetske promene podrazumevaju promene nasleđenog stanja genske ekspresije. Tri najčešća načina inaktivacije tumor supresor gena su homozigotna delecija gena ili hromozoma, gubitak jednog gena ili hromozoma (gubitak heterozigotnosti) praćen mutacijom na preostalom alelu i hipermetilacija promotora (86).

Homozigotna delecija je najčešći mehanizam inaktivacije tumor supresor gena SMAD4. U karcinomu pankreasa uglavnom dolazi do homozigotne delecije kompletnog hromozoma 18, a nešto ređe do delecije hromozomskog regiona q21, u kome se nalazi gen SMAD4.

Mutacije u genu SMAD4 su čest događaj u karcinomu pankreasa, a njihovo prisustvo je uočeno u različitim regionima gena (26, 87). Konzervirani karboksiterminalni domen proteina SMAD4 odgovoran je za većinu ligand-specifičnih efekata, pa je stoga i primarni target tumorigene inaktivacije. Karboksiterminalni domen proteina SMAD4 formira trimer kroz konzervirane međuproteinske interakcije, pa upravo u regionima koji učestvuju u interakciji mapira velika većina mutacija karakterističnih za tumore, koje ometaju homooligomerizaciju *in vitro* i *in vivo* (88). Dok mutacije u karboksiterminalnom domenu direktno pogađaju efektorsku funkciju proteina SMAD4, mutacije u aminoterminalnom domenu dovode do povećanja afiniteta ovog domena za karboksiterminalni domen, čime posredno inhibiraju interakciju proteina SMAD4 sa drugim SMAD proteinima (89).

Mehanizam inaktivacije tumor supresor gena putem hipermetilacije podrazumeva metilovanje GC ostrvaca u 5' nekodirajućem regionu, koja su u normalnom fiziološkom stanju nemetilovana (90, 91, 92). Do aberantne metilacije može da dođe već u najranijim stadijumima progresije tumora, što može dalje dovesti do gubitka kontrole ćelijskog ciklusa, promena funkcije transkripcionih faktora, narušavanja normalnih ćelijskih interakcija, inaktivacije puteva signalne transdukcije, gubitka signala za apoptozu i genetske nestabilnosti. Hipermetilacija 5' regulatornog regiona gena SMAD4 do sada nije uočena u karcinomu pankreasa.

1. 3. CILJ RADA

Mehanizmi inaktivacije gena SMAD4 u karcinomu pankreasa su relativno slabo proučeni. Poznato je da u više od polovine slučajeva karcinoma pankreasa dolazi do inaktivacije gena SMAD4 usled gubitka obe kopije ili delecije jedne kopije gena praćene pojavom mutacije na drugoj kopiji. Do sada nisu otkriveni drugi mehanizmi inaktivacije gena SMAD4 u karcinomu pankreasa, ali su u drugim malignim bolestima (endometrijalnom kanceru i karcinomu prostate) otkrivene genetske i epigenetske promene u 5' regulatornom regionu gena SMAD4, za koje se pretpostavlja da dovode do poremećaja njegove ekspresije (93, 94). O ekspresiji gena SMAD4 postoji vrlo malo podataka u literaturi. Okarakterisan je promotor odgovoran za osnovni nivo ekspresije ovog gena, ali rezultati nekih skorijih istraživanja ukazuju da je regulacija njegove ekspresije verovatno mnogo složenija nego što se do sada smatralo (51, 52).

Ovaj rad je bio usmeren na analizu genetskih i epigenetskih promena u delovima 5' regulatornog regiona gena SMAD4 kao potencijalnih mehanizama inaktivacije gena SMAD4 u karcinomu pankreasa. Analizirano je i prisustvo mutacije u kodonu 12 gena KRAS. Rad je takođe obuhvatio i izučavanje navedenih promena u kolorektalnom kanceru, bolesti u kojoj je, uz karcinom pankreasa, gen SMAD4 najčešće inaktiviran.

Ciljevi ovog rada su sledeći:

1. Analiza tkiva karcinoma pankreasa na prisustvo genetskih varijanti u promotoru gena SMAD4, u regionu približne veličine 800bp koji obuhvata okolinu prvog kodirajućeg egzona, a u okviru kog se nalazi bazalni promotor.

2. Analiza tkiva karcinoma pankreasa na prisustvo metilacije u delu 5' regulatornog regiona gena SMAD4 približne veličine 400bp koji obuhvata prvi nekodirajući egzon bogat potencijalnim mestima metilacije.

3. Analiza tkiva kolorektalnog kancera na prisustvo genetskih varijanti otkrivenih u genu SMAD4 u karcinomu pankreasa.

4. Funkcionalna analiza otkrivenih genetskih varijanti promotora SMAD4 i procena njihovog značaja za molekularne mehanizme koji leže u osnovi karcinoma pankreasa i kolorektalnog kancera.

5. Analiza uticaja prisustva otkrivenih genetskih varijanti u promotoru gena SMAD4 na vezivanje jedarnih proteina za ovaj region i procena njihovog značaja za regulaciju ekspresije gena SMAD4.

6. Analiza prisustva mutacije u kodonu 12 gena KRAS u tkivu karcinoma pankreasa u korelaciji sa prisustvom genetskih varijanti u promotoru gena SMAD4.

7. Procena primenljivosti otkrivenih genetskih varijanti kao molekularnih markera u dijagnostici i praćenju toka karcinoma pankreasa.

2. MATERIJAL I METODE

2. 1. Ispitanici

Ovo istraživanje je obuhvatilo 55 ispitanika koji su u periodu od 2004. do 2008. godine na osnovu kliničke dijagnoze karcinoma pankreasa podvrgnuti proceduri operativnog uklanjanja tumora na Prvoj hirurškoj klinici Kliničkog centra Srbije u Beogradu, a od kojih su za analizu uzeti uzorci odstranjenog pankreasnog tkiva. Istraživanje je takođe obuhvatilo 50 ispitanika kod kojih je u periodu od 2002. do 2006. godine postavljena klinička dijagnoza karcinoma pankreasa na Odeljenju za gastroenterologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu, a od kojih su za analizu uzeti uzorci periferne krvi. Kod svih ispitanika uključenih u studiju klinička dijagnoza karcinoma pankreasa je postavljena na osnovu nalaza abdominalnog ultrazvuka i rezultata skeniranja metodom spiralne kompjuterizovane tomografije. Dostupni podaci za sve ispitanike sa dijagnostikovanim karcinomom pankreasa uključene u istraživanje dati su u tabelama 2 i 3.

U ovo istraživanje je bilo uključeno 50 ispitanika koji su u periodu od 2004. do 2006. godine na osnovu kliničke dijagnoze kolorektalnog kancera podvrgnuti proceduri operativnog uklanjanja tumora na Prvoj hirurškoj klinici Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Od ispitanika sa kolorektalnim kancerom bili su dostupni uzorci DNK izolovani iz tkiva kolorektalnog kancera i periferne krvi. Kod svih ispitanika uključenih u studiju klinička dijagnoza kolorektalnog kancera je postavljena na osnovu analize biopsije uzorka kolorektalnog tkiva dobijenog kolonoskopijom. Dostupni podaci za sve ispitanike sa kolorektalnim kancerom uključene u istraživanje dati su u tabeli 4.

Nakon operativnog zahvata uzorci tkiva odstranjenog tumora analizirani su histopatološki radi potvrde kliničke dijagnoze. Stadijum tumora za karcinom pankreasa i kolorektalni kancer je određivan na osnovu TNM klasifikacije malignih tumora zasnovanoj na kriterijumima predloženim od strane udruženja American Joint Committee on Cancer (AJCC) (95). U okviru histopatološke TNM klasifikacije određuju se tri parametra: stepen u kome je tkivo zahvaćeno tumorom i njegova veličina (T1-T4), stepen infiltracije lokalnih limfnih čvorova tumorom (N1-N3) i metastaze tumora u udaljena tkiva (M1). U tabelama su za sve pacijente dati parametri T i N, dok je parametar M izostavljen, jer se za karcinom pankreasa i kolorektalni kancer najčešće ne može odrediti rutinskom histopatološkom analizom.

Za sve ispitanike su bili dostupni podaci o polu i starosti na postavljanju dijagnoze. Za ispitanike sa karcinomom pankreasa i kolorektalnim kancerom čiji su uzorci tkiva analizirani bili su dostupni podaci o histopatološkoj dijagnozi i stadijumu tumora. Za ispitanike sa karcinomom pankreasa čiji su uzorci periferne krvi analizirani bili su dostupni podaci o porodičnoj anamnezi i prisutnim poznatim faktorima rizika za karcinom pankreasa.

Tabela 2. Karakteristike ispitanika sa kliničkom dijagnozom karcinoma pankreasa čiji su uzorci tumorskog tkiva analizirani

OZNAKA UZORKA	POL	STAROST NA DIJAGNOZI	HISTOPATOLOŠKA DIJAGNOZA	TNM STADIJUM TUMORA
A1	M	50	karcinom pankreasa	T3 N1
A2	M	64	karcinom pankreasa	T2 N1
A3	Ž	59	karcinom pankreasa	T3 N1
A4	Ž	52	karcinom pankreasa	T3 N1
A5	Ž	49	karcinom pankreasa	T3 N1
A6	M	61	karcinom pankreasa	T4 NX
A7	M	44	karcinom pankreasa	T3 N0
A8	Ž	42	karcinom pankreasa	T3 N1
A9	M	53	karcinom pankreasa	T3 N0
A10	M	67	karcinom pankreasa	T3 N1
A11	M	62	benigni tumor pankreasa	—
A12	M	51	karcinom pankreasa	T3 N1
A13	Ž	52	karcinom pankreasa	T3 N0
A14	M	44	karcinom pankreasa	T3 N1
A15/A16	M	70	karcinom pankreasa	T3 N1
A17	M	51	karcinom pankreasa	T3 N1
A18/A19	M	62	karcinom pankreasa	T3 N0
A20	M	51	karcinom pankreasa	T3 N1
A21	M	54	karcinom pankreasa	T3 N1
A22/A23	Ž	64	karcinom pankreasa	T3 N1
A24	Ž	53	karcinom pankreasa	T3 N0
A25	Ž	72	karcinom pankreasa	T3 N0
A26/A27	M	69	karcinom pankreasa	T3 N1
A28	M	62	karcinom pankreasa	T3 N1
A29	M	42	hronični pankreatitis	—
A30	Ž	63	karcinom pankreasa	T1 N0
A31	Ž	47	karcinom pankreasa	T3 N1
A32	M	53	karcinom pankreasa	T3 N1
A33/A34	Ž	49	karcinom pankreasa	T3 N2
A35	M	70	karcinom pankreasa	T2 N1
A36	M	54	karcinom pankreasa	T2 N1
A37	Ž	62	karcinom pankreasa	T3 N1
A38	M	61	karcinom pankreasa	T3 N1
A39	M	67	cistična distrofija pankreasa	—
A40	M	49	cistična distrofija pankreasa	—
A41	Ž	52	hronični pankreatitis	—
A42	Ž	55	karcinom pankreasa	T3 N1
A43	M	47	karcinom pankreasa	T3 N1
A44	M	53	karcinom pankreasa	T4 N1
A45	Ž	62	karcinom pankreasa	T3 N1
A46	Ž	49	karcinom pankreasa	T3 N2
A47	M	71	karcinom pankreasa	T4 N2
A48	M	54	karcinom pankreasa	T3 N2
A49	M	57	karcinom pankreasa	T4 N2
A50	Ž	69	karcinom pankreasa	T3 N1
A51	M	65	karcinom pankreasa	T3 N2
A52	M	45	karcinom pankreasa	T3 N2
A53	Ž	52	karcinom pankreasa	T3 N2
A54	M	53	karcinom pankreasa	T4 N2
A55	M	63	karcinom pankreasa	T3 N1
A56	M	65	karcinom pankreasa	T3 N1
A57	Ž	49	karcinom pankreasa	T3 N1
A58	M	64	karcinom pankreasa	T3 N1
A59	M	54	karcinom pankreasa	T4 N2
A60	M	48	karcinom pankreasa	T3 N2

Tabela 3. Karakteristike ispitanika sa kliničkom dijagnozom karcinoma pankreasa
čiji su uzorci periferne krvi analizirani

OZNAKA UZORKA	POL	STAROST NA DIJAGNOZI	PORODIČNA ANAMNEZA	POZNATI FAKTORI RIZIKA ZA KARCINOM PANKREASA
1A	M	54	-	diabetes
2A	M	75	-	hronični pankreatitis
4A	M	76	-	hronični pankreatitis
5A	M	63	-	hronični pankreatitis
6A	Z	56	-	hronični pankreatitis
7A	Ž	41	-	holecistektomija
8A	Ž	70	-	-
11A	Ž	65	-	-
13A	M	80	-	holecistektomija
14A	M	56	-	-
15A	M	54	-	-
17A	Ž	71	-	kalkuloza holeciste
18A	M	66	-	-
20A	M	67	-	-
22A	M	62	-	diabetes
23A	Ž	43	-	duodenalni ulkus
24A	M	41	-	diabetes, hronični pankreatitis
27A	Ž	78	-	karcinom bešike
30A	M	74	-	diabetes, holecistektomija
31A	M	58	sestra karcinom jajnika	diabetes
32A	M	61	otac karcinom jetre	-
33A	Z	52	-	-
34A	M	46	-	-
35A	Z	66	-	-
36A	M	52	-	-
37A	M	57	-	-
38A	M	53	otac karcinom pluća	-
39A	M	65	majka holecistektomija	-
40A	M	68	-	-
41A	M	62	-	-
43A	M	70	-	-
44A	Ž	61	-	-
46A	M	54	-	holecistektomija
47A	Ž	58	-	diabetes
49A	M	51	-	-
50A	M	69	-	-
51A	M	77	-	-
52A	Ž	61	-	-
53A	M	36	-	-
54A	Ž	70	-	-
55A	Ž	71	-	holecistektomija
56A	M	56	majka karcinom uterusa	diabetes
57A	Ž	68	-	-
58A	Ž	55	-	diabetes
59A	Ž	65	-	diabetes
60A	M	69	sestra karcinom jetre	diabetes
61A	M	40	-	-
62A	Ž	48	-	-
63A	M	77	otac karcinom bešike	holecistektomija
64A	Ž	71	-	duodenalni ulkus

Tabela 4. Karakteristike ispitanika sa histopatološkom dijagnozom kolorektalnog kancera čiji su uzorci tumorskog tkiva i periferne krvi analizirani

OZNAKA UZORKA	POL	STAROST NA DIJAGNOZI	TNM STADIJUM TUMORA
CRC1	M	62	T3 N0
CRC2	M	59	T1 N0
CRC3	Ž	57	T1 N1
CRC4	M	63	T3 N0
CRC5	M	72	T2 N0
CRC6	M	71	T1 N0
CRC7	Ž	67	T3 N0
CRC8	Ž	52	T1 N1
CRC9	M	69	T1 N0
CRC10	M	61	T3 N0
CRC11	M	57	T1 N1
CRC12	Ž	46	T3 N0
CRC13	Ž	74	T2 N0
CRC14	Ž	59	T3 N1
CRC15	M	57	T2 N1
CRC16	M	80	T3 N0
CRC17	M	85	T3 N1
CRC18	Ž	65	T2 N0
CRC19	Ž	75	T2 N2
CRC20	Ž	46	T3 N1
CRC21	M	66	T2 N1
CRC22	Ž	58	T2 N1
CRC23	M	62	T1 N1
CRC24	M	65	T3 N0
CRC25	Ž	70	T3 N0
CRC26	M	63	T3 N1
CRC27	M	53	T3 N0
CRC28	Ž	69	T4 N1
CRC29	M	54	T3 N0
CRC30	Ž	77	T4 N2
CRC31	M	51	T3 N0
CRC32	M	74	T3 N0
CRC33	M	70	T2 N0
CRC34	M	69	T3 N3
CRC35	Ž	58	T2 N0
CRC36	M	82	T3 N1
CRC37	M	61	T3 N0
CRC38	Ž	73	T3 N0
CRC39	M	65	T3 N1
CRC40	M	70	T3 N0
CRC41	M	63	T4 N0
CRC42	Ž	60	T4 N1
CRC43	M	76	T2 N0
CRC44	M	64	T2 N1
CRC45	Ž	64	T1 N1
CRC46	M	53	T1 N0
CRC47	M	56	T2 N1
CRC48	M	59	T2 N1
CRC49	M	60	T1 N0
CRC50	M	68	T2 N1

2. 2. Materijal

2. 2. 1. Uzorci tkiva karcinoma pankreasa

Za ovo istraživanje korišćen je deo uzorka tkiva karcinoma dobijen resekcijom pankreasa prilikom hirurške intervencije. Uzorci A1-A11 i A35-A60 su bili dostupni u obliku parafinskog kalupa tkiva, a uzorci A12-A34 su bili dostupni kao delovi svežeg tkiva pankreasa odstranjenog prilikom operacije.

Uzorci dostupni kao parafinski kalupi tkiva se čuvaju na sobnoj temperaturi. Sveži uzorci tkiva pankreasa ($\approx 1\text{g}$) se nakon resekcije potope u 1mL fiziološkog rastvora (0,9% NaCl) i transportuju u laboratoriju, gde se potom centrifugiraju 5min na 2000rpm, nakon čega se supernatant odbaci, a talog zamrzne i čuva na -80°C .

2. 2. 2. Uzorci periferne krvi

Uzorci periferne krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa se uzimaju sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom i čuvaju na -20°C .

2. 2. 3. Uzorci DNK

Uzorci DNK izolovani iz tkiva kolorektalnog kancera i periferne krvi ispitanika sa kolorektalnim kancerom su dobijeni od Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Uzorci su bili dostupni u vidu vodenog rastvora DNK koncentracija 100-500ng/ μL .

U radu su korišćena i dva kontrolna uzorka DNK dobijena od Division of Oncology, University Hospital Basel. Ovi uzorci DNK izolovani su iz tkiva ispitanika sa kolorektalnim kancerom i u oba je prethodno analizirano prisustvo mutacija u kodirajućem regionu gena SMAD4. U jednom uzorku su prisutne dve mutacije u kodirajućem regionu (C931T i G1237T), a u drugom je prisutna

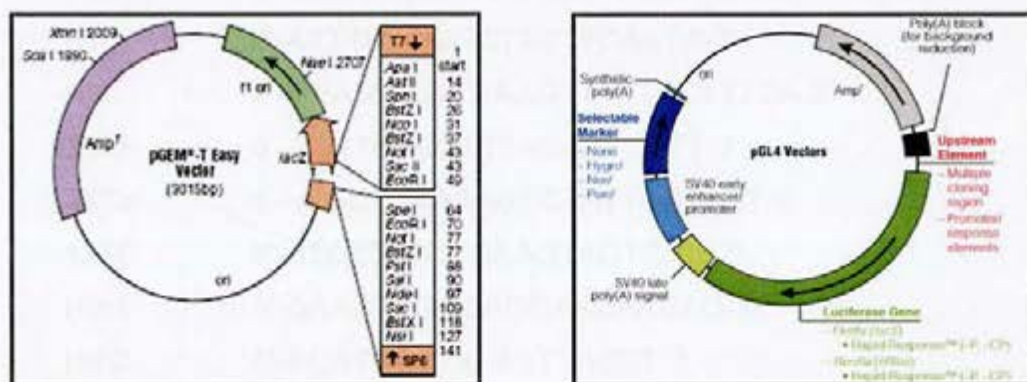
mutacija u intronu 7 koja dovodi do poremećaja obrade RNK. Uzorci su bili dostupni u vidu vodenog rastvora DNK koncentracije 3µg/µL.

2. 2. 4. Vektori

U ovom radu su korišćeni vektori pGEM-T Easy i dva pGL4 vektora, pGL4.10[luc2] i pGL4.70[hRluc] (Promega) (Slika 7).

Vektor pGEM-T Easy, veličine 3015bp, je prokariotski vektor sa ampicilinskom rezistencijom.

Vektori pGL4 su eukariotski ekspresioni vektori sa ampicilinskom rezistencijom. Vektor pGL4.10[luc2], veličine 4242bp, sadrži reporterski gen za luciferazu *Photinus pyralis*, dok vektor pGL4.70[hRluc], veličine 3522bp, sadrži reporterski gen za luciferazu *Renilla reniformis*.



Slika 7. Shematski prikaz vektora pGEM-T Easy i pGL4

2. 2. 5. Bakterijski sojevi

U ovom radu je korišćen bakterijski soj XL1-Blue *E. coli* (genotip: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI*^ΔZΔM15 Tn10 (Tet'^r)]).

2. 2. 6. Čelijske linije

U ovom radu su korišćene sledeće humane permanentne čelijske linije:

- SaOS-2, poreklom iz primarnog osteosarkoma
- NTERA-2, poreklom iz pluripotentnog embrionalnog karcinoma
- K562, poreklom iz hronične mijelogene leukemije
- HeLa, poreklom iz epiteloidnog karcinoma cerviksa

2. 2. 7. Oligonukleotidi

U ovom radu su korišćeni sledeći oligonukleotidi:

P1X	5'-GCGCGCTATACTCGAGATTTCTCGGCTTCTTCAATA-3'
P2H	5'-CCGCCGAATTAAGCTTTGTTCAAGTTTTTCCTTTTA-3'
P1	5'-ATTTCTCGGCTTCTTCAATA-3'
P2f	5'-6-FAM-TGTTCAAGTTTTTCCTTTTA-3'
15TF	5'-AAGTGCCTTTAGAATCCTT-3'
15Tv	5'-VIC-CCTAAAAGTCTATTACTAAT-3'
12TF	5'-ATCTTTTCCCAAGTAGTCAG-3'
Hm1	5'-CAAGTTGGCAGCAACAACAC-3'
Hm2	5'-ACATGGCGCGGTTACCT-3'
KRAS12	5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3'
KRAS12psm	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'

2. 3. Metode

2. 3. 1. Deparafinizacija kalupa tkiva pankreasa

U epruvetu od 1,5mL se odvoji deo parafinskog kalupa približne zapremine $0,1\text{cm}^3$ isečen sterilnim skalpelom (96). U epruvetu se zatim doda 1mL ksilola, smeša se vorteksuje 5min i centrifugira 5min na 13000rpm. Nakon što se supernatant ukloni, talog se ponovo ispere sa 1mL ksilola, smeša vorteksuje 5min i centrifugira 5min na 13000rpm. Nakon uklanjanja supernatanta deparafinisano tkivo se dva puta ispira etanolom. U svakom ispiranju u epruvetu se doda 1mL etanola, smeša se vorteksuje 1min, centrifugira 5min na 13000rpm i supernatant ukloni. U talog se zatim doda 1mL 70% etanola, smeša se vorteksuje 1min i centrifugira 5min na 13000rpm. Kada se supernatant ukloni, preostali talog se suši 1h na 37°C .

2. 3. 2. Izolacija DNK iz tkiva pankreasa

Izolacija DNK se vrši iz 20-100mg deparafinisanog ili svežeg tkiva pankreasa (97). Tkivo se najpre dva puta ispere u po 1mL pufera Tris-EDTA (0,15M Tris pH8,0, 0,07M EDTA), centrifugira 2min na 1500rpm i supernatant ukloni. Tkivo se zatim resuspenduje u $140\mu\text{L}$ pufera Tris-EDTA, pa se u smešu doda $20\mu\text{L}$ proteinaze K (20mg/mL) i $40\mu\text{L}$ 10% SDS. Smeša se zatim inkubira 1h-3h na 50°C , sa povremenim vorteksovanjem, do potpunog razlaganja tkiva. U $200\mu\text{L}$ smeše se zatim doda $300\mu\text{L}$ fenola, smeša se promućka i centrifugira 5min na 13000rpm. Supernatant se prebaci u novu epruvetu i u njega se doda $300\mu\text{L}$ smeše fenol:hlороform:izoamilalkohol (25:24:1). Nakon mućkanja i centrifugiranja 5min na 13000rpm, supernatant se ponovo prebaci u novu epruvetu i u njega se doda $300\mu\text{L}$ smeše hlороform:izoamilalkohol (24:1). Smeša se promućka, centrifugira 5min na 13000rpm i supernatant ponovo prebaci u novu epruvetu. U supernatant se zatim doda $5\mu\text{L}$ 3M natrijum-acetata i $750\mu\text{L}$ etanola. Nakon mešanja i centrifugiranja 5min na 13000rpm, supernatant se

odbaci, a talog ispere sa 300 μ L 70% etanola. Nakon centrifugiranja 5min na 13000rpm, supernatant se odbaci, a talog osuši na sobnoj temperaturi i potom rastvori u 50 μ L sterilne vode.

2. 3. 3. Izolacija DNK iz periferne krvi

Za izolaciju DNK iz limfocita periferne krvi koristi se komercijalni kit GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences). Izolacija se vrši iz 100 μ L periferne venske krvi uzete sa Na-citratom kao antikoagulansom, u koju se dodaje 500 μ L Extraction Solution. Smeša se zatim inkubira 5min na sobnoj temperaturi, a potom nanese na prethodno sklopljenu kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 8000rpm. Tečnost sakupljena u epruveti za sakupljanje se odliva, a na kolonu se doda 500 μ L Extraction Solution. Nakon centrifugiranja od 1min na 8000rpm sakupljena tečnost se odbacuje. Nakon toga se na kolonu doda 500 μ L Wash Solution i vrši se centrifugiranje 3min na 13000rpm. Kolona se zatim prebaci u epruvetu od 1,5mL i na nju se doda 100 μ L sterilne vode, prethodno zagrejane na 70°C. Ovako pripremljena kolona se inkubira 1min na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira 1min na 8000rpm. Nakon centrifugiranja kolona se odbaci, a u epruveti ostaje 100 μ L rastvora DNK.

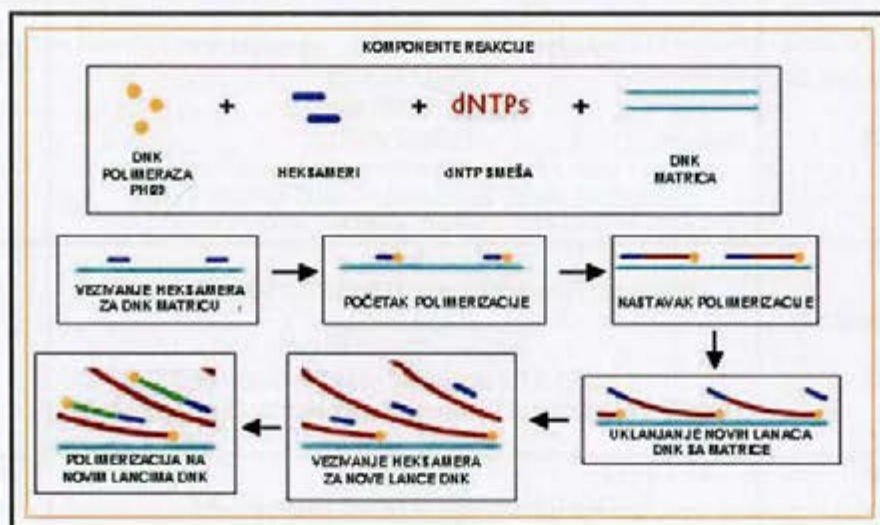
2. 3. 4. Elektroforeza DNK u gelu od agaroze

Analiza prinosa i kvaliteta DNK izolovane iz tkiva pankreasa i periferne krvi i analiza prinosa plazmidne DNK izolovane iz bakterijskih kultura vrše se pomoću elektroforeze u 1% gelu od agaroze. Provera fragmenata DNK dobijenih reakcijom lančanog umnožavanja vrši se elektroforezom u 2% gelu od agaroze.

Za pripremu gelova i elektroforezu se koristi 1xTAE pufer (40mM Tris, 20mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA). Elektroforeza se vrši pri naponu 7-10V/cm. Vizuelizacija DNK se omogućava dodavanjem etidijum bromida u gel (0,5 μ g/mL) i osvetljavanjem gela UV svetlošću.

2. 3. 5. Amplifikacija genoma

Amplifikacija genoma se vrši pomoću komercijalnog kita GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare). Metoda se zasniva na korišćenju polimeraze visoke preciznosti Phi29, koja ima sposobnost uklanjanja nosintetisanih lanaca sa DNK matrice, i heksamernih oligonukleotida, koji vezivanjem za nasumična mesta u genomu omogućavaju njegovo nespecifično umnožavanje (slika 8). Ova metoda se primenjuje za povećanje ukupne količine DNK u uzorcima koji je sadrže u maloj količini ili u tragovima (1ng/μL)



Slika 8. Shematski prikaz reakcije amplifikacije genoma

U 9μL Sample Buffer se dodaje 1μL rastvora DNK minimalne koncentracije 1ng/μL. Smeša se inkubira 3min na 95°C i potom ohladi na 4°C. U smešu se zatim dodaje 9μL Reaction Buffer i 1μL Enzyme Mix. Smeša se zatim inkubira 18h na 30°C, nakon čega se inkubira 10min na 65°C i potom čuva na 4°C.

2. 3. 6. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

Reakcija lančanog umnožavanja DNK (polymerase chain reaction - PCR) omogućava umnožavanje segmenta DNK definisanog oligonukleotidima koji su

komplementarni njegovim krajevima. Sastavi reakcionih smeša i uslovi umnožavanja korišćeni u ovom radu za pojedine fragmente dati su u tabeli 5.

Tabela 5. Sastavi smeša i uslovi reakcije lančanog umnožavanja DNK

FRAGMENT (DUŽINA)	ZAPREMINA I SASTAV REAKCIONE SMEŠE	USLOVI UMNOŽAVANJA
KRAS egzon 2 (157bp)	25 μ L 1X Reaction buffer B (Solis BioDyne) 2,5mM MgCl ₂ 0,2mM dNTP smeša po 5pmol oligonukleotida KRAS12 i KRAS12psm 1U FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne) 250ng DNK	94°C / 5min 35 ciklusa 94°C / 1min 55°C / 1min 72°C / 1min 72°C / 10min
SMAD4 nekodirajući egzon 1 (408bp)	25 μ L 1X Reaction buffer B (Solis BioDyne) 2,5mM MgCl ₂ 0,2mM dNTP smeša 10% DMSO po 10pmol oligonukleotida Hm1 i Hm2 2,5U FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne) 500ng DNK	95°C / 10min 40 ciklusa 95°C / 30sec 60°C / 45sec 72°C / 45sec 72°C / 10min
SMAD4 promotor (832bp)	50 μ L 1X GeneAmp PCR Gold Buffer (Applied Biosystems) 2,5mM MgCl ₂ 0,2mM dNTP smeša po 10pmol oligonukleotida P1X i P2H 2U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) 250ng DNK	94°C / 5min 35 ciklusa 94°C / 1min 55°C / 1min 72°C / 1min 72°C / 10min
deo SMAD4 promotora (153bp) obeležen bojom VIC	12,5 μ L 1X Reaction buffer B (Solis BioDyne) 2,5mM MgCl ₂ 0,2mM dNTP smeša po 2,5pmol oligonukleotida 15TF i 15Tv 0,5U FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne) 100ng DNK	94°C / 5min 40 ciklusa 94°C / 30sec 55°C / 30sec 72°C / 30sec 72°C / 10min
deo SMAD4 promotora (198bp) obeležen bojom 6-FAM	12,5 μ L 1X Reaction buffer for HotStar Taq (QIAGEN) 2,5mM MgCl ₂ 0,2mM dNTP smeša po 2,5pmol oligonukleotida 12TF i P2f 0,5U HotStar Taq DNA Polymerase (QIAGEN) 500ng DNK	94°C / 5min 40 ciklusa 94°C / 30sec 50°C / 30sec 72°C / 30sec 72°C / 10min
SMAD4 promotor (800bp) obeležen bojom 6-FAM	50 μ L 1X GeneAmp PCR Gold Buffer (Applied Biosystems) 2,5mM MgCl ₂ 0,2mM dNTP smeša po 10pmol oligonukleotida P1 i P2f 2U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) 250ng DNK	94°C / 5min 35 ciklusa 94°C / 1min 55°C / 1min 72°C / 1min 72°C / 10min

2. 3. 7. Digestija DNK restrikcionim enzimima

Digestija PCR fragmenta egzona 2 gena KRAS restrikcionim enzimom *Bst*NI radi detekcije mutacije u kodonu 12 se vrši u reakcionoj smeši od 20 μ L koja sadrži 15,5 μ L umnoženog fragmenta, 2 μ L 10X NE Buffer 2 (New England BioLabs), 2 μ L BSA (1mg/mL) i 0,5 μ L enzima *Bst*NI (10U/ μ L, New England BioLabs). Reakciona smeša se inkubira preko noći na 60°C.

Digestija genomske DNK restrikcionim enzimima *Msp*I i *Hpa*II radi detekcije metilacije u promotoru gena SMAD4 se vrši u reakcionoj smeši od 10 μ L koja sadrži 500ng genomske DNK, 1 μ L 10X Buffer Tango (Fermentas) i 0,5 μ L enzima *Msp*I ili *Hpa*II (10U/ μ L, Fermentas). Reakciona smeša se inkubira preko noći na 37°C.

Digestija plazmida pGEM sa insertom promotora gena SMAD4 i plazmida pGL4.10 restrikcionim enzimima *Hind*III i *Xho*I se vrši u reakcionoj smeši od 20 μ L koja sadrži 2 μ g plazmida, 2 μ L 10X NE Buffer 2 (New England BioLabs), 2 μ L BSA (1mg/mL), 1 μ L enzima *Hind*III (10U/ μ L, New England BioLabs) i 1 μ L enzima *Xho*I (10U/ μ L, New England BioLabs). Reakciona smeša se inkubira preko noći na 37°C.

2. 3. 8. Elektroforeza DNK u gelu od poliakrilamida

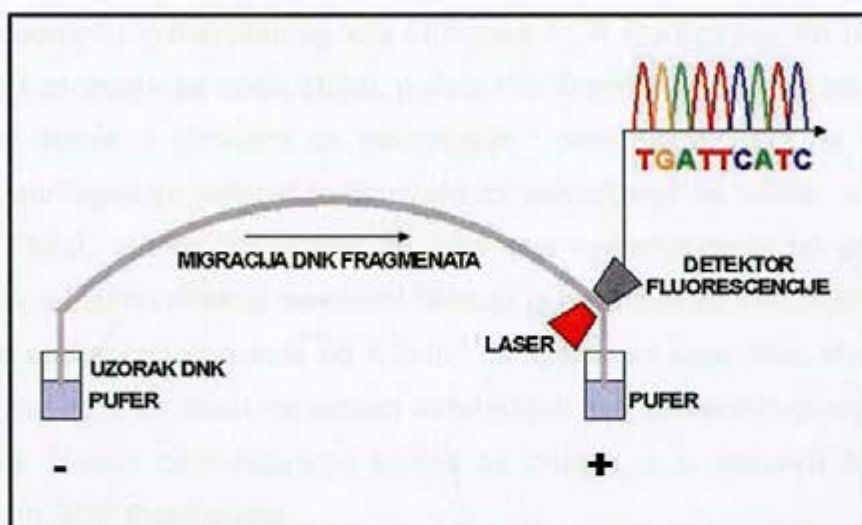
Za analizu produkata digestije PCR fragmenta gena KRAS radi detekcije mutacije u kodonu 12 koriste se nedenaturišući 10% poliakrilamidni gelovi (9,7% akrilamid, 0,3% N,N'-metilenbisakrilamid, 100mM Tris, 83mM borna kiselina, 1mM EDTA pH8, 0,1% amonijumpersulfat, 0,01% TEMED). Elektroforeza se vrši u 1xTBE puferu (100mM Tris, 83mM borna kiselina, 1mM EDTA pH8) pri naponu 10V/cm. Gelovi se po završenoj elektroforezi boje srebro-nitratom.

2. 3. 9. Bojenje DNK u gelu od poliakrilamida srebro-nitratom

Poliakrilamidni gelovi se po završenoj elektroforezi fiksiraju 20min u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline (98). Gelovi se boje 10min u 0,1% rastvoru srebronitrata, a potom dva puta isperu destilovanom vodom radi uklanjanja viška rastvora srebronitrata. Razvijanje se vrši 20min u rastvoru 1,5% natrijumhidroksida, 0,01% natrijumborhidrida i 0,048% formaldehida. Gelovi se potom drže 10min u rastvoru 0,75% natrijumkarbonata radi fiksiranja dobijenih traka.

2. 3. 10. Kapilarna elektroforeza DNK

Kapilarna elektroforeza DNK je znatno brža i jednostavnija za izvođenje od elektroforeze u gelu, jer se odvija pri daleko većoj voltaži, a vizualizacija DNK je zasnovana na laserskoj detekciji fluorofora kojima je DNK obeležena (slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz kapilarne elektroforeze

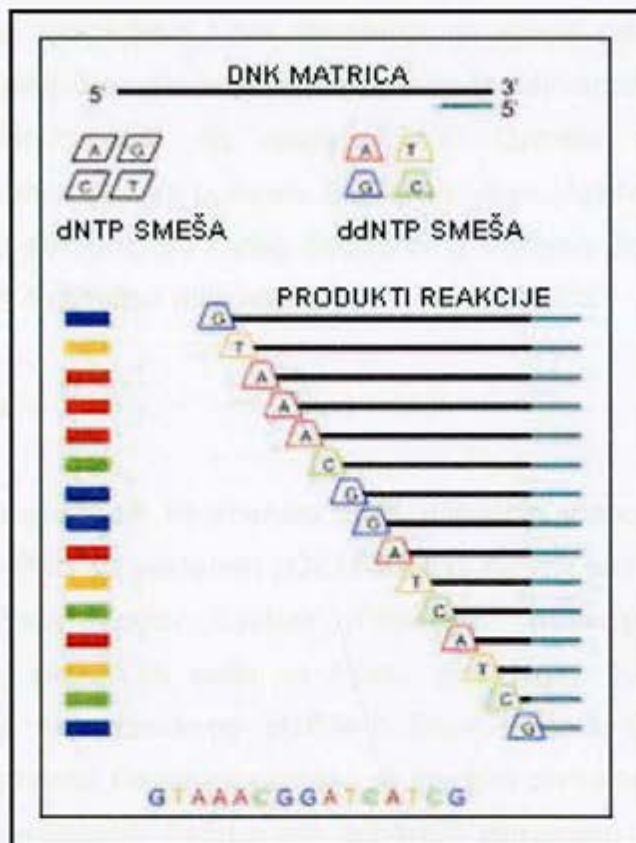
Fragmenti promotora gena SMAD4 umnoženi pomoću parova graničnika 15TF i 15Tv i 12TF i P2f, kao i prečišćeni fragmenti dobijeni nakon digestije dezoksiribonukleazom I analiziraju su kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pre elektroforeze uzorci se pripremaju mešanjem odgovarajuće količine uzorka ($1\mu\text{L}$ - $10\mu\text{L}$) sa $0,2\mu\text{L}$ GeneScan-500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) i $20\mu\text{L}$ HiDi Formamide (Applied Biosystems). Ovako pripremljeni uzorci se denaturišu inkubiranjem 3min na 95°C i potom čuvaju na ledu do nanošenja na aparat. Kapilarna elektroforeza se vrši u komercijalnom polimeru POP-7 (Applied Biosystems) u standardnim uslovima za G5 set fluorofora. Analiza dobijenih rezultata se vrši pomoću softvera GeneMapper Software Version 4.0 (Applied Biosystems) korišćenjem standardnog modula za genotipizaciju.

2. 3. 11. Prečišćavanje DNK fragmenata

Prečišćavanje PCR fragmenata promotora gena SMAD4 za sekvenciranje i ligaciju u pGEM T-Easy vektor, kao i produkata digestije dezoksiribonukleazom I se vrši pomoću komercijalnog kita QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). U $40\mu\text{L}$ PCR produkta se doda $200\mu\text{L}$ pufera PB. Smeša se nanese na prethodno sklopljene kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odliva, a na kolonu se sipa $750\mu\text{L}$ pufera PE. Zatim se vrše dva centrifugiranja od po 1min na 13000rpm, a nakon svakog se ukloni tečnost iz epruvete za sakupljanje. Kolona se potom prebaci na epruvetu od $1,5\text{mL}$ i na kolonu se sipa $30\mu\text{L}$ sterilne vode. Nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi vrši se centrifugiranje 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja kolona se odbaci, a u epruveti ostaje $30\mu\text{L}$ prečišćenih DNK fragmenata.

2. 3. 12. Sekvenciranje DNK

Redosled nukleotida u PCR fragmentu promotora gena SMAD4 umnoženog pomoću graničnika P1X i P2H, kao i fragmentima ukloniranim u vektor pGEM određuje se metodom sekvenciranja DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK sekvenaze da sintetiše komplementaran lanac DNK nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK. Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem didezoksiribonukleotida (ddNTP) koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK. Kao produkti reakcije sekvenciranja dobijaju se fragmenti DNK čije se dužine razlikuju za po 1 nukleotid, a koji se završavaju jednim od obeleženih dideoksinukleotida (slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz reakcije sekvenciranja DNK

Za sekvenciranje se koristi BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Kao matrica u reakciji sekvenciranja se koristi prečišćena dvolančana DNK dobijena u reakciji lančanog umnožavanja ili prečišćena plazmidna DNK. Odgovarajuća količina prečišćenog PCR produkta (1-2ng/100bp) ili plazmida (150-300ng) pomeša se sa 3,2pmol jednog od oligonukleotida kojim je vršeno umnožavanje u zapremini od 5 μ L. U smešu se zatim doda 3 μ L BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix. Nakon inicijalne denaturacije fragmenta od 1min na 96°C i 25 ciklusa umnožavanja: 10sec na 96°C, 5sec na 50°C i 4min na 60°C, produkti reakcije sekvenciranja se precipitiraju pre nanošenja na aparat. U 8 μ L smeše u kojoj je vršena reakcija sekvenciranja doda se 40 μ L 0,1M Na-acetata pH5,2 rastvorenog u etanolu, centrifugira se 10min na 13000rpm i ukloni supernatant. Talog se zatim ispere dva puta sa po 200 μ L 70% etanola, a nakon svakog ispiranja smeša se centrifugira 10min na 13000rpm i supernatant ukloni. Talog se suši nekoliko minuta na sobnoj temperaturi i pre nanošenja na aparat rastvori u 25 μ L Hi-Di Formamide (Applied Biosystems). Produkti reakcije sekvenciranja se analiziraju kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) u komercijalnom polimeru POP-7 Polymer (Applied Biosystems). Za analizu dobijenih sekvenci se koristi Sequencing Analysis Software v5.3.1 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems).

2. 3. 13. Ligacija

Ligacija prečišćenih fragmenata DNK dobijenih umnožavanjem pomoću graničnika P1X i P2H sa vektorom pGEM-T Easy se vrši pomoću komercijalnog kita pGEM-T Easy Vector System (Promega). Reakcija ligacije ukupne zapremine 10 μ L sadrži 1X pufer za ligazu (Promega), 1 μ L ligaze (10U/ μ L, Promega), 50ng linearizovanog pGEM-T Easy vektora (Promega) i 40ng prečišćenog fragmenta. Reakciona smeša se inkubira preko noći na 4°C.

Ligacija prečišćenih fragmenata dobijenih isecanjem inserta iz pGEM-T Easy vektora sa vektorom pGL4.10[luc2] vrši se pomoću enzima T4 ligaze.

Reakcija ligacije ukupne zapremine 20 μ L sadrži 1X pufer za ligazu (New England BioLabs), 10U T4 ligaze (New England BioLabs), 50ng linearizovanog pGL4.10[luc2] vektora i 40ng prečišćenog inserta isečenog iz vektora pGEM-T Easy. Reakcija se odvija preko noći na 16°C.

2. 3. 14. Kultivacija bakterija

Bakterije soja XL1-Blue *E. coli* se gaje na 37°C u hranljivom medijumu LB u tečnim bakterijskim kulturama uz aeraciju ili na čvrstoj podlozi (99). Tečni medijum LB sadrži 1% tripton, 0,5% ekstrakt kvasca i 0,5% NaCl, a čvrstu podlogu za gajenje bakterija čine medijum LB i 1,5% agar. Prilikom gajenja bakterija na selektivnoj podlozi u čvrstu podlogu i medijum LB se dodaje odgovarajući antibiotik.

2. 3. 15. Priprema kompetentnih ćelija za transformaciju toplotnim šokom

Kompetentne ćelije za transformaciju toplotnim šokom se pripremaju iz 400mL tečne kulture bakterija u logaritamskoj fazi rasta (100). Po 200mL tečne kulture se centrifugira 10min na 3000rpm i 4°C. Supernatanti se odbace, a talozi se resuspenduju u po 5mL ohlađenog 0,1M CaCl₂. Nakon inkubacije od 15min na ledu i centrifugiranja 10min na 3000rpm i 4°C, supernatanti se odbace, a talozi rastvore u po 1mL pufera RF2 (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% glicerol, pH6,8). Nakon inkubacije od 15min na ledu rastvori kompetentnih bakterijskih ćelija se alikvotiraju i čuvaju na -80°C.

2. 3. 16. Transformacija bakterija toplotnim šokom

Rastvor svežih kompetentnih ćelija (200 μ L) se pomeša sa 5 μ L produkta reakcije ligacije, pa se smeša dalje inkubira 1h na ledu (101). Nakon toga, smeša se inkubira najpre 2min na 42°C, a potom 5min ponovo na ledu. Na selektivnu

podlogu se zatim razmaže svih 200 μ L smeše. Nakon prekonoćne inkubacije na 37°C, transformanti se uočavaju kao pojedinačne kolonije.

2. 3. 17. Izolacija plazmidne DNK

Izolacija plazmidne DNK iz bakterija se vrši pomoću komercijalnog kita QIAprep MiniPrep Kit (Qiagen). Bakterijske ćelije iz kojih se vrši izolacija plazmidne DNK se talože u epruveti od 1,5mL u tri centrifugiranja od po 1min na 13000rpm iz 4,5mL prekonoćne bakterijske kulture. Talog se resuspenduje u 250 μ L pufera P1, a zatim se doda 250 μ L pufera P2, nakon čega se epruvete blago mućkaju. U smešu se zatim doda 350 μ L pufera N3 i epruvete se blago promućkaju, a potom centrifugiraju 10min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja supernatant se prebaci na prethodno sklopljene kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odlije, a na kolonu se sipa 500 μ L pufera PB i epruveta centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odlije, a kolona se ispira sa 750 μ L pufera PE. Zatim se vrše dva centrifugiranja od po 1min na 13000rpm, a nakon svakog se uklanja tečnost iz epruvete za sakupljanje. Kolona se potom prebaci na epruvetu od 1,5mL i na kolonu se sipa 50 μ L sterilne vode. Elucija DNK se nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi vrši centrifugiranjem 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja kolona se odbaci, a u epruveti ostaje 50 μ L prečišćene plazmidne DNK.

2. 3. 18. Prečišćavanje DNK fragmenata iz gela od agaroze

Inserti isečeni restrikcionim enzimima *Hind*III i *Xho*I iz vektora pGEM-T Easy se prečišćavaju iz gela od agaroze pomoću komercijalnog kita QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Produkti digestija plazmida enzimima *Hind*III i *Xho*I razdvajaju se elektroforezom u 2% gelu od agaroze koja teče u 0,25xTBE puferu (25mM Tris, 20mM borna kiselina, 0,25mM EDTA pH8) pri naponu 10V/cm. Vizuelizacija se vrši dodavanjem boje kristal violet u gel i pufer (2 μ g/mL). Trake

odgovarajuće dužine (820bp) se iseke iz gela i prebace u epruvete od 1,5mL, u kojima se potom meri masa agaroze. U epruvetu se zatim doda 3 zapremine pufera QG i smeša se inkubira na 50°C, 10 minuta ili do potpunog rastvaranja agaroze, uz povremeno vorteksovanje. Smeša se zatim nanese na prethodno sklopljene kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odlije, a na kolonu se sipa 750 μ L pufera PE. Zatim se vrše dva centrifugiranja od po 1min na 13000rpm, a nakon svakog se ukloni tečnost iz epruvete za sakupljanje. Kolona se potom prebaci na epruvetu od 1,5mL i na kolonu se sipa 30 μ L sterilne vode. Nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi vrši se centrifugiranje 1min na 13000rpm.

2. 3. 19. Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi

Plazmidne DNK iz bakterija u kojima je propagiran vektor pGL4.10[luc2] sa odgovarajućim insertom pripremaju se za transfekciju ćelija u kulturi pomoću komercijalnog kita EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Bakterijska kolonija sa petri šolje se zaseje u 5mL LB medijuma sa 5 μ L rastvora antibiotika ampicilina (100mg/mL) i gaji 8h na 37°C na 300rpm. Alikovot osmočasovne bakterijske kulture od 200 μ L se zaseje u 100mL LB medijuma, pa se bakterije potom gaje 16h na 37°C na 300rpm. Bakterijska kultura se zatim centrifugira 15min na 4°C na 3000rpm i supernatant odbaci. Talog se resuspenduje u 10mL pufera P1, zatim se doda 10mL pufera P2, uz blago mućkanje. Nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi, doda se 10mL pufera P3, smeša blago promućka i potom prebaci na prethodno pripremljeni Qiafilter Cartridge. Nakon inkubacije od 10min na sobnoj temperaturi, lizat bakterijskih ćelija se profiltrira pomoću Qiafilter Cartridge u epruvetu od 50mL. U profiltrirani lizat se zatim doda 2,5mL pufera ER i, nakon blagog mućkanja, smeša se inkubira 30min na ledu. Smeša se zatim prebaci na Qiagen-tip 500, koji je prethodno pripremljen ispiranjem sa 10mL pufera QBT. Nakon propuštanja smeše, Qiagen-tip 500 se ispere dva puta sa po 30mL pufera QC. Qiagen-tip 500 se zatim prebaci u odgovarajuću tubu za

centrifugiranje i potom ispere sa 15mL pufera QN. U rastvor dobijen eluiranjem sa Qiagen-tip 500 se doda 10,5mL izopropanola i smeša se, nakon blagog mućkanja, centrifugira 30min na 4°C na 8000rpm. Nakon pažljivog odlivanja supernatanta, talog se pere u 5mL 70% etanola i centrifugira 10min na 4°C na 8000rpm. Pošto se ukloni supernatant, preostali talog se osuši na sobnoj temperaturi, a potom rastvori u 500µL pufera TE.

2. 3. 20. Kultivacija humanih ćelijskih linija

Za gajenje ćelijskih linija SaOS-2, NTERA-2, K562 i HeLa se koristi medijum DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) obogaćen fetalnim goveđim serumom (FBS, Fetal Bovine Serum, PAA) i sa dodatkom 0,05mg/mL gentamicina. Ćelije SaOS-2 se održavaju u medijumu DMEM sa 20% FBS, dok se ćelije NTERA-2, K562 i HeLa gaje u medijumu DMEM sa 10% FBS. Ćelije NTERA-2 se gaje u prisustvu 2mM l-glutamina (Gibco BRL), a ćelije HeLa u prisustvu 1X neesencijalnih aminokiselina (PAA). Sve ćelijske linije se gaje u inkubatoru na 37°C i sa automatskim protokom 5% CO₂, u plastičnim sudovima površine 175cm² do približno 75% konfluentnosti.

2. 3. 21. Transfekcija humanih ćelijskih linija

Transfekcija se vrši pomoću reagensa Superfect (Qiagen), prema priloženom uputstvu proizvođača. Za transfekcije se koristi 5x10⁴ ćelija SaOS-2 koje se gaje u plastičnim sudovima površine 3,9cm² u medijumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) obogaćenom sa 20% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Fetal Bovine Serum, PAA) i u prisustvu 0,05mg/mL gentamicina. Nakon 24h gajenja vrše se kotransfekcije ćelija sa 480ng plazmida pGL4.10[luc2] sa odgovarajućim insertom i 30ng plazmida pGL4.70[hRluc]. Nakon što se DNK i Superfect u odnosu 1µg:5µL pomešaju sa rastvorom DMEM u zapremini od 75µL, smeša se vorteksuje 10sec i inkubira 10min na sobnoj temperaturi. U međuvremenu se ćelije operu puferom PBS (137mM NaCl,

3,375mM KCl, 1,76mM KH_2PO_4 , 10mM Na_2HPO_4). Formiranje kompleksa između DNK i reagensa Superfect se nakon 10min prekine dodavanjem 400 μL medijuma u smešu, nakon čega se smeša doda u ćelije. Nakon transfekcije ćelije se gaje naredna 3h, potom se doda još po 1mL medijuma u svaki sud i ćelije gaje dalje do isteka 24h od transfekcije.

2. 3. 22. Priprema ćelijskih ekstrakata

Priprema ćelijskih ekstrakata se vrši pomoću komercijalnog pufera za lizu Passive Lysis Buffer (Promega), prema uputstvu proizvođača. Nakon 24h od transfekcije ćelije se isperu dva puta u po 1mL kompletnog pufera PBS (137mM NaCl, 3,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4 , 10,1mM Na_2HPO_4 , 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2). Nakon dodavanja 200 μL 1X Passive Lysis Buffer (Promega) ćelije se inkubiraju 30min na ledu. Nakon inkubacije dobijeni ćelijski ekstrakti se sakupljaju u epruvete od 1,5mL i centrifugiraju 30sec na 13000rpm. Supernatanti koji sadrže proteine ćelijskih ekstrakata se prebace u epruvete od 1,5mL i čuvaju na -80°C .

2. 3. 23. Luciferazni esej

Merenje aktivnosti produkata gena luc2 i hRluc u ćelijama SaOS-2 transfekovanim plazmidima pGL4.10[luc2] sa odgovarajućim insertom i pGL4.70[hRluc] se vrši pomoću komercijalnog kita DualGlo Luciferase Assay (Promega) na aparatu GloMax 20/20 Luminometer (Promega). Metoda se zasniva na merenju aktivnosti luciferaze svica (gen [luc2]) i luciferaze renile (gen [hRluc]) u istom uzorku. Aktivnost navedenih enzima dovodi do hemijskih reakcija u kojima se emituje svetlost, čiji se intenzitet meri pomoću luminometra. Prvo se meri aktivnost luciferaze svica dodavanjem reagensa LAR II (Luciferase Assay Reagent II), u kome se nalazi luciferin koji luciferaza svica prevodi u oksiluciferin uz emitovanje svetlosti, čime se generiše stabilan luminescentni signal. Ovaj signal se gasi dodavanjem reagensa STOP & Glo Reagent, u kome se nalazi celenterazin koji luciferaza renile prevodi u celenteramid uz emitovanje

svetlosti, čime se ujedno generiše signal za merenje luciferaze renile, koji se sam postepeno gasi tokom merenja. Analiza se vrši na uzorku od 10 μ L ćeljskih ekstrakata pripremljenih u Passive Lysis Buffer, a za merenje se koristi po 50 μ L reagenasa LAR II i STOP & Glo Reagent.

2. 3. 24. Izolacija jedarnih proteina

Izolacija jedarnih proteina koji se koriste za zaštitu fragmenta DNK u dezoksiribonukleaznom eseju se vrši pomoću komercijalnog kita ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas). Ćelijske linije SaOS-2, NTERA-2, K562 i HeLa iz kojih se izoluju jedarni proteini se gaje 24h u plastičnim sudovima površine 150mm². Nakon uklanjanja medijuma ćelije se operu dva puta u po 10mL kompletnog pufera PBS (137mM NaCl, 3,7mM KCl, 1,8mM KH₂PO₄, 10,1mM Na₂HPO₄, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) i sakupe u epruvete od 15mL. Nakon centrifugiranja 5min na 250g i odbacivanja supernatanta proceni se zapremina taloga ćelija, u koji se zatim doda 10 zapremina Cell Lysis Buffer. Smeša se zatim vorteksuje 10sec, inkubira na ledu 10min, ponovo vorteksuje 10sec i zatim centrifugira 17min na 500g na 4°C. Nakon odvajanja supernatanta, u kome se nalaze citoplazmatični proteini, talog jedara se dva puta opere na ledu. Pranje jedarnog taloga podrazumeva dodavanje 500 μ L Nuclei Washing Buffer, blago vorteksovanje, inkubaciju 2min na ledu, centrifugiranje 7min na 500g na 4°C i odbacivanje supernatanta. Na oprani talog se zatim doda 150 μ L ledenog Nuclei Storage Buffer i smeša promeša pipetiranjem nekoliko puta. Nakon dodavanja 1/10 zapremine Nuclei Lysis Reagent smeša se blago vorteksuje i potom inkubira 15min na 4°C i 1200rpm. Nakon centrifugiranja 5min na 20000g i 4°C odvoji se supernatant, u kome se nalaze jedarni proteini, i čuva na -80°C.

2. 3. 25. Dezoksiribonukleazni esej

Dezoksiribonukleazni esej se zasniva na zaštiti određenog fragmenta DNK proteinima i digestiji nezaštićenih regiona dezoksiribonukleazom I (102). Reakciona smeša sadrži sledeće komponente: prečišćen fragment promotora gena SMAD4 dobijen umnožavanjem pomoću graničnika P1 i P2f (50ng), pufer A (4% glicerol, 10mM Tris pH7,5, 1mM MgCl₂, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTT, 50mM NaCl), polydIdC (1µg/µL) i jedarne proteine (100mg). Reakciona smeša se inkubira 1h na 37°C, kako bi se omogućilo vezivanje proteina za fragment DNK, nakon čega se u reakciju doda 0,005U dezoksiribonukleaze I. Nakon inkubacije od 15sec na ledu, dezoksiribonukleaza I se inaktivira inkubiranjem reakcione smeše 10min na 75°C. U kontrolnoj reakciji koristi se albumin goveđeg seruma (BSA, Bovine Serum Albumin, New England BioLabs) umesto jedarnih proteina. Nakon prečišćavanja, produkti digestije dezoksiribonukleazom I se analiziraju pomoću kapilarne elektroforeze.

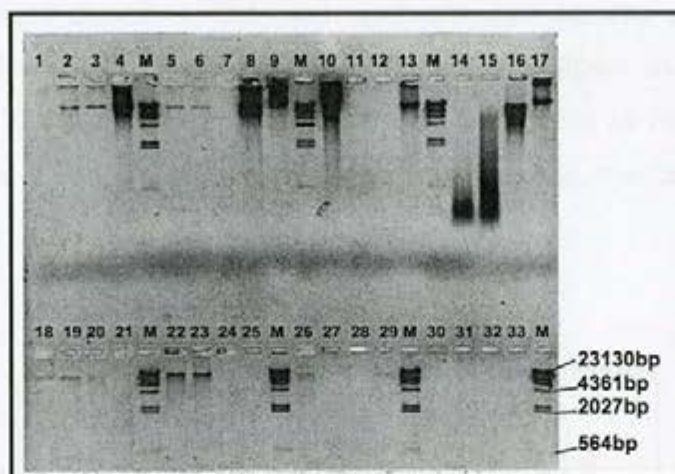
2. 3. 26. Statistička analiza

Statistička analiza se vrši pomoću softvera Statistical Package for Social Sciences (SPSS) verzija 10. Razlike u učestalosti pojedinih kliničkih parametara i otkrivenih genetskih varijanti među analiziranim grupama se testiraju korišćenjem χ^2 testa. Razlike u aktivnosti analiziranih promotorskih konstrukata se testiraju korišćenjem nezavisnog t-testa. Statistički značajne su vrednosti $p < 0.05$.

3. REZULTATI

3. 1. Izolacija DNK iz tkiva pankreasa i periferne krvi

Uzorci tkiva pankreasa pripremani su za izolaciju DNK u zavisnosti od tipa uzorka. Parafinski kalupi su podvrgavani proceduri deparafinizacije tkiva, dok su uzorci svežih tkiva čuvani u rastvoru 0,9% NaCl, nakon čega je DNK izolovana iz tkiva pankreasa fenol-hloroformskom metodom. Kvalitet i prinos DNK izolovanih iz tkiva pankreasa analizirani su elektroforezom u 1% gelu od agaroze (slika 11). Izolacija DNK iz periferne krvi je vršena komercijalnim kitom, a prosečan prinos je 100ng/μL.



Slika 11. Analiza uzoraka DNK elektroforezom u 1% gelu od agaroze

M – DNK marker *NHindIII*

1-13 i 18-29 - DNK izolovane iz svežih tkiva karcinoma pankreasa

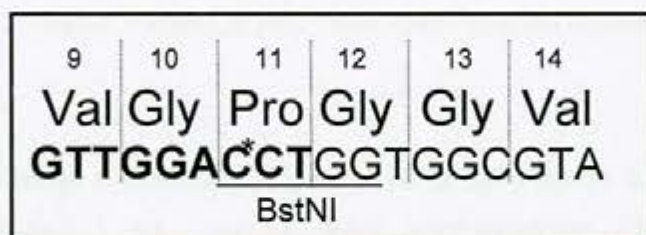
14-17 i 30-33 - DNK izolovane iz parafinskih kalupa karcinoma pankreasa

Uzorci DNK izolovani iz svežih tkiva karcinoma pankreasa bili su zadovoljavajućeg prinosa i kvaliteta i dalje su korišćeni direktno u reakciji

lančanog umnožavanja DNK. U uzorcima DNK izolovanim iz parafinskih kalupa karcinoma pankreasa DNK je u većini uzoraka bila fragmentirana (uzorci 14 i 15 na slici 11) i/ili prisutna u relativno maloj količini (uzorci 30-33 na slici 11), pa su ovi uzorci pre reakcije lančanog umnožavanja DNK najpre podvrgavani amplifikaciji genoma.

3. 2. Analiza mutacije u kodonu 12 gena KRAS

Prisustvo mutacije u kodonu 12 gena KRAS je analizirano u svim uzorcima tkiva karcinoma pankreasa i kolorektalnog kancera metodom specifične mutageneze posredstvom PCR reakcije (PCR-mediated site-directed mutagenesis, PSM), u kojoj se koriste graničnici dizajnirani tako da uvode mesta prepoznavanja za restrikcioni enzim *Bst*NI na oba kraja fragmenta. Amplifikacija je vršena pomoću graničnika KRAS12 i KRAS12psm, pomoću kojih se umnožava fragment dužine 157bp, koji obuhvata deo egzona 2 gena KRAS u kome se nalazi kodon 12. Graničnici KRAS12 i KRAS12psm uvode restrikciona mesta za enzim *Bst*NI na oba kraja umnoženog fragmenta za normalni alel, dok prisustvo mutacije u kodonu 12 ukida jedno od uvedenih mesta prepoznavanja (slika 12).



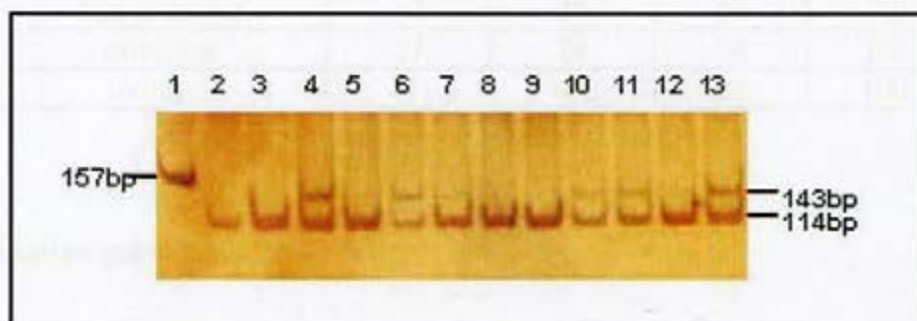
Slika 12. Deo sekvence graničnika KRAS12psm i umnoženog fragmenta gena KRAS u okviru kojih se nalaze mesto prepoznavanja za enzim *Bst*NI i mutacija u kodonu 12

9-14 – broj odgovarajućeg kodona u proteinu KRAS

* - izmenjen nukleotid u sekvenci graničnika KRAS12psm

BstNI – mesto prepoznavanja za restrikcioni enzim *Bst*NI

Fragmenti dobijeni amplifikacijom podvrgnuti su digestiji enzimom *Bst*NI. Produkt umnožavanja normalnog alela sečenjem daje fragmente od 114bp, 29bp i 14bp, dok produkt umnožavanja mutiranog alela ostaje nesečen na jednom od dva mesta prepoznavanja za enzim *Bst*NI i daje fragmente od 143bp i 14bp. Produkti digestije analizirani su elektroforezom u 10% gelu od poliakrilamida i vizuelizovani bojenjem srebro-nitratom. Pod datim uslovima elektroforeze na gelovima se u uzorcima u kojima je mutacija prisutna uočavaju trake od 143bp i 114bp, dok se u uzorcima u kojima mutacija nije prisutna uočava samo traka od 114bp (sika 13).



Slika 13. Analiza prisustva mutacije u kodonu 12 gena KRAS u 10% gelu od poliakrilamida

1 – nesečeni PCR fragment

2, 3, 5, 8, 9, 12 – uzorci u kojima nije prisutna mutirana varijanta kodona 12 gena KRAS

4, 6, 7, 10, 11, 13 – uzorci u kojima je prisutna mutirana varijanta kodona 12 gena KRAS

Analiza mutacije u kodonu 12 gena KRAS izvršena je u 50 uzoraka tkiva karcinoma pankreasa i 50 uzoraka tkiva kolorektalnog kancera. Prisustvo mutacije u kodonu 12 gena KRAS utvrđeno je u 74% slučajeva u karcinomu pankreasa i u 28% slučajeva u kolorektalnom kanceru. Analiza mutacije u kodonu 12 gena KRAS izvršena je takođe i u pet uzoraka tkiva pankreasa uzetih od ispitanika za koje histopatološki nije potvrđena dijagnoza karcinoma pankreasa. Od pet analiziranih uzoraka nemalignog tkiva pankreasa mutacija je

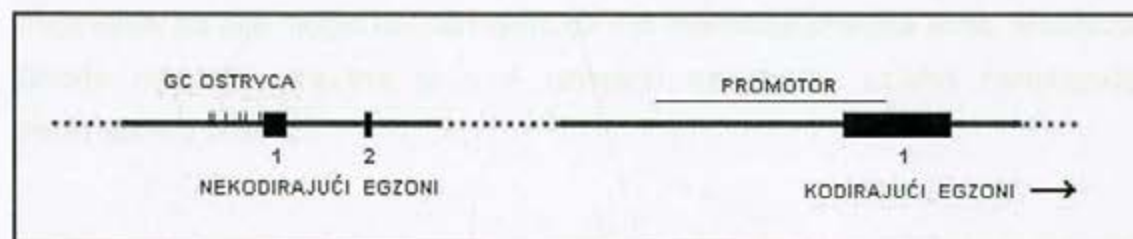
bila prisutna u dva slučaja cistične distrofije pankreasa, dok nije bila prisutna u slučaju benignog tumora pankreasa i dva slučaja hroničnog pankreatitisa. U dva kontrolna uzorka DNK kolorektalnog kancera koji sadrže mutacije u genu SMAD4 nije otkriveno prisustvo mutacije u kodonu 12 gena KRAS. Rezultati analize mutacije u kodonu 12 gena KRAS u malignim tkivima su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Distribucija mutacije u kodonu 12 gena KRAS u karcinomu pankreasa i kolorektalnom kanceru

mutacija u kodonu 12 gena KRAS	karcinom pankreasa		kolorektalni kancer	
	broj	%	Broj	%
nije prisutna	13	26	36	72
prisutna	37	74	14	28
ukupno	50	100	50	100

3. 3. Analiza gena SMAD4

Analiza gena SMAD4 je obuhvatila dva potencijalno značajna regiona u 5' nekodirajućem delu gena: okolinu prvog nekodirajućeg egzona bogatu GC ostrvcima i promotorski region u okolini prvog kodirajućeg egzona (slika 14). U okolini prvog nekodirajućeg egzona analizirano je prisustvo metil grupa na šest GC ostrvaca neposredno ispred egzona. Analiza promotorskog regiona u okolini prvog kodirajućeg egzona obuhvata strukturnu i funkcionalnu analizu fragmenta dužine 800bp u okviru koga se nalazi bazalni promotor.



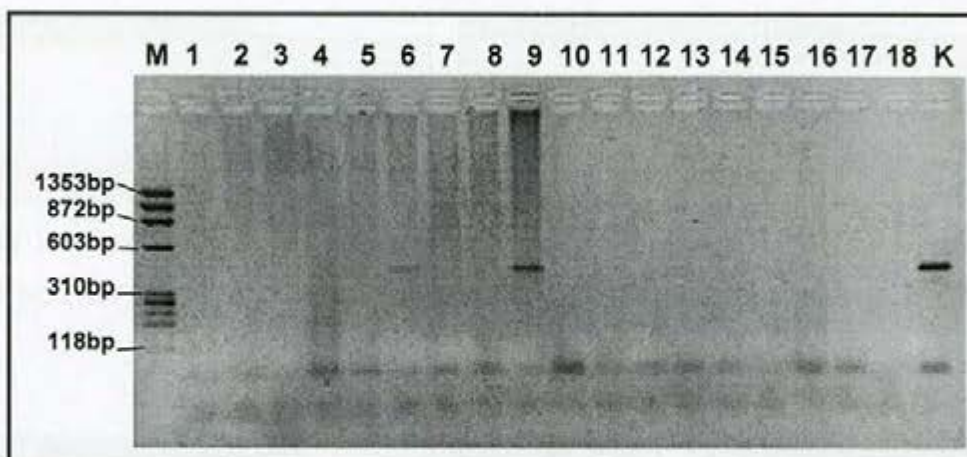
Slika 14. Shematski prikaz 5' nekodirajućeg regiona gena SMAD4

3. 3. 1. Analiza metilacije u nekodirajućem egzonu 1 gena SMAD4

Metilacioni status 5' regulatornog regiona gena SMAD4 analiziran je pomoću restrikcionih enzima *HpaII* i *MspI*, koji imaju isto mesto prepoznavanja (CCGG), ali se razlikuju po osetljivosti na prisustvo metil-grupa u DNK. Analizirani segment DNK obuhvata region bogat GC ostrvcima u okolini nekodirajućeg egzona 1 gena SMAD4 (103). U prisustvu metilacije na GC ostrvcima u pomenutom regionu *HpaII* enzim, koji je osetljiv na metilaciju, ne može da izvrši sečenje DNK, dok *MspI* enzim, koji je neosetljiv na metilaciju, može.

U kontrolnim reakcijama, u kojima se kao matrica za umnožavanje koristi genomska DNK koja je inkubirana bez enzima, pomoću graničnika Hm1 i Hm2 umnožava se fragment dužine 408bp. U reakcijama u kojima se kao matrica za umnožavanje koristi DNK inkubirana sa enzimom *MspI* dolazi do sečenja DNK i nema umnožavanja fragmenta. U reakcijama u kojima se kao matrica za umnožavanje koristi DNK inkubirana se enzimom *HpaII* do sečenja DNK dolazi u zavisnosti od metilacionog statusa GC ostrvaca u fragmentu, odnosno do umnožavanja dolazi samo ukoliko je metilacija prisutna i nije došlo do sečenja. Deo rezultata analize prisustva metilacije u 5' regulatornom regionu gena SMAD4 prikazan je na slici 15.

Analiza prisustva metil-grupa u nekodirajućem egzonu 1 gena SMAD4 uspešno je izvršena u 17 uzoraka DNK izolovanih iz svežih tkiva karcinoma pankreasa (34%) i nije otkrivena ni u jednom od analiziranih slučajeva. Za preostala 33 uzorka (66%) u kontrolnim reakcijama u kojima su kao polazne matrice korišćene nesečene genomske DNK nije došlo do umnožavanja fragmenta, pa nije moglo biti određeno da li je metilacija prisutna ili ne. Metilacija takođe nije bila prisutna ni u 4 uspešno analizirana uzorka nemalignog pankreasnog tkiva.



Slika 15. Analiza PCR produkata dobijenih umnožavanjem pomoću graničnika

Hm1 i Hm2 u 2% gelu od agaroze

M – DNK marker Φ X/HaeIII

1, 4, 7, 10, 13, 16 – DNK sečena enzimom *MspI*

2, 5, 8, 11, 14, 17 – DNK sečena enzimom *HpaII*

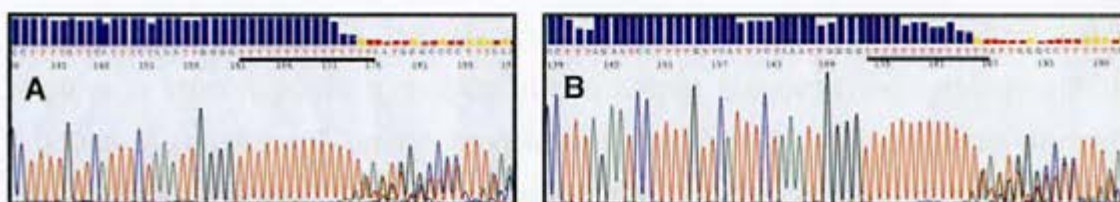
3, 6, 9, 12, 15, 18 – nesečena DNK

K – kontrolna DNK

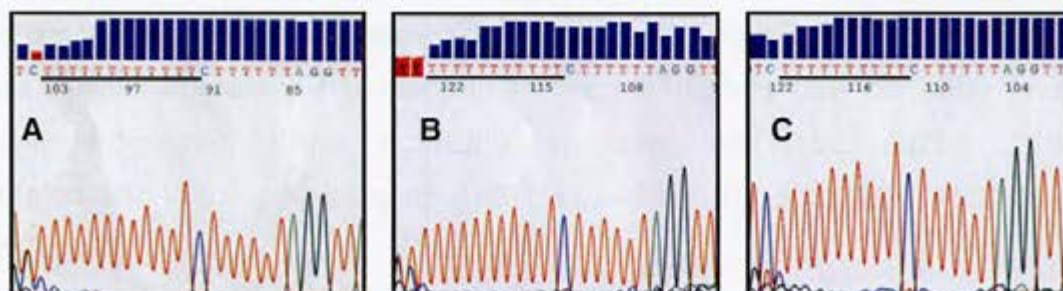
3. 3. 2. Analiza strukture promotora gena SMAD4

Strukturna analiza promotora gena SMAD4 vršena je sekvenciranjem DNK. Segment DNK dužine 800bp (-668bp do +131bp) umnožen je pomoću graničnika P1X i P2H. Prečišćeni produkti umnožavanja sekvencirani su u dve odvojene reakcije, a u svakoj je korišćen po jedan od graničnika kojima je vršeno umnožavanje. Prisustvo promena u odnosu na normalnu genetsku varijantu analizirano je u regionu -620bp do +80bp.

U analiziranom regionu promotora gena SMAD4 uočena su dva polimorfna niza timina na pozicijama -462 i -4, koji su se u analiziranim uzorcima tkiva pankreasa razlikovali u odnosu na normalne genetske varijante, -462T(15) i -4T(12). Pošto uzorci karcinoma predstavljaju genetski heterogenu populaciju ćelija, u svakom uzorku je određivano prisustvo najzastupljenije varijante. Osim normalnih varijanti -462T(15) i -4T(12), u tkivu karcinoma pankreasa je otkriveno i prisustvo varijanti -462T(14), -4T(11) i -4T(10) (slike 16 i 17).



Slika 16. Rezultati sekvenciranja regiona promotora gena SMAD4 u kome se nalazi polimorfizam -462T(15) u uzorcima u kojima su najzastupljenije varijante -462T(15) (A) i -462T(14) (B)



Slika 17. Rezultati sekvenciranja regiona promotora gena SMAD4 u kome se nalazi polimorfizam -4T(12) u uzorcima u kojima su najzastupljenije varijante -4T(12) (A), -4T(11) (B) i -4T(10) (C)

Analize DNK sekvenci ukazuju da je u oba polimorfna regiona u karcinomu pankreasa prisutan fenomen mikrosatelitne nestabilnosti. U većini uzoraka detektovano je u tragovima prisustvo varijanti kraćih za po 1-3bp u odnosu na najzastupljeniju varijantu. Zbog fenomena mikrosatelitne nestabilnosti metodom sekvenciranja nije bilo moguće precizno odrediti koje varijante polimorfizama -462T(15) i -4T(12) su najzastupljenije u analiziranim uzorcima tkiva karcinoma pankreasa, pa je određivanje varijanti izvršeno metodom analize fragmenata.

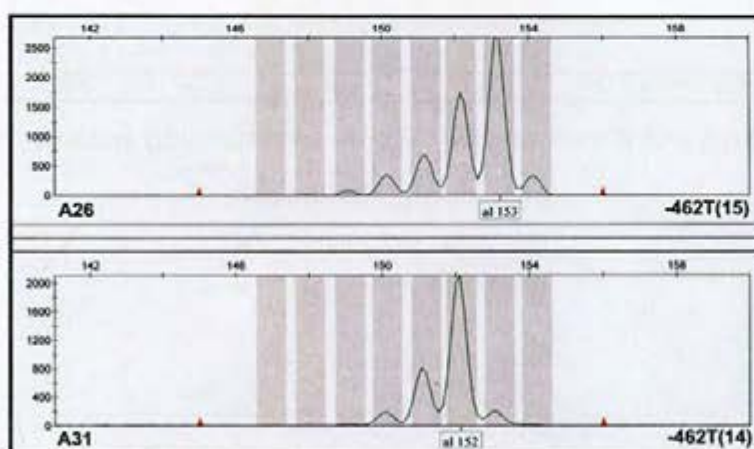
3. 3. 3. Analiza polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u promotoru gena SMAD4

Analiza varijanti polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u uzorcima tkiva i periferne krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa, kao i tkiva i periferne krvi

ispitanika sa kolorektalnim kancerom vršena je PCR metodom. Amplifikacija ovih regiona je vršena pomoću graničnika obeleženih fluoroforama, a dobijeni PCR produkti su analizirani kapilarnom elektroforezom. Prisustvo pojedinih varijanti određivano je pomoću softvera za genotipizaciju. Na svim slikama na kojima su prikazani rezultati analize fragmenata sa leve strane je označen broj uzorka, a sa desne dobijeni rezultat, koji predstavlja najčešću detektovanu varijantu ukoliko se radi o tkivu, odnosno detektovan genotip ukoliko se radi o perifernoj krvi.

Analiza polimorfizma -462T(15) je vršena pomoću graničnika obeleženog bojom VIC, a produkti su detektovani u rasponu dužina od 147bp do 154bp (x osa elektroferograma) i u rasponu intenziteta signala 250 do 4000 (y osa elektroferograma). Osim normalne varijante -462T(15), dužine 153bp, detektovano je još pet varijanti: -462T(16), -462T(14), -462T(12), -462T(10) i -462T(9).

U tkivu karcinoma pankreasa u 6% uzoraka je detektovana normalna varijanta -462T(15), a u preostalih 94% uzoraka varijanta -462T(14). Deo rezultata analize polimorfizma -462T(15) u uzorcima tkiva karcinoma pankreasa je prikazan na slici 18.

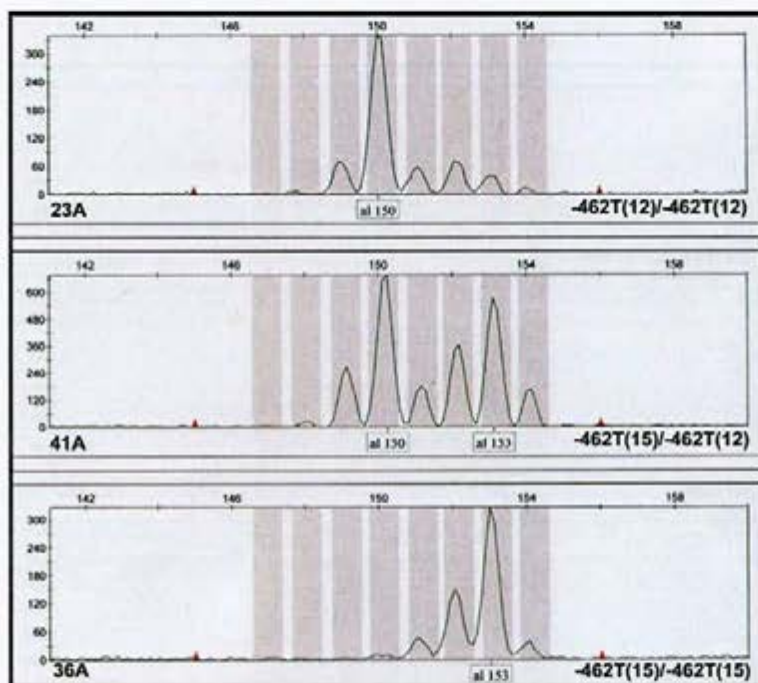


Slika 18. Analiza polimorfizma -462T(15) u tkivu karcinoma pankreasa

al153 – varijanta -462T(15)

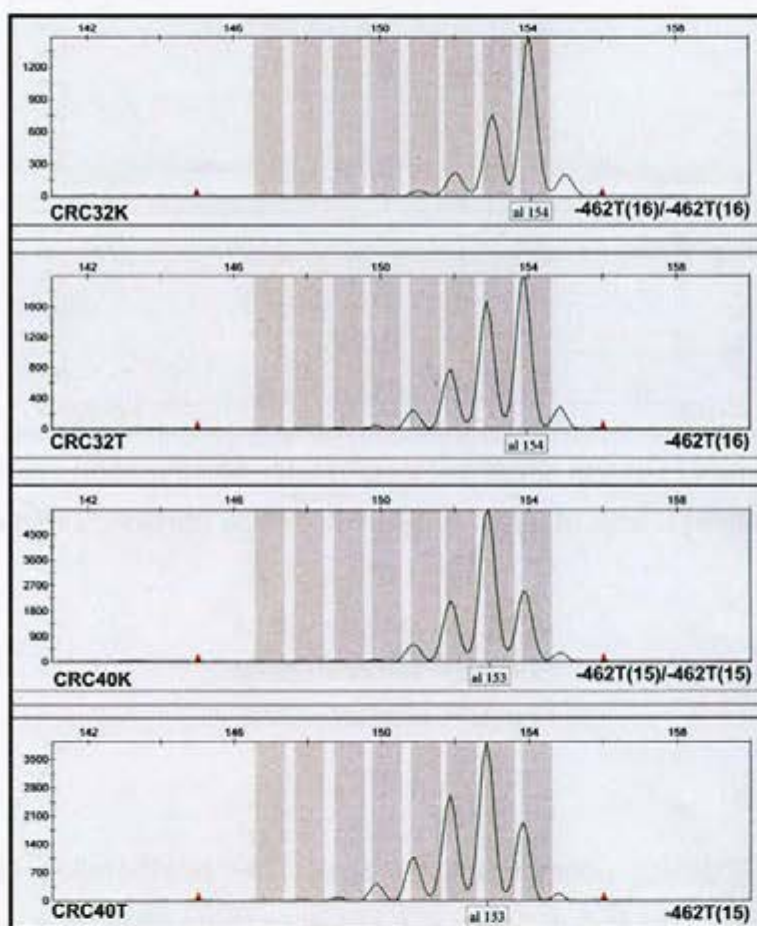
al152 – varijanta -462T(14)

U perifernoj krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa na 85% analiziranih alela je bila prisutna normalna varijanta -462T(15), a na 15% varijanta -462T(12). Tri ispitanika su bili heterozigoti za varijante -462T(15) i -462T(12), dok su ostali ispitanici bili homozigoti. Deo rezultata analize polimorfizma -462T(15) u uzorcima periferne krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa je prikazan na slici 19.



Slika 19. Analiza polimorfizma -462T(15) u perifernoj krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa
 al153 – varijanta -462T(15)
 al150 – varijanta -462T(12)

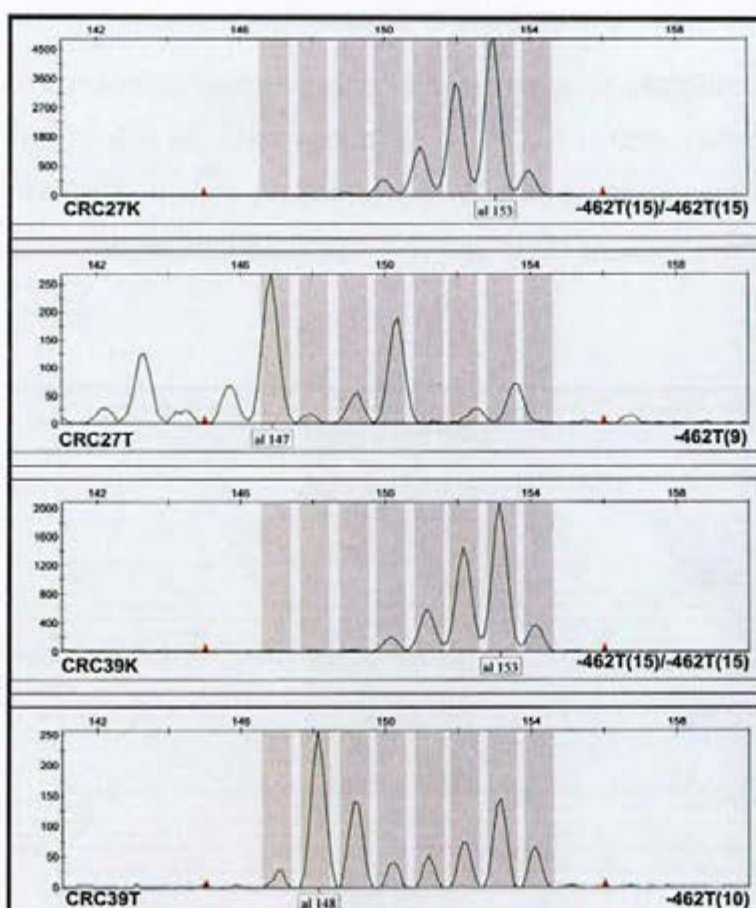
U kolorektalnom kanceru u 92% uzoraka je varijanta prisutna u perifernoj krvi ispitanika bila očuvana i u tkivu, od čega u 84% slučajeva varijanta -462T(15), a u 8% slučajeva varijanta -462T(16). U 8% slučajeva je u perifernoj krvi ispitanika bila prisutna varijanta -462T(15), od čega je u 4% slučajeva u tkivu detektovana varijanta -462T(10) i u 4% slučajeva varijanta -462T(9). Deo rezultata uporedne analize polimorfizma -462T(15) u uzorcima tkiva i periferne krvi ispitanika sa kolorektalnim kancerom je prikazan na slikama 20 i 21.



Slika 20. Analiza polimorfizma -462T(15) u perifernoj krvi (K) i tkivu (T) ispitanika sa kolorektalnim kancerom kod kojih su varijante detektovane u perifernoj krvi očuvane u tkivu

al154 – varijanta -462T(16)

al153 – varijanta -462T(15)



Slika 21. Analiza polimorfizma -462T(15) u perifernoj krvi (K) i tkivu (T) ispitanika sa kolorektalnim kancerom kod kojih varijante detektovane u perifernoj krvi nisu očuvane u tkivu

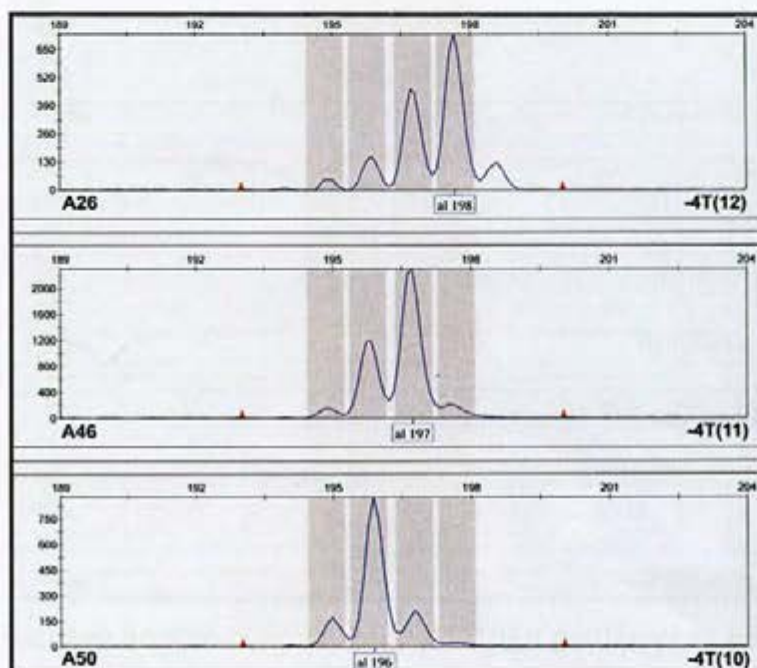
al153 – varijanta -462T(15)

al148 – varijanta -462T(10)

al147 – varijanta -462T(9)

Analiza polimorfizma -4T(12) je vršena pomoću graničnika obeleženog bojom 6-FAM, a produkti su detektovani u rasponu dužina od 195bp do 198bp (x osa elektroferograma) i u rasponu intenziteta signala 200 do 2000 (y osa elektroferograma). Osim normalne varijante -4T(12) dužine 198bp detektovane su još tri varijante: -4T(11), -4T(10) i -4T(9).

U tkivu karcinoma pankreasa u 6% uzoraka je detektovana normalna varijanta -4T(12), u 6% uzoraka varijanta -4T(11), a u 88% uzoraka varijanta -4T(10). Deo rezultata analize polimorfizma -4T(12) u uzorcima tkiva karcinoma pankreasa je prikazan na slici 22.



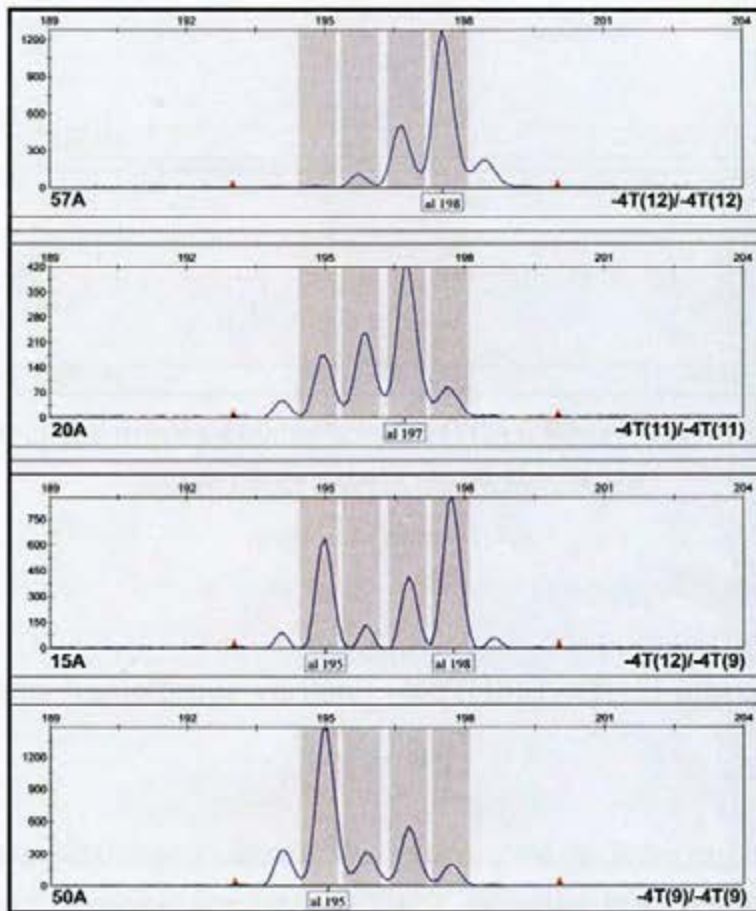
Slika 22. Rezultati analize polimorfizma -4T(12) u tkivu karcinoma pankreasa

al198 – varijanta -4T(12)

al197 – varijanta -4T(11)

al196 – varijanta -4T(10)

U perifernoj krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa na 89% alela je bila prisutna varijanta -4T(12), na 4% varijanta -4T(11), a na 7% varijanta -4T(9). Jedan ispitanik je bio heterozigot za varijante -4T(12) i -4T(9), dok su ostali ispitanici bili homozigoti. Deo rezultata analize polimorfizma -4T(12) u uzorcima periferne krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa je prikazan na slici 23.



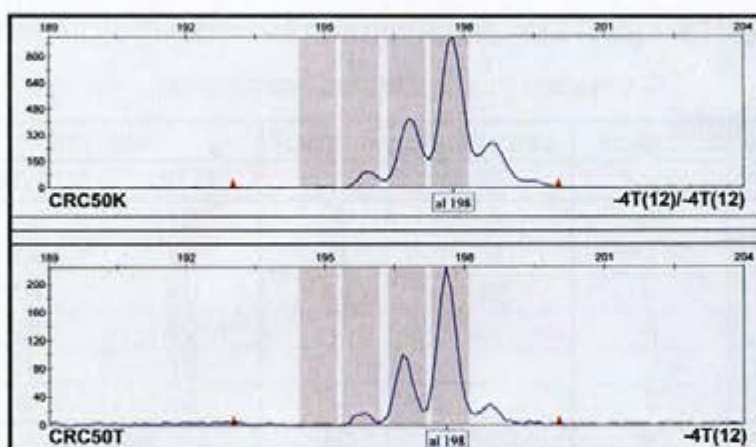
Slika 23. Rezultati analize polimorfizma -4T(12) u perifernoj krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa

al198 – varijanta -4T(12)

al197 – varijanta -4T(11)

al195 – varijanta -4T(9)

U kolorektalnom kanceru i u uzorcima tkiva i u uzorcima periferne krvi ispitanika je detektovana isključivo normalna varijanta -4T(12). Deo rezultata uporedne analize polimorfizma -4T(12) u uzorcima tkiva i periferne krvi ispitanika sa kolorektalnim kancerom je prikazan na slici 24.



Slika 24. Rezultati analize polimorfizma -4T(12) u tkivu (T) i perifernoj krvi (K) ispitanika sa kolorektalnim kancerom
al198 – varijanta -4T(12)

3. 3. 4. Analiza haplotipova varijanti -462T(15) i -4T(12) u promotoru gena SMAD4

Pod haplotipom se podrazumeva grupa alela na jednom hromozomu koji su lokalizovani u neposrednoj blizini i koji se usled toga nasleđuju zajedno. Varijante -462T(15) i -4T(12) u promotoru gena SMAD4 razdvaja svega 458bp, pa se njihove kombinacije mogu smatrati haplotipovima. Haplotipovi promotora gena SMAD4 su označeni na sledeći način: haplotip [broj timina u traktu -462T(15)]/[broj timina u traktu -4T(12)].

U analiziranim tkivima karcinoma pankreasa najčešći haplotip je bio haplotip 14/10, prisutan u 88% slučajeva, dok je najčešći haplotip u kolorektalnom kanceru bio normalan haplotip 15/12, prisutan u 84% slučajeva. Ostali haplotipovi su bili prisutni u relativno malom broju slučajeva. Distribucija haplotipova polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u analiziranim tkivima je prikazana u tabeli 7.

Tabela 7. Distribucija haplotipova polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u karcinomu pankreasa i kolorektalnom kanceru

haplotip		karcinom pankreasa		kolorektalni kancer	
-462(T)	-4(T)	broj	%	broj	%
15	12	3	6	42	84
14	11	3	6	-	-
14	10	44	88	-	-
16	12	-	-	4	8
10	12	-	-	2	4
9	12	-	-	2	4
ukupno		50	100	50	100

U analiziranim uzorcima periferne krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa najčešći haplotip je takođe bio normalni haplotip 15/12, prisutan na 78% analiziranih alela. Samo jedan uzorak je karakterisala heterozigotnost za obe varijante i u njemu su detektovani aleli -462T(15) i -462T(12), kao i aleli -4T(12) i -4T(9). U ovom slučaju haplotipovi su određeni kloniranjem sekvenciranih PCR produkata u pGEM T-Easy vektor i sekvenciranjem dobijenih klonova. Distribucija haplotipova polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u uzorcima periferne krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa je prikazana u tabeli 8.

Tabela 8. Distribucija haplotipova polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u perifernoj krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa

alel 1		alel 2		broj	%
-462(T)	-4(T)	-462(T)	-4(T)		
15	12	15	12	39	78
12	12	12	12	3	6
12	9	12	9	3	6
15	11	15	11	2	4
15	12	12	12	2	4
15	12	12	9	1	2
ukupno				50	100

U analiziranim uzorcima periferne krvi i tkiva ispitanika sa kolorektalnim kancerom najčešći haplotip je takođe bio normalni haplotip 15/12, prisutan na

84% analiziranih alela, dok je u 8% slučajeva bio prisutan haplotip 16/12. U preostalih 8% slučajeva u tkivu je došlo do gubitka normalnog haplotipa 15/12 i do pojave haplotipova 10/12 ili 9/12. Distribucija haplotipova polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u uzorcima tkiva i periferne krvi ispitanika sa kolorektalnim kancerom prikazana je u tabeli 9.

Tabela 9. Uporedna distribucija haplotipova polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u tkivu i perifernoj krvi ispitanika sa kolorektalnim kancerom

haplotip u tkivu		haplotip u krvi		broj	%
-462(T)	-4(T)	-462(T)	-4(T)		
15	12	15	12	42	84
16	12	16	12	4	8
15	12	10	12	2	4
15	12	9	12	2	4
ukupno				50	100

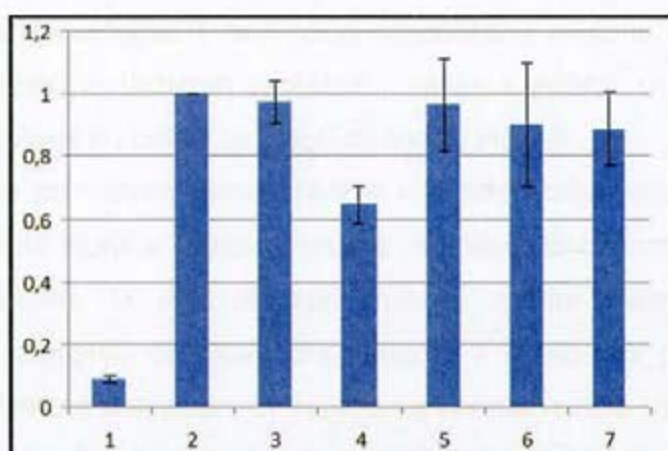
U uzorcima tkiva pankreasa uzetih od ispitanika za koje histopatološki nije potvrđena dijagnoza karcinoma pankreasa otkriveno je prisustvo haplotipova 14/11 i 14/10. Haplotip 14/11 je bio prisutan kod jednog ispitanika sa cističnom distrofijom pankreasa i jednog ispitanika sa hroničnim pankreatitisom, a haplotip 14/10 kod jednog ispitanika sa cističnom distrofijom pankreasa, jednog ispitanika sa hroničnim pankreatitisom i ispitanika sa benignim tumorom pankreasa.

U oba kontrolna uzorka DNK kolorektalnog kancera za koje je prethodno utvrđeno da sadrže mutacije u genu SMAD4 otkriveno je prisustvo normalnog haplotipa 15/12.

3. 3. 5. Analiza aktivnosti varijanti promotora gena SMAD4

Analiza aktivnosti promotora gena SMAD4 vršena je sa fragmentima koji su umnoženi pomoću graničnika P1X i P2H i potom klonirani u vektor pGEM T-Easy. Kloniranje je rađeno u nezavisnim serijama eksperimenata u kojima su korišćena po tri različita PCR produkta dobijena amplifikacijom na uzorcima DNK izolovanim iz tkiva karcinoma pankreasa dok nisu dobijeni klonovi sva tri haplotipa koji su detektovani u tkivu karcinoma pankreasa: 15/12, 14/11 i 14/10. Nakon ligacije u vektor i transformacije bakterijskog soja XL1-Blue *E. coli* vektori koji su nosili insert su izolovani iz bakterijskih kultura i analizirani sekvenciranjem. Analizom ukupno 23 dobijena klona otkriveno je prisustvo još tri haplotipa: 15/11, 12/11 i 12/9. Inserti navedenih šest kloniranih haplotipova su isecani iz vektora pGEM T-Easy pomoću enzima *HindIII* i *XhoI* i potom klonirani u vektor pGL4.10[luc2].

Analiza promotorske aktivnosti različitih haplotipova promotora gena SMAD4 je vršena pomoću sistema DualGlo Luciferase Assay. Uticaj prisustva otkrivenih genetskih varijanti na aktivnost promotora gena SMAD4 je analizirana u ćelijama SaOS-2. U eksperimentima tranzijentne kotransfekcije u ćelije SaOS-2 su uvedeni plazmid pGL4.10[luc2] sa odgovarajućim insertom i plazmid pGL4.70[hRluc], a aktivnosti gena luc2 i hRluc su merene nakon 24h. Svaki od konstrukata analiziran je u tri nezavisna eksperimenta, a u svakom od eksperimenata analiza svakog konstrukta je vršena u triplikatu. Rezultati izmerene aktivnosti luc2 gena su normalizovani prema efikasnosti transfekcije, odnosno prema izmerenoj aktivnosti hRluc gena. Normalizovane luc2 aktivnosti za analizirane genetske varijante su prikazane kao procenat aktivnosti normalnog haplotipa 15/12, kome je dodeljena vrednost od 100%, odnosno 1. Kao negativna kontrola korišćen je plazmid pGL4.10[luc2] bez inserta. Dobijeni rezultati merenja promotorske aktivnosti su prikazani na slici 25.



Slika 25. Analiza relativne aktivnosti haplotipova varijanti -462T(15) i -4T(12) promotora gena SMAD4 u odnosu na aktivnost haplotipa 15/12

- 1 –vektor pGL4.10[luc2] bez inserta
- 2 – haplotip 15/12
- 3 – haplotip 14/11
- 4 – haplotip 14/10
- 5 – haplotip 15/11
- 6 – haplotip 12/11
- 7 – haplotip 12/9

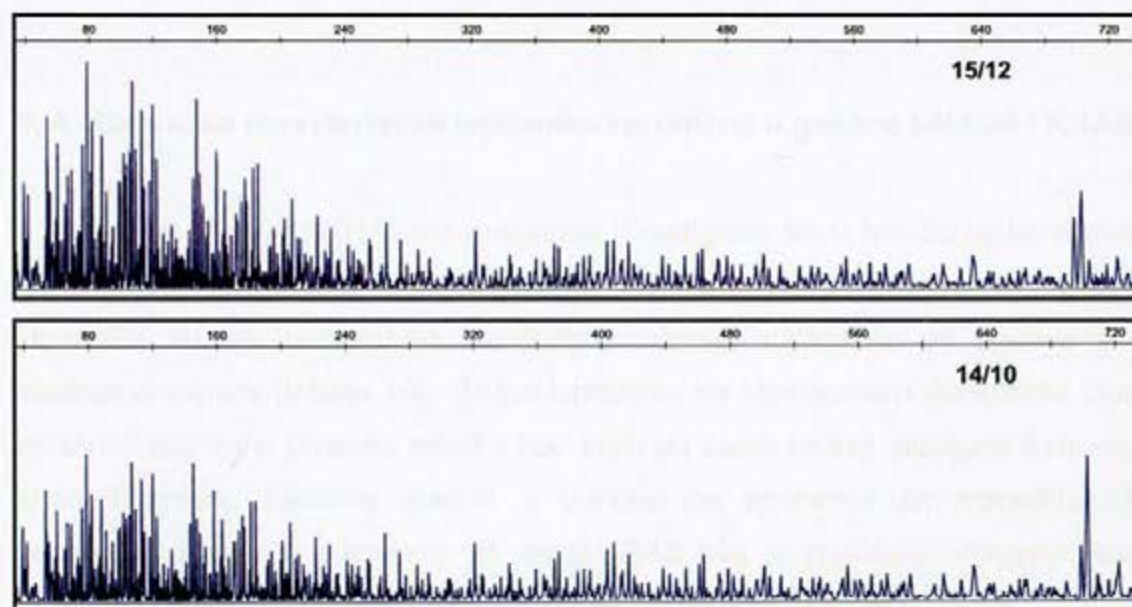
Od analiziranih genetskih varijanti promotora gena SMAD4 haplotipovi 15/11, 14/11, 12/11 i 12/9 su imali aktivnost u nivou aktivnosti normalne varijante 15/12. Statistički značajno sniženu aktivnost ($p < 0,001$) je pokazao haplotip 14/10, čija je aktivnost iznosila 65% aktivnosti normalne varijante ($0,65 \pm 0,06$).

3. 3. 6. Analiza vezivanja proteina za varijante promotora gena SMAD4

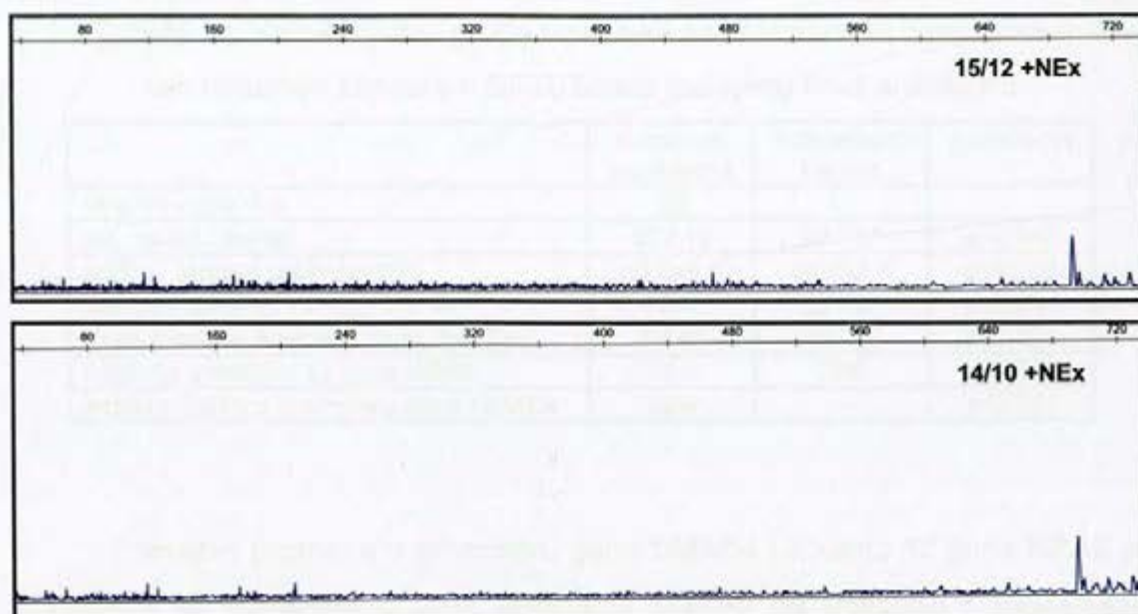
Analiza vezivanja proteina za promotor gena SMAD4 vršena je za normalan haplotip 15/12 i za haplotip 14/10, koji je pokazao sniženu promotorsku aktivnost. Fragmenti promotorskog regiona gena SMAD4 su umnoženi pomoću graničnika P1 i P2f, a dobijeni PCR produkti obeleženi bojom 6-FAM su prečišćeni. Prečišćeni PCR fragmenti su zaštićeni proteinima jedarnih ekstrakata ćelijskih linija SaOS-2, NTERA-2, K562 i HeLa, a zatim podvrgnuti dejstvu

enzima dezoksiribonukleaze I, koji seče nezaštićene regione DNK. Variranjem količine DNK, količine jedarnih proteina i sastava pufera u kojem se odvija reakcija uspostavljeni su uslovi za jasnu detekciju signala.

Fragmenti promotora gena SMAD4 koji nose haplotipove 15/12 i 14/10 pokazuju isti profil signala nakon digestije dezoksiribonukleazom I bez zaštite jedarnim proteinima. U oba slučaja prilikom zaštite fragmenata jedarnim proteinima pre digestije dezoksiribonukleazom I dolazi do potpunog gubitka signala u kompletnom analiziranom fragmentu i nema razlike između analiziranih varijanti. Na slikama 26 i 27 su prikazani rezultati dobijeni kada su PCR fragmenti podvrgnuti dejstvu dezoksiribonukleaze I bez zaštite jedarnih proteina i sa zaštitom jedarnim ekstraktima ćelijske linije NTERA-2. Isti profili signala dobijeni su i kada je zaštita fragmenta vršena jedarnim ekstraktima ćelijskih linija SaOS-2, K562 i HeLa.



Slika 26. Uporedna analiza fragmenata promotora gena SMAD4 sa haplotipovima 15/12 i 14/10 dobijenih nakon digestije dezoksiribonukleazom I bez zaštite jedarnim proteinima



Slika 27. Uporedna analiza fragmenata promotora gena SMAD4 sa haplotipovima 15/12 i 14/10 dobijenih nakon digestije dezoksiribonukleazom I sa zaštitom jedarnim proteinima ćelijske linije NTERA-2

3. 4. Korelacija karakteristika ispitanika i promena u genima SMAD4 i KRAS

Geni SMAD4 i KRAS su analizirani u malignom tkivu kod 50 ispitanika sa karcinomom pankreasa i 50 ispitanika sa kolorektalnim kancerom. Grupe ispitanika su se međusobno statistički značajno razlikovale po godinama i stadijumu tumora (tabela 10). Grupu ispitanika sa karcinomom pankreasa čine ispitanici koji su u proseku mlađi i kod kojih su češći kasniji stadijumi tumora i znaci njegovog lokalnog širenja u odnosu na ispitanike sa kolorektalnim kancerom. Mutacija u kodonu 12 gena KRAS bila je značajno učestalija kod ispitanika sa karcinomom pankreasa. Haplotip 14/10 u promotoru gena SMAD4, koji ima sniženu promotorsku aktivnost, bio je prisutan u tkivu kod 88% ispitanika sa karcinomom pankreasa, a nije bio prisutan ni u jednom slučaju kolorektalnog kancera.

Tabela 10. Karakteristike grupa ispitanika sa karcinomom pankreasa i kolorektalnim kancerom čiji su uzorci malignog tkiva analizirani

	karcinom pankreasa	kolorektalni kancer	p vrednost
ukupno ispitanika	50	50	
pol, muški / ženski	32 / 18	33 / 17	p=0,942
godine, srednja vrednost±SD	56,6±8,1	64,2±8,8	p=0,005
stadijum tumora, T1+T2 / T3+T4	4 / 46	23 / 27	p<0,001
znaci lokalnog širenja tumora, bez / sa	7 / 43	28 / 22	p<0,001
mutacija u kodonu 12 gena KRAS	74%	28%	p<0,001
haplotip 14/10 u promotoru gena SMAD4	88%	—	p<0,001

Prisustvo promena u promotoru gena SMAD4 i kodonu 12 gena KRAS je korelirano sa podacima o polu, godinama starosti na dijagnozi i stadijumom tumora ispitanika. Za potrebe statističke analize ispitanici su podeljeni u sledeće podgrupe: muškarci ili žene, mlađi ili stariji od 60 godina, sa ranijim (T1 i T2) ili kasnijim (T3 i T4) stadijumima tumora i bez (N0) ili sa (N1 i N2) znacima lokalnog širenja tumora. Među ovim podgrupama nisu uočene statistički značajne razlike u distribuciji haplotipova promotora gena SMAD4 i mutacije u kodonu 12 gena KRAS.

Prisustvo promena u promotoru gena SMAD4 takođe je ispitivano kao potencijalni faktor rizika u grupi ispitanika sa karcinomom pankreasa čiji su uzorci periferne krvi analizirani. Prisustvo haplotipova 15/11, 12/12 i 12/9 je korelirano sa podacima o polu, godinama starosti na dijagnozi, porodičnom istorijom tumora i drugim faktorima rizika, ali nisu uočene statistički značajne razlike.

Prisustvo otkrivenih promena u promotoru gena SMAD4 korelirano je sa prisustvom mutacije u kodonu 12 gena KRAS za analizirana maligna tkiva. U tkivu karcinoma pankreasa ni u jednom uzorku nije otkriveno prisustvo obe normalne varijante, promotora gena SMAD4 i kodona 12 gena KRAS. Samo u jednom slučaju je normalna varijanta kodona 12 gena KRAS detektovana u kombinaciji sa funkcionalnom varijantom promotora gena SMAD4, haplotipom 14/11. U 64% slučajeva bila je prisutna i mutacija kodona 12 u genu KRAS i varijanta promotora gena SMAD4 sa sniženom aktivnošću, haplotip 14/10, a u

98% slučajeva bar jedna od dve navedene promene. Rezultati kombinovane analize promena u genima SMAD4 i KRAS u karcinomu pankreasa prikazani su u tabeli 11. U tkivu kolorektalnog kancera kod svih 14 uzoraka u kojima je detektovana mutacija u kodonu 12 gena KRAS otkriveno je prisustvo haplotipa 15/12 promotora gena SMAD4.

Tabela 11. Distribucija haplotipova varijanti -462T(15) i -4T(12) gena SMAD4 i mutacije u kodonu 12 gena KRAS u analiziranim tkivima karcinoma pankreasa

mutacija u kodonu 12 gena KRAS	haplotip promotora gena SMAD4				ukupno	
	15/12	14/11	14/10			
nije prisutna	-	1 2%	12 24%		13	26%
prisutna	3 6%	2 4%	32 64%		37	74%
ukupno	3 6%	3 6%	44 88%		50	100%

Za deset ispitanika sa karcinomom i jednog ispitanika sa benignim tumorom pankreasa su bili dostupni i podaci o nivou ekspresije proteina SMAD4 u tkivu pankreasa, a koji su dati u tabeli 12. Nivo ekspresije proteina SMAD4 je određen metodom imunohistohemije. Nije uočena korelacija između prisustva otkrivenih promena u promotoru gena SMAD4 i nivoa ekspresije proteina SMAD4.

Tabela 12. Korelacija haplotipova varijanti -462T(15) i -4T(12) gena SMAD4 sa nivoom ekspresije proteina SMAD4

OZNAKA UZORKA	HISTOPATOLOŠKA DIJAGNOZA	HAPLOTIP PROMOTORA GENA SMAD4	NIVO EKSPRESIJE PROTEINA SMAD4*
A1	karcinom pankreasa	14/10	0
A2	karcinom pankreasa	14/10	2
A3	karcinom pankreasa	14/10	0
A4	karcinom pankreasa	14/10	2
A5	karcinom pankreasa	14/10	1
A6	karcinom pankreasa	14/10	3
A7	karcinom pankreasa	14/10	3
A8	karcinom pankreasa	15/12	2
A9	karcinom pankreasa	14/10	0
A10	karcinom pankreasa	14/10	2
A11	benigni tumor pankreasa	14/10	2

*0-nema ekspresije, 1-nizak nivo ekspresije, 2-srednji nivo ekspresije, 3-visok nivo ekspresije

3. 5. Rezultati analize gena SMAD4 i KRAS u grupama ispitanika

Zbirni rezultati analize gena SMAD4 i KRAS u nemalignom i malignom tkivu pankreasa i tkivu kolorektalnog kancera dati su u tabelama 13, 14 i 15. U tabeli 13 dati su zbirni rezultati analize mutacije u kodonu 12 gena KRAS i analize haplotipa promotora gena SMAD4 u karcinomu pankreasa i kolorektalnom kanceru, kao i rezultati analize metilacije u promotoru gena SMAD4 u karcinomu pankreasa. U tabeli 14 prikazani su rezultati analize haplotipa promotora gena SMAD4 u perifernoj krvi pacijenata sa karcinomom pankreasa. U tabeli 15 dati su rezultati analize mutacije u kodonu 12 gena KRAS, analize haplotipa promotora gena SMAD4 i rezultati analize metilacije u promotoru gena SMAD4 u uzorcima nemalignom tkiva pankreasa.

Tabela 13. Rezultati analize gena SMAD4 i KRAS u tkivu karcinoma pankreasa i kolorektalnog kancera

KARCINOM PANKREASA				KOLOREKTALNI KANCER			
OZNAKA UZORKA	MUTACIJA U KODONU 12 GENA KRAS	METILACIJA U PROMOTORU GENA SMAD4	HAPLOTIP PROMOTORA GENA SMAD4	OZNAKA UZORKA	MUTACIJA U KODONU 12 GENA KRAS	HAPLOTIP PROMOTORA GENA SMAD4	
						TKIVO	KRV
A1	+		14/10	CRC1	—	15/12	15/12
A2	+		14/10	CRC2	—	15/12	15/12
A3	+		14/10	CRC3	—	15/12	15/12
A4	—		14/10	CRC4	—	15/12	15/12
A5	+		14/10	CRC5	—	15/12	15/12
A6	+		14/10	CRC6	+	15/12	15/12
A7	+		14/10	CRC7	—	15/12	15/12
A8	+		15/12	CRC8	—	15/12	15/12
A9	—		14/10	CRC9	+	15/12	15/12
A10	+		14/10	CRC10	+	15/12	15/12
A12	+	—	15/12	CRC11	—	15/12	15/12
A13	+	—	14/10	CRC12	—	15/12	15/12
A14	—	—	14/10	CRC13	—	15/12	15/12
A15/A16	+	—	14/10	CRC14	—	15/12	15/12
A17	—	—	14/10	CRC15	+	15/12	15/12
A18/A19	+	—	14/10	CRC16	—	9/12	15/12
A20	—	—	14/10	CRC17	+	15/12	15/12
A21	—	—	14/10	CRC18	—	15/12	15/12
A22/A23	+	—	14/10	CRC19	—	15/12	15/12
A24	—	—	14/10	CRC20	—	15/12	15/12
A25	—	—	14/10	CRC21	+	15/12	15/12
A26/A27	+	—	15/12	CRC22	—	15/12	15/12
A28	+	—	14/10	CRC23	—	16/12	16/12
A30	+	—	14/10	CRC24	—	15/12	15/12
A31	+	—	14/10	CRC25	—	15/12	15/12
A32	+	—	14/10	CRC26	+	15/12	15/12
A33/A34	—	—	14/11	CRC27	—	9/12	15/12
A35	+		14/10	CRC28	—	16/12	16/12
A36	+		14/10	CRC29	+	15/12	15/12
A37	+		14/10	CRC30	+	15/12	15/12
A38	—		14/10	CRC31	—	10/12	15/12
A42	—		14/10	CRC32	—	16/12	16/12
A43	+		14/10	CRC33	—	15/12	15/12
A44	+		14/10	CRC34	—	15/12	15/12
A45	+		14/10	CRC35	+	15/12	15/12
A46	+		14/11	CRC36	+	15/12	15/12
A47	—		14/10	CRC37	—	15/12	15/12
A48	+		14/10	CRC38	—	16/12	16/12
A49	+		14/10	CRC39	—	10/12	15/12
A50	+		14/10	CRC40	—	15/12	15/12
A51	—		14/10	CRC41	—	15/12	15/12
A52	+		14/10	CRC42	—	15/12	15/12
A53	+		14/10	CRC43	+	15/12	15/12
A54	+		14/10	CRC44	—	15/12	15/12
A55	+		14/10	CRC45	+	15/12	15/12
A56	+		14/11	CRC46	—	15/12	15/12
A57	+		14/10	CRC47	—	15/12	15/12
A58	+		14/10	CRC48	—	15/12	15/12
A59	+		14/10	CRC49	—	15/12	15/12
A60	+		14/10	CRC50	+	15/12	15/12

Mutacija u kodonu 12 gena KRAS: + - prisutna, — - nije prisutna

Metilacija u promotoru gena SMAD4: — - nije prisutna, za ostale uzorke analiza nije uspjela

Tabela 14. Rezultati analize gena SMAD4 i KRAS u perifernoj krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa

OZNAKA UZORKA	HAPLOTIP PROMOTORA GENA SMAD4
1A	15/12
2A	15/12
4A	15/12
5A	15/12
6A	15/12
7A	15/12
8A	12/12
11A	15/12
13A	12/9
14A	15/12
15A	15/12+12/9
17A	15/11
18A	15/12
20A	15/11
22A	15/12
23A	12/12
24A	15/12
27A	15/12
30A	15/12
31A	15/12
32A	15/12
33A	15/12
34A	15/12
35A	15/12
36A	15/12
37A	15/12
38A	12/12
39A	15/12
40A	15/12
41A	15/12+12/12
43A	12/9
44A	15/12
46A	15/12+12/12
47A	15/12
49A	15/12
50A	12/9
51A	15/12
52A	15/12
53A	15/12
54A	15/12
55A	15/12
56A	15/12
57A	15/12
58A	15/12
59A	15/12
60A	15/12
61A	15/12
62A	15/12
63A	15/12
64A	15/12

Tabela 15. Rezultati analize gena SMAD4 i KRAS u nemalignom tkivu pankreasa

OZNAKA UZORKA	POL	STAROST NA DIJAGNOZI	HISTOPATOLOŠKA DIJAGNOZA	MUTACIJA U KODONU 12 GENA KRAS	METILACIJA U PROMOTORU GENA SMAD4	HAPLOTIP PROMOTORA GENA SMAD4
A11	M	62	benigni tumor pankreasa	—	—	14/10
A29	M	42	hronični pankreatitis	—	—	14/10
A39	M	67	cistična distrofija pankreasa	+	—	14/11
A40	M	49	cistična distrofija pankreasa	+	—	14/11
A41	Ž	52	hronični pankreatitis	—	—	14/10

Mutacija u kodonu 12 gena KRAS: + - prisutna, — - nije prisutna

Metilacija u promotoru gena SMAD4: — - nije prisutna, za uzorak A11 analiza nije uspjela

4. DISKUSIJA

Ovo istraživanje je imalo za cilj da ispita postojanje strukturnih promena u genu SMAD4 u malignom tkivu resektabilnih stadijuma karcinoma pankreasa, kao i da istraži funkcionalne posledice otkrivenih promena i njihov eventualni značaj u nastanku i razvoju ove bolesti. Za razliku od drugih genetskih oštećenja, promene u genu SMAD4 predstavljaju specifičan marker za pankreasnu karcinogenezu, pa je proučavanje promena strukture i funkcije gena SMAD4 u karcinomu pankreasa od velikog značaja za unapređenje dijagnostike, terapije i praćenja toka ove bolesti.

Dok su mutacije u genu SMAD4 koje dovode do potpunog gubitka njegove ekspresije jasno povezane sa kasnijim stadijumima tumora, metastazama i vrlo lošom prognozom, status ovog gena u ranim stadijumima karcinoma pankreasa još uvek nije dovoljno istražen. Novija istraživanja ukazuju da gen SMAD4 verovatno nije klasičan tumor supresor gen, odnosno da na molekularne procese u karcinogenezi ne utiče samo potpun gubitak proteina SMAD4, već da je mnogo verovatnije da se različiti stepeni oštećenja strukture i funkcije gena SMAD4 javljaju u različitim stadijumima karcinogeneze i dovode do različitih stepena oštećenja signalnog puta u kome SMAD4 učestvuje (104, 105).

U ovom istraživanju gen SMAD4 je analiziran u tkivu karcinoma pankreasa koje je odstranjeno prilikom operacije i potom direktno korišćeno za genetske analize. Većina dosadašnjih studija je vršena na primarnim kulturama ćelija karcinoma pankreasa poreklom od pacijenata, ali je poznato da je stopa mutacija u njima znatno viša nego u polaznom tkivu (24, 63). Stoga samo tumorsko tkivo uzeto od pacijenata predstavlja najinformativniji biološki materijal za proučavanje pankreasne karcinogeneze, jer omogućava reprezentativan uvid u status gena SMAD4 u tumoru. Kako od ispitanika čiji su uzorci karcinoma pankreasa analizirani nisu bili dostupni uzorci drugih tkiva, koji bi omogućili poređenje statusa gena SMAD4 u malignom i nemalignom tkivu, u istraživanje je

uključena i grupa ispitanika sa karcinomom pankreasa koji nisu podvrgavani operaciji uklanjanja tumora i čiji su uzorci periferne krvi takođe korišćeni za genetsku analizu.

U istraživanju su takođe korišćeni uzorci kolorektalnog kancera, radi poređenja dobijenih rezultata sa tumorom u kome su zastupljeni slični molekularni mehanizmi karcinogeneze, a u kome je gen SMAD4 najčešće oštećen posle karcinoma pankreasa. Uzorci kolorektalnog kancera su uključeni u istraživanje da bi se ispitalo u kojoj su meri otkrivene promene specifične za karcinom pankreasa, odnosno da li su karakteristične samo za određeni tip tumora ili za maligno tkivo uopšte.

Za strukturnu i funkcionalnu analizu promotora gena SMAD4 odabran je eksperimentalni pristup visoke senzitivnosti i specifičnosti, kao i mogućnost kvantifikacije rezultata. Za strukturnu analizu su korišćene metode sekvenciranja DNK i analize DNK fragmenata obeleženih fluoroforima sa laserskom detekcijom, koje obezbeđuju višu senzitivnost i specifičnost u odnosu na klasične metode molekularne genetike. Za funkcionalnu analizu različitih varijanti promotora gena SMAD4 je odabran luciferazni esej, metoda koja obezbeđuje mogućnost kvantifikacije promotorske aktivnosti i normalizovanje vrednosti u odnosu na efikasnost eksperimenta, a samim tim i visoku pouzdanost dobijenih rezultata.

4. 1. Analiza DNK iz tumorskog tkiva pankreasa

U ovom istraživanju za analizu statusa gena SMAD4 je korišćeno tumorsko tkivo karcinoma pankreasa, sveže ili u parafinskom kalupu, koje je dobijeno resekcijom pankreasnog tkiva od ispitanika koji su podvrgnuti proceduri operativnog uklanjanja tumora. Među pacijentima kod kojih se dijagnostikuje karcinom pankreasa, svega kod oko 15-20% se tumor otkrije u dovoljno ranom stadijumu da bi mogao da se odstrani operativnim putem. Relativno mali broj pacijenata sa karcinomom pankreasa se godišnje upućuje na operativni zahvat, pa je samim tim bio mali broj uzoraka svežih tkiva dostupan za ovo istraživanje.

Zbog toga su u istraživanju korišćeni i arhivski uzorci parafinskih kalupa tkiva karcinoma pankreasa, kako bi se obezbedio dovoljan broj uzoraka tkiva za pouzdaniju analizu.

Uzorci svežeg tumorskog tkiva su najpogodniji materijal za proučavanje molekularnih promena u malignim ćelijama, jer su nukleinske kiseline i proteini u njima relativno dobro očuvani, ukoliko se uzorci pravilno pripremaju i skladište. Međutim, ovakvi uzorci se relativno retko koriste za analizu DNK u istraživačke svrhe, jer medicinske procedure ne podrazumevaju rutinsko uzimanje svežih uzoraka tkiva. Dodatni problem u obradi ovakvih uzoraka je što je neophodno da se odmah po uzimanju podvrgnu izolaciji DNK, odnosno ne mogu da se očuvaju u dužem vremenskom periodu, osim uz pomoć procesa trenutnog dubokog zamrzavanja u tečnom azotu. Prinos i kvalitet DNK izolovane iz svežih tkiva u načelu su vrlo visoki i retko zavise od procedure izolacije ili drugih faktora (106). Uzorci svežih tkiva korišćeni u ovom istraživanju davali su dobar prinos i kvalitet DNK nakon izolacije, pa su korišćeni direktno za dalje analize.

Parafinski kalupi tkiva predstavljaju vrstu arhivskih uzoraka koji su vrlo otporni na razne uticaje sredine, pa se mogu lako očuvati više desetina godina (106). Ovakvi uzorci su izuzetno pogodni za analizu DNK, zbog svoje dostupnosti i činjenice da DNK u tkivu može ostati stabilna više godina. Međutim, količina i kvalitet DNK izolovane iz parafinskog kalupa tkiva može veoma da varira i u najvećoj meri zavisi od kvaliteta parafinskog kalupa, a u manjoj meri i od procedure izolacije DNK (107). Prilikom pripreme parafinskog kalupa, odnosno procesa parafinizacije tkiva, tokom fiksacije tkiva u rastvoru dolazi do degradacije nukleinskih kiselina, pri čemu je stepen degradacije veći ukoliko se tkivo u rastvoru inkubira kraće od 6h ili duže od 24h. Do degradacije DNK takođe dolazi u manjoj ili većoj meri tokom procedure izolacije iz tkiva, a najvećim delom tokom inkubacije tkiva u rastvoru proteinaze K, koja se odvija 1h-3h na povišenoj temperaturi (50°C), a koja je neophodna da bi se ćelije tkiva međusobno razdvojile pre izolacije. U ovom istraživanju izolacijom DNK iz parafinskih kalupa tkiva dobijena je DNK u relativno maloj količini i vrlo lošeg kvaliteta, tako da se nije mogla koristiti direktno u daljim analizama, zbog čega je podvrgavana metodi

amplifikacije genoma. Ova metoda omogućava umnožavanje celokupne DNK pomoću nespecifičnih graničnika i koristi se u analizama u kojima je količina DNK uzorka ograničena da bi se povećala ukupna količina polazne DNK za amplifikaciju željenih fragmenata PCR metodom.

4. 2. Analiza mutacije u kodonu 12 gena KRAS u karcinomu pankreasa

Mutacija u kodonu 12 gena KRAS karakteristična je za najveći broj slučajeva karcinoma pankreasa i uglavnom se detektuje u ranom stadijumu tumora ili čak u premalignim lezijama. Zbog toga se ova genetska promena smatra molekularnim markerom rane pankreasne karcinogeneze. Prisustvo mutacije u kodonu 12 gena KRAS otkriveno je u pankreasnom tkivu u 75-100% slučajeva karcinoma pankreasa (108). Mutacija je uglavnom prisutna kod pacijenata kod kojih je došlo do lokalnog širenja tumora, odnosno njeno prisustvo je povezano sa agresivnijim, rekurentnim i metastatskim tumorima (109). Prisustvo mutacije u kodonu 12 gena KRAS je kod pacijenata u ovoj studiji otkriveno sa nešto nižom učestalošću, u 74% slučajeva, što se može objasniti činjenicom da su u istraživanje uključeni ispitanici sa ranim stadijumima tumora. Kod ispitanika sa kolorektalnim kancerom mutacija u kodonu 12 gena KRAS bila je prisutna u 28% slučajeva, što je nešto niža učestalost u odnosu na druge studije (110, 111).

Analizom nemalignih tkiva pankreasa mutacija je otkrivena kod dva ispitanika sa cističnom distrofijom pankreasa, dok kod dva ispitanika sa hroničnim pankreatitisom i kod ispitanika sa benignim tumorom pankreasa mutacija nije bila prisutna. Mutacija u kodonu 12 gena KRAS često može biti prisutna u tkivu pankreasa u hroničnom pankreatitisu, koji predstavlja faktor rizika za razvoj karcinoma, ali nije poznato kakav je status gena KRAS u cističnoj distrofiji pankreasa (108, 112). Cistična distrofija pankreasa je oboljenje čija je klinička slika u velikoj meri slična karcinomu pankreasa, ali pošto je ova bolest izuzetno retka još uvek nije istraženo da li kod obolelih postoji povišen rizik za karcinom pankreasa.

Mutacija u kodonu 12 gena KRAS može biti prisutna u vrlo malom broju ćelija tumora ili premaligne lezije, što otežava njeno otkrivanje i zahteva da metoda koja se primenjuje za njenu detekciju ima visoku osetljivost. U ovom istraživanju detekcija mutacije u kodonu 12 gena KRAS je vršena PCR-RFLP metodom, čija osetljivost nije visoka, a na čiju su efikasnost dodatno uticali kvalitet i količina DNK koja je upotrebljena kao polazni materijal. Uzorci DNK izolovani iz uzoraka svežeg pankreasnog tkiva su dali jasne rezultate, ali u slučaju uzoraka DNK izolovanih iz parafinskih kalupa tkiva pankreasa osetljivost metode je povećana amplifikacijom genoma pre PCR amplifikacije. Prednost primene PCR-RFLP metode za detekciju mutacije u kodonu 12 gena KRAS, osim u njenoj jednostavnosti, brzini izvođenja i ekonomskoj isplativosti, leži u činjenici da je metoda tako dizajnirana da se njom postiže detekcija prisustva bilo koje od nekoliko mogućih nukleotidnih promena u kodonu 12.

Iako analiza prisustva mutacije u kodonu 12 gena KRAS nije dovoljno informativna za diferenciranje karcinoma pankreasa od hroničnog pankreatitisa i drugih tipova tumora u kojima se ova mutacija takođe često javlja, u rutinskoj dijagnostici bi mogla da posluži kao jedan od parametara za lakše dijagnostikovanje karcinoma pankreasa. Njeno uvođenje u rutinsku dijagnostiku treba posebno razmotriti u svetlu činjenice da se analiza može potencijalno vršiti i na uzorcima krvne plazme, zahvaljujući prisustvu izvesne količine DNK koja se u plazmu oslobađa usled nekroze ćelija tumorskog tkiva (113, 114).

Gen KRAS se poslednjih godina intenzivno izučava kao potencijalna terapijska meta u karcinomu pankreasa, kolorektalnom kanceru i karcinomu pluća (115). Poznato je da prisustvo mutacija u genu KRAS u tkivu tumora dovodi do njegove rezistentnosti na određeni tip lekova (116). Monoklonska antitela na receptor za epidermalni faktor rasta imaju dejstvo samo na tumore u kojima je prisutna normalna varijanta gena KRAS. Analiza mutacije tumorskog tkiva na prisustvo mutacije u genu KRAS kao prediktivnog faktora za odgovor na terapiju preporučuje se u slučajevima metastatskog kolorektalnog kancera pre primene terapije monoklonskim antitelima na receptor za epidermalni faktor rasta (117). U lečenju karcinoma pankreasa još uvek se istražuje efikasnost pojedinih

lekova i efekat njihove kombinovane primene, pa se analiza mutacije u genu KRAS još uvek ne koristi rutinski kao prediktivni faktor za odgovor na terapiju (118)

4. 3. Analiza metilacionog statusa promotora gena SMAD4

Metilacija GC ostrvaca u promotoru gena SMAD4 predstavlja potencijalni mehanizam inaktivacije ovog gena u malignim bolestima. Fragment koji je u ovom istraživanju odabran za analizu prisustva metil-grupa je bogat GC ostrvcima i nalazi se uzvodno od promotora gena SMAD4. Analiza prisustva metil-grupa je vršena pomoću eseja zasnovanog na PCR metodi u kome se koriste restrikcioni enzimi *MspI* i *HpaII*, koji prepoznaju isto restrikciono mesto (CCGG), ali od kojih je jedan osetljiv (*HpaII*), a drugi nije osetljiv (*MspI*) na prisustvo metil-grupa, što omogućava razlikovanje metilovane i nemetilovane DNK.

Analiza metilacionog statusa promotora gena SMAD4 uspešno je izvršena u uzorcima DNK izolovanim iz svežih tkiva karcinoma pankreasa (34% slučajeva) i u ovim uzorcima nije otkriveno prisustvo metilovane DNK. U preostalim uzorcima DNK, koje su izolovane iz parafinskih kalupa tkiva karcinoma pankreasa (66% slučajeva) analiza nije bila uspešna zbog nedovoljne količine kvalitetne DNK. Prvi korak u analizi prisustva metil-grupa je digestija genomske DNK restrikcionim enzimima, nakon čega sledi PCR amplifikacija određenog regiona. Ukoliko je DNK degradovana, što je bio slučaj sa uzorcima korišćenim za ovu analizu i što je vrlo čest slučaj sa uzorcima DNK izolovanim iz parafinskih kalupa, u reakciji nakon digestije ne ostaje dovoljno fragmenata neophodne dužine da posluže kao matrica za uspešnu amplifikaciju.

Analiza prisustva metil-grupa u DNK takođe se može vršiti metodom konverzije citozina pomoću natrijumbisulfita (119). Ova metoda je osetljivija od metode koja se zasniva na korišćenju restrikcioni enzima, pošto uključuje DNK sekvenciranje, odnosno detekciju DNK obeležene fluoroforima, ali zbog osetljivosti na količinu DNK može često da da lažno negativan rezultat. Pošto se

bisulfitna konverzija odvija na svim dostupnim GC ostrvcima u genomskoj DNK koja se koristi kao supstrat u reakciji, prevelika količina DNK može uzrokovati nekompletnu konverziju. S druge strane, nedovoljna količina DNK može da uzrokuje odsustvo umnožavanja nakon reakcije konverzije. Iz navedenih razloga analiza metilacije bisulfitnom konverzijom DNK je metoda izbora samo ukoliko su dostupni kvalitetni DNK uzorci.

Hipremetilacija promotora gena SMAD4 je analizirana kao mehanizam inaktivacije ovog tumor supresor gena u razčitim tipovima malignih bolesti. Prisustvo metil-grupa u promotoru gena SMAD4 uglavnom je analizirano u kolorektalnom kanceru, u kome, nakon karcinoma pankreasa, najčešće dolazi do oštećenja ovog gena, ali nije utvrđeno da je hipermetilacija jedan od mehanizama inaktivacije gena SMAD4 u ovom tumoru (103, 105, 120). Hipermetilacija promotora gena SMAD4 takođe nije otkrivena ni u cervikalnom kanceru (121). Otkriveno je da je promotor gena SMAD4 hipermetilovan u malignim bolestima gastrointestinalnog trakta, ali svega u 5% slučajeva (122). Takođe je otkriveno da je metilacija u promotoru gena SMAD4 prisutna u karcinomu prostate, kao i da korelira sa smanjenom ekspresijom proteina SMAD4 u odmaklim stadijumima ove bolesti (94). Na osnovu dosadašnjih istraživanja, uključujući i rezultate ove studiju, može se zaključiti da je hipermetilacija promotora gena SMAD4 relativno redak događaj u procesu karcinogeneze, kao i da verovatno ne predstavlja mehanizam inaktivacije ovog tumor supresor gena u karcinomu pankreasa.

4. 4. Strukturna i funkcionalna analiza promotora gena SMAD4

Vrlo je malo podataka u literaturi o regulaciji ekspresije kako gena SMAD4, tako i drugih gena iz SMAD familije. Poznato je da su regulatorni i inhibitorni SMAD proteini međusobno regulisani, kao i da u toj regulaciji učestvuje SMAD4. Analiza regulacije ekspresije gena SMAD7 pokazala je da je ovaj molekul direktno regulisan proteinima SMAD3 i SMAD4 (123, 124, 125). Takođe je poznato da overekspresija proteina SMAD2 dovodi do povećanja

ekspresije gena SMAD4 (126). Međutim, osim međusobnih uticaja, nije poznato koji drugi faktori učestvuju u regulaciji ekspresije SMAD gena.

U ovoj studiji je za strukturnu analizu promotora gena SMAD4 odabran region koji obuhvata -620bp do +80bp u odnosu na prethodno određeni start transkripcije, jer je na osnovu softverske predikcije gustina vezivanja transkripcionih faktora u ovom regionu najveća (51). U uzvodnom delu ovog regiona se po predikciji nalaze mesta vezivanja za Pit-1 (2 mesta), F2F (4 mesta) i HoxA-5 (1 mesto), transkripcione faktore koji imaju ulogu u razviću i čija je ekspresija tkivno- i vremenski-specifična. U nizvodnom delu ovog regiona se nalaze start transkripcije i TATA-like box, gde se vezuju RNK polimeraza i osnovni transkripcioni faktori. U analiziranom regionu u tkivu karcinoma pankreasa je otkriveno prisustvo dva polimorfna regiona, pri čemu su oba polimorfizma po tipu monukleotidni ponovci timina, -462T(15) i -4T(12). U regionima gde se nalaze ovi ponovci po predikciji nisu prisutna potencijalna mesta za vezivanje proteina.

Identifikacija pojedinih varijanti otkrivenih polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u promotoru gena SMAD4 je vršena dvema metodama, DNK sekvenciranjem i analizom DNK fragmenata obeleženih fluoroforama. Rezultati sekvenciranja ukazuju da se u slučaju oba pomenuta regiona u tkivu karcinoma pankreasa ispoljava fenomen mikrosatelitne nestabilnosti, odnosno da su u izvesnoj meri prisutne i varijante kraće od varijante koja je najzastupljenija u uzorku. Pošto je tumačenje rezultata sekvenciranja DNK u takvim slučajevima otežano zbog preklapanja signala usled prisustva više različitih alela, analiza pomenutih polimorfizama u svim uzorcima obuhvaćenim istraživanjem je vršena metodom analize fragmenata DNK obeleženih fluoroforama. Ova analiza se zasniva na umnožavanju određenog segmenta DNK pomoću graničnika od kojih je jedan obeležen fluoroforom i laserskoj detekciji umnoženih fragmenata, što metodi daje vrlo visoku specifičnost i osetljivost. Za svaki prisutan alel detektuje se signal koji odgovara određenoj dužini PCR fragmenta, a intenzitet signala je srazmeran zastupljenosti određenog alela u populaciji tumorskih ćelija u uzorku tkiva iz koga je izolovana DNK. Ova metoda stoga omogućava da se po potrebi

semikvantitativno odredi u kojoj meri je pojedini alel zastupljen u populaciji tumorskih ćelija.

Mikrosatelitna nestabilnost je čest fenomen u malignom tkivu i podrazumeva inserciju ili deleciju najmanje 1bp u regionima DNK koji se karakterišu ponovcima nukleotida, a do čega dolazi usled grešaka DNK polimeraze tokom replikacije DNK pred ćelijsku deobu (127). U normalnim ćelijama ove greške ispravljaju enzimi ćelijskog sistema za reparaciju oštećenja na DNK, dok se u malignim ćelijama greške nakupljaju ili usled povišene stope grešenja DNK polimeraze ili usled smanjene stope reparacije DNK. Fenomen mikrosatelitne nestabilnosti u karcinogenezi može biti i posledica poremećaja regulacije gena koji učestvuju u reparaciji DNK, a do koje dolazi usled aberantne metilacije njihovih promotora. Najčešći slučaj je metilacija promotora gena MLH1 (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (*E. coli*)). Moguće je i da mutacije u genu za MBD4/MED1 (methyl-CpG binding domain protein 4/mediator complex subunit 1), koji se vezuje za GC ostrvca, mogu dovesti do povećanja mikrosatelitne nestabilnosti (128).

Mikrosatelitna nestabilnost DNK je karakteristična za mnoge kancere, kao što su kolorektalni ili ovarijalni kancer (129, 130, 131). Velika većina hereditarnih nepolipoznih kolorektalnih tumora i deo gastrointestinalnih i endometrijalnih tumora ima takozvani fenotip mikrosatelitnih mutatora, koji dovodi do akumulacije stotina hiljada klonalnih mutacija u kratkim ponovljenim sekvencama (132). Iako je mikrosatelitna nestabilnost mononukleotidnih ponovaka relativno česta pojava u humanim malignitetima, posebno gastrointestinalnim, još uvek nije razjašnjen njen značaj, kao ni utvrđena učestalost ove pojave u različitim tumorima (133, 134, 135, 136). U ovom istraživanju u analiziranim uzorcima tkiva karcinoma pankreasa i kolorektalnog kancera fenomen mikrosatelitne nestabilnosti nije bio izražen u velikoj meri. Analiza DNK fragmenata obeleženih fluoroforama omogućila je detekciju po jednog najzastupljenijeg alela za sve analizirane uzorke tkiva, iako su u većini slučajeva bili prisutni i signali karakteristični za alele kraće za po 1-2bp. Kako je poznato da se monotimidinski ponovci duži od 11bp amplifikuju sa smanjenom preciznošću, kao i da čak i polimeraze visoke

preciznosti greše prilikom amplifikacije mono- i di- nukleotidnih ponovaka, deo signala detektovan za manje zastupljene alele može se pripisati nepreciznosti umnožavanja ovih regiona (137).

Za polimorfizam -462T(15) je u ovoj studiji otkriveno da je polimorfan i u malignom tkivu i u perifernoj krvi kod ispitanika sa karcinomom pankresa i kolorektalnim kancerom. Varijante -462T(16) i -462T(12) su otkrivene u perifernoj krvi kod ispitanika sa karcinomom pankreasa i kolorektalnim kancerom i verovatno predstavljaju polimorfne varijante koje su prisutne u manjem broju slučajeva u opštoj populaciji. Varijante -462T(10) i -462T(9) su otkrivene u po dva slučaja kolorektalnog kancera, u kojima je u nemalignom tkivu bila prisutna varijanta -462T(15), pa je verovatno da je u ovim slučajevima u pitanju genetsko oštećenje do kog je došlo u malignom tkivu. Varijanta -462T(14) je u ovoj studiji otkrivena samo u tkivu karcinoma pankreasa, ali se ne može zaključiti da li je u pitanju genetsko oštećenje u malignom tkivu, jer uzorci drugih tkiva od istih ispitanika nisu bili dostupni.

Za polimorfizam -4T(12) je u ovoj studiji otkriveno da je varijanta -4T(12) prisutna u najvećem broju slučajeva u perifernoj krvi bolesnika sa karcinomom pankreasa i kolorektalnim kancerom, kao i da je u tkivu kolorektalnog kancera ovaj trakt očuvan u svim slučajevima. Varijanta -462T(11) je otkrivena u manjem broju slučajeva u tkivu karcinoma pankreasa, ali je takođe bila prisutna, kao i varijanta -462T(9), u perifernoj krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa. Obe navedene varijante su verovatno prisutne u određenom broju slučajeva u opštoj populaciji. Prisustvo varijante -462T(10) je od analiziranih tkiva otkriveno samo u karcinomu pankreasa, na osnovu čega se ne može zaključiti da li je u pitanju genetsko oštećenje u malignom tkivu, jer uzorci drugih tkiva od istih ispitanika nisu bili dostupni.

Posledice prisustva pojedinih varijanti u otkrivenim polimorfnim regionima na aktivnost promotora gena SMAD4 ispitivane su pomoću luciferaznog eseja, čija visoka senzitivnost i mogućnost normalizacije rezultata omogućavaju uočavanje i malih razlika u aktivnosti pojedinih promotorskih varijanti. Funkcionalna analiza šest različitih haplotipova promotora gena SMAD4

pokazala je da haplotip 14/10, koji je prisutan u najvećem broju slučajeva karcinoma pankreasa (88%), ima za 35% sniženu promotorsku aktivnost u odnosu na normalnu varijantu 15/12, dok ostali haplotipovi imaju aktivnost u nivou aktivnosti normalne varijante. Činjenica da haplotip 14/10 ima aktivnost sniženu za 31% i u odnosu na haplotip 14/11 navodi na zaključak da se sniženje aktivnosti može povezati sa prisustvom varijante -4T(10).

Na osnovu rezultata dobijenih funkcionalnom analizom, kao i distribucije varijanti u analiziranim grupama, može se pretpostaviti da u regulaciji transkripcije gena SMAD4 polimorfizam -462T(15) verovatno nema ulogu, dok je polimorfizam -4T(12) verovatno značajan. Polimorfizam -462T(15) se nalazi u regionu u kome se po predikciji ne vezuju proteini od značaja za transkripciju. Osim toga, u ovom istraživanju su u nemalignom tkivu otkrivene različite varijante polimorfizma -462T(15), što ukazuje na odsustvo selektivnog pritiska. Poznato je da su duži ponovci generalno više polimorfni bez obzira na lokaciju, a za ponovke koji su uglavnom očuvani se pretpostavlja da imaju funkcionalni značaj i da su monomorfni usled selektivnog pritiska (138). Polimorfizam -4T(12) se nalazi u regionu bazalnog promotora, a od četiri otkrivene varijante samo je varijanta -4T(10) bila prisutna isključivo u malignom tkivu i povezana sa sniženom aktivnošću promotora, što ukazuje da je dužina ovog trakta od značaja za regulaciju transkripcije i da neka vrsta selektivnog pritiska postoji za ovaj region.

Za određen broj ispitanika bili su dostupni podaci o nivou ekspresije gena SMAD4 u tkivu, koji je određen imunohistohemijskom analizom, ali ovi podaci nisu bili informativni. Verovatan razlog što nije uočena korelacija je što haplotip 14/10 u promotoru gena SMAD4 dovodi do relativno male razlike u aktivnosti promotora gena SMAD4 i time do blažeg poremećaja ekspresije proteina SMAD4, a imunohistohemijska analiza omogućava samo grubo određivanje nivoa proteina u ćelijama. Imunohistohemijskom analizom moguće je utvrditi poremećaj lokalizacije proteina SMAD4, kao i potpuni gubitak njegove ekspresije, a u oba slučaja najčešći poznat uzrok su mutacije u kodirajućem regionu gena SMAD4 koje dovode do ozbiljnih poremećaja strukture i/ili funkcije SMAD4

proteina. Da bi se potvrdilo da li je varijanta -4T(10) u promotoru gena SMAD4 povezana sa sniženom ekspresijom gena SMAD4 potrebno je analizirati nivo informacione RNK koja se prepisuje sa ovog gena u tkivu karcinoma pankreasa u kome je prisutna ova varijanta, što u ovoj studiji nije bilo moguće zbog ograničenja materijala koji je korišćen za analizu.

Postoje podaci da mutacije u promotoru gena SMAD4 mogu da utiču na regulaciju njegove ekspresije, ali do sada nisu otkrivene u karcinomu pankreasa. Dve mutacije tipa bazne zamene, -154T/C i +5+6GG/AA, otkrivene u 5' nekodirajućem regionu gena SMAD4 u endometrijalnom kanceru dovode do potpunog utišavanja SMAD4 promotora i do odsustva transkripcije (93). Nekoliko promena tipa nukleotidne zamene u promotoru gena SMAD4 su otkrivene i kod zdravih ispitanika (139). Varijante promotora gena SMAD4 ispitivane u ovom istraživanju očigledno ne dovode do utišavanja promotora, ali dovode do promene u nivou njegove aktivnosti. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je polimorfizam -4T(12) verovatno od značaja za regulaciju transkripcije gena SMAD4, odnosno da genetske promene u ovom regionu mogu imati posledice na nivo ekspresije proteina SMAD4.

4. 5. Funkcionalni značaj mononukleotidnih ponovaka u promotoru gena SMAD4

U ovom istraživanju su identifikovana dva mononukleotidna ponovka u promotoru gena SMAD4, -462T(15) i -4T(12), koji su pokazali polimorfnost u tkivu karcinoma pankreasa, u kome je najčešće bio prisutan haplotip 14/10, dok je normalan haplotip 15/12 bio zastupljen u vrlo malom broju uzoraka. Da bi se ispitalo da li su otkrivene varijante ovih ponovaka somatske mutacije koje su se dogodile u malignom tkivu bilo bi potrebno analizirati normalna tkiva ispitanika od kojih su uzorci uzeti (perifernu krv ili bukalni bris), ali od ovih ispitanika nisu bili dostupni drugi uzorci osim tkiva karcinoma pankreasa. Zbog toga je oformljena grupa ispitanika kod kojih je dijagnostikovana ista bolest, ali koji nisu upućeni na operaciju i od kojih su bili dostupni uzorci periferne krvi. Kada su mononukleotidni

ponovci u promotoru gena SMAD4 analizirani u ovim uzorcima otkriveno je da su takođe polimorfni i u normalnom tkivu. Međutim, haplotip 14/10, koji je detektovan u 88% tkiva karcinoma pankreasa, nije otkriven ni u jednom uzorku periferne krvi, na osnovu čega se može zaključiti da je najverovatnije u pitanju somatska mutacija do koje dolazi u malignom pankreasnom tkivu. U uzorcima periferne krvi ispitanika sa karcinomom pankreasa osim normalnog haplotipa 15/12 otkriveno je, sa relativno malom učestalošću, i prisustvo haplotipova, 15/11, 14/11, 12/12 i 12/9.

Da bi se procenio značaj otkrivenih varijanti promotora gena SMAD4 u karcinomu pankreasa, analiza je proširena na kolorektalni kancer, malignitet u kome se poremećaji gena SMAD4 javljaju najčešće posle karcinoma pankreasa. Status analiziranih mononukleotidnih ponovaka je tako upoređen sa drugim tipom kancera u kome su zastupljeni slični molekularni mehanizmi karcinogeneze. U uzorcima tkiva i periferne krvi uzete od ispitanika sa kolorektalnim kancerom otkriveno je prisustvo normalnog haplotipa 15/12 u 84% slučajeva i haplotipa 16/12 u 8% slučajeva. U 8% slučajeva od ukupnog broja je u tkivu detektovan različit haplotip u odnosu na nemaligno tkivo. U ovim slučajevima radilo se o skraćenju ponovka -462T(15) sa 15 na 10 ili 9 timina. Kako polimorfizam -462T(15) verovatno nije od značaja za funkciju promotora gena SMAD4, ove promene najverovatnije predstavljaju oštećenja DNK nastala kao posledice genetske nestabilnosti malignih ćelija. S druge strane, odsustvo haplotipa 14/10 u tkivu kolorektalnog kancera ukazuje na mogućnost da ova somatska mutacija predstavlja molekularni događaj specifičan za karcinom pankreasa.

Kako je u ovoj studiji otkriveno da haplotip 14/10 u promotoru gena SMAD4 ima promotorsku aktivnost sniženu za 35%, koja može da uzrokuje sniženje nivoa ekspresije ovog gena, funkcionalni značaj pomenutog haplotipa treba posebno sagledati u svetlu novijih podataka koji ukazuju da je za ulogu gena SMAD4 u razvoju patologije važan i fenomen haploinsuficijencije, odnosno dozne zavisnosti (104, 105). Verovatno je da SMAD4 ne predstavlja klasičan tumor-supresor gen čiji gubitak obe kopije vodi ćeliju u karcinogenezu, već da

snižen nivo ekspresije gena SMAD4 može takođe imati ozbiljne posledice po ćeliju, a ozbiljnost posledica je najverovatnije srazmerna smanjenju ekspresije. Stoga snižen nivo promotorske aktivnosti haplotipa 14/10 takođe ukazuje na mogućnost da njegovo prisustvo nije samo posledica genetskih oštećenja u malignoj ćeliji, već možda i jedan od uzroka, odnosno molekularnih događaja u samom procesu karcinogeneze.

Sniženje promotorske aktivnosti haplotipa 14/10 najverovatnije je posledica prisustva varijante -4T(10), koja se nalazi se u centralnom delu bazalnog promotora gena SMAD4, što dodatno ukazuje na njen moguć funkcionalni značaj za regulaciju ekspresije ovog gena. Bazalni promotor se tipično prostire približno 40-50bp uzvodno i nizvodno od starta transkripcije i sadrži nekoliko karakterističnih elemenata, od kojih je najznačajniji TATA boks (140, 141, 142). Kako se pomenuta varijanta -4T(10) nalazi u blizini samog starta transkripcije, struktura ovog regiona sigurno je od značaja za prostorni raspored koji zauzimaju proteini značajni za otpočinjanje procesa transkripcije. Moguće je da dužina trakta -4T(12) utiče na međusobni položaj koji u prostoru zauzimaju proteini koji se vezuju za elemente promotora uzvodno i nizvodno od samog starta transkripcije, čime bi se moglo objasniti zašto su i kraće i duže varijante ovog trakta prisutne u populaciji i nisu otkrivene u malignom tkivu.

Da bi se ispitalo kako prisustvo varijante -4T(10) utiče na vezivanje proteina u regionu bazalnog promotora korišćen je dezoksiribonukleazni esej, pomoću koga je analiziran profil vezivanja jedarnih proteina za haplotipove 15/12 i 14/10 promotora gena SMAD4. Iako se za dezoksiribonukleazni esej najčešće koriste fragmenti DNK obeleženi radioaktivnim izotopima, u ovom istraživanju su korišćeni fragmenti DNK obeleženi fluoroforima. Korišćenje fluorofora za obeležavanje DNK omogućava visoku senzitivnost zahvaljujući laserskoj detekciji, brzinu i jednostavnost zahvaljujući automatizaciji procesa elektroforeze, kao i bezbedan rad u odnosu na proceduru koja se zasniva na korišćenju radioaktivnih izotopa. Za zaštitu fragmenata korišćeni su ekstrakti pripremljeni iz nekoliko različitih ćelijskih linija: SaOS-2, HeLa, K562 i NTERA-2. Četiri navedene ćelijske linije predstavljaju model-sisteme za različite tipove tumora

koji se karakterišu različitim mehanizmima karcinogeneze. Čelijska linija SaOS-2 je odabrana jer su u njoj vršeni eksperimenti analize promotorske aktivnosti haplotipova promotora gena SMAD4 u kojima je dobijena razlika u aktivnosti između haplotipova 15/12 i 14/10. Čelijska linija NTERA-2 predstavlja ćelije humanog razvojnog tumora, zbog čega bi ekspresioni profil ove ćelijske linije trebalo da se odlikuje visokim nivoom ekspresije gena SMAD4, koji se u najvećoj meri eksprimira u razviću. Čelijske linije HeLa i K562, koje se često koriste u laboratorijskoj praksi, predstavljaju različite tipove tumora (epiteloidni karcinom i leukemija) i korišćene su da bi se isključio uticaj tipa maligniteta i razlike u ekspresionim profilima na dobijene rezultate. Iako se haplotipovi 15/12 i 14/10 razlikuju u promotorskoj aktivnosti, nisu otkrivene nikakve razlike u profilu vezivanja jedarnih proteina za ove varijante. Za oba analizirana haplotipa dobija se isti profil traka posle sečenja fragmenata desoksiribonukleazom i u oba slučajaja signal se skoro u potpunosti gubi nakon zaštite fragmenata jedarnim proteinima. Region od interesa u promotoru gena SMAD4 po svemu sudeći u potpunosti prekrivaju različiti jedarni proteini, što je u skladu sa činjenicom da analizirani fragment obuhvata bazalni promotor u kome se vezuju RNK polimeraza i opšti transkripcioni faktori. Da bi se detaljnije ispitala uloga regiona -4T(12) i njegovih polimorfnih varijanti u regulaciji ekspresije gena SMAD4 potrebno je da se prethodno precizno okarakteriše koji se proteini vezuju u ovom regionu, što bi bilo najbolje učiniti eksperimentima na najkraćem fragmentu koji je transkripciono aktivan, a koji obuhvata region od -365bp do +45bp (51).

Iako nije otkrivena razlika u efikasnosti vezivanja jedarnih proteina za varijantu -4T(10) u odnosu na varijantu -4T(12), moguće je da do promene dolazi na nivou efikasnosti samog procesa transkripcije tako što se međusobni odnos proteina transkripcionog kompleksa koji se vezuju u uzvodnom i nizvodnom regionu bazalnog promotora menja u zavisnosti od dužine trakta -4T(12). Na osnovu činjenice da varijante -4T(12), -4T(11) i -4T(9) pokazuju normalnu promotorsku aktivnost, a varijanta -4T(10) sniženu, može se pretpostaviti da broj od 10 timina u traktu na poziciji -4 nije optimalan, odnosno da na neki način narušava i umanjuje funkcionalnost čitavog transkripcionog kompleksa. Time bi

se mogao objasniti uticaj dužine trakta -4T(12) na promotorsku aktivnost, pošto sam trakt verovatno ne predstavlja mesto prepoznavanja za bilo koji od transkripcionih faktora koji se vezuju u njegovoj okolini.

Učestalost funkcionalnih mikrosatelitnih polimorfizama u *cis*-regulatornim regionima je veća nego što se pretpostavljalo (143). U nekim slučajevima mikrosatelitne mutacije mogu da koreliraju sa promenama u ekspresiji gena, kao što je slučaj sa MRE11 genom u kanceru želuca (144). U intronu 4 gena MRE11 otkriven je poly(T)11 trakt čija delecija 2bp dovodi do odsustva ili vrlo smanjene ekspresije ovog gena u gastričnom kanceru, a koji je povezan sa pozitivnom istorijom bolesti. Sličan fenomen otkriven je u promotoru gena UGT1A9 (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9), u kome je otkrivena insercija 1bp koja rezultira u povećanju niza polyT(9) na polyT(10) i dovodi do povećanja aktivnosti promotora za 2,6 puta (145). U promotoru gena HGF (hepatocyte growth factor) otkriven je element na -750bp koji funkcioniše kao transkripcioni represor i čija se delecija javlja u karcinomu dojke (146). Ovaj element je mononukleotidni ponovak polyA(30), a funkcionalne studije su otkrile da njegova delecija dovodi do konstitutivne aktivacije HGF promotora. Pretpostavlja se da je skraćenje ovog elementa na polyA(25) ili manje adenina povezano sa povišenom predispozicijom za karcinom dojke. U humanim ćelijama kancera kolona sa visokom stopom mikrosatelitne nestabilnosti prisutne su mutacije koje se nalaze u kodirajućem regionu gena za TGFbeta receptor II, a koje su po tipu mononukleotidni i dinukleotidni ponovci i imaju uticaj na nivo ekspresije, odnosno povezane su sa sniženim količinama transkripta (147).

Potencijalnu ulogu haplotipa 14/10 promotora gena SMAD4 u regulaciji ekspresije u normalnom pankreasnom tkivu i karcinomu pankreasa je teško proceniti na osnovu rezultata ove studije, pošto je analizirani broj uzoraka relativno mali. S druge strane, prednost ove studije je što je obuhvatila dva različita tipa maligniteta, pa odsustvo haplotipa 14/10 u tkivu kolorektalnog kancera ukazuje na mogućnost da pomenuti haplotip predstavlja promenu specifičnu za karcinom pankreasa. Otkriće ove genetske promene otvara nove pravce daljih istraživanja promotora gena SMAD4 i mogućnost za njenu

potencijalnu primenu kao molekularnog markera u dijagnostici i praćenju bolesti. Dalje izučavanje regulacije ekspresije promotora gena SMAD4 treba razmatrati u svjetlu nedavnog otkrića potencijalnog drugog promotora, koji se nalazi 16kb uzvodno od starta transkripcije (52). Predstoje istraživanja u kojim tkivima i u kojoj meri su ova dva promotora aktivna, pa samim tim i od kolikog su funkcionalnog značaja eventualne genetske promene koje su u njima prisutne u normalnoj ili malignoj ćeliji. Analiza promotora u genomima vertebrata ukazuje da 20-50% gena imaju alternativne promotore koji su jasno odvojeni jedan od drugog nekoliko stotina baznih parova (148). Alternativno korišćenje promotora može predstavljati mehanizam za tkivno- i razvojno- specifičnu aktivnost gena. Promotori sa TATA boksom se uglavnom koriste nakon embrionalnog razvića, a promotori bez TATA boksa su aktivni baš tokom ranog embrionalnog razvića (149, 150, 151). Razlika postoji i u načinu na koji transkripcija otpočinje. Visoko inducibilni geni sa TATA boksom koriste histonacetiltransferazni kompleks, dok geni sa TATA boksom i bazalnim nivoom ekspresije preferencijalno koriste transkripcioni faktor TFIID (152). Analizirani promotor gena SMAD4 nema TATA boks, a ima veći broj potencijalnih mesta za vezivanje proteina iz Hox familije, koji imaju vrlo važnu ulogu u embrionalnom razviću, kao i nekoliko mesta za vezivanje proteina Pit-1 i F2F, koji učestvuju u embrionalnom razvoju endokrinog sistema (51). Struktura i položaj dva potencijalna promotora u genu SMAD4 ukazuju da bi atipičan promotor, koji je prvi otkriven, mogao predstavljati promotor koji je aktivan u ranom razviću, a tipičan promotor, koji je otkriven tek nedavno, promotor koji u kasnijim fazama razvića preuzima bazalnu ekspresiju.

4. 6. Mononukleotidni ponovci u promotoru gena SMAD4 kao potencijalni molekularni markeri u karcinomu pankreasa

Osnovni problem u dijagnostikovanju i lečenju karcinoma pankreasa je nedostatak pouzdanih i specifičnih molekularnih markera, na čijem se razvoju intenzivno radi poslednjih godina (153, 154). Dijagnoza se u pravilu postavlja na osnovu nalaza endoskopskog ultrazvuka i kompjuterizovane tomografije, a kao

dodatni parametar u dijagnostici se najčešće koristi serumski nivo karbohidratnog antigena 19-9 (CA19-9) (155, 156). Imunohistohemijska analiza proteina p16, p53 i SMAD4 vrši se rutinski na uzorcima tkiva odstranjenim prilikom operativnog zahvata kao dopuna histopatološkoj dijagnozi, ali ova analiza ima samo prognostički značaj (157). Genetsko testiranje se još uvek ne vrši u svrhe dijagnostikovanja karcinoma pankreasa.

Izmenjen status tumor supresor gena SMAD4 u karcinomu pankresa predstavlja potencijalno dragocen molekularni marker zbog relativno velike specifičnosti za ovu bolest. Takođe je otkriveno da je SMAD4 od značaja za malignu progresiju kolorektalnih tumora, iako u njima nije inaktiviran u tolikoj meri kao u karcinomu pankreasa (158, 159), pa se može potencijalno koristiti i kao prognostički marker. Detekcija inaktivacije SMAD4 tumor supresora u kanceru se retko vrši na genetskom nivou i relativno je malo studija koje su se do sada bavile genetskom analizom markera SMAD4 u karcinomu pankreasa. U svrhe istraživanja i rutinske dijagnostike najčešće se koristi imunohistohemijski metod detekcije SMAD4 proteina, pomoću koga se procenjuje nivo njegove ekspresije i određuje njegova lokalizacija u ćeliji (157). Uvođenje analize gena SMAD4 u rutinsku dijagnostiku omogućilo bi da se u odnosu na imunohistohemijsku analizu poveća senzitivnost, kao i da se prevaziđe nedostatak koji se ogleda u činjenici da promene u nivou ekspresije i lokalizacije proteina ne koreliraju uvek jasno sa poremećajima strukture gena SMAD4.

Fenomen mikrosatelitne nestabilnosti je univerzalni molekularni marker karcinogeneze. Detekcija mikrosatelitne nestabilnosti u gastrointestinalnim tumorima obećava da postane jedan od najšire korišćenih molekularnih prognostičkih testova u humanim kancerima (160). Gastrointestinalni tumori koje karakteriše mikrosatelitna nestabilnost imaju jasan kliničko-patološki profil i relativno dobru prognozu. Pacijenti sa karcinomom pankreasa pozitivnim za mikrosatelitnu nestabilnost imaju bolju prognozu nakon resekcije, verovatno usled intenzivne imunoreakcije na tumor, pošto se pokazalo da je tumorska infiltracija leukocitima mnogo intenzivnija u tumorima pozitivnim za mikrosatelitnu nestabilnost (136). U poslednjih nekoliko godina intenzivno se razvijaju metode

za detekciju mikrosatelitne nestabilnosti u humanim malignim bolestima, uključujući i karcinom pankreasa. U detekciji mikrosatelitne nestabilnosti mononukleotidni ponovci su se pokazali superiornim u odnosu na dinukleotidne ponovke (161). Metoda analize fragmenata DNK obeleženih fluoroforima izuzetno je pogodna za simultanu detekciju mikrosatelitne nestabilnosti na više lokusa (161, 162, 163, 164, 165). Velika prednost ove metode je u visokoj efikasnosti na malim količinama DNK, odnosno u situacijama kada treba detektovati mali broj kopija mutirane DNK u prisustvu i do 500 puta većih količina normalne DNK, kao što je slučaj u malignim bolestima (166). Mogućnost variranja pristupa u dizajniranju protokola za analizu fragmenata može se iskoristiti za smanjenje lažno pozitivnih rezultata usled grešaka polimeraze, tako što se koriste tehnike zasnovane na produžavanju graničnika ili ligaciji (166, 167). U ovom istraživanju je otkriveno da je fenomen mikrosatelitne nestabilnosti u karcinomu pankreasa prisutan i u promotoru gena SMAD4, u regionu dva mononukleotidna ponovka -462T(15) i -4T(12). Međutim, mikrosatelitna nestabilnost u pomenutom regionu je prisutna u manjoj meri, što ograničava njenu potencijalnu primenu kao molekularnog markera.

Kada je u pitanju analiza genetskih promena promotora u molekularnoj dijagnostici, još uvek ne postoji usaglašen stav kako ih treba tretirati, odnosno da li treba testirati njihovo prisustvo kod pacijenata i kako tumačiti rezultate ovakvih analiza (168, 169). Za najveći broj otkrivenih promena u promotorskim regionima ne zna se pouzdano da li imaju uticaja na poremećaje u ekspresiji gena, pa samim tim ni da li su povezane sa razvojem bolesti. S druge strane, poznato je da prisustvo mutacija u promotorskim regionima gena može uticati na razvoj tumora i prognozu bolesti, kao i na susceptibilnost za tumor (170, 171). Mononukleotidni ponovci u promotoru gena SMAD4 otkriveni u ovom istraživanju predstavljaju potencijalne molekularne markere za karcinom pankreasa. Činjenica da je haplotip 14/10 u promotoru gena SMAD4 otkriven u tkivu karcinoma pankreasa, ali ne u tkivu kolorektalnog kancera, otvara mogućnost daljih istraživanja koja bi eventualno dovela do njegovog korišćenja u dijagnostici, prognostici i praćenju bolesti. U prilog ovome dodatno govori

činjenica da su u ovom istraživanju analizirani isključivo uzorci karcinoma pankreasa kod kojih je bolest dijagnostikovana u stadijumu u kome je lečenje putem operativnog uklanjanja tumora moguće, odnosno da su u pitanju tkiva u kojima se u većini ćelija još uvek nije dogodila delecija gena SMAD4 ili gubitak hromozoma na kome se on nalazi, što je karakteristika agresivnih metastatskih tumora. Da bi se eventualno uzeo u razmatranje kao potencijalni marker za karcinom pankreasa, potrebno je dodatno istražiti u kojoj meri je haplotip 14/10 povezan sa nastankom i razvojem bolesti. Od posebnog interesa je pitanje u kom trenutku dolazi do pojave ovog genetskog oštećenja, što je moguće ispitati genetskom analizom normalnih pankreasnih tkiva i različitih prekursorskih lezija tumora, ali je do ovakvih uzoraka teško doći jer se ne koriste u rutinskoj medicinskoj praksi. Osim daljeg istraživanja procesa nastanka ovog genetskog oštećenja i njegove uloge u karcinomu pankreasa, ispitivanje značaja haplotipa 14/10 za potencijalnu dijagnostičku primenu u ovoj bolesti trebalo bi da obuhvati njegovu analizu u većem broju uzoraka karcinoma pankreasa i kolorektalnog kancera. Takođe bi bilo poželjno da se ispita učestalost varijanti mononukleotidnih ponovaka u promotoru gena SMAD4 kod zdravih ispitanika, a i u drugim bolestima u kojima dolazi do oštećenja gena SMAD4, osim karcinoma pankreasa i kolorektalnog kancera.

Kao što je već ispitivano da li se i kako mutacije u genu KRAS mogu detektovati u DNK izolovanoj iz plazme pacijenata sa karcinomom pankreasa, i detekcija polimorfničkih varijanti mononukleotidnih ponovaka gena SMAD4 u plazmi takođe bi se u budućnosti mogla razvijati kao neinvazivna metoda za praćenje maligne bolesti (113, 114). Kada je u pitanju karcinom pankreasa, analiza prisustva haplotipa 14/10 u kombinaciji sa analizom prisustva mutacije u kodonu 12 gena KRAS mogla bi se evaluirati kao potencijalno informativan dijagnostički test za karcinom pankreasa. U ovom istraživanju kod 98% ispitanika je otkriveno prisustvo bar jedne od ove dve genetske promene u malignom tkivu pankreasa, a kod čak 64% ispitanika su bile prisutne obe promene. S druge strane, u analiziranim nemaligim tkivima pankreasa bila je prisutna samo jedna od pomenute dve genetske promene. Stoga, nakon analize većeg broja uzoraka i

potvrde rezultata dobijenih u ovom istraživanju, kombinovana analiza dva pomenuta molekularna markera bi mogla potencijalno da se razvija kao dijagnostička procedura koja bi dopunila postojeći klinički protokol za dijagnozu karcinoma pankreasa. Dalje otkrivanje novih molekularnih markera za karcinom pankreasa trebalo bi da dovede do razvijanja molekularno-dijagnostičkog testa koji bi obuhvatio više molekularnih markera, čija bi kombinovana analiza mogla da obezbedi visoku specifičnost u dijagnostikovanju karcinoma pankreasa. S obzirom na mogućnost da se testiranje vrši na uzorku plazme pacijenta, ovakva analiza bi mogla da se koristi za rutinsku neinvazivnu dijagnostiku karcinoma pankreasa.

5. ZAKLJUČCI

1. Mutacija u kodonu 12 gena KRAS je otkrivena u 74% slučajeva karcinoma pankreasa, u kome predstavlja čest molekularni događaj, kao i u 28% slučajeva kolorektalnog kancera, u kome se javlja znatno ređe.

2. Analiza metilacionog statusa promotora gena SMAD4 je uspešno izvršena u 34% uzoraka tkiva karcinoma pankreasa, pri čemu metilacija promotora nije otkrivena ni u jednom slučaju i verovatno ne predstavlja mehanizam inaktivacije gena SMAD4 u ovoj bolesti.

3. Strukturna analiza regiona promotora gena SMAD4 koji obuhvata -620bp do +80bp u odnosu na prethodno određeni start transkripcije u tkivu karcinoma pankreasa dovela je do identifikacije dva polimorfna niza timina na pozicijama -462 i -4, koji su se u analiziranim uzorcima tkiva pankreasa razlikovali u odnosu na normalne genetske varijante, -462T(15) i -4T(12).

4. Analizom varijanti i haplotipova polimorfizama -462T(15) i -4T(12) u promotoru gena SMAD4 u uzorcima tkiva i periferne krvi pacijenata sa karcinomom pankreasa i kolorektalnim kancerom otkriveno je ukupno 7 varijanti polimorfizma -462T(15), dužina 9, 10, 12, 13, 14, 15 i 16 timina, i 4 varijante polimorfizma -4T(12), dužina 9, 10, 11 i 12 timina.

5. Analizom promotorske aktivnosti različitih haplotipova promotora gena SMAD4 pokazana je statistički značajno snižena aktivnost ($p < 0,001$) haplotipa 14/10, čija je aktivnost iznosila 65% aktivnosti normalne varijante 15/12, dok su ostali analizirani haplotipovi (15/11, 14/11, 12/11 i 12/9) imali aktivnost u nivou aktivnosti normalne varijante.

6. Analiza vezivanja proteina jedarnih ekstrakata četiri različita ćelijska tipa (SaOS-2, HeLa, K562 i NTERA-2) za promotor gena SMAD4 sa haplotipovima 15/12 i 14/10 nije pokazala razlike u profilu vezivanja proteina za ove fragmente.

7. Distribucija haplotipova promotora gena SMAD4 ukazuje da od varijanti polimorfizma -462T(15) varijante -462T(16), -462T(15), -462T(14) i -462T(12) predstavljaju polimorfne varijante prisutne u opštoj populaciji, dok varijante -462T(10) i -462T(9) verovatno predstavljaju genetsko oštećenje do kog dolazi u malignom tkivu.

8. Distribucija haplotipova promotora gena SMAD4 ukazuje da od varijanti polimorfizma -4T(12) varijante -4T(12), -4T(11) i -4T(9) predstavljaju polimorfne varijante prisutne u opštoj populaciji, dok varijanta -462T(10) verovatno predstavlja genetsko oštećenje do kog dolazi u malignom tkivu.

9. U karcinomu pankreasa najčešći haplotip promotora gena SMAD4 u analiziranim tkivima je bio haplotip 14/10, prisutan u 88% slučajeva, koji nije otkriven u drugim analiziranim tkivima i verovatno predstavlja genetsko oštećenje specifično za maligne ćelije u pankreasu.

10. U kolorektalnom kanceru u 8% slučajeva je uočeno da je u tkivu kancera došlo do strukturne promene u promotoru gena SMAD4 u odnosu na haplotip prisutan u nemalignom tkivu, pri čemu je haplotip 15/12 u po 4% slučajeva bio izmenjen u haplotipove 10/12 i 9/12.

11. Učestalost i ulogu haplotipova 14/10, 10/12 i 9/12 promotora gena SMAD4 otkrivenih u karcinomu pankreasa i kolorektalnom kanceru treba dalje istražiti, kao i mogućnost primene analize ovih markera u dijagnostici i praćenju navedenih bolesti.

6. LITERATURA

1. Lankisch PG, Buchler M, Mossner J, Muller-Lissner S. A primer of pancreatitis. Springer. 1997.
2. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*. 2007;56(8):1134-1152.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.
4. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(12):897-909.
5. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20(2):197-209.
6. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2007;117(1):50-59.
7. Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA. Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem*. 2007;101(4):887-907.
8. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 2006;20(10):1218-1249.
9. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2008;3:157-188.
10. Koorstra JBM, Hustinx SR, Offerhaus GJA, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*. 2008;8:110-125.
11. Ranganathan P, Harsha HC, Pandey A. Molecular alterations in exocrine neoplasms of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(3):405-412.
12. Bhatti I, Lee A, Lund J, Larvin M. Small RNA: a large contributor to carcinogenesis? *J Gastrointest Surg*. 2009;13(7):1379-1388.
13. Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Klöppel G, Kalthoff H, Ungefroren H, Löhner M, Scarpa A. Genetic

- profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.* 2001;439(6):798-802.
14. Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol.* 2000;157(4):1105-1111.
 15. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 2000;60(7):2002-2006.
 16. Takahashi H, Oda T, Hasebe T, Aoyagi Y, Kinoshita T, Konishi M, Nakagohri T, Inoue K, Takahashi S, Kawahira H, Monden M, Ochiai A. Biologically different subgroups of invasive ductal carcinoma of the pancreas: Dpc4 status according to the ratio of intraductal carcinoma components. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3772-3779.
 17. Iacobuzio-Donahue CA, Wilentz RE, Argani P, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas: frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(11):1544-1548.
 18. Hua Z, Zhang YC, Hu XM, Jia ZG. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003;9(12):2764-2767.
 19. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4115-4121.
 20. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, DePinho RA. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 2006;20(22):3130-3146.

21. Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, Jhala NC, Kim HG, Schoeb TR, Grizzle WE, Klug CA. Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res.* 2007;67(17):8121-8130.
22. Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, Deng CX, Hruban RH, Adsay NV, Tuveson DA, Hingorani SR. Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell.* 2007;11(3):229-243.
23. Popović Hadzija M, Korolija M, Jakić Razumović J, Pavković P, Hadzija M, Kapitanović S. K-ras and Dpc4 mutations in chronic pancreatitis: case series. *Croat Med J.* 2007;48(2):218-224.
24. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science.* 1996;271(5247):350-353.
25. GeneCards: <http://www.genecards.org/>
26. CHIP Bioinformatics Tools: <http://snpper.chip.org/>
27. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1995;139(3):1347-1358.
28. Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(2):790-794.
29. Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, Wang XF. Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol.* 1997;17(12):7019-7028.
30. Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH,

- Vogelstein B, Wang XF. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell*. 1996;87(2):173.
31. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005;19(23):2783-2810.
 32. Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev*. 1998;12(2):186-197.
 33. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*. 1996;383(6603):832-836.
 34. De Caestecker MP, Hemmati P, Larisch-Bloch S, Ajmera R, Roberts AB, Lechleider RJ. Characterization of functional domains within Smad4/DPC4. *J Biol Chem*. 1997;272(21):13690-13696.
 35. Jones JB, Kern SE. Functional mapping of the MH1 DNA-binding domain of DPC4/SMAD4. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):2363-2368.
 36. Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(3):383-408.
 37. Wu RY, Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol*. 1997;17(5):2521-2528.
 38. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J*. 1997;16(17):5353-5362.
 39. Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem*. 1998;273(4):1872-1879.
 40. Liu F, Pouponnot C, Massagué J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev*. 1997;11(23):3157-3167.

41. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 1998;17(11):3091-3100.
42. Shioda T, Lechleider RJ, Dunwoodie SL, Li H, Yahata T, de Caestecker MP, Fenner MH, Roberts AB, Isselbacher KJ. Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(17):9785-9790.
43. Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev.* 1998;12(14):2153-2163.
44. Tada K, Inoue H, Ebisawa T, Makuuchi M, Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Region between alpha-helices 3 and 4 of the mad homology 2 domain of Smad4: functional roles in oligomer formation and transcriptional activation. *Genes Cells.* 1999;4(12):731-741.
45. Atfi A, Buisine M, Mazars A, Gespach C. Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem.* 1997;272(40):24731-24734.
46. Grau AM, Zhang L, Wang W, Ruan S, Evans DB, Abbruzzese JL, Zhang W, Chiao PJ. Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 1997;57(18):3929-3934.
47. Hunt KK, Fleming JB, Abramian A, Zhang L, Evans DB, Chiao PJ. Overexpression of the tumor suppressor gene Smad4/DPC4 induces p21waf1 expression and growth inhibition in human carcinoma cells. *Cancer Res.* 1998;58(24):5656-5661.

48. Song CZ, Siok TE, Gelehrter TD. Smad4/DPC4 and Smad3 mediate transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling through direct binding to a novel TGF-beta-responsive element in the human plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29287-29290.
49. Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, Datto MB, Liberati NT, Li JM, Wang XF. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):1821-1830.
50. Dai JL, Bansal RK, Kern SE. G1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: phenotypes reversed by a tumorigenic mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1427-1432.
51. Minami R, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. Analysis of 5'-flanking region of human Smad4 (DPC4) gene. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1443(1-2):182-185.
52. Calva D, Chinnathambi S, Howe JR. Discovery of SMAD4 promoter 16 Kb upstream from its translation start site. *J Surg Res.* 2009;151(2):193.
53. Anna CH, Devereux TR. Sequence and chromosomal mapping of the mouse homolog (Madh4) of the human DPC4/MADH4 gene. *Mamm Genome.* 1997;8(6):443-444.
54. Yang X, Li C, Xu X, Deng C. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3667-3672.
55. Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, Itie A, Mirtsos C, Cheung A, Hahn S, Wakeham A, Schwartz L, Kern SE, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* 1998;12(1):107-119.
56. Takaku K, Miyoshi H, Matsunaga A, Oshima M, Sasaki N, Taketo MM. Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res.* 1999;59(24):6113-6117.

57. Xu X, Brodie SG, Yang X, Im YH, Parks WT, Chen L, Zhou YX, Weinstein M, Kim SJ, Deng CX. Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene*. 2000;19(15):1868-1874.
58. Dai JL, Turnacioglu KK, Schutte M, Sugar AY, Kern SE. Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells. *Cancer Res*. 1998;58(20):4592-4597.
59. Reiss M, Santoro V, de Jonge RR, Vellucci VF. Transfer of chromosome 18 into human head and neck squamous carcinoma cells: evidence for tumor suppression by Smad4/DPC4. *Cell Growth Differ*. 1997;8(4):407-415.
60. De Winter JP, Roelen BA, ten Dijke P, van der Burg B, van den Eijnden-van Raaij AJ. DPC4 (SMAD4) mediates transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induced growth inhibition and transcriptional response in breast tumour cells. *Oncogene*. 1997;14(16):1891-1899.
61. Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Lüttges J, Klöppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9624-9629.
62. Dai JL, Schutte M, Bansal RK, Wilentz RE, Sugar AY, Kern SE. Transforming growth factor-beta responsiveness in DPC4/SMAD4-null cancer cells. *Mol Carcinog*. 1999;26(1):37-43.
63. Bartsch D, Barth P, Bastian D, Ramaswamy A, Gerdes B, Chaloupka B, Deiss Y, Simon B, Schudy A. Higher frequency of DPC4/Smad4 alterations in pancreatic cancer cell lines than in primary pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Lett*. 1999;139(1):43-49. A
64. Moskaluk CA, Hruban RH, Schutte M, Lietman AS, Smyrk T, Fusaro L, Fusaro R, Lynch J, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch HT, Kern SE. Genomic sequencing of DPC4 in the analysis of familial pancreatic carcinoma. *Diagn Mol Pathol*. 1997;6(2):85-90.

65. Howe JR, Ringold JC, Summers RW, Mitros FA, Nishimura DY, Stone EM. A gene for familial juvenile polyposis maps to chromosome 18q21.1. *Am J Hum Genet.* 1998;62(5):1129-1136.
66. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Järvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IP, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science.* 1998;280(5366):1086-1088.
67. Houlston R, Bevan S, Williams A, Young J, Dunlop M, Rozen P, Eng C, Markie D, Woodford-Richens K, Rodriguez-Bigas MA, Leggett B, Neale K, Phillips R, Sheridan E, Hodgson S, Iwama T, Eccles D, Bodmer W, Tomlinson I. Mutations in DPC4 (SMAD4) cause juvenile polyposis syndrome, but only account for a minority of cases. *Hum Mol Genet.* 1998;7(12):1907-1912.
68. Kim IJ, Ku JL, Yoon KA, Heo SC, Jeong SY, Choi HS, Hong KH, Yang SK, Park JG. Germline mutations of the dpc4 gene in Korean juvenile polyposis patients. *Int J Cancer.* 2000;86(4):529-532.
69. Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306:799-804.
70. Takagi Y, Kohmura H, Futamura M, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S. Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology.* 1996;111(5):1369-1372.
71. MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R. Comparative mutational analysis of DPC4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene.* 1997;15(9):1111-1114.
72. Koyama M, Ito M, Nagai H, Emi M, Moriyama Y. Inactivation of both alleles of the DPC4/SMAD4 gene in advanced colorectal cancers: identification of seven novel somatic mutations in tumors from Japanese patients. *Mutat Res.* 1999;406(2-4):71-77.
73. Ohtaki N, Yamaguchi A, Goi T, Fukaya T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Urano T. Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in

- colorectal cancers and relationship to metastasis. *Int J Oncol.* 2001;18(2):265-270.
74. Mamot C, Mild G, Reuter J, Laffer U, Metzger U, Terracciano L, Boulay JL, Herrmann R, Rochlitz C. Infrequent mutation of the tumour-suppressor gene *Smad4* in early-stage colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2003;88(3):420-423.
75. Popović Hadzija M, Radosevic S, Kovacević D, Lukac J, Hadzija M, Spaventi R, Pavelić K, Kapitanović S. Status of the *DPC4* tumor suppressor gene in sporadic colon adenocarcinoma of Croatian patients: identification of a novel somatic mutation. *Mutat Res.* 2004;548(1-2):61-73.
76. Kim SK, Fan Y, Papadimitrakopoulou V, Clayman G, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Mao L. *DPC4*, a candidate tumor suppressor gene, is altered infrequently in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(11):2519-2521.
77. Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H, Sidransky D, Casero RA Jr, Meltzer PS, Hahn SA, Kern SE. *DPC4* gene in various tumor types. *Cancer Res.* 1996;56(11):2527-2530.
78. Nagatake M, Takagi Y, Osada H, Uchida K, Mitsudomi T, Saji S, Shimokata K, Takahashi T, Takahashi T. Somatic in vivo alterations of the *DPC4* gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* 1996;56(12):2718-2720.
79. Hahn SA, Bartsch D, Schroers A, Galehdari H, Becker M, Ramaswamy A, Schwarte-Waldhoff I, Maschek H, Schmiegel W. Mutations of the *DPC4/Smad4* gene in biliary tract carcinoma. *Cancer Res.* 1998;58(6):1124-1126.
80. Lazzereschi D, Nardi F, Turco A, Ottini L, D'Amico C, Mariani-Costantini R, Gulino A, Coppa A. A complex pattern of mutations and abnormal splicing of *Smad4* is present in thyroid tumours. *Oncogene.* 2005;24(34):5344-5354.

81. Hoque AT, Hahn SA, Schutte M, Kern SE. DPC4 gene mutation in colitis associated neoplasia. *Gut*. 1997;40(1):120-122.
82. Kageyama H, Seki N, Yamada S, Sakiyama S, Nakagawara A. DPC4 splice variants in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 1998;122(1-2):187-193.
83. Bartsch D, Hahn SA, Danichevski KD, Ramaswamy A, Bastian D, Galehdari H, Barth P, Schmiegel W, Simon B, Rothmund M. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors. *Oncogene*. 1999;18(14):2367-2371. B
84. Scarpa A, Orlandini S, Moore PS, Lemoine NR, Beghelli S, Baron A, Falconi M, Zamboni G. Dpc4 is expressed in virtually all primary and metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *Virchows Arch*. 2002;440(2):155-159.
85. Perren A, Saremaslani P, Schmid S, Bonvin C, Locher T, Roth J, Heitz PU, Komminoth P. DPC4/Smad4: no mutations, rare allelic imbalances, and retained protein expression in pancreatic endocrine tumors. *Diagn Mol Pathol*. 2003;12(4):181-186.
86. Sugimura T, Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutat Res*. 2000;462(2-3):235-246.
87. The Human Gene Mutation Database:
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
88. Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature*. 1997;388(6637):87-93.
89. Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G, Massagué J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature*. 1997;388(6637):82-87.
90. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):687-692.
91. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet*. 2002;111(2):115-127.

92. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002;21(35):5427-5440.
93. Zhou Y, Kato H, Shan D, Minami R, Kitazawa S, Matsuda T, Arima T, Barrett JC, Wake N. Involvement of mutations in the DPC4 promoter in endometrial carcinoma development. *Mol Carcinog*. 1999;25(1):64-72.
94. Aitchison AA, Veerakumarasivam A, Vias M, Kumar R, Hamdy FC, Neal DE, Mills IG. Promoter methylation correlates with reduced Smad4 expression in advanced prostate cancer. *Prostate*. 2008;68(6):661-674.
95. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M, eds. *American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed, New York, NY, USA, Springer, 2002..
96. Faolain EO, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Lambkin HA, Byrne HJ, Lyng FM. Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(1):121-129.
97. Berger DH, Chang H, Wood M, Huang L, Heath CW, Lehman T, Ruggeri BA. Mutational activation of K-ras in nonneoplastic exocrine pancreatic lesions in relation to cigarette smoking status. *Cancer*. 1999;85(2):326-332.
98. Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem*. 2000;46(6):883-884.
99. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
100. Roychoudhury A, Basu S, Sengupta DN. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors. *Indian J Biochem Biophys*. 2009;46(5):395-400.
101. Huff JP, Grant BJ, Penning CA, Sullivan KF. Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *Biotechniques*. 1990;9(5):576-577.
102. Zianni M, Tessanne K, Merighi M, Laguna R, Tabita FR. Identification of the DNA bases of a Dnase I footprint by the use of dye primer sequencing on

- an automated capillary DNA analysis instrument. *J Biomol Tech.* 2006;17(2):103-113.
103. Roth S, Laiho P, Salovaara R, Launonen V, Aaltonen LA. No SMAD4 hypermethylation in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2000;83(8):1015-1019.
104. Alberici P, Gaspar C, Franken P, Gorski MM, de Vries I, Scott RJ, Ristimäki A, Aaltonen LA, Fodde R. Smad4 haploinsufficiency: a matter of dosage. *Pathogenetics.* 2008;1(1):2.
105. Ando T, Sugai T, Habano W, Jiao YF, Suzuki K. Analysis of SMAD4/DPC4 gene alterations in multiploid colorectal carcinomas. *J Gastroenterol.* 2005;40(7):708-715.
106. Frayling IM. Methods of molecular analysis: mutation detection in solid tumours. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002;55:73-79.
107. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Denenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams PM, Palma JF, Warrington JA. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1929-1935.
108. Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol.* 2004;10(4):471-475.
109. Kim J, Reber HA, Dry SM. Unfavourable prognosis associated with K-ras gene mutation in pancreatic cancer surgical margins. *Gut.* 2006;55(11):1598-1605.
110. Sohn BS, Kim TW, Lee JL, Ryu MH, Chang HM, Kang YK, Park HS, Na YS, Jang SJ, Kim JC, Lee JS. The role of KRAS mutations in predicting the efficacy of cetuximab-plus-irinotecan therapy in irinotecan-refractory Korean metastatic colorectal cancer patients. *Oncology.* 2009;77(3-4):224-230.
111. Yen LC, Yeh YS, Chen CW, Wang HM, Tsai HL, Lu CY, Chang YT, Chu KS, Lin SR, Wang JY. Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients

- with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(13):4508-4513.
112. Pugliese V, Pujic N, Saccomanno S, Gatteschi B, Pera C, Aste H, Ferrara GB, Nicolo G. Pancreatic intraductal sampling during ERCP in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer: cytologic studies and k-ras-2 codon 12 molecular analysis in 47 cases. *Gastrointest Endosc.* 2001;54(5):595-599.
113. Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Sole M, Capella G, Lluís F, Fernández-Cruz L, Navarro S, Farre A. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol.* 1999;17(2):578-584.
114. Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2129-2137.
115. Ji Z, Mei FC, Lory PL, Gilbertson SR, Chen Y, Cheng X. Chemical genetic screening of KRAS-based synthetic lethal inhibitors for pancreatic cancer. *Front Biosci.* 2009;14:2904-2910.
116. Modjtahedi H, Essapen S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities. *Anticancer Drugs.* 2009;20(10):851-855.
117. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6(9):519-527.
118. Rivera F, López-Tarruella S, Vega-Villegas ME, Salcedo M. Treatment of advanced pancreatic cancer: from gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(4):335-339.
119. Smith ZD, Gu H, Bock C, Gnirke A, Meissner A. High-throughput bisulfite sequencing in mammalian genomes. *Methods.* 2009;48(3):226-232.

120. Derks S, Bosch LJ, Niessen HE, Moerkerk PT, van den Bosch SM, Carvalho B, Mongera S, Voncken JW, Meijer GA, de Bruine AP, Herman JG, van Engeland M. Promoter CpG island hypermethylation and H3K9me3 and H3K27me3-mediated epigenetic silencing targets the Deleted in Colon Cancer (DCC) gene in colorectal carcinogenesis without affecting neighboring genes on chromosomal region 18q21. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):1041-1048.
121. Kloth JN, Kenter GG, Spijker HS, Uljee S, Corver WE, Jordanova ES, Fleuren GJ, Gorter A. Expression of Smad2 and Smad4 in cervical cancer: absent nuclear Smad4 expression correlates with poor survival. *Mod Pathol*. 2008;21(7):866-875.
122. Wang LH, Kim SH, Lee JH, Choi YL, Kim YC, Park TS, Hong YC, Wu CF, Shin YK. Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression. *Clin Cancer Res*. 2007;13(1):102-110.
123. Von Gersdorff G, Susztak K, Rezvani F, Bitzer M, Liang D, Böttinger EP. Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta. *J Biol Chem*. 2000;275(15):11320-11326.
124. Nagarajan RP, Zhang J, Li W, Chen Y. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J Biol Chem*. 1999;274(47):33412-33418.
125. Stopa M, Anhuf D, Terstegen L, Gatsios P, Gressner AM, Dooley S. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000;275(38):29308-29317.
126. Li J, Tsuji K, Komori T, Miyazono K, Wrana JL, Ito Y, Nifuji A, Noda M. Smad2 overexpression enhances Smad4 gene expression and suppresses CBFA1 gene expression in osteoblastic osteosarcoma

- ROS17/2.8 cells and primary rat calvaria cells. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31009-31015.
127. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1079-1099.
128. Bader S, Walker M, Hendrich B, Bird A, Bird C, Hooper M, Wyllie A. Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. *Oncogene.* 1999;18(56):8044-8047.
129. Kuismanen SA, Moisio AL, Schweizer P, Truninger K, Salovaara R, Arola J, Butzow R, Jiricny J, Nyström-Lahti M, Peltomäki P. Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability. *Am J Pathol.* 2002;160(6):1953-1958.
130. Ichikawa A, Sugano K, Fujita S. DNA variants of BAT-25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability. *Jpn J Clin Oncol.* 2001;31(7):346-348.
131. Saito M, Okamoto A, Kohno T, Takakura S, Shinozaki H, Isonishi S, Yasuhara T, Yoshimura T, Ohtake Y, Ochiai K, Yokota J, Tanaka T. Allelic imbalance and mutations of the PTEN gene in ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2000;85(2):160-165.
132. Schwartz S Jr, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventós J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.* 1999;59(12):2995-3002.
133. Suzuki K, Dai T, Suzuki I, Dai Y, Yamashita K, Perucho M. Low mutation incidence in polymorphic noncoding short mononucleotide repeats in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *Cancer Res.* 2002;62(7):1961-1965.
134. Starostik P, Greiner A, Schultz A, Zettl A, Peters K, Rosenwald A, Kolve M, Müller-Hermelink HK. Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood.* 2000;95(4):1180-1187.

135. Duval A, Reperant M, Hamelin R. Comparative analysis of mutation frequency of coding and non coding short mononucleotide repeats in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Oncogene*. 2002;21(52):8062-8066.
136. Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Hirakawa K. Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(8):2536-2540.
137. Clarke LA, Rebelo CS, Gonçalves J, Boavida MG, Jordan P. PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol*. 2001;54(5):351-353.
138. Suraweera N, Iacopetta B, Duval A, Compoint A, Tubacher E, Hamelin R. Conservation of mononucleotide repeats within 3' and 5' untranslated regions and their instability in MSI-H colorectal cancer. *Oncogene*. 2001;20(51):7472-7477.
139. Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Ishikawa M, Niikawa N, Yoshiura K. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its signaling pathway. *J Hum Genet*. 2002;47(9):478-483.
140. Heintzman ND, Ren B. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(4):386-400.
141. Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*. 2007;8(6):424-436.
142. Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(3):253-259.
143. Rockman MV, Wray GA. Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol*. 2002;19(11):1991-2004.

144. Ottini L, Falchetti M, Saieva C, De Marco M, Masala G, Zanna I, Paglierani M, Giannini G, Gulino A, Nesi G, Mariani Costantini R, Palli D. MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2337-2343.
145. Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M, Hara Y, Tachibana O, Yamashita J, McLeod HL, Yokoi T. A novel polymorphism in the promoter region of human UGT1A9 gene (UGT1A9*22) and its effects on the transcriptional activity. *Pharmacogenetics*. 2004;14(5):329-332.
146. Ma J, DeFrances MC, Zou C, Johnson C, Ferrell R, Zarnegar R. Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer. *J Clin Invest*. 2009 Feb 2. pii: 36640. doi: 10.1172/JCI36640. [Epub ahead of print]
147. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995;268(5215):1336-1338.
148. Muller F, Demeny MA, Tora L. New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *J Biol Chem*. 2007;282(20):14685-14689.
149. Davis W Jr, Schultz RM. Developmental change in TATA-box utilization during preimplantation mouse development. *Dev Biol*. 2000;218(2):275-283.
150. Duan ZJ, Fang X, Rohde A, Han H, Stamatoyannopoulos G, Li Q. Developmental specificity of recruitment of TBP to the TATA box of the human gamma-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5509-5514.
151. Majumder S, DePamphilis ML. TATA-dependent enhancer stimulation of promoter activity in mice is developmentally acquired. *Mol Cell Biol*. 1994;14(6):4258-4268.

152. Sikorski TW, Buratowski S. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(3):344-351.
153. Jimeno A, Hidalgo M. Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(4):787-796.
154. Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, Balakrishnan L, Dwivedi SB, Telikicherla D, Selvan LD, Goel R, Mathivanan S, Marimuthu A, Kashyap M, Vizza RF, Mayer RJ, Decaprio JA, Srivastava S, Hanash SM, Hruban RH, Pandey A. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med.* 2009;6(4):e1000046.
155. Mendieta Zeron H, García Flores JR, Romero Prieto ML. Limitations in improving detection of pancreatic adenocarcinoma. *Future Oncol.* 2009;5(5):657-668.
156. Gemmel C, Eickhoff A, Helmstädter L, Riemann JF. Pancreatic cancer screening: state of the art. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;3(1):89-96.
157. Wilentz RE, Su GH, Dai JL, Sparks AB, Argani P, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol.* 2000;156(1):37-43.
158. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell.* 1998;92(5):645-656.
159. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene.* 1999;18(20):3098-3103.
160. Simpson AJ, Caballero OL, Pena SD. Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer. *Trends Mol Med.* 2001;7(2):76-80.

161. Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Buhard O, Duval A, Chung TK, Hamelin R. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis*. 2006;27(5):951-955.
162. Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, Hamilton SR, Griffin CA, Eshleman JR. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*. 2000;2(1):20-28.
163. Umetani N, Sasaki S, Watanabe T, Ishigami H, Ueda E, Nagawa H. Diagnostic primer sets for microsatellite instability optimized for a minimal amount of damaged DNA from colorectal tissue samples. *Ann Surg Oncol*. 2000;7(4):276-280.
164. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):251-257.
165. Thompson JM, Salipante SJ. PeakSeeker: a program for interpreting genotypes of mononucleotide repeats. *BMC Res Notes*. 2009;2:17.
166. Sun X, Liu Y, Lutterbaugh J, Chen WD, Markowitz SD, Guo B. Detection of mononucleotide repeat sequence alterations in a large background of normal DNA for screening high-frequency microsatellite instability cancers. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):454-459.
167. Zirvi M, Nakayama T, Newman G, McCaffrey T, Paty P, Barany F. Ligase-based detection of mononucleotide repeat sequences. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(24):e40.
168. De Vooght KM, van Solinge WW. Gene promoter analysis in molecular diagnostics: do or don't? *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;9(5):403-405.
169. De Vooght KM, van Wijk R, van Solinge WW. Management of gene promoter mutations in molecular diagnostics. *Clin Chem*. 2009;55(4):698-708.
170. Moran A, Iñesta P, de Juan C, García-Aranda C, Díaz-Lopez A, Benito M. Impairment of stromelysin-1 transcriptional activity by promoter mutations

in high microsatellite instability colorectal tumors. *Cancer Res.* 2005;65(9):3811-3814.

171. Nomura F, Itoga S, Uchimoto T, Tomonaga T, Nezu M, Shimada H, Ochiai T. Transcriptional activity of the tandem repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the human CYP2E1 gene. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27(8Suppl):42S-46S.



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Структурна и функционална анализа 5'регулаторног региона гена смд4 у карциному панкреаса човека

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 23.12.2013.

Потпис

А. М. М. М. М.

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структурна и функционална анализа 5'регулаторног региона гена смад4 у карциному панкреаса човека

која је моје ауторско дело.

Сагласан сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



У Београду, 23. 12. 2013.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.