

Ekspresija proteina GLI1 i S100A7 u melanomu čovjeka

Hajpek, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:768517>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Helena Hajpek

**Ekspresija proteina GLI1 i S100A7 u
melanomu čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Helena Hajpek

**GLI1 and S100A7 protein expression in
human melanoma**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Maje Sabol te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlič. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Prije svega, neizmjereno hvala mojoj mentorici dr. sc. Maji Sabol na beskonačnoj susretljivosti, strpljivosti i posvećenosti te na iskazanom povjerenju i motivaciji koja me je vodila tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko Vam hvala što ste vjerovali u mene i bili spremni pomoći u svim teškim trenucima, uz Vas sam naučila kako zavoljeti znanost i prije svega što znači biti divan čovjek i mentor!

Zahvaljujem se i komentorici, izv. prof. dr. sc. Ingi Urlić, na pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i voditelju laboratorija dr. sc. Petru Ozretiću te dr. sc. Vesni Musani na iskazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada. Hvala Josipi, dr. sc. Matei i dr. sc. Nikolini na velikodušnoj pomoći i uloženom trudu, na svim savjetima i zanimljivim razgovorima, zbog vas je rad u laboratoriju bio posebno iskustvo!

Na kraju ovog dijela mog akademskog puta, najviše bih se htjela zahvaliti svojoj obitelji: mami Dragici, tati Ivici, sestri Magdaleni i šogoru Ivanu, što su vjerovali u mene i bili najbolja podrška i oslonac u svim teškim trenucima. Bez vas ništa ovo ne bi bilo moguće!

Posebno mjesto tijekom ovog putovanja imaju i moji prijatelji. Pogotovo se zahvaljujem onima koji su bili uz mene još od djetinjstva: Mii, Clari, Ana Marii, Maji, Marini, Magdaleni, Emi i Katarini. Hvala mojoj Hakk ekipi, Eni, Nini i Lei na podršci te svim savjetima, kavama i divnim uspomnama koje sam imala priliku dijeliti s vama tijekom ovih studijskih dana.

Veliko hvala i mojim prekrasnim docimericama, mojim curama iz prvog paviljona, na najboljim studentskim danima koje sam mogla zamisliti!

I na kraju, posebno hvala ide mojoj baki Ruži, koja me sigurno sada ponosno prati od gore.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija proteina GLI1 i S100A7 u melanomu čovjeka

Helena Hajpek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Signalni put Hedgehog važan je tijekom embrionalnog razvoja, te u odraslom organizmu u održavanju homeostaze tkiva. Otkriće aberantne aktivacije puta Hedgehog kod melanoma, jednog od najagresivnijih tumora, značilo je i potencijalno usmjeravanja novih terapija i dijagnostike melanoma na komponente ovog puta i na gene i proteine koje ovaj signalni put regulira. U ovom diplomskom radu analizirana je ekspresija proteina GLI1 i S100A7 na uzorcima melanoma iz pacijenata te na staničnim linijama melanoma i keratinocita kože. Glavni cilj bio je ispitati postoji li povezanost u ekspresiji ova dva proteina u tkivima melanoma, kako bi se utvrdilo regulira li GLI1 ekspresiju S100A7. Ekspresija transkripcijskog faktora GLI1, komponente puta Hedgehog, i njegove mete, proteina S100A7, detektirani su uglavnom u epitelu koji okružuje tumor, dok je njihova ekspresija u samim tumorima slaba. Intenzitet bojanja oba proteina raste sa stadijem bolesti. Imunofluorescencija na staničnim linijama dodatno je potvrdila porast ekspresije proteina S100A7 u ovisnosti o ekspresiji proteina GLI1 staničnom modelu melanoma i keratinocita kože. Proteini GLI1 i S100A7 važna su komponenta razvoja melanoma pa bi nova istraživanja usmjerena na ove proteine mogla dovesti do njihovog korištenja kao potencijalnih prognostičkih markera, kao i do razvoja novih lijekova.

Ključne riječi: signalni put Hedgehog, epitel, imunohistokemija, imunofluorescencija
(51 stranica, 24 slike, 2 tablice, 84 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Maja Sabol
Komentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:
Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić
Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić
Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 8. 2. 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

GLI1 and S100A7 protein expression in human melanoma

Helena Hajpek

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The Hedgehog signaling pathway is important during embryonic development, and in the adult organism in maintaining tissue homeostasis. The discovery of aberrant activation of the Hedgehog pathway in melanoma, one of the most aggressive tumors, meant potentially directing new therapies and melanoma diagnostics to the components of this pathway and to the genes and proteins that this signaling pathway regulates. In this graduate thesis, the expression of GLI1 and S100A7 proteins was analyzed on melanoma samples from patients and on melanoma and skin keratinocytes cell lines. The main objective was to examine whether there is a connection in the expression of these two proteins in melanoma tissues, in order to determine whether GLI1 regulates the expression of S100A7. The expression of the transcription factor GLI1, a component of the Hedgehog pathway, and its target, the protein S100A7, were detected mainly in the epithelium surrounding the tumor, while their expression in the tumors themselves was weak. The staining intensity of both proteins increases with the stage of the disease. Immunofluorescence on cell lines further confirmed the increase in S100A7 protein expression in dependence on GLI1 protein expression in melanoma and skin keratinocyte cell models. GLI1 and S100A7 proteins are an important component of melanoma development, so new research focused on these proteins could lead to their use as potential prognostic markers, as well as to the development of new drugs.

Keywords: Hedgehog signaling pathway, epithelium, immunohistochemistry, immunofluorescence

(51 pages, 24 figures, 2 tables, 84 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Maja Sabol, PhD

Co-mentor: Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Asst. Prof. Sofia Ana Blažević, PhD

Thesis accepted: 8. 2. 2024.

Sadržaj

1. Uvod	1
1. 1. Tumor	1
1. 2. Podjela tumora	2
1. 3. Koža	2
1. 4. Melanom	4
1. 4. 1. Stadij melanoma i TNM klasifikacija	5
1. 4. 2. Stadij po Breslowu.....	6
1. 4. 3. Stadij po Clarku.....	6
1. 4. 4. Uloga melanocita u apsorpciji ultraljubičastog zračenja.....	7
1. 4. 5. Rizični faktori za razvoj melanoma	8
1. 5. Signalni put Hedgehog	11
1. 5. 1. Kanonska aktivacija puta	12
1. 5. 2. Nekanonska aktivacija puta.....	13
1. 5. 3. Transkripcijski faktori GLI	15
1. 5. 4. Uloga signalnog puta Hedgehog u karcinogenezi	16
1. 5. 5. Uloga proteina GLI u karcinogenezi	17
1. 5. 6. Analiza transkripcijskih meta proteina GLI	18
1. 5. 7. Gen i protein S100A7	18
2. Cilj istraživanja	20
3. Materijali i metode	21
3. 1. Parafinski prerezi melanoma	21
3. 2. Stanične linije	21
3. 3. Protutijela	21
3. 4. Imunohistokemija	22
3. 4. 1. Imunohistokemijsko bojanje tkiva.....	22
3. 4. 2. Obrada rezultata imunohistokemijskog bojanja	24
3. 5. Rad sa staničnim linijama	25
3. 5. 1. Odmrzavanje stanica.....	25
3. 5. 2. Održavanje i presađivanje stanica u kulturi	25
3. 5. 3. Nasađivanje stanica	26
3. 5. 4. Transfekcija stanica	26
3. 6. Imunofluorescencija	27
3. 6. 1. Obrada rezultata imunofluorescencije	28

4. Rezultati	30
4.1. Imunohistokemijsko bojanje prereza melanoma na proteine GLI1 i S100A7	30
4.2. Imunofluorescencijska analiza ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u staničnim linijama A375 i HaCaT	36
5. Rasprava	40
6. Zaključak istraživanja	43
7. Literatura	44
8. Životopis	51

Popis kratica

A375	stanična linija A375
BCL2	protein BCL2 (eng. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BIRC7	gen <i>BIRC7</i> (eng. <i>baculoviral IAP repeat containing 7</i>)
BRAF	gen <i>BRAF</i> (eng. <i>B-Raf proto-oncogene</i>)
BSA	goveđi serum albumin (eng. <i>bovine serum albumin</i>)
ChIP-seq	kromatinska imunoprecipitacija sa sekvenciranjem (eng. <i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i> .)
Ci	protein Ci (eng., <i>cubitus interruptus</i>)
CK1	protein kazein kinaza 1 (eng. <i>casein kinase 1</i>)
CSD	kronično izložene suncu (eng. <i>chronically sundamaged</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHH	protein DHH (eng. <i>Desert hedgehog</i>)
DMEM	Dulbeccov modificirani Eagle medij (eng. <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EMT	epitelno mezenhimska tranzicija
FABP	protein koji veže masne (eng. <i>fatty acid-binding protein</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i>)
GHI	gen <i>GHI</i> (eng. <i>growth hormone 1</i>)
GLI	protein GLI (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog</i>)
GLI	gen <i>GLI</i> (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog</i>)
GLI2FL	protein GLI2FL (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog full-length</i>)
GLI3FL	protein GLI3FL (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog full-length</i>)
GLI2R	protein GLI2R (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog Repressor 2</i>)
GLI3R	protein GLI2R (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog Repressor 3</i>)
GSK3	glikogen sintaza kinaze-3 (eng. <i>glycogen synthase kinase-3</i>)

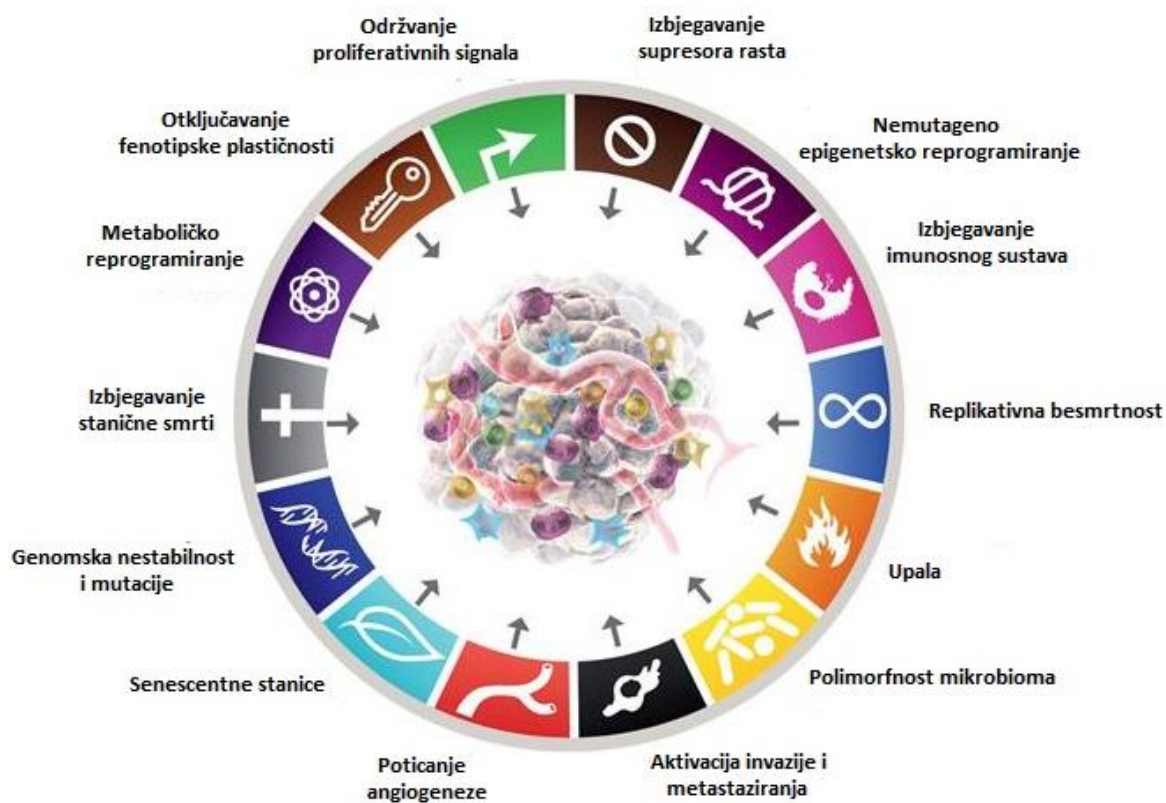
HaCaT	stanična linija HaCaT
HH	protein Hedgehog
HRP	peroksidaza iz hrena (eng. <i>horseradish peroxidase</i>)
IHH	protein IHH (eng. Indidan hedgehog)
IL1R2	gen <i>IL1R2</i> (eng. <i>interleukin 1 receptor type 2</i>)
KIF7	protein KIF7 (eng. <i>kinezin protein 7</i>)
KRT16	gen <i>KRT16</i> (eng. <i>keratin 16</i>)
KRT17	gen <i>KRT17</i> (eng. <i>keratin 17</i>)
MAPK	protein MAPK (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MC1R	melanokortin 1 receptor
MRAS	protein MRAS (eng. <i>muscle RAS Oncogene Homolog</i>)
NF1	gen neurofibromin 1
non-CSD	rijetko izloženi suncu (eng. <i>non-chronically sundamaged</i>)
NRAS	gen <i>NRAS</i> (eng. <i>neuroblastoma RAS oncogene homolog</i>)
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PKA	proteinska kinaza A (eng. <i>protein kinase A</i>)
PTCH1	protein PTCH1 (eng. <i>Patched</i>)
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom (eng. <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RET	gen <i>RET</i> (eng. <i>rearranged during transfection</i>)
ROS	rekativni kisikovi radikali (eng. <i>reactive oxygene species</i>)
S100A7	protein S100A7 (eng. <i>S100 calcium binding protein A7</i>)
S100A7	gen <i>S100A7</i> (eng. <i>S100 calcium binding protein A7</i>)
S100A9	gen <i>S100A9</i> (eng. <i>S100 calcium binding protein A9</i>)
SHH	protein SHH (eng. <i>Sonic hedgehog</i>)
SMO	protein SMO (eng. <i>Smoothend</i>)
SOX2	protein SOX2 (eng. <i>SRY-box transcription factor 2</i>)
SOX9	gen SOX9 (eng. <i>SRY-box transcription factor 9</i>)
SRC	protein SRC (eng. <i>sarcoma</i>)
SUFU	protein SUFU (eng. <i>Suppressor of fused</i>)
TBST	TBST pufer (eng. <i>tris-buffered saline + Tween</i>)
TCGA	eng. <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF-β	protein TGF-β (eng. <i>Transforming Growth Factor β</i>)

TGF-β2	protein TGF-β2 (eng. <i>Transforming Growth Factor-β2</i>)
TIL	limfociti koji infiltriraju tumor (eng. <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TIS	tumor <i>in situ</i>
UV	ultraljubičasto zračenje (eng. <i>ultraviolet radiation</i>)
VEGF	protein VEGF (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organization</i>)
α-MSH	hormon koji stimulira melanocite (eng. <i>α-melanocyte stimulating hormone</i>)

1. Uvod

1. 1. Tumor

U ljudskom organizmu svaki dan diobom nastane oko 10^{11} stanica (Gilbert 2000). Stanična dioba strogo je kontroliran proces signalima koje stanice dobiva od okoline i signalima iz unutrašnjosti stanice. Za održavanje homeostaze i pravilno funkcioniranje organizma isto toliko stanica dnevno i umire. Različiti događaji mogu dovesti do gubitka kontrole procesa; stanice se nekontrolirano dijele i nastaje masa stanica koja se naziva tumor ili neoplazija (Williams i Stoeber 2012). Različite mutacije i specifičan mikrookoliš čini svaki tumor jedinstvenim pa je često vrlo zahtjevno opisati ponašanje samog tumora i pristupiti liječenju. Kako bi se priskočilo ovom problemu osobine tumora sistematiziralo se kroz četrnaest obilježja (Slika 1).



Slika 1. Četrnaest obilježja tumorskih stanica. Preuzeto i prilagođeno prema Hanahan (2022).

U prvom modelu Hanahan i Weinberg (2000) opisali su šest osnovnih obilježja tumorskih stanica: održavanje proliferativnih signala, izbjegavanje supresora rasta, izbjegavanje stanične smrti, replikativna besmrtnost, poticanje angiogeneze te aktivacija invazije i metastaziranja. Nakon nekoliko godina model je dopunjen sa još četiri nova obilježja: izbjegavanje imunskog sustava, metaboličko reprogramiranje, genomska nestabilnost i mutacije te upala (Hanahan i Weinberg 2011) Posljednji model iz 2022. predlaže ukupno četrnaest obilježja, među kojima su i četiri nove: otključavanje fenotipske plastičnosti, senescentne stanice, nemutageno epigenetsko reprogramiranje te polimorfnost mikrobioma (Hanahan 2022).

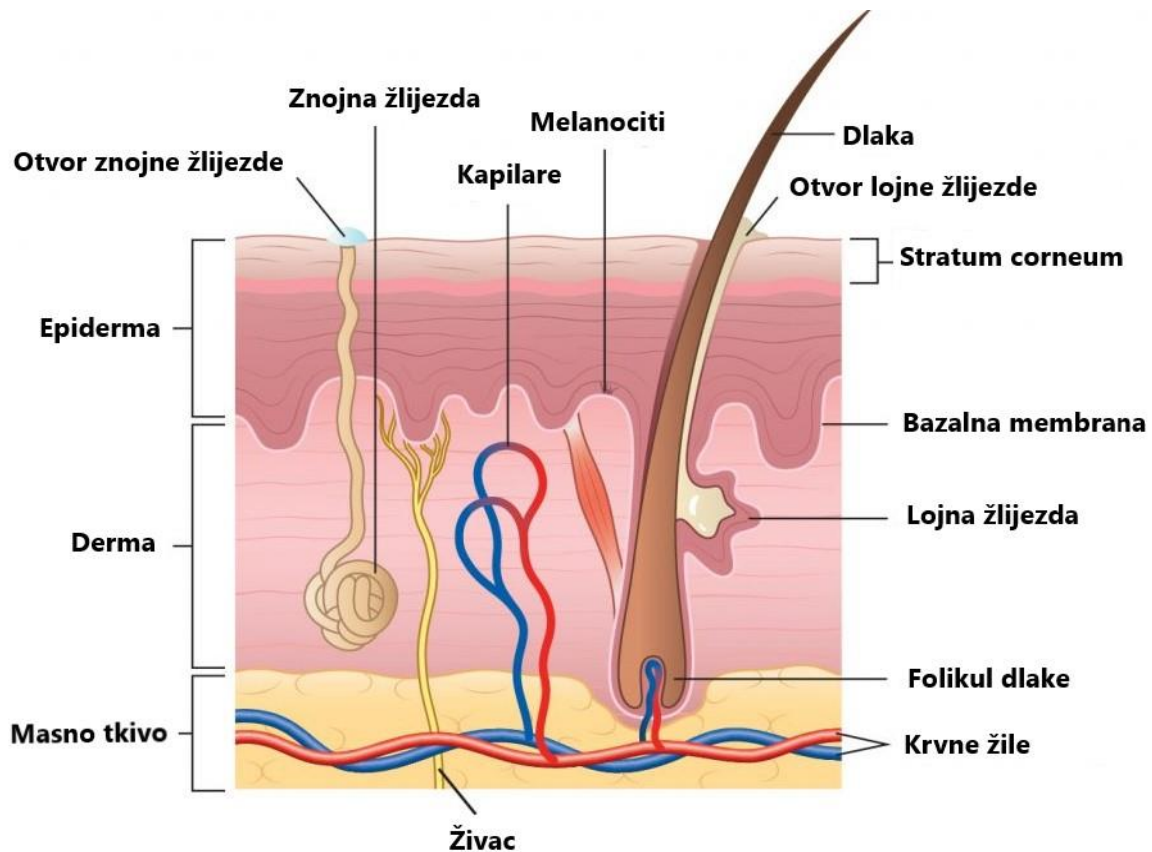
1. 2. Podjela tumora

Stanicama koje se brzo dijele, kao što su tumorske stanice, potrebni su hrana, voda i kisik. Intenzivnom proliferacijom opskrba tkiva nije više zadovoljavajuća, a okoliš postaje ograničavajući faktor. U tom slučaju jedino rješenje je promjena okoline. Stanice stječu sposobnost migracije, probijaju bazalnu membranu, ulaze u krvne i limfne žile te odlaze u udaljena tkiva koja će pružiti dovoljno nutrijenata za daljnji rast. Opisani proces naziva se invazija i metastaziranje (Hanahan i Weinberg 2011). Tumori koji imaju sposobnost metastaziranja zloćudni su i imaju lošiji klinički ishod. Benigni tumor nema sposobnost invazije i zauzimanja novih ekoloških niša, već ostaje unutar primarnog mjesta nastanka. Histogenetski tumori se mogu klasificirati prema organu i tipu tkiva iz kojih nastaju. Stanice ljudskog organizmu nastaju iz tri zametna listića embrija: mezoderma, ektoderma ili endoderma. Ovisno o tipu tkiva i zametnog listića iz kojeg nastaju, tumore možemo svrstati u epitelne, mezenhimalne, tumore limfocita i hematopoetskih stanica, tumore spolnih stanica, tumore potpornih stanica živčanog sustava te neuralne tumore i srodne tvorevine (Kos i sur. 2023).

1. 3. Koža

Koža je najveći organ ljudskog tijela i predstavlja prvu barijeru prema vanjskom svijetu. Koža pruža zaštitu od kemijskih i fizikalnih agensa, patogena i mehaničkih ozljeda. Velika površina kože omogućuje joj i da bude efikasan regulator temperature; širenjem krvnih žila otpušta se višak topline dok se skupljanjem sprječava njezin gubitak. Koža također predstavlja i dvosmjerni put za putovanje iona i vode. U koži se nalazi i veliki broj živaca i receptora čija je uloga prijenos informacije iz okoline u naš središnji živčani sustav (Abdo i sur. 2020). Koža se sastoji od donjeg sloja kože ili derme i gornjeg sloja kože ili epiderme (Slika 2). Derma se nalazi ispod bazalne membrane kože i sastoji se od dva sloja vezivnog tkiva. Papilarni sloj je gornji

sloj koji se sastoji od rahlog vezivnog tkiva. Retikularni sloj je donji i deblji i sastoji se od gustog vezivnog tkiva sa spletom kolagenih vlakana, folikula dlaka, mišića i krvnih žila. Ispod derme nalazi se hipoderma, odnosno potkožno masno tkivo. Epiderma je podijeljena u nekoliko slojeva; *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* i *stratum corneum*. *Stratum basale* najdublji je sloj koja se nalazi na bazalnoj membrani, a sastoji se od kubičnih i cilindričnih stanica koje se stalno dijele. U ovom sloju se nalaze i melanociti. *Stratum spinosum* sastoji se od nepravilnih stanica s citoplazmatskim izdancima koje su povezane dezmosomima. *Stratum granulosum* ima stanice oblika dijamanta koje sadrže keratohijalinske i lamelarne granule iz kojih nastaju keratin i epidermalni lipidi. *Stratum lucidum* tanak je sloj koje se može pronaći u debljim dijelovima kože (dlanovi i stopala). *Stratum corneum* sloj je koji se sastoji od mrtvih keratinocita koji sadrže keratin. Lipidi povezuju keratinociti i tvore hidrofobnu barijeru, a tu se nalaze i otvori žlijezda znojnica i lojnica (Yousef i sur. 2023).



Slika 2. Struktura kože. Preuzeto i prilagođeno prema Lawton (2019).

1. 4. Melanom

Melanom je zloćudni tip tumora koji nastaje nekontroliranom proliferacijom melanocita. Melanociti su podrijetlom stanice neuralnog grebena koje tijekom embrionalnog razvoja stječu sposobnost migracije i naseljavaju druge dijelove embrija. Melanociti su prisutni i na mukoznim površinama, meningama, srednjoj očnoj ovojnici (uvei) i koži pa su ta mjesta ujedno i mjesta nastanka melanoma. Kožni oblik melanoma najagresivniji je oblik tumora kože s visokim metastatskim potencijalom. Kožni melanom mogu biti primarni ili metastatski. Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO) je kožne melanome na temelju kliničkih i patohistoloških karakteristika svrstala u nekoliko podtipova: površinsko šireći melanom, nodularni melanom, lentiginozni melanom i akralni lentiginozni melanom (Slika 3). Najčešći tip melanoma je površinsko šireći melanom. Kod ovog tipa melanoma tumorske stanice proliferiraju unutar površinske epiderme radijalno ili horizontalno (tumor *in situ*). Nodularni melanom raste u obliku popila ili čvora, širi se vertikalno i često ulcerira. Lentiginozni melanom posljedica je dugotrajne izloženosti zračenju, pojavljuje se u obliku makule i najčešće kod osoba starije životne dobi. Akralni lentiginozni melanom pojavljuje se na mjestima kao što su dlanovi, tabani i pod noktom. Najčešće se pojavljuje kod starijih ženskih pacijenata (Rastrelli i sur. 2014).



Slika 3. Patohistološki podtipovi kožnih melanoma. Preuzeto i prilagođena prema MoleMap (2023).

U Hrvatskoj melanom čini oko 3 % svih tumora te je na 9. mjestu po incidenciji. U 2020. godini dijagnosticirano je 412 slučajeva kod muškaraca i 341 slučajeva kod žena (Mario Šekerija i sur. 2022). Incidencija melanoma rasla je u zadnjih 50 godina, a ovaj tip raka postao je i jedan od najučestalijih tipova raka kod mlađih pacijenata (Matthews i sur. 2017). Napredak medicine

doveo je do razvoja brojnih novih lijekova, međutim i dalje veliki problem ostaje brzi razvoj rezistencije na terapiju.

1. 4. 1. Stadij melanoma i TNM klasifikacija

Utvrđivanje stadija melanoma važan je prognostički marker te ključno za određivanje odgovarajuće terapije. Stadij melanoma određuje se pomoću TNM klasifikacije koja se temelji na anatomskom opisu samog tumora; veličini primarnog tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i drugih tkiva (M) (Tablica 1). Tumor može biti stadija TIS, I, II, III ili IV. Stadij TIS predstavlja *tumor in situ*, bez zahvaćenosti limfnih čvorova i udaljenih metastaza. Stadiji I i II predstavljaju tumor koji je veći i koji je zahvatio više tkiva, ali se nije proširio u regionalne limfne čvorove i nije metastazirao. Stadij III predstavlja tumor koji je zahvatio regionalne limfne čvorove, ali nema udaljenih metastaza. Tumor stadija IV je tumor koji je metastazirao (Rosen i Sapra 2023).

Tablica 1. TNM klasifikacije tumora i opis karakteristike svakog stadija.

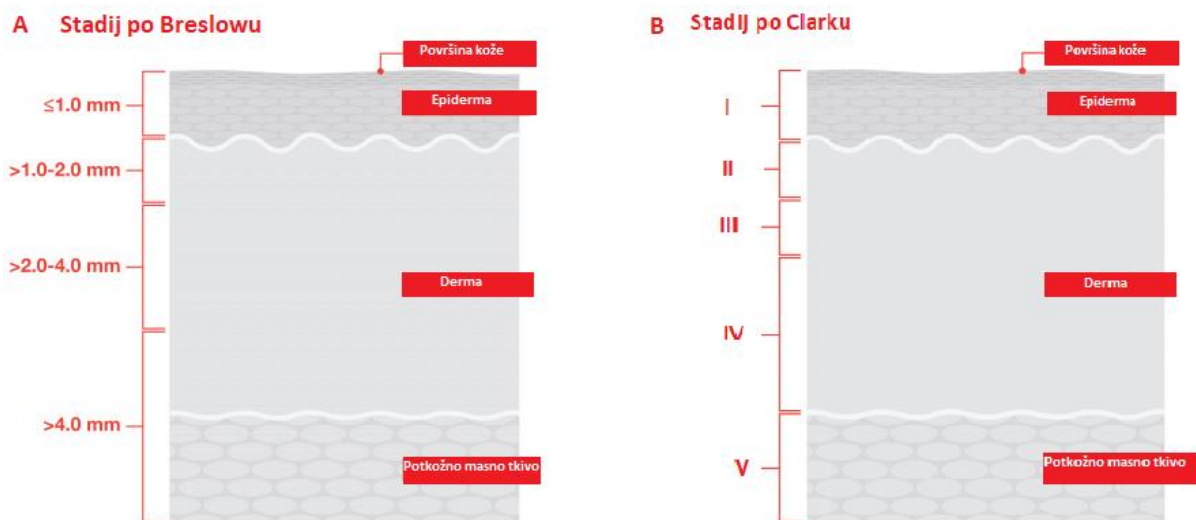
TNM klasifikacija	Karakteristike
TX	primarni tumor ne može se adekvatno odrediti
TIS	<i>Tumor in situ</i> , tumor se nije proširio, nije probio bazalnu membranu
T0	primarni tumor ne postoji
T1, T2, T3, T4	veličina i proširenost primarnog tumora, veća proširenost veći broj T
NX	zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova ne može se adekvatno odrediti
N0	nema zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
N1, N2, N3	zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, veća zahvaćenost veći broj N
MX	postojanje metastaza ne može se adekvatno odrediti
M0	nema udaljenih metastaza
M1	metastaze postoje

1. 4. 2. Stadij po Breslowu

Utvrđivanjem stadija po Breslowu mjeri se debljina melanoma od površine do najdubljeg dijela (Slika 4A). Patolog pod svjetlosnim mikroskopom analizira prerez tkiva obojan imunohistokemijski. Debljinu melanoma mjeri malim ravnalom, mikrometrom te ju iskazuje u milimetrima. Tumor može biti dodijeljen stadij 0, 1, 2, 3, 4 ili 5, ovisno o izmjenom iznosu debljine tumora (Breslow i Washington 1970).

1. 4. 3. Stadij po Clarku

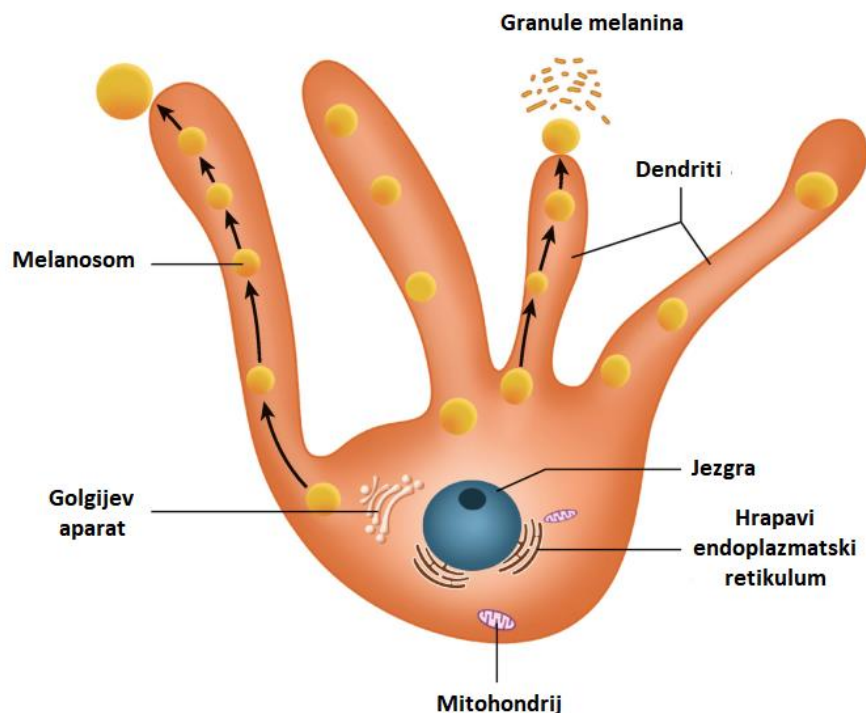
Stadijem po Clarku mjeri se koliko je duboko melanom prodro u kožu. Postoji nekoliko razina stadija po Clarku i na svakoj razini zahvaćen je različit sloj tkiva (Slika 4B). Razina jedan predstavlja tumor *in situ*, melanom je ograničen na epidermu. Razina dva znači da je melanom zahvatio papilarnu dermu, sloj direktno ispod epiderme. Melanomi razine tri nalaze se na granici retikularnog dermisa, a zahvaćen retikularni dermis odgovara razini četiri. Kada melanom preraste sve slojeve kože i uđe u potkožno masno tkivo dosega je razinu pet (Clark i sur. 1969).



Slika 4. Određivanje stadija melanoma po A) Breslowu i B) Clarku. Preuzeto i prilagođeno prema Melanoma Research Alliance.

1. 4. 4. Uloga melanocita u apsorpciji ultraljubičastog zračenja

Ljudski organizam svakodnevno je izložen suncu. Ultraljubičasto zračenje (eng. *ultraviolet radiation*, UV) ima poseban utjecaj na kožu, a ono obuhvaća spektar valnih duljina od 100 nm do 400 nm. Svjetlost kraćih valnih duljina (100 nm do 280 nm), koje nazivamo UVC, apsorbira zemljina atmosfera pa nema utjecaja na ljudsko zdravlje. UVB zračenje je zračenje valne duljine od 280 nm do 315 nm koje uzrokuje rak, imunosupresiju, opekotine i crvenilo. UVB ima i povoljan utjecaj na zdravlje poticanjem sinteze vitamina D. UVA je zračenje duljih valnih duljina (315 nm do 400 nm) koje prodiru dublje u kožu, kroz epidermu i dermu, a prisutno je tijekom dana. UVA zračenje odgovorno je za starenje kože, a prema novijim istraživanjima uključeno je i u razvoj raka i imunosupresiju (D'Orazio i sur. 2013). Štetan utjecaj UV zračenja posljedica je nastanka DNA fotolezija i oštećenja DNA posredovanih reaktivnim kisikovim radikalima (eng. *reactive oxygene species*, ROS). UVB svjetlom inducirani ciklobutanski pirimidinski dimeri i 6–4 fotoprodukti narušavaju trodimenzionalnu strukturu dvostruke uzvojnice DNA. Fotolezije blokiraju transkripciju i replikaciju DNA te ometaju normalno sparivanje baza što dovodi do mutacija. Karakteristične tranzicije baza (TT→CC) izazvane UV svjetlom nazivaju se UV potpisom. Za razliku od UVB, UVA zračenje indirektno oštećuje DNA nastankom ROS-ova. Oštećenje nastalo kao posljedica djelovanja ROS-ova ometa normalno sparivanje baza, a popravkom dolazi do transverzijske mutacije G→C (Sarasin 1999). Stalna izloženost UV zračenju može dovesti do nakupljanja mutacija pa je zaštita DNA od oštećenja vrlo važna. Za apsorpciju ultraljubičastog zračenja i zaštitu genetičkog materijala odgovoran je melanin. Melanin proizvode stanice, melanociti, koje se nalaze u bazalnom sloju kože i rijetko se dijele pa ih ima tek 1200 po mm². UV svjetlost aktivira keratinocite na proizvodnju hormona α -MSH (eng. *α -melanocyte stimulating hormone*, hormon koji stimulira melanocite). Aktivacijom putem MC1R (melanokortin 1 receptor) koji se nalazi na melanocitima dolazi do sinteza melanina koji se prenosi u susjedne keratinocite u obliku granula (Slika 5). Keratinociti izloženi suncu unose melanin i nakupljaju ga u stanici u okolici jezgre. Melanin apsorbira svjetlost i štiti jezgru keratinocita od mogućih mutacija (Cichorek i sur. 2013).

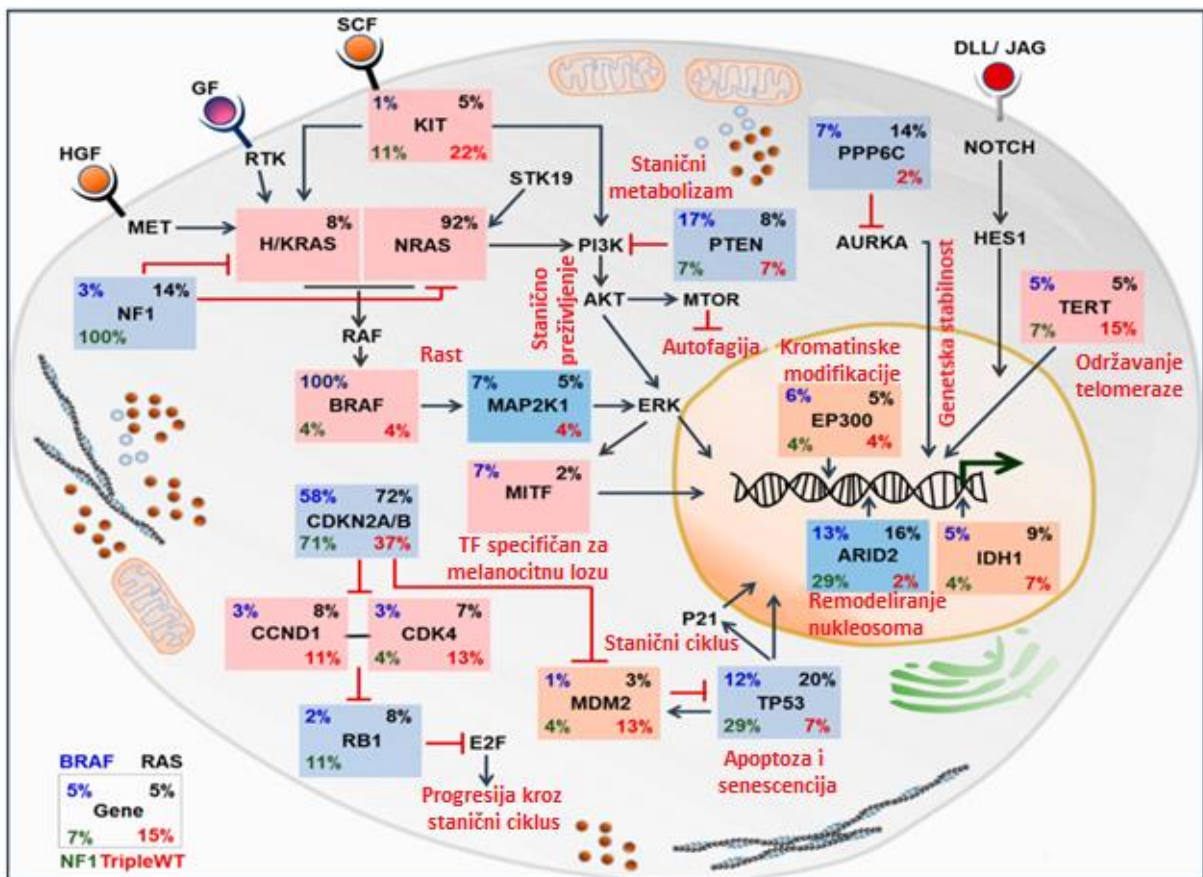


Slika 5. Sinteza melanina u melanocitima i izlučivanje melanina u obliku granula. Preuzeto i prilagođena prema Eserdağ (2023).

1. 4. 5. Rizični faktori za razvoj melanoma

Madeži su nakupina melanocita u koži. Iako su benigna tvorba, ipak oko 33 % melanoma nastaje direktno iz madeža, dok su ostali nastali „de novo“, na mjestima u koži gdje prethodno nije bilo madeža. Do razvoja melanoma dolazi nakupljanjem mutacija pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika. The Cancer Genome Atlas (TCGA) program analizirao je DNA, RNA i proteine 333 uzoraka primarnih i metastatskih kožnih melanoma i sistematizirao dobivene podatke. Melanomi se prema tome mogu podijeliti na 4 podtipa na temelju toga koji su geni mutirani: *BRAF* (eng. *B-Raf proto-oncogene*), *NRAS* (eng. *neuroblastoma RAS oncogene homolog*), *NF1* (neurofibromin 1) i trostruko negativni tip (Akbani i sur. 2015). Gen *BRAF* kodira za serin/treoninsku kinazu RAF uključenu u signalni put RAS/RAF/MEK/ERK (odnosno signalni put MAPK, eng. *mitogen-activated protein kinase*). Supstitucija aminokiseline valin u glutamin na poziciji 600 dovodi do konstitutivne aktivacije kinaze, a time i svih nizvodnih komponenti puta. Ova mutacija je prisutna u više od 50 % melanoma. Supstitucija valina u arginin, lizin i aspartatnu kiselinu također je prisutna, ali s mnogo manjom učestalošću (Davies i sur. 2002). Pacijenti kod kojih je primijećena mutacija proteina BRAF

većinom su mlađe životne dobi (Akbani i sur. 2015). *NRAS* prvi je gen identificiran da nosi potencijalnu pokretačku mutaciju u melanomu. Ovaj gen kodira za malu GTPazu RAS koja mutirana dovodi do neprekidne signalizacije kroz signalne puteve MAPK i PI3K/AKT. U više od 80 % slučajeva mutiranog proteina NRAS prisutna je točkasta mutacija na poziciji 61 gdje dolazi do zamjene glutamina za leucin. Većina pacijenta koja nosi mutaciju u proteinu NRAS starije je životne i kronično je bila izložena UV svjetlu, s tendencijom pojave tumora u području ekstremiteta (Muñoz-Couselo i sur. 2017). Mutacije u genima *BRAF* i *NRAS* rijetko se nalaze u istom melanomu zajedno (Slika 6).



Slika 6. Signalni putevi promijenjeni u melanomu. Učestalost promjena pojedinih gena koji su ključni za razvoj melanoma nalaze se u kutevima tekstualnih okvira izraženi u postotcima. Plavi tekstualni okviri prikazuju inaktivirajuće događaje, a u crvenim su prikazani aktivirajući događaji. Preuzeto i prilagođeno prema Madamsetty i sur. (2020).

Treći najučestaliji gen mutiran kod melanoma je *NF1*. Protein NF1 negativni je regulator puta MAPK jer potiče hidrolizu GTP-a vezanog za protein RAS. NF1 pretvara aktivan oblik proteina RAS (RAS-GTP) u neaktivan RAS-GDP. Posljedica mutacija koje dovode do gubitka funkcije

ili inaktivacije proteina NF1 konstitutivna je aktivacija signalnog puta MAPK. Pacijenti koji imaju ovu mutaciju su značajno stariji u odnosu na dobne grupe pacijenata sa ostalim tipovima mutacija. Sva tri genotipa melanoma uključeni su u regulaciju signalnog puta MAPK odgovornog za regulaciju proliferacije, diferencijacije i preživljenja koji su bitni u tumorogenezi. Ako mutacije nisu prisutne u nijednom od navedena tri gena, melanom je karakteriziran kao trostruko negativan tip. Kompleksni genomski rearanžmani, povećan udio mutacija *KIT* i fokalne amplifikacije karakteristične su za ovaj genotip melanoma (Akbani i sur. 2015).

Osobe sa plavom i zelenom bojom očiju te crvenom i plavom kosom (Bliss i sur. 1995) kao i osobe s obiteljskom anamnezom melanoma, svijetlom puti te madežima različitih oblika i veličina (Damsky i Bosenberg 2017) imaju povećani rizik od razvoja kožnog melanoma. Učestale opekotine od sunca tijekom mlađe dobi, kao i učestala izloženost suncu također dovode do povećanog rizika od razvoja melanoma (White i sur. 1994) (Slika 7). Razlikujemo dvije grupe melanoma ovisno o izloženosti suncu i lokaciji na kojoj se pojavljuju na tijelu: melanomi kod osoba koje su kronično izložene suncu (eng. *chronically sundamaged*, CSD) i rijetko izložene suncu (eng. *non-chronically sundamaged*, non-CSD). CSD melanom pojavljuje se poslije 55. godine u područjima glave i vrata koji su ujedno i najizloženiji suncu. Kod osoba s ovim tipom melanoma prisutne su raznolike mutacije (*NF1*, *NRAS*, *BRAF*, *KIT*). Non-CSD melanom većinom je prisutan kod mlađih osoba, a anatomski se najčešće pojavljuje u područjima koja nisu jako izložena suncu kao što su trup i proksimalni dijelova ekstremiteta. Ovaj tip melanoma ima trostruko negativni genotip ili je karakterističan je po mutacijama u genu *BRAF* (Teixido i sur. 2021). Izloženost umjetnom izvoru UV zračenja korištenjem solarija u ranijoj dobi (prije 25. godine) kao i učestalo korištenje solarija tijekom života pojedinca dovodi do povećanog rizika od razvoja melanoma (Burgard i sur. 2018). Život u određenim geografskim područjima također je jedan od faktora rizika; Australija i Novi Zeland imaju najveću incidenciju melanoma u svijetu (Matthews i sur. 2017).



Slika 7. Rizični faktori za razvoj melanoma.

Svi nabrojani faktori mogu dovesti do velikog broja kompleksnih mutacija zbog čega je često vrlo zbunjujuće kliničarima određivati daljnji tijek terapije. Većina dostupnih lijekova cilja signalni put MAPK koji je i najčešće promijenjeni signalni put u melanomu, ali postoje i brojni drugi signalni putevi koji također pokazuju onkogene promjene i doprinose tumorigenezi. Osim signalnog puta MAPK, često su promijenjeni PI3K/AKT te signalni putevi povezani s diferencijacijom i održavanjem matičnih stanica kao što su NOTCH, WNT i Hedgehog.

1. 5. Signalni put Hedgehog

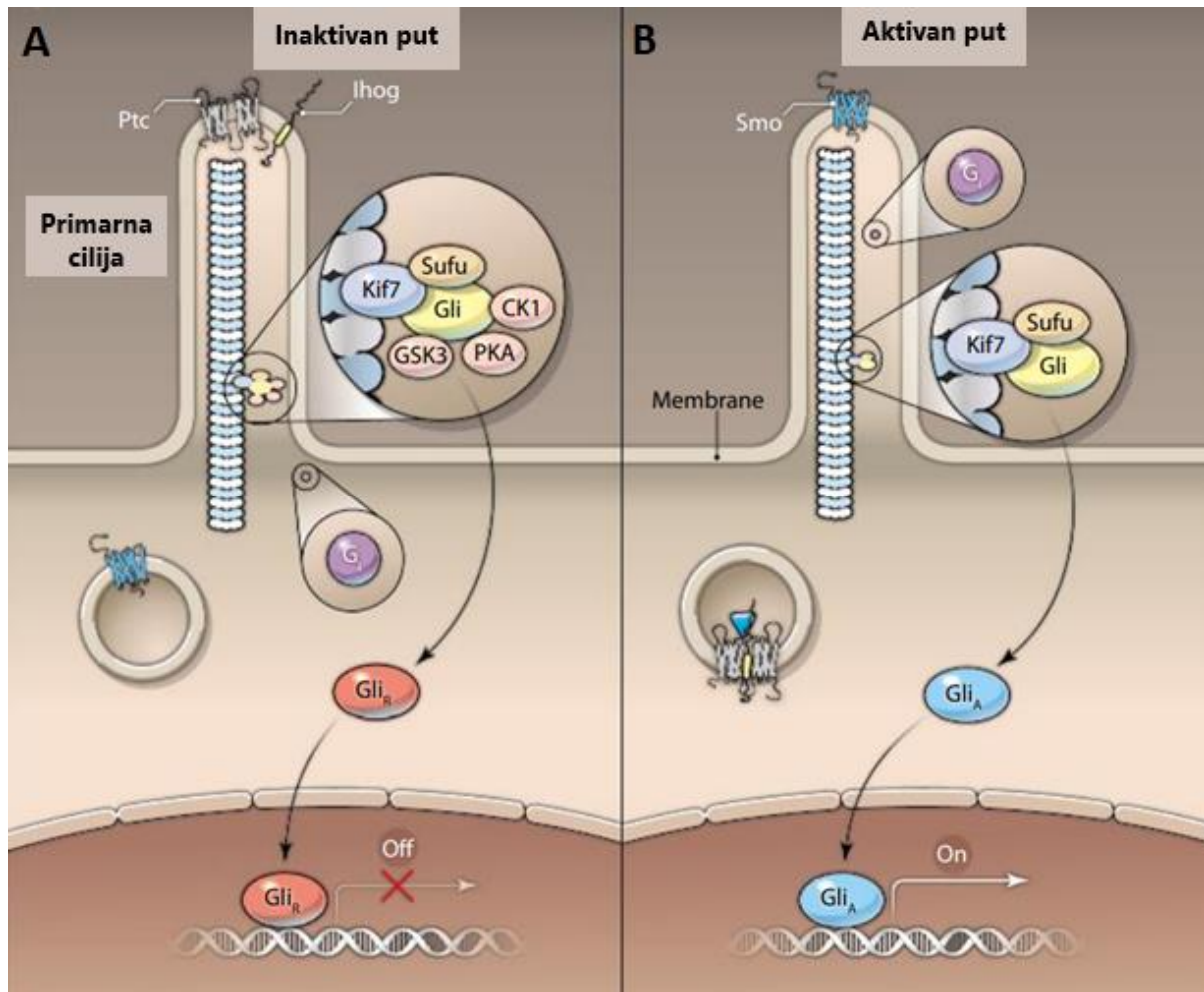
Geni uključeni u signalni put Hedgehog prvi puta su otkriveni u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*). Ličinka vinske mušice kod koje je ligand ovog puta, protein Hedgehog (HH), bio mutiran nije imala pravilnu anteriorno-posteriornu segmentaciju. Izgled ličinke podsjećao je na ježa pa su signalni put i mutirani gen dobili naziv Hedgehog što u prijevodu znači jež (Nüsslein-Volhard i Wieschaus 1980). Signalni put Hedgehog jedan je od nekolicine puteva koji su uključeni u signalizaciju tijekom razvoja i organogeneze. Prva komponenta puta, ligand HH, ima ulogu morfogena u procesu embriogeneze. Protein difundira u međustanični prostor i uspostavom koncentracijskog gradijenta definira položaj u prostoru; stanice reagiraju na prag koncentracije proteina što usmjerava diferencijaciju i određuje identitet tkiva. Na ovaj način definirana je anteriorno-posteriorna os udova i dorzoventralna os posteriornog dijela neuralne

cijevi. U odraslom organizmu ovaj put je odgovoran za održavanje somatskih i pluripotentnih matičnih stanica odgovornih za popravak i regeneraciju tkiva kao što su matične stanice kože, eritropoetske stanice, epitel pluća itd. (Groves i sur. 2020). Istraživanja različitih tipova tumora pokazalo je i aberantnu aktivnost signalnog puta Hedgehog pri razvoju tumora. Njegova uloga povezana je s početnim stadijima karcinogeneze, sposobnosti tumora da invadira tkivo i povećanim metastatskim potencijalom tumora (Jiang i Hui 2008).

1. 5. 1. Kanonska aktivacija puta

Hedgehog signalizacija kod kralježnjaka odvija se unutar posebne strukture koja se projicira s površine stanica, a naziva se primarna cilija. Primarna cilija je organel sastavljen od devet parova mikrotubula koji ima ulogu primanja mehaničkih, kemijskih i toplinskih signala (Plotnikova i sur. 2008). Aktivacija puta može se odvijati kanonski i nekanonski. Kanonski put aktivacije uključuje vezanje liganda HH za receptor PTCH1 (eng. *Patched*), a put nizvodno završava premještanjem transkripcijskog faktora GLI (eng. *Glioma-Associated Oncogene Homolog*) u jezgru (Slika 8). Kod kralježnjaka postoji 3 liganda HH: SHH (eng. *Sonic hedgehog*), DHH (eng. *Desert hedgehog*) i IHH (eng. *Indidan hedgehog*). IHH ima ulogu u morfogenezi kostiju, a DHH je uključen u diferencijaciju zametnih stanica testisa. Najbolje proučeni ligand je SHH koji ima ulogu morfogena tijekom embriogeneze kao i središnju ulogu u organogenezi. Na staničnoj membrani primarne cilije nalazi se receptor PTCH1 s dvanaest transmembranskih domena koji inhibira receptor sa sedam transmembranskih domena SMO (eng. *Smoothend*) (Murone i sur. 1999). U citoplazmi se nalazi kompleks koji se sastoji od KIF7 (eng. *kinezin protein 7*), SUFU (eng. *Suppressor of fused*) i GLI. Razlikujemo tri proteina GLI: GLI1, GLI2 i GLI3, koji će biti opisani u narednom poglavlju. Vezanjem SHH za receptor PTCH1 dolazi do internalizacije receptora PTCH1 i prekida njegove inhibicije proteina SMO, a receptor SMO se fosforilira i premješta na plazma membranu na vrhu primarne cilije (Robbins i sur. 2012). Aktivirani signalni put Hedgehog nizvodno od SMO dovodi do otpuštanja inhibitornog djelovanja proteina SUFU te se protein GLI otpušta iz citoplazmatskog kompleksa i odlazi u jezgru gdje djeluje kao aktivator transkripcije ciljnih gena. Neki od ciljnih gena su i *GLI1* i *PTCH1*, koji djeluju kao pozitivni, odnosno negativni regulatori puta. U uvjetima kada put nije aktivan, proteine GLI fosforiliraju proteinska kinaza A (eng. *protein kinase A*, PKA), kazein kinaza 1 (eng. *casein kinase 1*, CK1) i glikogen sintaza kinaze-3 (eng. *glycogen synthase kinase-3*, GSK3) što prepoznaje E3 ubikvitinska ligaza čime je protein usmjeren u razgradnju.

Protein GLI1 razgrađuje se u potpunosti, dok u slučaju GLI2 i GLI3 dolazi do cijepanja proteina pune duljine (GLI2FL ili GLI3FL, od eng. *full-length*) na skraćene represorske oblike GLI2 ili GLI3 (GLI2R ili GLI3R, od eng. *repressor*) koji ulaze u jezgru i djeluju kao represor transkripcije gena (Carballo i sur. 2018).



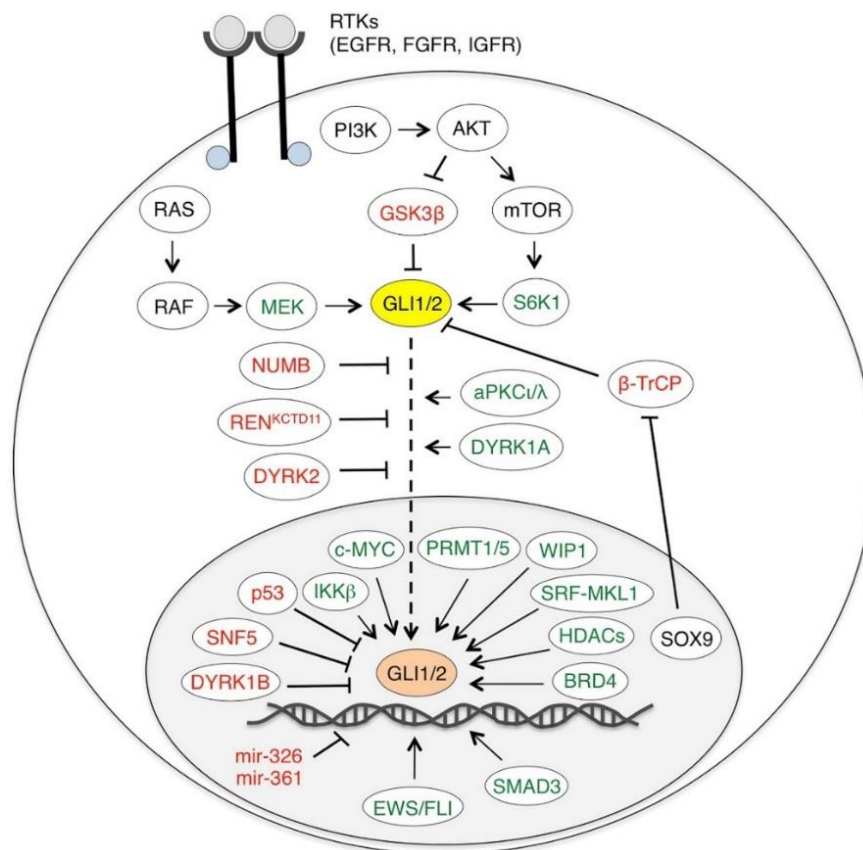
Slika 8. Kanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog kod kralješnjaka. A) Inaktivan put Hedgehog. B) Aktivan put Hedgehog. Preuzeto i prilagođeno prema Robbins i sur. (2012).

1. 5. 2. Nekanonska aktivacija puta

Postoji dva glavna alternativna mehanizama signalizacije puta Hedgehog koji se nazivaju nekanonskim putevima aktivacije. Prvi način nekanonske aktivacije uključuje uzvodne komponente puta Hedgehog koje nizvodno aktiviraju neki drugi signalni put ili stanični odgovor (Brennan i sur. 2012). Ovaj put aktivacije ovisi o proteinima SHH, PTCH ili SMO koji aktiviraju nizvodne komponente drugih signalnih puteva, primjerice SHH može aktivirati

estrogeni i androgeni receptor direktnim vezanjem (Trnski i sur. 2021) (Sabol i sur. 2014), PTCH1 može aktivirati stanični ciklus vezanjem za ciklin B1 (Yu i sur. 2014), dok SMO može aktivirati kinazu SRC (eng. *sarcoma*) (Ho Wei i sur. 2018).

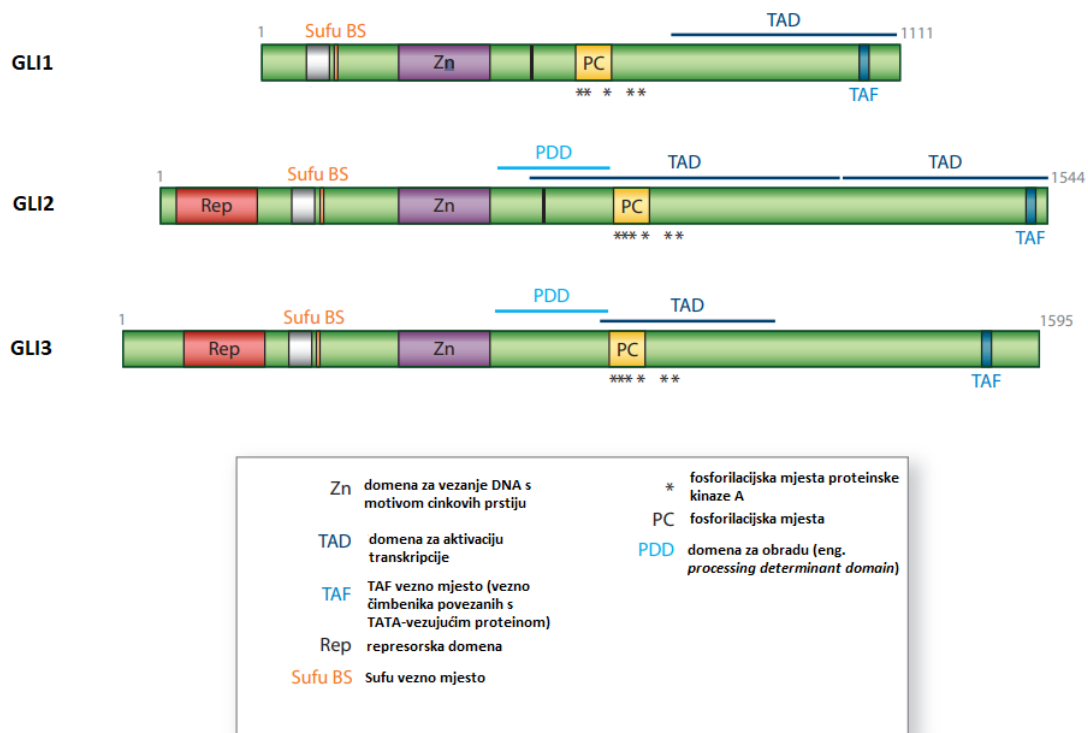
Mnoga istraživanja pokazala su da drugi signalni putevi usko surađuju sa signalnim putem Hedgehog i mogu aktivirati GLI transkripcijski faktor neovisno o ligandu SHH. Ovo je drugi način nekanonske aktivacije kod kojeg dolazi do aktivacije GLI neovisno o uzvodnoj kontroli i prisutan je kod različitih tipova tumora. MAPK, PI3K/AKT/mTOR i TGF- β (eng. *Transforming Growth Factor- β*) neki su od signalnih puteva koji mogu modificirati transkripcijski faktor GLI fosforilacijom i poticati rast, preživljenje, proliferaciju (Slika 9) (Pietrobono i sur. 2019). Signalni put MAPK najčešće je promijenjeni put u melanomu uključen u nekanonsku signalizaciju, a uključuje malu GTP-azu RAS koja aktivira kaskadu serin/treoninskih kinaza što završava fosforilacijom nizvodnih substrata odgovornih za transkripciju niza gena (Brechbiel i sur. 2014).



Slika 9. Nekanonska aktivacija puta Hedgehog na razini transkripcijskih faktora GLI. Pozitivni regulatori puta naznačeni su zelenom bojom, a negativni regulatori puta crvenom bojom. Preuzeto od Pietrobono i sur. (2019).

1. 5. 3. Transkripcijski faktori GLI

Prošlog stoljeća je iz ljudskog glioblastoma, agresivnog oblika tumora mozga, izoliran višestruko amplificiran gen. Prema tipu tumora iz kojeg je izoliran gen je nazvan *GLI* (eng. *Glioma-associated oncogene*) koji kodira za istoimeni protein (Kinzler i sur. 1987). U vinskoj mušici pronađen je homolog ovog gena nazvan *cubitus interruptus* (Ci) koji ima ulogu u specifikiranju gole kutikule unutar svakog epidermalnog segmenta (Motzny i Holmgren 1995). Proteini GLI su transkripcijski faktori koji imaju pet visoko konzerviranih motiva cinkovih prstiju tipa C2H2-Kruppel (Ruppert i sur. 1988) koji vežu molekulu DNA na visoko konzerviranoj sekvenci slijeda 5'-GACCACCCA-3' (Kinzler i Vogelstein 1990). Kod kralježnjaka su pronađena tri takva proteina: GLI1, GLI2 i GLI3. GLI2 i GLI3 nužni su u regulaciji ekspresije gena tijekom embrionalnog razvoja. GLI1, osim u embrionalnom razvoju važan je i u odraslom organizmu u održavanju hematopoietskih matičnih stanica (Merchant i sur. 2010) i regeneraciji srca i proliferaciji kardiomiocita (Singh i sur. 2018). Osim razlika u funkciji, GLI1 se od GLI2 i GLI3 razlikuje i u strukturi. GLI1 je transkripcijski aktivator koji na svom C terminalnom kraju ima aktivacijsku domenu, dok GLI2 i GLI3 uz aktivacijsku domenu na C terminalnom kraju imaju i represorsku domenu na N terminalnom kraju (Sasaki i sur. 1999). Kada nema signalizacije putem liganda HH, GLI2 i GLI3 se cijepaju u represorske forme, a GLI1 se razgrađuje u potpunosti. Najzastupljenija je represorska forma proteina GLI3, koji u embrionalnom bubregu represivno djeluje na transkripciju gena *GLI2* i *GLI1* (Hu i sur. 2006). Aktivacijom puta nema razgradnje proteina GLI1, te su prisutne aktivne forme proteina GLI2 i GLI3 pune duljine. GLI2 je najzastupljenija aktivna forma koja ujedno potiče ekspresiju i GLI1. Signalizacija putem liganda HH stoga utječe na ravnotežu između aktivatorskih i represorskih formi čime je određena sudbina stanice (Hui i Angers 2011).



Slika 10. Struktura transkripcijskih faktora GLI1, GLI2 i GLI3. Preuzeto i prilagođeno prema Hui i Angers (2011).

1. 5. 4. Uloga signalnog puta Hedgehog u karcinogenezi

Aberantna aktivacija signalnog puta Hedgehog može se pronaći kod čak trećine malignih tumora. Postoje tri potencijalna načina na temelju kojih može doći do poremećaja funkcije ovog puta. Prva uključuje autonomnu aktivaciju puta, neovisnu o regulaciji putem liganda. Mutacije koje dovode do aktivacije pozitivnih regulatora (SMO), te mutacije koje će inaktivirati negativne regulatore (PTCH1 i SUFU) rezultiraju konstitutivnom aktivacijom puta koja neće ovisiti o vezanju liganda HH za receptor PTCH1 (Sabol i sur. 2018). Ovakvi tipovi aktivacije povezani su s razvojem karcinoma bazalnih stanica i rabdiosarkoma (Brechbiel i sur. 2014). Drugi način do kojeg može doći do aberantne aktivacije puta je povećana proizvodnja liganda HH od strane tumorskih ili stromalnih stanica. Tumorske stanice autokrinom, ili stromalne stanice parakrinom signalizacijom dovode do hiperaktivacije puta u samim tumorskim stanicama, čime se potiče proliferacije i preživljenje stanica tumora. Ovakav tip signalizacije primijećen je u tumorima probavnog sustava (Sabol i sur. 2018), melanomu (Stecca i sur. 2007) i mnogim drugim tipovima tumora. Treći tip promjene signalizacije posljedica je povećane

produkcije liganda kod tumorskih stanica, koje parakrinom signalizacijom aktiviraju stromalne stanice. Stromalne stanice kao odgovor na aktivaciju puta ekspimiraju cijeli niz gena uključenih u poticanje rasta tumora, čime stvaraju povoljan mikrookoliš za rast tumora (Sabol i sur. 2018).

1. 5. 5. Uloga proteina GLI u karcinogenezi

Proteini GLI potiču karcinogenezu regulacijom transkripcije gena odgovornih za maligni fenotip stanice. Geni koji se ekspimiraju posreduju povećanje mase tumora mijenjajući stanični ciklus. Ekspresija ciklina D1 i D2 inicira proliferaciju stanica (Bermudez i sur. 2013), dok je ekspresija SOX2 (eng. *SRY-box transcription factor 2*) odgovorna za proces samoobnavljanja matičnih stanica (Bora-Singhal i sur. 2015). GLI-potaknutom ekspresijom proteina TGF- β 2 (eng. *Transforming Growth Factor- β 2*) i BCL2 (eng. *B-cell lymphoma 2*), tumorski promijenjene stanice izbjegavaju staničnu smrt posredovanu imunosnim odgovorom i apoptozom (Fan i sur. 2010) (Regl i sur. 2004). Utjecaj ovih transkripcijskih faktora vidljiv je i u povećanju metastatskog potencijala tumorskih stanica. Epitejno-mezenhimska tranzicija (EMT) vjerojatno je posredovana transkripcijom proteina SNAIL (Louro i sur. 2002), a angiogeneza ovisi o ekspresiji VEGF-a (eng. *vascular endothelial growth factor*) (Carpenter i sur. 2015). Veliku važnost imaju i stanice tumorske strome čija ekspresija proteina regulirana proteinima GLI utječe na okolne tumorske stanice i promovira parakrine pozitivne povratne petlje (Fan i sur., 2004.). Genetske promjene proteina GLI mogu pridonijeti razvoju raka amplifikacijom gena, translokacijom gena, kratkim genetskim varijantama, epigenetskim promjenama, metilacijom DNA, proteina i histona te RNA interferencijom (Kurtović i sur. 2022). GLI1 je uključen u različite faze karcinogeneze; od inicijacije, održavanja matičnih stanica do metastaziranja. Inicijaciju melanoma vjerojatno posreduje mehanizmom koji uključuje izbjegavanjem senescencije (Faião-Flores i sur. 2017). Povećana ekspresija serin treoninske jezgrine kinaze WIP (eng. *WASP-interacting protein*) povezana je sa pojačanom transkripcijskom aktivnošću, proteinskom stabilnosti i lokalizacijom GLI1 u jezgri. Poticanjem Hedgehog signalizacije preko GLI1 potiče se rast i samoobnavljanje matičnih stanica melanoma (Pandolfi i sur. 2013). GLI1 aktivnost povećava i ekspresiju matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP2 i MMP9). MMP2 i MMP9 razaraju okolno tkivo i olakšavaju migraciju tumorskih stanica što dovodi do povećane sposobnosti invazije i metastaziranja (Faião-Flores i sur. 2017).

1. 5. 6. Analiza transkripcijskih meta proteina GLI

Transkripcijske mete proteina GLI imaju potencijalnu ulogu u nastanku i razvoju melanoma čovjeka. Kako bi ih detektirali, Kurtović i sur. (2022) proveli su analizu jedinstvenih i preklapajućih meta proteina GLI u staničnim linijama melanoma. Sekvenciranjem transkriptoma stanica melanoma utvrđene su 1642 mete koje su zajedničke za proteine GLI1 i GLI2, 23 zajedničkih meta za GLI2 i GLI3 te 9 zajedničkih meta za GLI1 i GLI3. GLI1 ima 607, GLI2 1080, a GLI3 37 jedinstvenih meta. Pronađeno je 808 diferencijalno eksprimiranih gena za GLI1, 941 za GLI2 te 58 za GLI3. Identificirani geni uključeni su u signalne puteve WNT, MAPK i RAS, te u nastanak brojnih tumora. Za dodatnu potvrdu rezultata i analizu regija DNA za koju se vežu transkripcijski faktori GLI u staničnim linijama melanoma napravljena je kromatinska imunoprecipitacija sa sekvenciranjem (eng. *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*, ChIP-seq). Identificirano je 2183 gena koji imaju vezno mjesto za proteine GLI u promotorima, od kojih su samo 157 zajednička za sva tri transkripcijska faktora. Pouzdanost rezultata dobivenih RNA sekvenciranjem trebalo je potvrditi qPCR (eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction*, kvantitativna lančana reakcija polimerazom) analizom diferencijalno eksprimiranih gena. Popis diferencijalno eksprimiranih gena trebalo je suziti na manji broj potencijalnih kandidata korištenjem nekoliko internetskih alata. Diferencijalno eksprimirani geni su filtrirani alatom GeneAnalytics u bazi podataka GeneCards prema signalnim putevima i bolestima, a dodatne analize provedene su i bazama podataka GEPIA i Human Protein Atlas. Ovako je identificirano 10 meta: *KRT16* (eng. *keratin 16*), *KRT17* (eng. *keratin 17*), *S100A7* (eng. *S100 calcium binding protein A7*), *S100A9* (eng. *S100 calcium binding protein A9*), *GHI* (eng. *growth hormone 1*), *SOX9* (eng. *SRY-box transcription factor 9*), *BIRC7* (eng. *baculoviral IAP repeat containing 7*), *MRAS* (eng. *muscle RAS Oncogene Homolog*), *RET* (eng. *rearranged during transfection*) i *IL1R2* (eng. *interleukin 1 receptor type 2*) (Kurtović i sur. 2022).

1. 5. 7. Gen i protein S100A7

Jedan od identificiranih transkripcijskih meta je gen *S100A7*. Obitelj proteina S100 broji 20 članova koji dijele strukturnu sličnost, kalcij vezujuću domenu ali su funkcijski iznimno raznoliki. Osim u održavanje homeostaze kalcija ovi proteini uključeni su i u procese proliferacije, diferencijacije, apoptoze, metabolizma, upale i popravka tkiva te migraciju i

invaziju. Jedan od članova ove porodice je i protein psorijazin (S100A7) (Donato 2003). Gen *S100A7* nalazi se na dugom kraku ljudskog kromosoma 1 u sklopu regije 1q21 koja se naziva i kompleksom epidermalne diferencijacije. Ovaj kompleks obuhvaća niz gena uključenih u terminalnu diferencijaciju epiderme čovjeka (Mischke i sur. 1996). Otkrivena je samo jedna varijanta transkripta gena *S100A7* koja se sastoji od 3 eksona (Wolf i sur. 2011), a čijom translacijom nastaje protein male molekulske mase od tek 11,366 Da (Meyer i sur. 2008). Kako bi bio aktivan, S100A7 mora formirati dimer dvostrukom rotacijom osi. Vezanjem iona za protein izlaže se aktivna površina kojom protein može interagirati s drugim proteinima (Wolf i sur. 2011). Svojim vezanjem regulira protein koji veže masne kiseline (eng. *fatty acid-binding protein*, FABP), a u imunskom sustavu djeluje kao antimikrobni peptid lizirajući bakterije kao što je *Escherichia coli* te kao kemoatraktant za CD4+ limfocite T i neutrofile (Dong Son i sur. 2016). Osim protektivne uloge u imunskom sustavu, ekspresija S100A7 povezana je s patogenezom brojnih kožnih bolesti te uz mehaničke i kemijske ozlijede kože. Protektivna barijera kože nastaje gomilanjem proteina uz unutarnju staničnu membranu tijekom zadnje faze diferencijacije keratinocita. Transglutaminaza tip I membranski je enzim koji kovalentno povezuje prekursore proteina, a jedan od substrata je i protein S100A7 (Robinson i sur. 1997). Proupalni citokini, te patološka stanja kao psorijaza, atopijski dermatitis i karcinom skvamoznih stanica mokraćnog mjehura te površinske ozlijede kože povezani su s visokom ekspresijom proteina S100A7. S100A7 dovodi do abnormalne diferencijacije i proliferacije stanica kože koje su ujedno i patološke karakteristike prisutne u psorijazi i atopijskom dermatitisu i tako uništava funkciju kože kao barijere (Dong Son i sur. 2016). Ekspresija članova obitelji proteina S100 važna je i za razvoj i progresiju melanoma (Xiong i sur. 2019). Prisutnost proteina S100 pronađena je u krvi pacijenata sa melanomom pa bi ovaj protein mogao biti potencijalni prognostički marker za napredak bolesti (Henze i sur. 1997).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati povezanost ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u uzorcima melanoma pacijenata te u staničnim linijama melanoma i keratinocita kože. Analizirati će se patohistološke karakteristike uzoraka melanoma pacijenata te provjeriti postoji li povezanost ekspresije proteina GLI1 i S100A7 s navedenim karakteristikama.

Specifični ciljevi su:

- a) Odrediti ekspresiju proteina GLI1 i S100A7 u uzorcima melanoma pacijenata metodom imunohistokemije.
- b) Provjeriti postoji li povezanost patohistoloških karakteristika melanoma sa ekspresijom proteina GLI1 i S100A7 na uzorcima melanoma pacijenata.
- c) Provjeriti mijenja li se ekspresija proteina S100A7 u ovisnosti o ekspresiji proteina GLI1 u staničnom modelu melanoma i keratinocita kože te utvrditi lokalizaciju njihove ekspresije.

3. Materijali i metode

3. 1. Parafinski prerezi melanoma

U svrhu izrade diplomskog rada koristila sam prereze melanoma čovjeka fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin. Analizirala sam uzorke 40 pacijenata po stadiju; tumor *in situ* (TIS), T1, T2, T3 i T4, prikupljenih na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak između 2018 i 2022. godine. Za uzorak svakog pacijenta imala sam po tri prereza, jedan koji sam bojala na protein GLI1, jedan koji sam bojala na protein S100A7, te treći rez koji je služio kao negativna kontrola. Pacijenti čije sam uzorke analizirala starosti su između 30 i 96 godina.

3. 2. Stanične linije

Usporedbu i semikvantitativnu analizu ekspresije proteina GLI1 i S100A7 između melanoma i normalnog tkiva pratila sam na dvije komercijalno dostupne adherentne stanične linije A375 i HaCaT. Linija A375 je stanična linija melanoma čovjeka koju sam koristila kao model tumorske stanične linije. Linija HaCaT je imortalizirana stanična linija keratinocita iz kože čovjeka te predstavlja model zdrave stanične linije. Stanice sam uzgajala u sterilnim uvjetima na 37°C, vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ u DMEM (eng. *Dulbecco Modified Eagle Medium*, Dulbeccov modificirani Eagle medij) mediju s 10 % FBS-a (eng. *fetal bovine serum*, fetalni goveđi serum).

3. 3. Protutijela

U Tablici 2 navela sam protutijela korištena u izradi ovog diplomskog rada. Primarna protutijela korištena u imunohistokemiji ista su kao i ona korištena u imunofluorescenciji.

Tablica 2. Primarna i sekundarna protutijela korištena u imunohistokemiji i imunofluorescenciji. Za obje metode protutijela su razrijeđena 1:100.

	Specifičnost protutijela	Proizvođač i kataloški broj
Primarna protutijela	Zečji anti-GLI-1 IgG	Novus, NB600-600
	Mišji anti-S100A7 IgG	Novus, 47C1068
Sekundarna protutijela	Anti-mišji IgG Alexa-594	Cell Signaling, 8890S
	Anti-zečji IgG Alexa-488	Cell Signaling, 4412S
	Anti-mišji IgG Alexa-488	Cell Signaling, 4408S
	Anti-zečji IgG Alexa-594	Cell Signaling, 8889S

3. 4. Imunohistokemija

3. 4. 1. Imunohistokemijsko bojanje tkiva

Prereze melanoma bojala sam u staklenoj kadici u koju sam stavljala po 20 stakalaca (40 prereza tkiva, 2 prereza po stakalcu). Pri svakom bojanju u kadicu sam stavljala stakalca sa prerezima različitih stadija kako bi izbjegla utjecaj postupka bojanja u pojedinoj seriji na rezultat pokusa. Imunohistokemijsko bojanje sam provela koristeći komercijalni komplet LSAB2 System HRP (Dako) po protokolu tvrtke Aviva Systems Biology. Prereze sam prvo deparafinizirala u BioClear otopini (BioGnost) tri puta po tri minute. BioClear je sredstvo na bazi ksilena koje može otapati parafin, a miješa se s alkoholom te se koristi za rehidraciju i dehidraciju uzoraka u imunohistokemiji. Prereze sam rehidrirala uranjanjem u tri otopine etanola (Sigma Aldrich) padajuće koncentracije (100 %, 95 % i 70 % otopina), dva puta po dvije minute u svakoj koncentraciji etanola. Posljednji korak je konačna rehidracija u destiliranoj vodi. Fiksacijom u formalinu aminokiseline u proteinu postaju međusobno povezane kovalentnim vezama. Kako bi epitopi na proteinima ponovno bili dostupni za vezanje protutijela koristi se otopina za renaturaciju proteina (eng. *epitope retrieval buffer*, 0,01 M natrijev citratni pufer, pH 6,0, DAKO). Otopinu sam najprije zagrijala na 100°C u mikrovalnoj pećnici te prereze inkubirala četrdeset minuta, tijekom čega se otopina polako hladila na sobnoj temperaturi. Potom sam isprala jednu minutu u TBST puferu (eng. *tris-buffered saline* + *Tween*, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, pH 7,5)). Stanice tkiva sadrže peroksidaze koje bi mogle dovesti do stvaranja nespecifičnog signala, a inaktiviraju se dodatkom vodikovog peroksida. Blokiranje endogenih peroksidaza sam provela u otopini 3 % vodikovog peroksida u metanolu deset

minuta pa isprala tri puta po jednu minutu u TBST puferu. Tijekom ispiranja pripremila sam vlažnu komoru; u kutiju s poklopcem sam stavila ubruse i dobro ih namočila destiliranom vodom. Stakalca sam nakon inkubacije ocijedila i osušila filter papirom te prereze tkiva okružila PAP-PEN (BioGnost) olovkom i pri tom sam pazila da su prerezi cijeli obrubljeni. PAP-PEN olovka ostavlja hidrofobni trag i sprječava da vodene otopine skliznu s prereza. Na obrubljene prereze tkiva dodala sam dvije kapi otopine (mora prekriti cijeli prerez) koja sprječava nespecifično pozadinsko obojenje (Protein Block, Serum-Free, Dako) i stavila stakalca u vlažnu komoru. Nakon dvadeset minuta pokupila sam otopinu filter papirom i dodala odgovarajuće primarno protutijelo (Tablica 2). Primarna protutijela pripremila sam razrjeđivanjem u omjeru 1:100 u 2 % BSA (eng. *bovine serum albumin*, goveđi serum albumin) u TBST-u. Razrijeđeno primarno protutijelo dodala sam na prereze (50 μ L po prerezu) te inkubirala preko noći u vlažnoj komori na 4 °C do sljedećeg dana. Za stakalca negativne kontrole umjesto razrjeđenja primarnog protutijela koristila sam 2 % BSA/TBST.

Sljedeći dan sam pipetom sa prereza pokupila primarno protutijelo i prebacila ga u plastičnu epruvetu volumena 1,5 mL i pohranila ga na -20 °C kako bi se moglo ponovno koristiti. Stakalca sa prerezima sam potom isprala tri puta po jednu minutu u TBST puferu i dodala kap do dvije univerzalnog sekundarnog protutijela sa vezanim biotinom (Biotinylated link, Dako LSAB2 System-HRP) direktno na prerez u trajanju od deset minuta. Nakon inkubacije, stakalca sam isprala tri puta po jednu minutu u TBST puferu te sam na isti način nakapala streptavidin sa vezanim HRP enzimom (Streptavidin-HRP, Dako LSAB2 System-HRP) direktno na prerez u trajanju od deset minuta. Stakalca sam ocijedila od prethodno dodanog reagensa i tri puta po jednu minutu isprala u TBST puferu. Kako bi vizualizirala područja na koje se vezalo primarno protutijelo dodala sam substrat peroksidaze, kromogen DAB (3,3'-diaminobenzidin, Dako, Liquid DAB + Substrate Chromogen System) i ostavila da reagira sedam minuta. HRP (eng. *horseradish peroxidase*, peroksidaza iz hrena) enzim je koji katalizira reakciju oksidacije kromogena DAB vodikovim peroksidom pri čemu nastaje smeđi precipitat na mjestu enzima. Otopinu kromogena sam pripremila dodatkom 1 kapi kromogena (DAB + Chromogen, Dako, Liquid DAB + Substrate Chromogen System) u 1 mL pufera (DAB + Substrate Buffer, Dako, Liquid DAB + Substrate Chromogen System). Nakon inkubacije stakalca sam ocijedila i isprala pet minuta u destiliranoj vodi. Iz staklene kadice sam izlila destiliranu vodu i provela protubojanje hematoksilinom (Hematoxylin H, Biognost) trideset sekundi. Hematoksilin je bazična boja koja boja jezgru plavo-ljubičasto. Hematoksilin sam vratila nazad u bocu, a stakalca sam pet minuta ispirala u destiliranoj vodi tako što sam nekoliko puta natočila vodu u

kadicu, nježno promiješala te izlila. Prije uklapanja prereze sam dehidrirala u tri otopine etanola rastuće koncentracije (70 %, 95 % i 100 % otopina), dva puta po dvije minute u svakoj koncentraciji. Prereze sam inkubirala u BioClear otopini tri puta po tri minute. Prereze tkiva sam izvadila na radnu površinu u digestoru te nakapala po dvije kapi Biomount (Biognost) otopine te nježno prislonila pokrovno stakalce kako bi ostalo što manje mjehurića. Pokrovna stakalca sam nježno pritislula kako bi uklonila višak Biomount otopine i maknula mjehuriće koji bi smetali pri mikroskopiranju. Stakalca sam ostavila u digestoru kako bi se osušili i bili spremni za mikroskopiranje.

3. 4. 2. Obrada rezultata imunohistokemijskog bojanja

Patohistološku analizu melanomskih prereza napravili su patolozi u KBC Sestre milosrdnice tijekom rutinske obrade, te dostavili podatke o uzorcima zajedno s uzorcima. Melanomima je određen stadij (TIS, T1, T2, T3 i T4), te klasifikacija po Clarku (koliko slojeva kože je zahvatio melanom) i Breslowu (debljina melanoma). Analizirana je i veličina melanoma, broj mitozu po mm², prisutnost limfocitnog infiltrata, pigmentofaga i nevusa, te ulceracije. Te podatke sam koristila za statističku analizu mojih rezultata.

Ekspresija proteina GLI1 i S100A7 kvantificirana je za više dijelova svakog preparata: (1) tumorska masa, (2) epitel direktno iznad tumora, (3) epitel na granici tumorskog tkiva i normalnog tkiva, te (4) udaljeni epitel. Intenzitet obojenja vrednovao se na skali od 0 do 3. Ocjena 0 znači da nema signala, 1 je slabo obojenje, 2 je umjereno obojenje i 3 je jako obojenje. Osim prema intenzitetu obojenja, prerezi melanoma su podijeljeni u tri kategorije na temelju broja obojenih stanica; prerezi bez obojenih stanica, prerezi s manje od 50 % obojenih stanica te prerezi s više od 50 % obojenih stanica. Na temelju ove dvije karakteristike uzorci su svrstani u tri kategorije: negativno (bez obojenja), slabo (svi uzorci intenziteta 1 i uzorci intenziteta 2 s manje od 50 % obojenih stanica) i jako (uzorci intenziteta 2 sa više od 50 % obojenih stanica i svi uzorci intenziteta 3).

Rezultate sam statistički analizirala u programu MedCalc (V.22.014) za Windows. Rezultate sam analizirala hi-kvadrat (eng. *Chi-square*) testom za trend ili Kruskal-Wallis testom.

3. 5. Rad sa staničnim linijama

Rad sa staničnim linijama provodila sam u sterilnim uvjetima u laminarnom kabinetu sa vertikalnim protokom zraka. Koristila sam sterilno posuđe, otopine, pufere i medije. Prije i poslije upotrebe radnu površinu kabineta sterilizirala sam etanolom i UV svjetlom.

3. 5. 1. Odmrzavanje stanica

Stanice staničnih linija A375 i HaCaT bile su pohranjene u mediju za zamrzavanje (50 % FBS, 40 % DMEM, 10 % DMSO (dimetil sulfoksid)) u krio-ampulama na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ koje sam odmah stavila na led. Dok su se stanice u krio-ampulama odmrzavale na ledu, pripremila sam dvije sterilne staklene epruvete u koju sam dodala 5 mL medija DMEM s 10 % FBS. Nakon što su se stanice odvojile od stijenke krio-ampule prebacila sam ih u prethodno pripremljene i prikladno označene staklene epruvete. Epruvete sam centrifugirala pet minuta na $300 \times g$ i $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ te sam supernatante izlila. U ovom koraku stanice su isprane od DMSO-a koji ostane u supernatantu pa je odmrzavanje je važno napraviti u najkraćem mogućem roku kako bi se smanjio štetan utjecaj krioprotektanta DMSO-a na stanice. Taloge stanica sam resuspendirala u 10 mL DMEM medija i potom prebacila sadržaj svake od epruveta u pripadajuću Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm. Petrijeve zdjelice sam nježno protresla i spremila u inkubator u uvjetima temperature $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5 % CO_2 kako bi se uspostavile adherentne stanične kulture.

3. 5. 2. Održavanje i presađivanje stanica u kulturi

Stanicama staničnih linija A375 i HaCaT mijenjala sam medij svakih dva do tri dana tako što sam uklanjala medij iz Petrijeve zdjelice i dodavala 10 mL svježeg medija sterilnom pipetom. Nakon što adherentne stanične linije postanu konfluentne, odnosno zauzmu cijelu površinu Petrijeve zdjelice, treba ih razrijediti. Kako bi stanice razrijedila uklonila sam medij iz Petrijeve zdjelice te dodala 5 mL PBS pufera (eng. *Phosphate-Buffered Saline*, 1,7 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, pH 7,2). PBS-om se ispiru stanice od zaostalog medija koji sadrži proteaze. Proteaze iz medija mogu inaktivirati tripsin, enzim važan za odvajanje stanice od podloge. Nakon što sam dobro isprala stanice i uklonila sav PBS pufer na stanice sam dodala 1 mL tripsina s 1 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) i inkubirala pet minuta. Tijekom inkubacije povremeno sam protresla Petrijevu zdjelicu i provjerila pod

svjetlosnim mikroskopom jesu li se stanice odvojile od podloge. Nakon inkubacije tripsin sam inaktivirala dodatkom 5 mL medija DMEM s 10 % FBS te sam stanice resuspendirala sterilnom pipetom. U novu Petrijevu zdjelicu nasadila sam 1 mL suspenzije stanica te dodala 10 mL medija DMEM. Ostatak suspenzije sam bacila.

3. 5. 3. Nasađivanje stanica

Za analizu imunofluorescencijom stanice staničnih linija A375 i HaCaT sam trebala nasaditi u komoru sa šest bunarića. U tri bunarića nasadila sam stanice stanične linije A375, a u tri bunarića nasađena je stanična linija HaCaT. Stanice sam tripsinizirala kao što sam opisala u poglavlju 3. 5. 2. 20 μ L suspenzije stanica dodala sam u 80 μ L metilenskog modrila i resuspendirala. U Neubauerovu komoricu (komoricu za brojanje stanica) koja ima ugraviranu mrežicu mikropipetom sam dodala 20 μ L te otopine te sam pod svjetlosnim mikroskopom izbrojala stanice i odredila broj stanica u 1 mL. Broj stanica u mL suspenzije sam izračunala prema sljedećoj formuli: (broj stanica u 4 kvadranta/ 0,4) x 5 x 10³. Broj stanica u svim bunarićima treba biti 50 000. Stanica stanične linije A375 bilo je 1 000 000 po mL te sam u tri bunarića dodala po 50 μ L suspenzije stanica A375 (50 000 stanica/ 1 000 000 stanica/mL). Stanica stanične linije HaCaT bilo je 725 000 po mL te sam u ostala tri bunarića dodala po 69 μ L suspenzije stanica HaCaT. U svaki bunarić sam nadodala DMEM medij tako da konačni volumen bude 2 mL. Komorice sa bunarićima stavila sam u inkubator na 37 °C i 5 % CO₂ kako bi se stanice uhvatile za podlogu.

3. 5. 4. Transfekcija stanica

Za usporedbu ekspresije transkripcijskog faktora GLI1 i njegove mete, proteina S100A7 između staničnih linija A375 i HaCaT imunofluorescencijom stanice moraju ekspimirati transkripcijski faktor GLI1. Metodom biorazgradivih nanočestica stanice se moraju transfecirati plazmidnom DNA koja kodira za protein GLI1. Koristila sam ekspresijski plazmid pcDNA4NLSMTGLI1 (Regl i sur. 2004). Dan nakon nasađivanja u komoru sa šest bunarića stanice su se prihvatile za podlogu te su bile spremne za transfekciju. Potrebno je transfecirati 5 μ g plazmidne DNA (5000 ng) po svakom bunariću. Uzorak plazmidne DNA s ugrađenim genom koji kodira za protein GLI1 ima masenu koncentraciju 900 ng/ μ L. Potreban volumen za svaki bunarić bio je 5,5 μ L (5000 ng / 900 ng/ μ L). Pripremila sam četiri epruvete od 1,5 mL te

u svaku dodala po 5,5 μ L plazmidne DNA i 100 μ L Xfect pufera; dvije su za transfekciju stanične linije A375 te dvije za transfekciju stanične linije HaCaT. Prvi bunarići u svakom redu (jedan sa staničnom linijom A375 i jedan sa staničnom linijom HaCaT) predviđeni su za negativnu kontrolu bojanja protutijelima te za njih nisam pripremala reakcijsku smjesu. U svaku epruvetu s plazmidom i puferom dodala sam po 1,5 μ L Xfect polimera te sam epruvete vorteksirala i kratko centrifugirala. Dok su se reakcijske smjese inkubirale na sobnoj temperaturi deset minuta stanicama sam promijenila medij; maknula sam stari i dodala 2 mL medija bez FBS-a. Kad je inkubacija završila na stanice sam kap po kap dodavala reakcijsku smjesu pri čemu sam komoru nježno proljuljala da se smjesa dobro raspoređi. Komoru sam stavila na inkubaciju u uvjetima 37 °C, 5 % CO₂ u inkubator do sljedećeg dana. Sljedeći dan sam promijenila medij stanicama; maknula sam medij bez FBS-a i dodala 2 mL DMEM medija s 10 % FBS-a.

3. 6. Imunofluorescencija

Kako bi mogla usporediti i kvantitativno analizirati ekspresiju proteina GLI1 i S100A7 u jezgri i citoplazmi stanica staničnih linija A375 i HaCaT, nasadene i transfecirane stanice pripremila sam za imunofluorescenciju. Iz bunarića sam maknula medij i stanice isprala tri puta po pet minuta u PBS-u. Stanice sam fiksirala u 3,6 % paraformaldehidu petnaest minuta na sobnoj temperaturi. Sterilnom pipetom uklonila sam paraformaldehid i stanice isprala tri puta po pet minuta dodatkom 1 mL PBS-a. Na stanice sam dodala 1 mL metanola i inkubirala petnaest minuta. Nakon što sam maknula metanol stanice sam isprala tri puta po pet minuta u PBS-u. Za to vrijeme pripremila sam vlažnu komoru; u plastičnu kutiju stavila sam filter papir i dobro ga natopila vodom. U komorice sam dodala Protein Block i inkubirala trideset minuta u vlažnoj komori. Otopinu primarnih protutijela za 4 bunarića pripremila sam tako što sam 8 μ L anti-GLI1 i 8 μ L anti-S100A7 IgG protutijela (Tablica 2) dodala u 800 μ L 2 % BSA/PBS. Sa stanica sam uklonila Protein Block i u svaki bunarić dodala 200 μ L otopine primarnih protutijela razrjeđenja 1:100 u 2 % BSA/PBS-u prema Slici 11. U bunariće za negativnu kontrolu bojanja stavila sam samo 2 % BSA/PBS. Falcon komoru inkubirala sam preko noći na 4 °C u vlažnoj komori.

Sljedeći dan sa stanica sam maknula primarno protutijelo te ih isprala tri puta po pet minuta dodatkom 1 mL PBS-a. Kako bih odbacila mogućnost utjecaja fluorofora na rezultate pokusa koristila sam crveno (Alexa 594) i zeleno (Alexa 488) označeno sekundarno protutijelo u dva

odvojena pokusa; anti-mišji IgG označen crvenim fluoroforom s anti-zečjim IgG protutijelom označenim zelenim fluoroforom te anti-mišji IgG označen zelenim fluoroforom s anti-zečjim IgG označenim crvenim fluoroforom. Sekundarna protutijela pripremila sam u razrjeđenju 1:100 u 2 % BSA/PBS-u te dodala u bunariće prema Slici 11. Falcon komoru sam prekrila aluminijskom folijom kako bi ju zaštitila od svjetla te inkubirala jedan sat na sobnoj temperaturi. Stanice sam isprala tri puta po pet minuta u PBS-u. Stanice sam bojala bojom DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) kako bi detektirala i usporedila lokalizaciju proteina GLI1 i S100A7 između jezgre i citoplazme. DAPI je fluorescentna boja koja se veže za regije molekule DNA bogate adeninom i timidinom. Otopinu boje DAPI razrijedila sam 50 000 puta tako što sam pomiješala 10 µL boje DAPI koncentracije 14,3 mM u 50 mL PBS-a. U svaki bunarić sam dodala 100 µL boje DAPI i omotala aluminijskom folijom te inkubirala u mraku pet minuta nakon čega sam ih isprala PBS-om.



Slika 11. Shema dodavanja primarnog i sekundarnog protutijela u Falcon komoru sa šest bunarića u koje su nasadene stanične linije A375 i HaCaT u pokusu imunofluorescencije. Boja slova naznačava boju fluorofora kojom je označeno sekundarno protutijelo.

3. 6. 1. Obrada rezultata imunofluorescencije

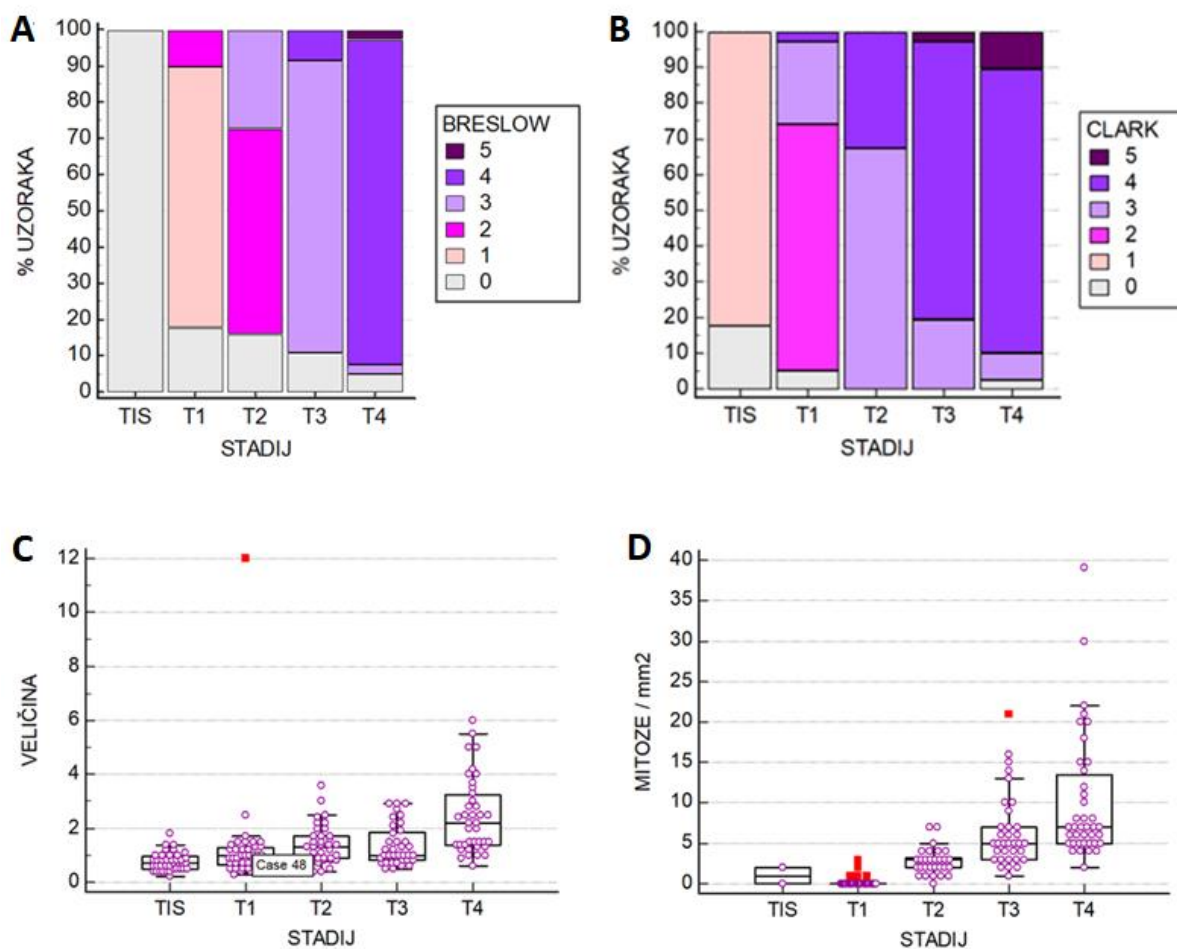
Rezultate imunofluorescencije promatrala sam na instrumentu EVOS FLoid Cell Imaging Station. Stanice sam fotografirala pod vidljivom svjetlošću, filterima za crveno i zeleno svjetlo kako bi detektirala fluorofore te pod filterom za plavo svjetlo za detekciju boje DAPI. Obradom

slika u programu ImageJ (V.1.53t) kvantificirala sam intenzitet i usporedila lokalizaciju fluorescencije na 10 vidnih polja za svaki uvjet. Rezultate sam statistički analizirala t-testom u programu MedCalc (V.22.014) za Windows.

4. Rezultati

4. 1. Imunohistokemijsko bojanje prereza melanoma na proteine GLI1 i S100A7

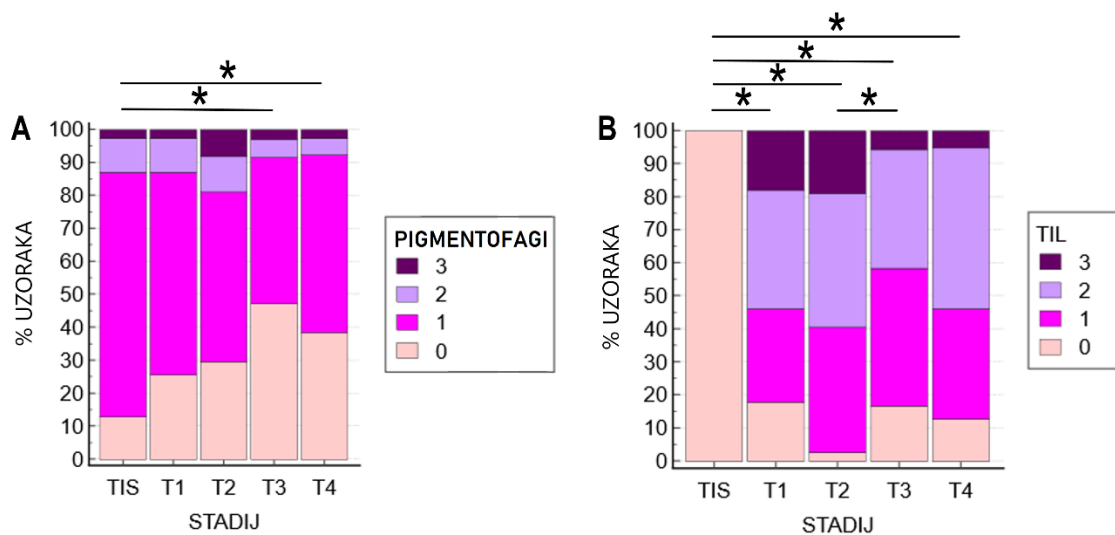
Korelaciju između stadija melanoma i stadija po Breslowu i Clarku, veličine melanoma i broja mitoze po mm² izračunala sam hi-kvadrat testom. Ovaj test pokazao je visoku povezanost stadija melanoma sa stadijem po Breslowu (Slika 12A, P<0,0001) i Clarku (Slika 12B, P<0,0001), veličinom melanoma (Slika 12C, P =0,0031) i brojem mitoze po mm² (Slika 12D, P<0,0001).



Slika 12. Povezanost stadija melanoma sa stadijima po A) Breslowu, B) Clarku, C) veličinom melanoma i D) brojem mitoze po mm².

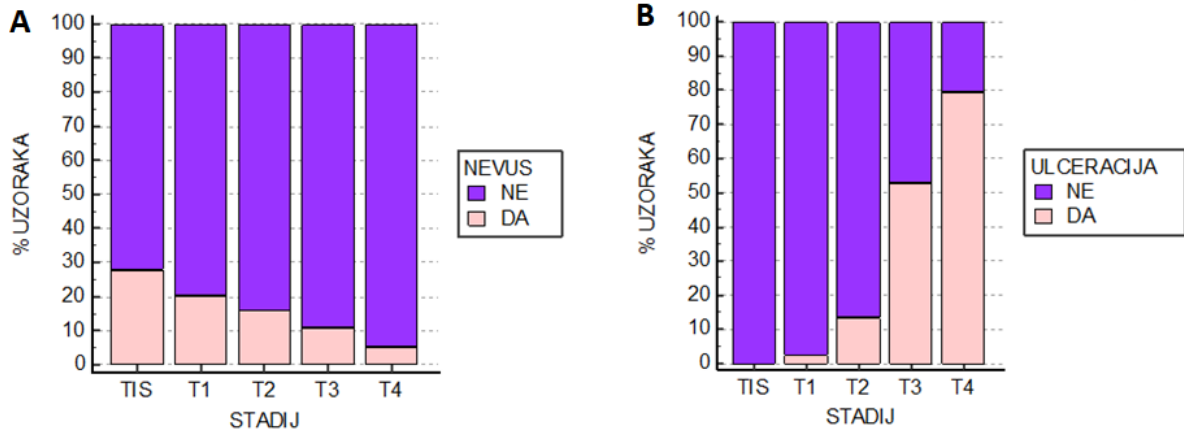
Imunosne stanice domaćina invadiraju tumor i imaju ulogu u modulaciji imunološkog odgovora. U patologiji su imunosne stanice bitan prognostički marker. Prisutnost pigmentofaga

i TIL-ova i njihovu povezanost sa stadijem tumora statistički sam analizirala Kruskal-Wallis testom s pridruženim Jonckheere-Terpstra testom za trend. Pigmentofagi su statistički značajno manje zastupljeni kod viših stadija melanoma. Iako individualnih razlika između grupa nema (Kruskal-Wallis test; $P=0,0383$), post hoc analiza testom za trend pokazuje da trend postoji i da je statistički značajan (Jonckheere-Terpstra test za trend; $P=0,0148$) (Slika 13A). TIL-ovi također pokazuju statistički značajnu povezanost sa stadijem melanoma, ali u ovom slučaju zastupljenost raste sa stadijem. Razlike između grupa postoje, kao i trend (Kruskal-Wallis test; $P<0,0001$, Jonckheere-Terpstra test za trend; $P<0,001$). Postojanje trenda vjerojatno je posljedica ne postojanja TIL-ova u TIS stadiju i povećanja broja limfocita između T2 i T3 stadija, dok između T1 i T2 te T3 i T4 razlika nije statistički značajna (Slika 13B).



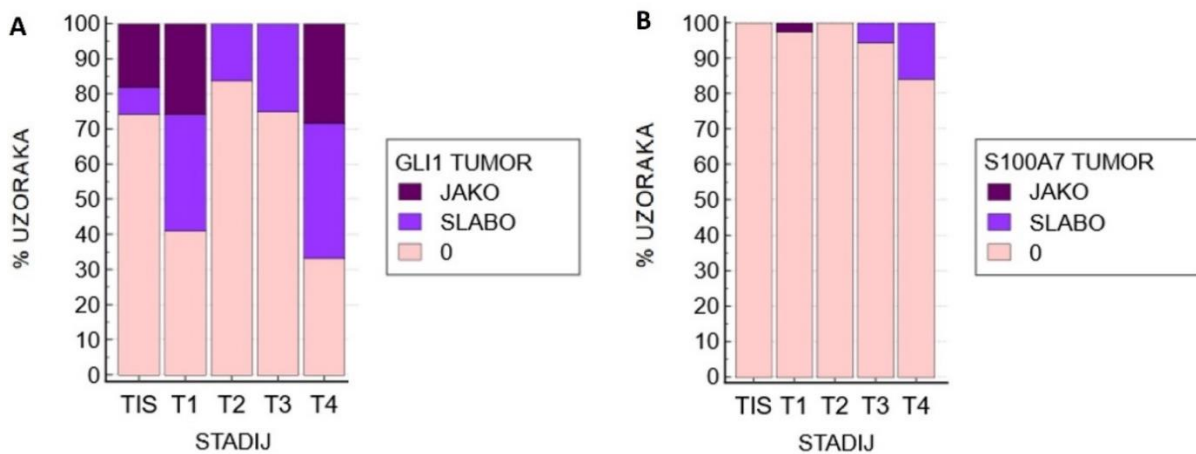
Slika 13. Povezanost stadija melanoma sa brojem A) pigmentofaga i B) TIL-ova. Prema brojnosti pigmentofaga i TIL-ova prerezima su dodijeljene sljedeće vrijednosti: 0=nema, 1=rijetki, 2=srednje ili fokalno gusti i 3=gusti. P vrijednosti označene zvjezdicom (*) predstavljaju $P<0,05$.

Melanom može nastati na mjestu postojećeg madeža (nevusa) ili *de novo*, na mjestu gdje madeža prije nije bilo. Razvoj melanoma iz nevusa najučestalije je kod tumora *in situ*, dok porastom stadija pada incidencija nastanka melanoma iz nevusa (Slika 14A). Statistički značajne razlika između pojedinih stadija melanoma nema, ali trend postoji (Jonckheere-Terpstra test za trend; $P=0,0031$). Ulceracija je u patologiji važan prognostički marker kod pacijenata s melanomom. Kod melanoma višeg stadija statistički se češće detektira ulceracija (Kruskal-Wallis test; $P < 0,0001$, Jonckheere-Terpstra test za trend; $P < 0,0001$) (Slika 14B).



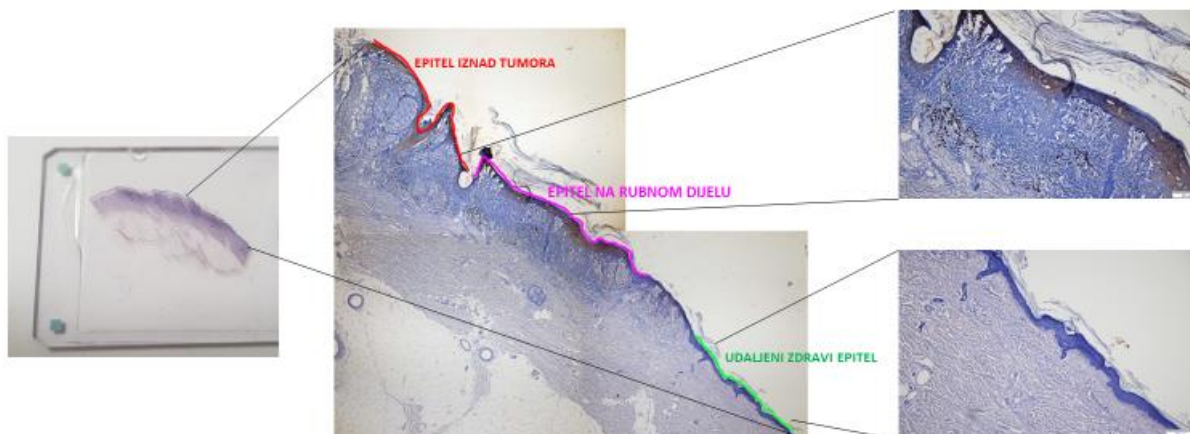
Slika 14. Povezanost stadija melanoma s A) postojećim nevusom i B) prisutnošću ulceracija.

Prvo sam odredila bojanje proteina GLI1 i S100A7 u tumorskoj masi. Iznenadujuće, broj uzoraka s pozitivnim bojanjem tumorske mase na proteine GLI1 i S100A7 je relativno mali, osobito za protein S100A7, ali je statistički značajan za oba proteina ($P < 0,001$ za GLI1, $P = 0,0058$ za S100A7) (Slika 15A i 15B).

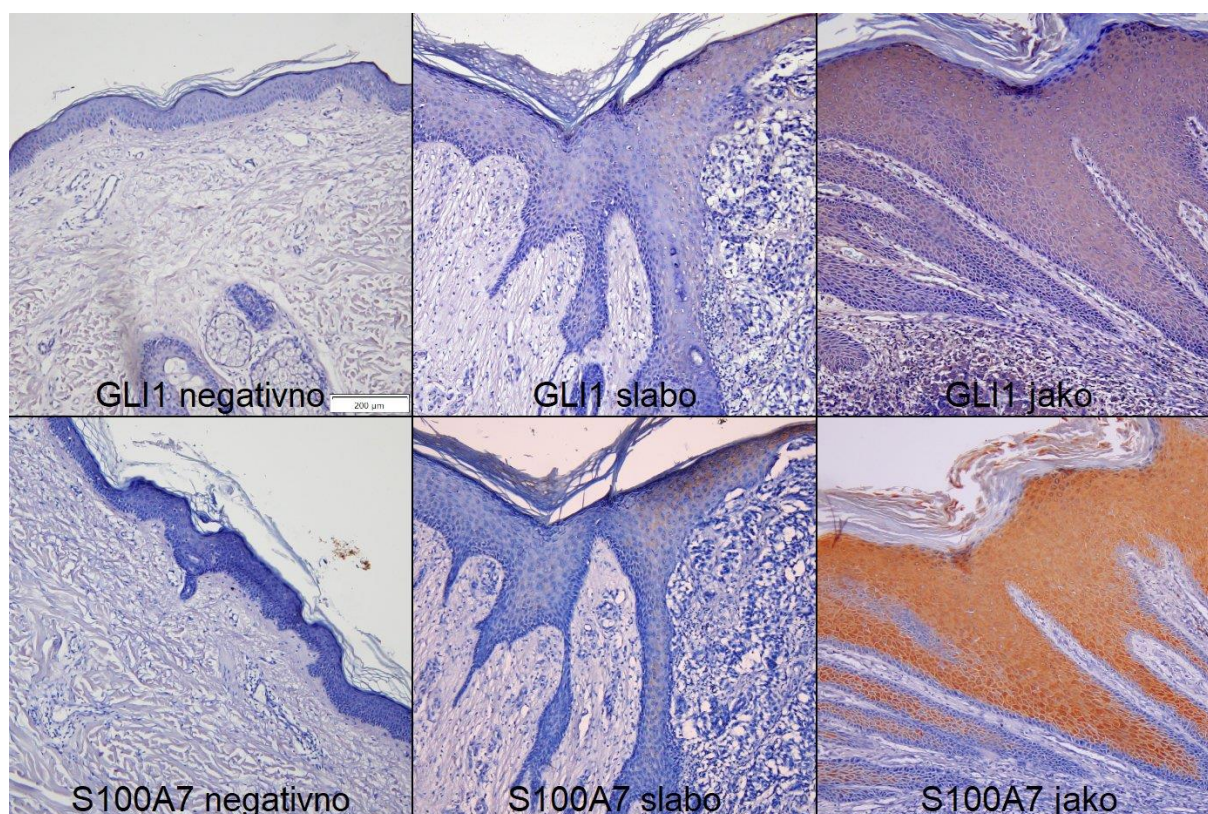


Slika 15. Bojanje tumorske mase na proteine A) GLI1 i B) S100A7.

Međutim, signal je bio puno više zastupljen u epitelu uzoraka, i to isključivo u epitelu koji okružuje tumorsku masu. Zbog toga sam prisutnost i intenzitet imunohistokemijskog bojanja ovih proteina analizirala i u epitelu. Odvojeno sam promatrala (1) epitel koji se nalazi direktno iznad melanoma, (2) epitel koji je na granici između epitela direktno iznad tumora i zdravog epitela, te (3) epitel na rubnom dijelu isječka koji predstavlja zdravu kožu (Slika 16). Reprezentativne primjere negativnog, slabog i jakog obojenja prikazala sam na Slici 17.

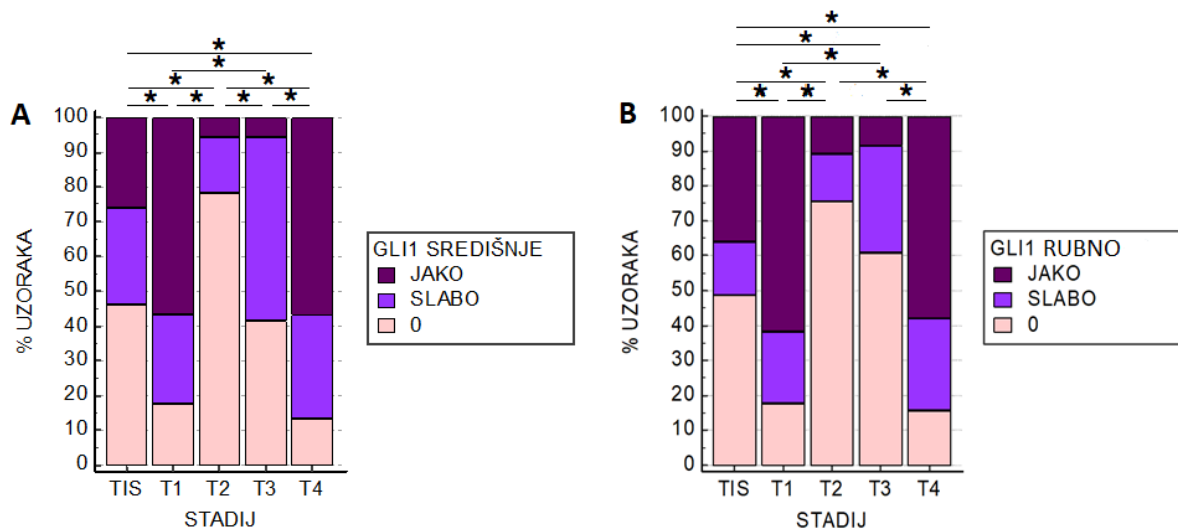


Slika 16. Preparat tkiva melanoma bojanog imunohistokemijski s naznačenim lokacijama epitela: crveno-epitel iznad tumora, ružičasto-epitel na rubnom dijelu i zeleno-udaljeni zdravi epitel. Lijevi dio slike predstavlja makroskopski izgled preparata, srednji dio je fotografija povećanja 40 x, a desni dio fotografija povećanja 100 x. Skala predstavlja duljinu od 200 μ m.



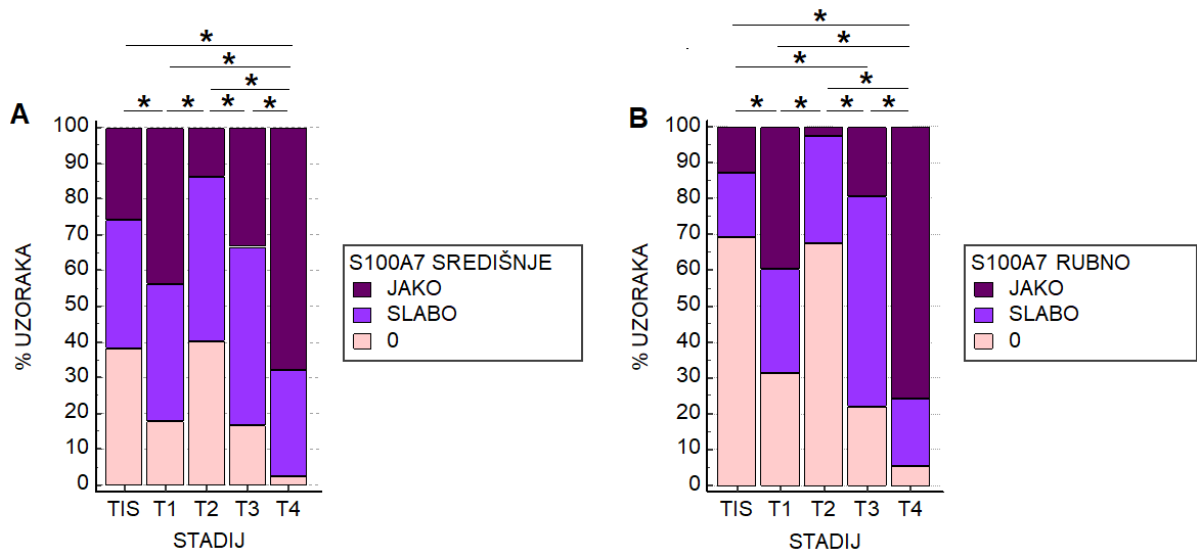
Slika 17. Primjer određivanja intenziteta negativnog, slabog i jakog bojanja za proteine GLI1 i S100A7. Sve slike su slikane pri povećanju 100 x, a skala predstavlja duljinu od 200 μ m.

Rezultate bojanja proteina GLI1 usporedila sam sa stadijem melanoma. Podatke sam analizirala Kruskal-Wallis testom te sam dobila statistički različito obojenje proteina GLI1 u različitim stadijima u epitelu direktno iznad tumora i u rubnom epitelu (Kruskal-Wallis test; $P < 0,0001$) (Slika 18A i 18B). Trend ne postoji te obrazac obojenja prereza razlikuje se za stadije T2 i T3 za koje je obojenje slabije od očekivanog. GLI1 u zdravom udaljenom epitelu nije detektiran, pa posebna statistička analiza za tu regiju nije prikazana.



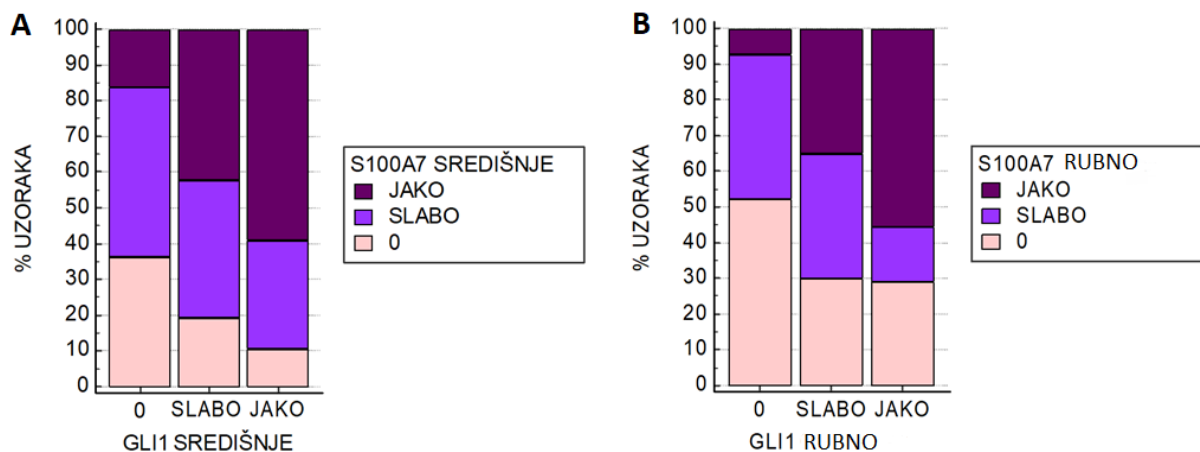
Slika 18. Povezanost stadija melanoma s ekspresijom proteina GLI1 u A) epitelu iznad tumora i u B) rubnom epitelu. P vrijednosti označene zvjezdicom (*) predstavljaju $P < 0,05$.

Rezultati dobiveni za protein S100A7 slični su rezultatima dobivenim za protein GLI1. Povećanjem stadija melanoma u epitelu iznad tumora i u rubnom epitelu raste i intenzitet bojanja proteina S100A7, a rezultat je statistički značajan (hi-kvadrat test; $P < 0,0001$), te pokazuje značajni trend (Slika 19A i 19B). S100A7 u zdravom epitelu nije detektiran, pa posebna statistička analiza za tu regiju nije prikazana.



Slika 19. Povezanost stadija melanoma s ekspresijom proteina S100A7 u A) epitelu iznad tumora i B) rubnom epitelu. P vrijednosti označene zvjezdicom (*) predstavljaju $P < 0,05$.

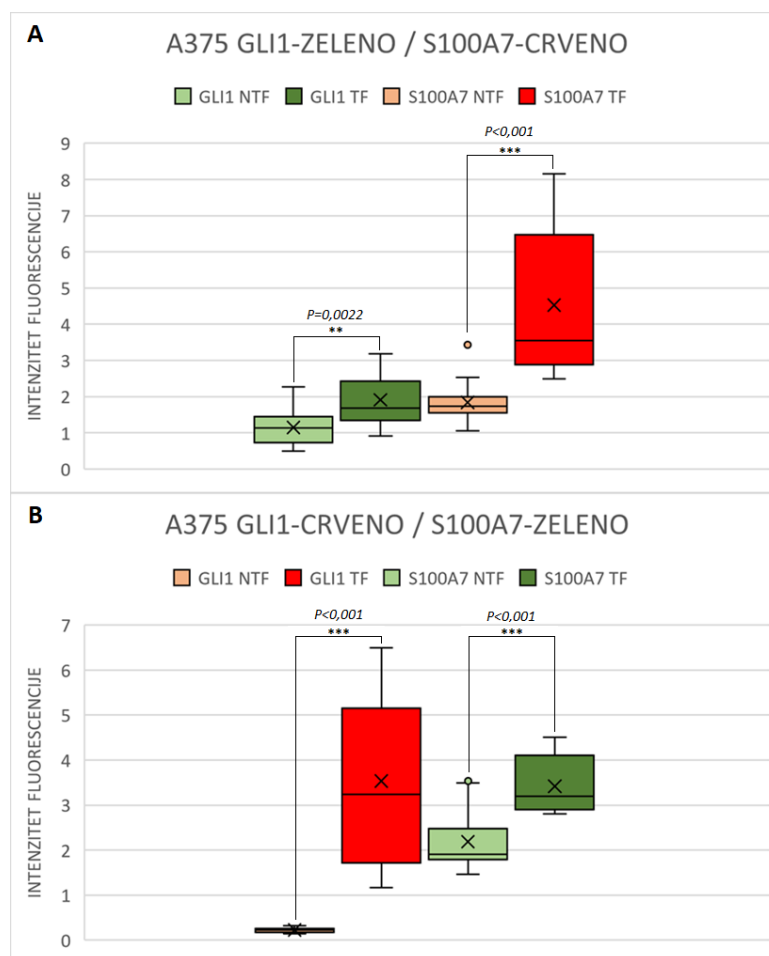
Kako bi provjerila odnos između ekspresije proteina GLI1 i proteina S100A7 na istim lokacijama usporedila sam jačinu bojanja dva proteina u epitelu iznad tumora za GLI1 sa epitelom iznad tumora za S100A7, te u rubnom epitelu za GLI1 sa rubnim epitelom za S100A7. Jače obojenje GLI1 povezano je sa jačim obojenjem proteina S100A7 i u epitelu iznad tumora i u rubnom epitelu što je potvrdio Kruskal-Wallis test ($P < 0,0001$) i Jonckheere-Terpstra test za trend ($P < 0,0001$) (Slika 20A i 20B).



Slika 20. Povezanost ekspresije proteina GLI1 s ekspresijom proteinom S100A7 u A) epitelu iznad tumora i B) rubnom epitelu.

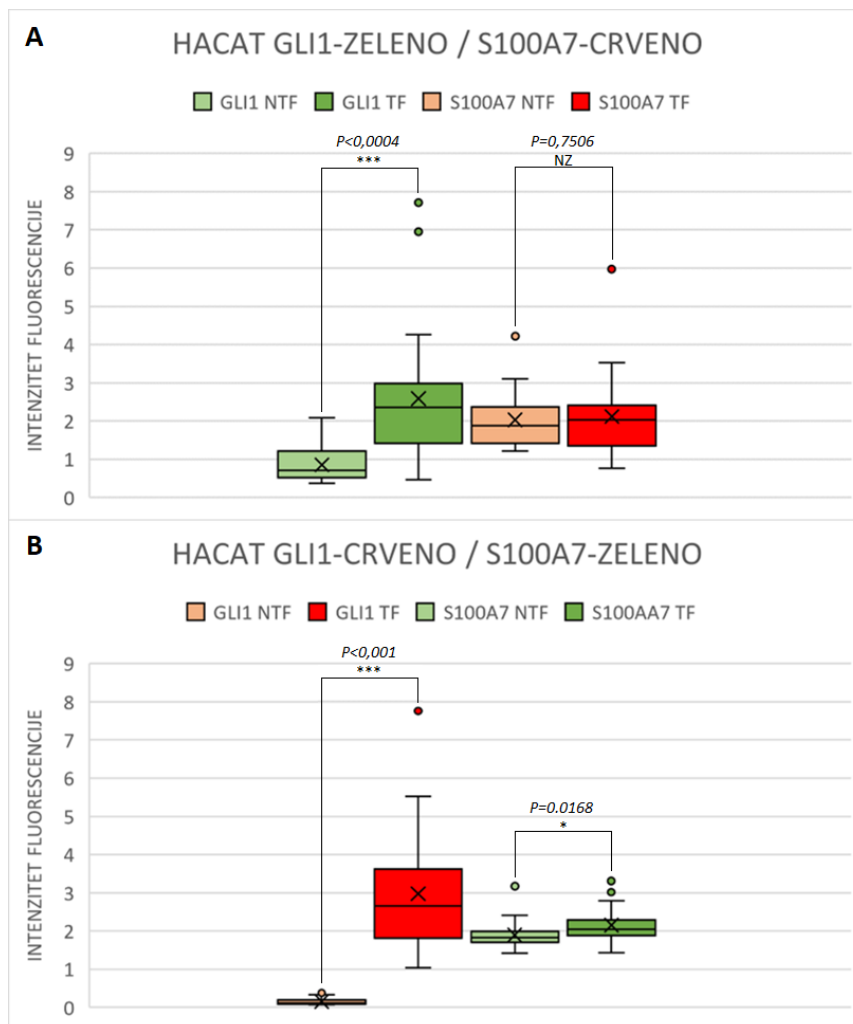
4. 2. Imunofluorescencijska analiza ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u staničnim linijama A375 i HaCaT

Stanična linija melanoma A375 predstavljala je model tumorskog tkiva u pokusu imunofluorescencije. Stanična linija A375 transfecirana je ekspresijskim plazmidom za protein GLI1, nakon čega je praćen intenzitet obojenja stanica u transfeciranim i netransfeciranim stanicama. Pretpostavka jest da će u stanicama nakon transfekcije koje pojačano ekspimiraju GLI1 doći do povećanja ekspresije S100A7. Kod obje kombinacije protutijela u bunarićima postoji statistički značajno povećanje ekspresije GLI1 i S100A7 u transfeciranim stanicama (TF) u odnosu na netransfeciranu kontrolu (NTF) (Slika 21A i 21B). U kombinaciji gdje je kao sekundarno protutijelo korišteno protutijelo označeno crvenim fluoroforom (Slika 21A S100A7-crveno i Slika 21B GLI1-crveno) vidi se jači intenzitet obojenja u odnosu na kombinaciju gdje je kao sekundarno protutijelo korišteno ono označeno zelenim fluoroforom.



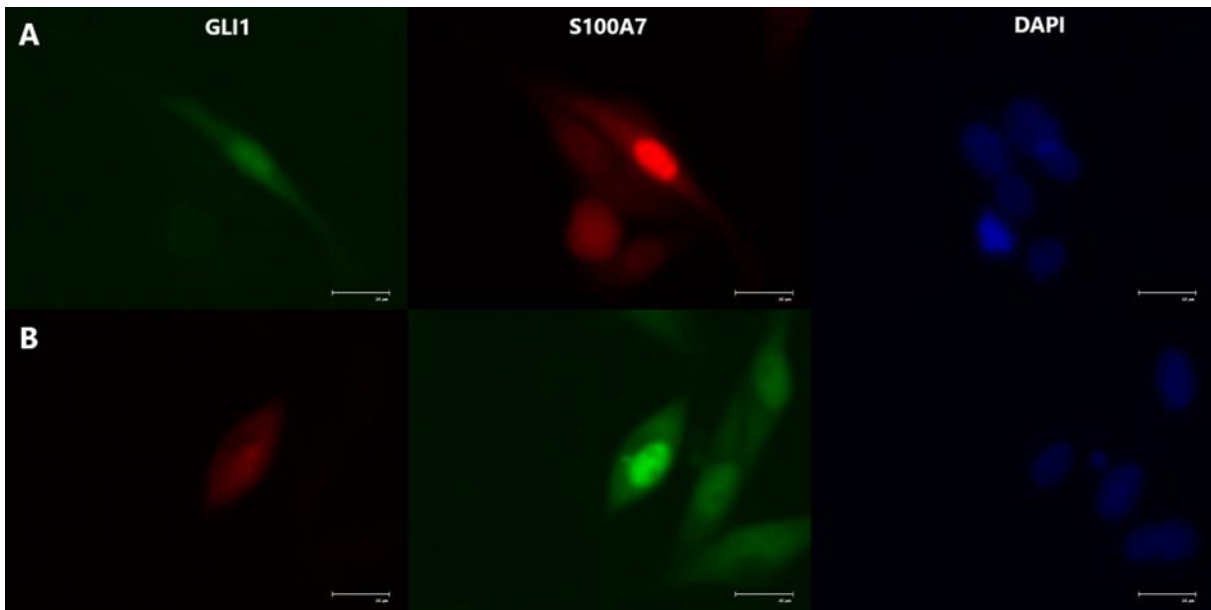
Slika 21. Imunofluorescencijska analiza ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u staničnoj liniji A375 kombinacijom sekundarnih protutijela označenih različitim fluoroforima; A) GLI1-zeleno i S100A7-zeleno te B) GLI1-crveno i S100A7-zeleno.

Kako bi usporedila ekspresiju GLI1 i S100A7 u netumorskim stanicama, koristila sam staničnu liniju HaCaT koja predstavlja imortalizirane keratinocite kože. U pokusu sa sekundarnim protutijelom označenim GLI1-zeleno i S100A7-crveno povećana je ekspresija proteina GLI1 u transfeciranim stanicama u odnosu na negativnu kontrolu ($P=0,0004$), dok ekspresija S100A7 ne pokazuje statistički značajno povećanje u odnosu na negativnu kontrolu ($P=0,7506$) (Slika 22A). I u drugoj kombinaciji protutijela (GLI1-crveno i S100A7-zeleno) postoji statistički značajno povećanje ekspresije proteina GLI1 u transfeciranim stanicama u odnosu na negativnu kontrolu ($P<0,001$), ali i blago povećanje ekspresije S100A7 u odnosu na negativnu kontrolu ($P=0,0168$) (Slika 22B). U oba slučaja intenzitet crvenog obojenja veći je u odnosu na zeleno obojenje.



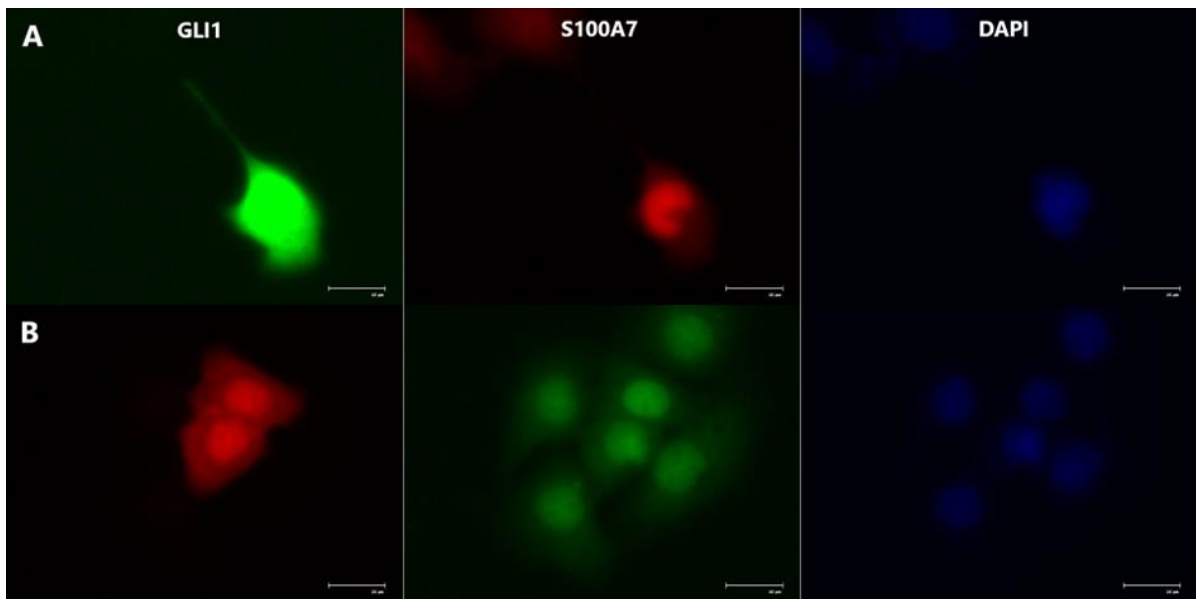
Slika 22. Imunofluorescencijska analiza ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u staničnoj liniji HaCaT kombinacijom sekundarnih protutijela označenih različitim fluoroforima; A) GLI1-zeleno i S100A7-zeleno te B) GLI1-crveno i S100A7-zeleno.

Usporedbom zelenih i crvenih fluorescentnih signala sa signalom boje DAPI u istom vidnom polju pod različitim filterima odredila sam lokalizaciju ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u stanicama A375. U obje kombinacije protutijela crveni i zeleni signal se preklapaju sa signalom boje DAPI, koja boja jezgru, stoga je ekspresija oba proteina primarno u jezgri, ali vidljiv je i slabiji citoplazmatski signal (Slika 23).



Slika 23. Lokalizacija ekspresija proteina GLI1 i S100A7 u stanicama stanične linije A375 slikane pod tri različita filtera u istom vidnom polju za dvije kombinacije sekundarnog protutijela označenih različitim fluoroforima: A) GLI1-zeleno i S100A7-crveno te B) GLI1-crveni i S100A7-zeleno. Skala predstavlja duljinu od 25 µm.

Usporedila sam i lokalizacije ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u staničnoj liniji HaCaT. U obje kombinacije protutijela crveni i zeleni signal se preklapaju sa signalom boje DAPI, pa kao i kod stanične linije A375, ekspresija je većim dijelom u jezgri, ali prisutan je i slabiji citoplazmatski signal (Slika 24).



Slika 24. Lokalizacija ekspresija proteina GLI1 i S100A7 u stanicama stanične linije HACAT slikane pod tri različita filtera u istom vidnom polju za dvije kombinacije sekundarnog protutijela označenih različitim fluoroforima: A) GLI1-zeleno i S100A7-crveno te B) GLI1-crveni i S100A7-zeleno. Skala predstavlja duljinu od 25 μm .

5. Rasprava

Prva istraživanja signalnog puta Hedgehog utvrdila su njegovu važnost u embrionalnom razvoju i održavanju homeostaze tkiva. Osim uloge u regeneraciji i održavanju matičnih stanica, otkrivena je pojačana aktivnost puta i u nekoliko tipova tumora. Neki od prvih tumora za koje je utvrđeno da imaju aktivan put Hedgehog bili su karcinom bazalnih stanica i meduloblastom (Gupta i sur. 2010). Otkriće aberantne aktivacije ovog puta kod melanoma, jednog od najagresivnijih oblika tumora, značilo je i potencijalno proširenje spektra mogućnosti liječenja. Različite komponente puta postale su nove potencijalne mete razvoja novih terapija. Među njima se nalazi i transkripcijski faktor GLI. Kod čovjeka je pronađeno tri gena *GLI*, među kojima je i *GLI1*. Daljnja istraživanja dovela su do saznanja o ulozi proteina *GLI1* u inicijaciji melanoma, održavanju matičnih stanica raka, kao i u uključenost u posljednje faze karcinogeneze; invaziji i metastaziranju (Faião-Flores i sur. 2017). Upravo melanom svoj agresivni fenotip može zahvaliti visokoj sposobnosti invadiranja okolnog tkiva i širenju u druge dijelove tijela. U klinici, patohistološke karakteristike melanoma važne su u određivanje točne dijagnoze i pouzdanoj procjeni prognoze. Prognostički parametri uključuju određivanje debljine tumora, broj mitozu, regresiju, prisutnost ulceracija te zastupljenost pigmentofaga, mononukleara i TIL-ova. U novije vrijeme u određivanju prognoze i pripisivanju terapije veliku važnost dobivaju genetička testiranja i imunohistokemijske analize (Filosa i Filosa 2018).

U izradi ovog diplomskog rada najprije sam statistički obradila podatke dobivene histopatološkim pregledom prereza melanoma. Pri utvrđivanju stadija melanoma uzima se u obzir i stadij po Clarku i Breslowu pa ova dva parametra pokazuju jasnu korelaciju. Porastom stadija raste i veličina melanoma i broj mitozu po mm² pa ove dvije karakteristike predstavljaju važne prognostičke markere. Analizirala sam i odnos između stadija melanoma i razvoja melanoma iz postojećih nevusa te postojanja ulceracija. Osobe ranije primjećuju maligne promjene kod postojećih nevusa, zbog čega se takvi melanomi otkrivaju u ranijim stadijima. Ako je melanom nastao *de novo* većina ljudi će promjene na koži pripisivati nastanku novih, benignih nevusa, koji zapravo to nisu, i takvi se melanomi dijagnosticiraju u kasnijim stadijima. Ekspanzivne aktivnosti melanoma mogu dovesti do potpunog razaranja epitela koja prekriva melanom što se naziva ulceracija. Ulceracije nastaju kao posljedica brze diobe stanica koje naglo povećavaju tumorsku masu te promjene krvne opskrbe zbog začepljenja tumorskih krvnih žila trombom ili mikrometastazama. Prisutnost ulceracija dobar je prognostički marker; tumori koji ulceriraju imaju lošiju prognozu pa melanom višeg stadija ima veću vjerojatnost nastanka ulceracija (Mascaro i sur. 1984). Melanom je kroz brojne interakcije u bliskoj vezi sa različitim

komponentama u mikrookolišu, među kojima su i stanice imunološkog sustava. Prisutnost TIL-ova upućuje na napredovanje melanoma i može postati jedan od važnih kliničkih biomarkera (Falcone i sur. 2020). Rezultati imunohistokemijske analize potvrdili su da se povećanjem stadija tumora povećava broj TIL-ova, a broj pigmentofaga pada. Ovo govori u prilog važnosti imunološke modulacije u razvoju melanoma koji spada u jedan od najimunogeničnijih tumora. Važan doprinos razvoju melanoma ima i epitel koja okružuje tumor. Aberantna aktivacija signalnog puta Hedgehog mogla bi biti važan pokazatelj utjecaja okolnog epitela u karcinogenezi. Istraživanja u staničnim linijama melanoma pokazala su uključenost signalnog puta Hedgehog u izbjegavanju stanične senescencije, čime se potiče inicijacija melanoma. Senescencija je terminalni zastoj proliferacije stanica čiji je okidač stres, a predstavlja barijeru prema tumorigenezi. Utišavanjem gena *GLI1* stanice melanoma su bile usmjerene u senescenciju (Stecca i sur. 2007). Povećana ekspresija *GLI1* u TIS i T1 stadijima u epitelu iznad tumora kao i u rubnom epitelu govori u prilog važnosti *GLI1* u tumorskoj transformaciji melanocita i u skladu je s gore navedenim istraživanjem Stecca i sur. U stadijima T2 i T3 dolazi do smanjenja obojenja proteina *GLI1*, a porast je ponovno prisutan u stadiju T4 kada su prisutne i metastaze. Povećana ekspresija *GLI1* u ovom stadiju može biti vezana uz aktivnost *MMP2* i *MMP9* koje su odgovorne za invazivni fenotip melanoma i metastaziranje (Faião-Flores i sur. 2017).

Tijekom prošlog stoljeća istraživanja malignog melanoma utvrdila su aberantnu ekspresiju obitelji proteina *S100* kod malignog melanoma. Primjerice, 1980. utvrđena je povišena ekspresija *S100B* u kožnom melanoma nakon čega se isti počeo koristiti u praćenju liječenja metastatskog melanoma kemoterapijom i imunoterapijom (Hauschild i sur. 1999). Drugi član obitelji, protein *S100A7*, detektiran je i u urinu pacijenata s melanomom zbog čega bi se potencijalno mogao koristiti kao neinvazivni biomarker (Brouard i sur. 2002). Međutim, podataka o ekspresiji *S100A7* u melanomima gotovo nema u literaturi, ali je zato izrazito povezan sa psorijazom, karcinomom bazalnih stanica kože i karcinomom pločastih stanica kože (Moubayed i sur. 2007). Rezultati ove imunohistokemijske analize pokazuju da ekspresija proteina *S100A7* raste u epitelu iznad tumora i u rubnom epitelu porastom stadija melanoma. Usporedbom ekspresije *GLI1* i njegove mete, proteina *S100A7*, u epitelu iznad tumora uočena je njihova povezanost; porastom ekspresije proteina *GLI1* raste i ekspresija *S100A7*. Ovaj trend primijećen je i u rubnom epitelu. To dodatno potvrđuje prethodne rezultate Kurtović i sur. (2022), koji su identificirali *S100A7* kao transkripcijsku metu proteina *GLI1* u panelu staničnih linija melanoma (Kurtović i sur. 2022.).

Istraživanja na različitim tipovima tumora pokazala su razlike u Hedgehog signalizaciji između zdravog i tumorskog tkiva. Usporedbom aktivacije puta kod raka prostate i zdravog tkiva prostate pronađena je promjena u mehanizmu signalizacije puta koja je odgovorna za nastanak raka (Tzelepi i sur. 2011). Također, imunohistokemijski obojani prerezi tkiva melanoma kostiju imaju povećanu ekspresiju komponenti puta u odnosu na normalno tkivo kože (Shamsoon i sur. 2023). U ovom radu bojanje GLI1 i S100A7 nije bilo prisutno u zdravoj koži, što je u skladu s rezultatima Shamsoon i sur. (2023).

Rezultati imunofluorescencije pokazali su da razlika u ekspresiji GLI1 i S100A7 postoji između zdravog tkiva i melanoma u modelu *in vitro*. Stanične linije HaCaT i A375 transfecirane su plazmidom koji kodira za protein GLI1, nakon čega je praćeno dolazi li do povećanja intenziteta S100A7 u tim stanicama. U staničnoj liniji melanoma A375 dolazi do pojačanja ekspresije proteina S100A7 odnosu na netransfecirane stanice, što se također slaže s rezultatima Kurtović i sur. To nije slučaj u modelu zdravog tkiva, staničnoj liniji HaCaT, gdje je ekspresija S100A7 već jaka i bez transfekcije proteina GLI1. Takav podatak poznat je i iz literature, Martinsson i sur. pokazali su da stanična linija HaCaT može eksprimirati visoke razine S100A7 u uvjetima s povišenim razinama izvanstaničnog Ca^{2+} , te pri višoj konfluentnosti (Martinsson i sur. 2005). Moguće je da zbog navedenih čimbenika transfekcija GLI1 nije dodatno utjecala na povišenje ekspresije S100A7 u keratinocitima. Ekspresije GLI1 i S100A7 preklapaju se i u najvećem dijelu detektiraju se u jezgri, ali dio signala postoji i u citoplazmi. Ovi rezultati dobiveni su i za staničnu liniju A375 i HaCaT pa nema razlike u lokalizaciji ekspresije ova dva proteina između tkiva melanoma i zdravog tkiva.

Razlike u Hedgehog signalizaciji između tumorskog i zdravog tkiva slaba su točka maligne bolesti i imaju dobar potencijal za razvoj terapija. Trenutno se u liječenju karcinoma bazalnih stanica i akutne mijeloidne leukemije upotrebljava nekoliko antagonista signalnog puta Hedgehog, a trenutno je u fazi istraživanja i upotreba antagonista i u liječenju raka dojke, prostate, debelog crijeva, metastatskog raka gušterače i nekoliko drugih solidnih tumora (Niyaz i sur. 2019). Daljnja istraživanja signalnog puta Hedgehog kod melanoma trebaju se usmjeriti na pronalazak novih meta i lijekova koje bi potencijalno povećale preživljenje pacijenata i zaustavilo progresiju ove iznimno agresivne maligne bolesti.

6. Zaključak istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati povezanost ekspresije proteina GLI1 i S100A7 u uzorcima melanoma pacijenata te u staničnim linijama melanoma i keratinocita kože. Analizom patohistoloških karakteristika uzoraka melanoma pacijenata željeli smo provjeriti postoji li povezanost ekspresije proteina GLI1 i S100A7 s navedenim karakteristikama.

Zaključci ovog diplomskog rada su sljedeći:

- a) Sa stadijem melanoma rastu i patohistološke karakteristike kao što su stadij po Breslowu i Clarku, veličina melanoma, broj mitozu po mm², prisutnost pigmentofaga, limfocita koji infiltriraju tumor i ulceracija.
- b) Bojanje GLI1 i S100A7 češće se detektira u epitelu koji okružuje tumor nego u samoj tumorskoj masi, te lokalizira u istim strukturama.
- c) Porastom stadija melanoma raste ekspresija proteina GLI1 i S100A7 u epitelu koji okružuje melanom.
- d) Intenziteti bojanja GLI1 i S100A7 međusobno su povezani u epitelu koji okružuje melanom.
- e) Ekspresija proteina S100A7 raste u ovisnosti o ekspresiji proteina GLI1 u staničnom modelu melanoma. U modelu keratinocita kože statistički značajan porast ekspresija proteina S100A7 u ovisnosti o ekspresiji proteina GLI1 nije detektiran.
- f) U oba stanična modela lokalizacija ekspresija oba proteina se preklapa i primarno je ograničena na jezgru uz slabiji citoplazmatski signal.

Na temelju sve prikazanog, kao i prethodnih istraživanja, možemo zaključiti da je ekspresija GLI1 i S100A7 povezana u uzorcima melanoma pacijenata, da bojanje oba proteina lokalizira u iste strukture te je povezano sa stadijem bolesti. U *in vitro* modelu melanomskih stanica, ekspresija S100A7 regulirana je proteinom GLI1. Sve ovo govori u prilog hipotezi da je S100A7 transkripcijska meta proteina GLI1.

7. Literatura

- Abdo J. M., Sopko N. A., Milner S.M. (2020): The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. **Wound Medicine** 28: 100179.
- Akbani R., Akdemir K. C., Aksoy B. A., Albert M., Ally A., Amin S. B., i sur. (2015): Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell** 161: 1681–1696.
- Bermudez O., Hennen E., Koch I., Lindner M., Eickelberg O. (2013): Gli1 Mediates Lung Cancer Cell Proliferation and Sonic Hedgehog-Dependent Mesenchymal Cell Activation. **PLoS One** 8: e63226.
- Bliss J. M., Ford D., Swerdlow A. J., Armstrong B. K., Cristofolini M., Elwood J. M., i sur. (1995): Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: Systematic overview of 10 case-control studies. **International Journal of Cancer** 62: 367–376.
- Bora-Singhal N., Perumal D., Nguyen J., Chellappan S. (2015): Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. **Neoplasia** 17: 538–551.
- Brechbiel J., Miller-Moslin K., Adjei A. A. (2014): Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer. **Cancer Treatment Reviews** 40: 750–759.
- Brennan D., Chen X., Cheng L., Mahoney M., Riobo N. A. (2012): Noncanonical Hedgehog Signaling. **Vitamines and Hormones** 88: 55–72.
- Breslow A., Washington G. (1970): Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of Surgery** 172: 902-908.
- Brouard M. C., Saurat J-H., Ghanem G., Siegenthaler G. (2002): Urinary excretion of epidermal-type fatty acid-binding protein and S100A7 protein in patients with cutaneous melanoma. **Melanoma Research** 12: 627–631.
- Burgard B., Schöpe J., Holzschuh I., Schiekofer C., Reichrath S., Stefan W., i sur. (2018): Solarium Use and Risk for Malignant Melanoma: Meta-analysis and Evidence-based Medicine Systematic Review. **Anticancer Research** 38: 1187–1199.
- Carballo G. B., Honorato J. R., Lopes G. P. F. de, Spohr T. C. L. de S. (2018): A highlight on Sonic hedgehog pathway. **Cell Communication and Signaling** 16: 11.
- Carpenter R. L., Paw I., Zhu H., Sirkisoon S., Xing F., Watabe K., i sur. (2015): The gain-of-function GLI1 transcription factor TGLI1 enhances expression of VEGF-C and TEM7 to promote glioblastoma angiogenesis. **Oncotarget** 6: 22653–22665.

- Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A., Tymińska A. (2013): Skin melanocytes: biology and development. **Advances in Dermatology and Allergology** 1: 30–41.
- Clark W. H., From L., Bernardino E. A., Mihm M. C. (1969): The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research** 29: 705–727.
- D’Orazio J., Jarrett S., Amaro-Ortiz A., Scott T. (2013): UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences** 14: 12222–12248.
- Damjanov I. Seiwrth S., Jukić S., Nola M. (2023). Novotvorevine. U: Kos M., Batelja Vuletić L., Cindrić M. (ur.) Patologija. Zagreb, Medicinska naklada, str. 151-187.
- Damsky W. E., Bosenberg M. (2017): Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. **Oncogene** 36: 5771–5792.
- Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., i sur. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 417: 949–954.
- Donato R. (2003): Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique** 60: 540–551.
- Dong Son E., Kim H-J., Han Kim K., Ho Bin B., Bae I-H, Lim K-M, i sur. (2016): S100A7 (psoriasin) inhibits human epidermal differentiation by enhanced IL-6 secretion through IjB/NF-jB signalling. **Experimental Dermatology** 25: 636–641.
- Eserdağ S. (2023): Skin Histology and Physiology. Aesthetic and Functional Female Genital Surgery. Edinburgh, Springer, Cham str. 45-54.
- Faião-Flores F., Alves-Fernandes D. K., Pennacchi P. C., Sandri S., Vicente A. L. S. A., Scapulatempo-Neto C., i sur. (2017): Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. **Oncogene** 36: 1849–1861.
- Falcone I., Conciatori F., Bazzichetto C., Ferretti G., Cognetti F., Ciuffreda L., i sur. (2020): Tumor Microenvironment: Implications in Melanoma Resistance to Targeted Therapy and Immunotherapy. **Cancers (Basel)** 12: 2870.
- Fan L., Pepicelli C. V., Dibble C. C., Catbagan W., Zarycki J. L., Laciak R., i sur. (2004): Hedgehog Signaling Promotes Prostate Xenograft Tumor Growth. **Endocrinology** 145: 3961–3970.
- Fan Q., He M., Sheng T., Zhang X., Sinha M., Luxon B., i sur. (2010): Requirement of TGFβ Signaling for SMO-mediated Carcinogenesis. **Journal of Biological Chemistry** 285: 36570–36576.
- Filosa A., Filosa G. (2018): Melanoma Diagnosis: The Importance of Histopathological

- Report. **Dermatopathology** 5: 41–43.
- Gilbert S. F. (2000): The Cell Death Pathways. Developmental Biology. Sunderland, Sinauer Associates.
- Groves I., Placzek M., Fletcher A. G. (2020). Of mitogens and morphogens: modelling Sonic Hedgehog mechanisms in vertebrate development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 375: 20190660.
- Gupta S., Takebe N., Lorusso P. (2010): Targeting the Hedgehog pathway in cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology** 2: 237–250.
- Hanahan D. (2022): Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery** 12: 31–46.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000): The Hallmarks of Cancer. **Cell** 100: 57–70.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell** 144: 646–674.
- Hauschild A., Engel G., Brenner W., Gläser R., Mönig H., Henze H., i sur. (1999): Predictive value of serum S100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/or immunotherapy. **British Journal of Dermatology** 140: 1065–1071.
- Henze G., Dummer R., Joiler-Jemelka H. I., Böni R., Burg G. (1997): Serum S100 – A Marker for Disease Monitoring in Metastatic Melanoma. **Dermatology** 194: 208–212.
- Ho Wei L., Arastoo M., Georgiou I., Manning D. R., Riobo-Del Galdo N. A. (2018): Activation of the Gi protein-RHOA axis by non-canonical Hedgehog signaling is independent of primary cilia. **PLoS One** 13: e0203170.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020., Bilten 45, Zagreb, 2022.
- Hu M. C., Mo R., Bhella S., Wilson C. W., Chuang P-T., Hui C., i sur. (2006): GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. **Developmental Cell Biology** 133: 569–578.
- Hui C., Angers S. (2011). Gli Proteins in Development and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 27: 513–537.
- Jiang J., Hui C. (2008). Hedgehog Signaling in Development and Cancer. **Developmental Cell** 15: 801–812.
- Kinzler K. W., Bigner S. H., Bigner D. D., Trent J. M., Law M. L., O'Brien S. J., i sur. (1987): Identification of an Amplified, Highly Expressed Gene in a Human Glioma. **Science** 236: 70–73.
- Kinzler K. W., Vogelstein B. (1990): The GLI Gene Encodes a Nuclear Protein Which Binds

- Specific Sequences in the Human Genome. **Molecular and Cellular Biology** 10: 634–642.
- Kurtović M., Piteša N., Bartoniček N., Ozretić P., Musani V., Čonkaš J., i sur. (2022): RNA-seq and CHIP-seq Identification of Unique and Overlapping Targets of GLI Transcription Factors in Melanoma Cell Lines. **Cancers (Basel)** 14: 4540.
- Lawton S. (2019): Skin 1: The structures and the functions of the skin. **Nursing Times** 10: 30-33
- Louro I. D., Bailey E. C., Li X., South L. S., McKie-Bell P. R., Yoder B. K., i sur. (2002): Comparative gene expression profile analysis of GLI and c-MYC in an epithelial model of malignant transformation. **Cancer Research** 62: 5867–73.
- Madamsetty V. S., Paul M. K., Mukherjee A., Mukherjee S. (2020): Functionalization of Nanomaterials and Their Application in Melanoma Cancer Theranostics. **ACS Biomaterials Science and Engineering** 6: 167–181.
- Martinsson H., Yhr M., Enerbäck C. (2005): Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. **Experimental Dermatology** 14: 161–168.
- Mascaro J. M., Castro J., Castel T., Lecha M., Gratacos R., Mascaro J. M. (1984): Why do melanomas ulcerate? **Journal of Cutaneous Pathology** 11: 269–273.
- Matthews N. H., Li W-Q., Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E (2017): Epidemiology of Melanoma. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, Brisbane.
- Melanoma Research Alliance. Breslow Depth and Clark Level.
<https://www.curemelanoma.org/about-melanoma/melanoma-staging/breslow-depth-and-clark-level> (pristupljeno 16. 1. 2024.)
- Merchant A., Joseph G., Wang Q., Brennan S., Matsui W. (2010): Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSCs and myeloid progenitors. **Blood** 115: 2391–2396.
- Meyer J. E., Harder J., Sipos B., Maune S., Klöppel G., Bartels J., i sur. (2008): Psoriasin (S100A7) is a principal antimicrobial peptide of the human tongue. **Mucosal Immunology** 1: 239–243.
- Mischke D., Korge B.P., Marenholz I., Volz A., Ziegler A. (1996): Genes Encoding Structural Proteins of Epidermal Cornification and S100 Calcium-Binding Proteins Form a Gene Complex (“Epidermal Differentiation Complex”) on Human Chromosome 1q21. **Journal of Investigative Dermatology** 106: 989–992.
- MoleMap (2023) What you should know about different melanoma types?

- <https://www.molemap.co.nz/melanoma/types> (pristupljeno 16. 1. 2024.)
- Motzny C. K., Holmgren R. (1995): The Drosophila cubitus interruptus protein and its role in the wingless and hedgehog signal transduction pathways. **Mechanisms of Development** 52: 137–150.
- Moubayed N., Weichenthal M., Harder J., Wandel E., Sticherling M., Gläser R. (2007): Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** 133: 253–261.
- Muñoz-Couselo E., Zamora Adelantado E., Ortiz Vélez C., Soberino-García J., Perez-Garcia J. M. (2017): NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. **OncoTargets and Therapy** 10: 3941–3947.
- Murone M., Rosenthal A., Sauvage F. J. de (1999): Hedgehog Signal Transduction: From Flies to Vertebrates. **Experimental Cell Research** 253: 25–33.
- Niyaz M., Khan M. S., Mudassar S. (2019): Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. **Translational Oncology** 12: 1334–1344.
- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. (1980): Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. **Nature** 287: 795–801.
- Pandolfi S., Montagnani V., Penachioni J. Y., Vinci M. C., Olivito B., Borgognoni L., i sur. (2013): WIP1 phosphatase modulates the Hedgehog signaling by enhancing GLI1 function. **Oncogene** 32: 4737–4747.
- Pietrobono S., Gagliardi S., Stecca B. (2019): Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. **Frontiers in Genetics** 10: 556.
- Plotnikova O. V., Golemis E. A., Pugacheva E. N. (2008): Cell Cycle-Dependent Ciliogenesis and Cancer. **Cancer Research** 68: 2058–2061.
- Rastrelli M., Tropea S., Rossi C. R., Alaibac M. (2014): Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo** 28: 1005–11.
- Regl G., Kasper M., Schnidar H., Eichberger T., Neill G. W., Philpott M. P., i sur. (2004): Activation of the BCL2 Promoter in Response to Hedgehog/GLI Signal Transduction Is Predominantly Mediated by GLI2. **Cancer Research** 64: 7724–7731.
- Robbins D. J., Fei D. L., Riobo N. A. (2012): The Hedgehog Signal Transduction Network. **Science Signalling** 5(246): re6.
- Robinson N. A., Lopic S., Welter J. F., Eckert R. L. (1997): S100A11, S100A10, Annexin I, Desmosomal Proteins, Small Proline-rich Proteins, Plasminogen Activator Inhibitor-2, and Involucrin Are Components of the Cornified Envelope of Cultured Human

- Epidermal Keratinocytes. **Journal of Biological Chemistry** 272: 12035–12046.
- Rosen R. D., Sapra A. (2023). TNM Classification. StatPearls Publishing, Saint Petersburg.
- Ruppert J. M., Kinzler K. W., Wong A. J., Bigner S. H., Kao F-T., Law M. L., i sur. (1988): The GLI-Kruppel Family of Human Genes. **Molecular and Cellular Biology** 8: 3104–3113.
- Sabol M., Trnski D., Musani V., Ozretić P., Levanat S. (2018): Role of GLI Transcription Factors in Pathogenesis and Their Potential as New Therapeutic Targets. **Interantional Journal of Molecular Sciences** 19: 2562.
- Sabol M., Trnski D., Uzarevic Z., Ozretic P., Musani V., Rafaj M., i sur. (2014): Combination of Cyclopamine and Tamoxifen Promotes Survival and Migration of MCF-7 Breast Cancer Cells – Interaction of Hedgehog-Gli and Estrogen Receptor Signaling Pathways. **PLoS One** 9: e114510.
- Sarasin A. (1999): The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** 428: 5–10.
- Sasaki H., Nishizaki Y., Hui C., Nakafuku M., Kondoh H. (1999): Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. **Development** 126: 3915–3924.
- Shamsoon K., Hiraki D., Yoshida K., Takabatake K., Takebe H., Yokozeki K., i sur. (2023): The Role of Hedgehog Signaling in the Melanoma Tumor Bone Microenvironment. **Internationa Journal of Molecular Sciences** 24 (10): 8862.
- Singh B. N., Koyano-Nakagawa N., Gong W., Moskowitz I. P., Weaver C. V., Braunlin E., i sur. (2018): A conserved HH-Gli1-Mycn network regulates heart regeneration from newt to human. **Nature Communications** 9: 4237.
- Stecca B., Mas C., Clement V., Zbinden M., Correa R., Piguet V., i sur. (2007): Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. **Proceedings of the National Academy of Science** 104: 5895–5900.
- Teixido C., Castillo P., Martinez-Vila C., Arance A., Alos L. (2021): Molecular Markers and Targets in Melanoma. **Cells** 10: 2320.
- Trnski D., Sabol M., Tomić S., Štefanac I., Mrčela M., Musani V., i sur. (2021): SHH-N non-canonically sustains androgen receptor activity in androgen-independent prostate cancer cells. **Scientific Reports** 11: 14880.
- Tzelepi V., Karlou M., Wen S., Hoang A., Logothetis C., Troncoso P., i sur. (2011):

- Expression of hedgehog pathway components in prostate carcinoma microenvironment: shifting the balance towards autocrine signalling. **Histopathology** 58: 1037–1047.
- White E., Kirkpatrick C. S., Lee J. A. H. (1994). Case-Control Study of Malignant Melanoma in Washington State. **American Journal of Epidemiology** 139: 857–868.
- Williams G. H., Stoeber K. (2012): The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology** 226: 352–364.
- Wolf R., Ruzicka T., Yuspa S. H. (2011): Novel S100A7 (psoriasin)/S100A15 (koebnerisin) subfamily: highly homologous but distinct in regulation and function. **Amino Acids** 41: 789–796.
- Xiong T., Pan F., Li D. (2019): Expression and clinical significance of S100 family genes in patients with melanoma. **Melanoma Research** 29: 23–29.
- Yousef H., Alhadj M., Sharma S. (2023): Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls Publishing, Saint Petersburg.
- Yu F-Y., Hong Y-Y., Qu J-F., Chen F., Li T-J. (2014): The large intracellular loop of ptch1 mediates the non-canonical Hedgehog pathway through cyclin B1 in nevoid basal cell carcinoma syndrome. **International Journal of Molecular Medicine** 34: 507–512.

8. Životopis

Rođena sam u Osijeku 29.11.1998. godine. Pohađala sam Osnovnu školu Višnjevac te Isusovačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Osijeku u kojima sam prolazila s odličnim uspjehom. Sudjelovala sam na mnogim županijskim natjecanjima na kojima sam bila vrlo uspješna, a tijekom srednjoškolskog obrazovanja plasirala sam se i na državna natjecanja iz geografije i biologije. Zajedno sa suigračicama druge i prve ekipe ŽOK Osijek sudjelovala sam na brojnim odbojkaškim natjecanjima gdje smo bile iznimno uspješne, od čega bih istaknula 2. mjesto na državnom natjecanju u juniorskoj i kadetskoj konkurenciji te 2. mjesto u hrvatskom odbojkaškom kupu Snježane Ušić. Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisujem 2017. godine gdje prolazim s odličnim uspjehom i nalazim se među 10 % najboljih studenata u svojoj generaciji. Preddiplomski sveučilišni studij završavam 2020. godine kada sam stekla akademski status sveučilišne prvostupnice molekularne biologije, gdje sam pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlić obranila završni rad pod nazivom *Metabolizam tumora*. 2020. godine upisujem Diplomski studij molekularne biologije na PMF-u te paralelno i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija obavljala sam stručne prakse u tvrtki Genos, jednoj od vodećih znanstvenih institucija za analizu glikana, pod mentorstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca te na katedri za Medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Frane Paića. Tijekom svog akademskog obrazovanja sudjelovala sam na manifestaciji Noć biologije u sklopu radionice „Genska terapija (od ideje do terapije)“, online tečaju pod nazivom PROMISE („*Personalized Medicine Inquiry-Based Education*“) te na 6. konferenciji Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR-6). Kao aktivan sudionik ZIMS-a („*Zagreb International Medical Summit*“) 2021. godine osvajam treću nagradu za najbolju usmenu prezentaciju sa radom pod nazivom *Expression of SFRP family members in primary, luminal, HER2-positive, and triple-negative breast cancer cases by in silico analysis of RNA-sequencing and promoter DNA methylation data*. Na zadnjoj godini diplomskog studija dobila sam priliku izraditi diplomski rad na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak gdje sam se upoznala sa radom u staničnoj kulturi, metodama imunohistokemije, imunofluorescencije i westernske metode otiska. Voljela bih da moj daljnji put bude usmjeren u znanstvenom i kliničkom području onkologije i medicinske genetike.