

# Uloga proteina DNER u epitelno-mezenhimskoj tranziciji ljudskih stanica tumora jajnika otpornih na karboplatinu

---

Gjirlić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:147900>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Dora Gjirlić

**Uloga proteina DNER u epitelno-  
mezenhimskoj tranziciji ljudskih  
stanica tumora jajnika otpornih na  
karboplatinu**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Anamarije Brozović, i predan je na ocjenjivanje Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Just because it's over doesn't mean it's really over*

*And if I think it over, maybe you'll be comin' over again*

*And I'll have to get over you all over again*

Katy Perry. Tekst pjesme "Never Really Over". KP5, 2019, [genius.com/Katy-perry-never-really-over-lyrics](https://genius.com/Katy-perry-never-really-over-lyrics)

Zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, Andreji, Davoru, Dragomiri, Ivani, Kseniji, Marini, Nikolini. Bili su odlični i uvijek spremni pomoći. I urnebesni naravno.

Zahvaljujem suvoditeljici izv. prof. dr. sc. Maji Matulić na izvanrednom strpljenju i dobroj volji. Količinu dobre volje koju ste pokazali teško se može nadmašiti. Usporediva je jedino s onom voditeljice.

Najljepša i najveća hvala voditeljici i mentorici dr. sc. Anamariji Brozović čije vodstvo i savjeti su mi pomogli, i nastavljat će pomagati, u oblikovanju ideje znanstvenice kakvom želim postati. Bez Vas ne bih imala priliku toliko toga naučiti, niti spoznati čemu se želim usmjeriti.

Naposlijetku, i s posebnim žarom moram zahvaliti Juranu i Margareti. Za sve. Legendarni ste. Zaista. Nema tih riječi. Mogla bih početi nadahnuto pisati, ali mislim da ste se dovoljno mog teksta načitali.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Uloga proteina DNER u epitelno-mezenhimskej tranziciji ljudskih stanica tumora jajnika otpornih na karboplatinu**

Dora Gjirlić  
Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Serozni tumor jajnika najsmrtonosniji je od svih ginekoloških karcinoma. Poodmakli stadij bolesti i razvoj otpornosti na terapiju glavni su razlog neuspješnosti terapije. U potrazi za zajedničkim biljegom odgovornim za regulaciju molekularnih mehanizama otpornosti na lijek te pojave epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT), u preliminarnom istraživanju provedena je analiza genske ekspresije u roditeljskoj liniji stanica tumora jajnika MES-OV i liniji stanica otpornoj na karboplatinu (CBP) MES-OV 8CBP metodom *microarray*. Nakon provedene bioinformatičke analize utvrđeno je da je ekspresija gena *DNER*, koji kodira za protein DNER, netipični aktivator signalnog puta Notch, bila značajno povećana u MES-OV 8CBP u odnosu na roditeljsku liniju stanica. Ovim radom istražena je moguća uloga DNER u otpornosti OVCAR-3 7CBP GFP stanica na CBP i u EMT. Pokazano je da je linija stanica OVCAR-3 7CBP GFP 2-3 puta otpornija na CBP u odnosu na roditeljsku liniju stanica OVCAR-3 GFP te da ima povećanu ekspresiju biljega mezenhimskeg fenotipa, i smanjenu ekspresiju biljega epitelne fenotipa. Metodom RT-qPCR potvrđena je povećana ekspresija *DNER* u liniji stanica MES-OV 8CBP u odnosu na roditeljsku liniju te u dodatne dvije linije stanica raka jajnika otpornih na CBP, OVCAR-3 7CBP GFP i SK-OV-3 6CBP, u odnosu na njihove odgovarajuće roditeljske linije stanica. Važnost *DNER* u odgovoru stanica na CBP uočena je nakon kratkotrajnog izlaganja OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP kliničkoj dozi CBP kada je povećana ekspresija *DNER* izmjerena kod otporne linije stanica. Zbog nedostatka specifičnog anti-DNER protutijela nije bilo moguće utvrditi konstitutivnu ekspresiju proteina DNER i postići zadane ciljeve.

(45 stranica, 13 slika, 6 tablica, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika; hrvatski)

Ključne riječi: progresija tumora, otpornost na kemoterapeutik, signalni put, utišavanje

Voditeljica rada: dr. sc. Anamaria Brozović, viša znanstvena suradnica

Suvoditeljica rada: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.; dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.; dr. sc. Duje Lisičić, doc.

Zamjena: dr. sc. Silvija Černi, doc.

Rad prihvaćen: 18.09.2019

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

### **Role of DNER protein in carboplatin induced epithelial-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells**

Dora Gjirlić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Serous ovarian tumour is the deadliest of all gynaecologic carcinomas. The advanced stage of the disease and the development of drug resistance are main reasons for unsuccessful therapy. While searching for a common marker(s) responsible for regulating molecular mechanisms of drug resistance and the occurrence of epithelial-mesenchymal transition (EMT), gene expression analysis of ovarian tumour cell lines, parental MES-OV and carboplatin (CBP) resistant MES-OV 8CBP by microarray assay was performed previously as part of preliminary research. Among others, the increased expression of gene *DNER* that encodes DNER protein, an alternative activator of Notch signalling pathway, was found. This work sought to determine whether DNER plays a role in the CBP resistance of OVCAR-3 7CBP GFP cells and in the development of a mesenchymal-like phenotype. The OVCAR-3 7CBP GFP cell line has been shown to be 2-3 times more resistant to CBP than the parent OVCAR-3 GFP cell line and has increased expression of mesenchymal-like phenotype and decreased expression of the epithelial-like phenotype markers. The RT-qPCR method confirmed the result of preliminary studies on increased *DNER* expression in the MES-OV 8CBP cell line relative to the parent cells, as well as in two additional human ovarian cancer cell lines resistant to CBP, OVCAR-3 7CBP GFP and SK-OV-3 6CBP. The importance of *DNER* in response to CBP was observed after short-term exposure of OVCAR-3 GFP and OVCAR-3 7CBP GFP to a clinical dose of CBP when *DNER* expression was increased only in the resistant cell line. At the moment the lack of specific anti-DNER antibody has made it impossible to determine the constitutive expression of DNER protein in experimental cell model and to achieved the set goals.

(45 pages, 13 figures, 6 tables, 40 references, original in: Croatian)

Key words: tumour progression, chemoresistance, signal path, silencing

Supervisor: Dr. Anamaria Brozović, Senior Research Associate

Assistant supervisor: Dr. Maja Matulić, Associate Professor

Reviewers: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.; Dr. Nada Oršolić, Full Prof.; Dr.  
Duje Lisičić, Assoc. Prof.

Replacement: Dr. Silvija Černi, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 18.09.2019.

## Sadržaj rada

1. Uvod .....	1
1.1. Tumori .....	1
1.2. Tumor jajnika .....	1
1.2.1. Liječenje tumora jajnika .....	2
1.2.1.1. Kemoterapija tumora jajnika .....	3
1.2.1.2. Otpornost na karboplatinu .....	4
1.3. Epitelno-mezenhimska tranzicija .....	5
1.3.1. Molekularni mehanizam EMT .....	7
1.3.1.1. Karakterizacija genske ekspresije stanica koje prolaze kroz EMT .....	9
1.4. Protein DNER .....	10
1.4.1. Signalni put Notch .....	11
1.4.2. Uloga proteina DNER u tumorskoj bolesti .....	12
2. Ciljevi istraživanja .....	14
3. Materijali i metode .....	15
3.1. Materijali .....	15
3.1.1. Stanične linije .....	15
3.1.2. Kemikalije .....	15
3.1.3. Protutijela .....	18
3.1.4. Male interferirajuće RNA (siRNA) .....	18
3.2. Metode .....	18
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi .....	18
3.2.2. Utišavanje gena prolaznom transfekcijom malim interferirajućim RNA .....	20
3.2.3. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu .....	21
3.2.4. Western blot .....	23
3.2.5. Mjerenje sposobnosti stanica da stvaraju kolonije .....	25
3.2.6. Statistička analiza .....	25
4. Rezultati .....	26
4.1. Roditeljska stanična linija OVCAR-3 GFP pokazuje slabije preživljenje od OVCAR-3 7CBP GFP nakon tretmana karboplatinom .....	26
4.2. Stanična linija OVCAR-3 7CBP GFP pokazuje mezenhimski fenotip u odnosu na epitelni fenotip roditeljske linije OVCAR-3 GFP .....	27
4.3. Ekspresija DNER je povećana u sve tri linije stanica otporne na karboplatinu .....	29
4.4. Količina DNER nakon tretmana stanica OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP s karboplatinom je različita .....	30
4.5. Određivanje djelatne koncentracije siDNER u stanicama OVCAR-3 7CBP GFP .....	31
4.6. Utišavanje DNER ne utječe na sposobnost stanica OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP da stvaraju kolonije .....	33
5. Rasprava .....	35
6. Zaključci .....	40
7. Literatura .....	41
8. Životopis .....	45

# 1. Uvod

## 1.1. Tumori

Neoplazme ili novotvorine su nenormalne nakupine stanica koje nastaju uslijed poremećaja signalnih puteva uključenih u regulaciju rasta i diobe stanice. Rast neoplazme opisan je procesom neoplazije, a populacija stanica koja nastaje tijekom tog procesa je heterogena populacija klonova proizašla iz jedne, izvorne stanice (Knigavko *i sur*, 2018; Waldum *i sur*, 2008). U kliničkoj praksi se neoplazme nazivaju tumorima te je njihova podjela vrlo kompleksna i temelji se na porijeklu tkiva u odnosu na organ, histološkom porijeklu tkiva te prema stupnju raširenosti tumora. U novije vrijeme provodi se i dodatna raščlamba temeljena na prisutnosti molekulskih biljega koji su dokazano jedinstveni za pojedini podtip tumora (Maley *i sur*, 2017). Raščlamba na temelju porijekla tkiva obično uzima u obzir osobine najviše diferenciranih stanica prisutnih u tumoru (Waldum *i sur*, 2008). Zbog velikog diobenog potencijala, epitelna tkiva mjesta su nastanka više od 80% tumora. Tumori epitelnog porijekla nazivaju se karcinomi i u većini slučajeva, napretkom tumorske bolesti, razvijuju maligni obrazac ponašanja (Ye i Weinberg, 2015). Stanice malignih tumora se u određenom trenutku počnu krvožilnim i/ili limfnim sustavom širiti po organizmu i stvarati sekundarne tumore – metastaze (Iwatsuki *i sur*, 2010; Thiery *i sur*, 2009). Istovremeno se stvara tumorski mikrookoliš i prilagođava djelovanjem tumora kao niša u kojoj raste. Unutar tumorskog mikrookoliša karakteristična je pojava hipoksije i nekroze zbog intenzivnog metabolizma tumorskih stanica, angiogeneze te imunološke mimikrije, što zahtijeva poseban liječnički pristup kako bi se tumor lakše i uspješnije izliječio (Coleman *i sur*, 2013).

## 1.2. Tumor jajnika

Maligni tumor jajnika je ginekološki tumor epitelnog porijekla koji se najčešće otkriva u kasnoj fazi kada se tumorska masa nalazi proširena uglavnom po intraperitonealnom prostoru. Iako se tumori jajnika prema mjestu nastanka označavaju jednim zajedničkim imenom, oni se zapravo histološki razlikuju te su podijeljeni prema tipu stanica (serozni, mucinozni, tumor bistrh stanica i endometrijski) i prema niskom ili visokom stupnju diferencijacije. Međutim, istu kliničku sliku kao tumori jajnika mogu imati tumori različitog mjesta nastanka, primjerice



tumor jajovoda ili primarni tumor peritoneuma. Neki tumori jajnika i dojke, posebno slabije diferencirani oblici, dijele čak međusobno više karakteristika nego manje i više diferencirani oblici istog tumora. Stoga, uzimajući u obzir sve navedeno i činjenicu da se tumor jajnika otkriva dosta kasno, postavlja se pitanje je li tumor koji se razvija zaista istovjetan primarnom tumoru jajnika i razvija li se iz promijenjenih stanica jajnika, ili se u jajniku razvijaju metastaze porijeklom iz udaljenog primarnog tumora. Heterogenost tumora jajnika očituje se različitim histološkim obilježjima tumorskog tkiva, ali i različitim aktivnim staničnim putevima koji vode proliferaciji i invaziji. Nadalje, danas je već prihvaćeno mišljenje da tumor jajnika zapravo nastaje u jajovodu te se iz njega širi (Coleman *i sur*, 2013).

Serozni karcinom jajnika je najčešći oblik malignog tumora jajnika, no obuhvaća primarne tumore različitih karakteristika, ovisno o vrsti signalnih puteva aktivnih u promijenjenim stanicama tumora. Svaki podtip tumora jajnika ima posebne molekularne obrasce i pokazuje različito kliničko ponašanje (Coleman *i sur*, 2013). Iako je karakteristika svakog tumora jajnika da tijekom nastanka i razvoja nakuplja jedinstven obrazac mutacija, postoje određene mutacije koje su neophodne za napredovanje tumorigeneze, a uključuju inaktivaciju tumor supresorskih gena i aktivaciju protoonkogeni. Ove mutacije unose poremećaje u regulaciju staničnog ciklusa, apoptoze, popravka genoma, diferencijacije te proliferacije (Coleman *i sur*, 2013).

### **1.2.1. Liječenje tumora jajnika**

Liječenje tumora jajnika temelji se na nekoliko različitih pristupa koji uključuju kirurško odstranjivanje tumora, adjuvantnu kemoterapiju, neoadjuvantnu kemoterapiju te terapiju održavanjem tumora (Coleman *i sur*, 2013; Maley *i sur*, 2017). Nakon što se tumor jajnika dijagnosticira, često u uznapredovalom stadiju, pristupa se kirurškom odstranjivanju tumorske mase ili citoredukciji (Coleman *i sur*, 2013). U postoperativnom periodu osobi se daje adjuvantna kemoterapija. Adjuvantna i neoadjuvantna kemoterapija tumora jajnika uključuju smjesu kemoterapeutika, često spoja na bazi platine i spoja iz skupine taksana. U zadnje vrijeme se koristi i pristup neoadjuvantne kemoterapije koja uključuje primjenu kemoterapije s ciljem smanjivanja tumora, nakon čega se razmatra kirurško uklanjanje. Međutim, u novije vrijeme sve više pažnje pridaje se tumorskom mikrookolišu, pa se uz dva navedena kemoterapeutika počinje dodavati i protutijelo anti-VEGF, bevacizumab. Ovo protutijelo veže se za VEGF kojeg luče stanice tumora i tumorskog mikrookoliša te se tako sprječava angiogeneza, a samim time

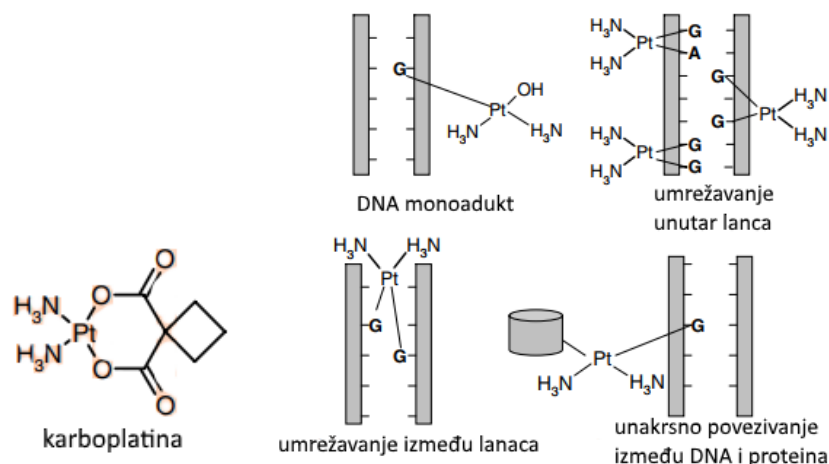
ograničava i dotok hranjivih tvari i kisika u tumor (Coleman *i sur*, 2013; Johnson *i sur*, 2004). Terapija održavanjem tumora obećavajuća je strategija zadržavanja tumorske mase u određenom razvojnom stadiju te može slijediti neoadjuvantnu kemoterapiju ili biti primarna strategija liječenja. Održavanjem tumora u istoj fazi razvoja sprječava se pojava simptoma bolesti. Veoma često se ovom rješenju pristupa u slučaju povratka bolesti (relapsa) (Coleman *i sur*, 2013).

### 1.2.1.1. Kemoterapija tumora jajnika

Karboplatina (CBP) i paklitaksel su kemoterapeutici koji se rutinski koriste u kombinaciji u svrhu liječenja tumora jajnika (Coleman *i sur*, 2013). Karboplatina ( $C_6H_{12}N_2O_4Pt$ ) se uz ostale kemoterapeutike na bazi platine koristi u liječenju mnogih tumora (Rabik i Dolan, 2007). Zbog činjenice da joj metalnu jezgru čini platina, karboplatina se svrstava u antineoplastičke lijekove uz cisplatinu i oksaliplatinu (Johnstone *i sur*, 2015; Rabik i Dolan, 2007). Radi se o planarnom spoju čiji je atom platine s oksidacijskim brojem II (Johnstone *i sur*, 2015) kompleksiran s dvije amino skupine i dikarboksil-ciklobutanskim ostatkom. Spoj se aktivira unutarstanično i elektrofilno napada dušične baze stvarajući kovalentne veze (Johnstone *i sur*, 2015; Ojima *i sur*, 2016). Paklitaksel ( $C_{47}H_{51}NO_{14}$ ) je spoj izoliran iz pacifičke tise (*Taxus brevifolia* Nutt.) i najvažniji mehanizam djelovanja mu je vezanje za  $\alpha$ - $\beta$  tubulinski dimer i onemogućavanje depolimerizacije mikrotubula, čime se zaustavlja stanična dioba (Ojima *i sur*, 2016).

Spojevi na bazi platine su biološki aktivni te se nakon ulaska u stanicu, zbog polarnosti, vežu na nukleofilne molekule, posebice dušikove baze nukleinskih kiselina. Vezanjem na nukleinske kiseline stvaraju lezije koje uključuju monoadukte, umrežavanje (eng. *crosslink*) unutar istog lanca DNA te umrežavanje između različitih lanaca iste DNA molekule (Slika 1). Najviše zastupljeni tipovi lezija su umreženja unutar istog lanca DNA. Posljedica vezanja karboplatine za molekulu DNA je savijanje molekule za  $32^\circ$ - $35^\circ$  prema velikom utoru uzvojnice i odvijanje uzvojnice za  $13^\circ$ , te izvrtanje citozina. Izvrnuti citozini pospješuju stvaranje veza između dvaju lanaca DNA molekule. Posljedica veze između lanaca DNA molekule je savijanje prema malom utoru i odvijanje uzvojnice do  $80^\circ$ . Umrežavanja unutar istog lanca molekule DNA prepoznaju proteini jake pokretljivosti HMG (eng. *high mobility group*) i vežu se za njih čineći osnovu citotoksičnog djelovanja karboplatine. Proteini HMG onemogućuju zaobilaženje

blokirane replikacijske vilice, onemogućuju transkripciju i sprječavaju popravak DNA molekule izrezivanjem nukleotida NER (eng. *nucleotide excision repair*). Ostali mehanizmi djelovanja karboplatine su izazivanje stresa djelovanjem na endoplazmatski retikulum (ER), te aktivacija signalnih kaskada. Svi mehanizmi u konačnici indirektno ili direktno preko čimbenika uzrokuju apoptozu i osnova su citotoksičnosti karboplatine (Brozovic *i sur*, 2013; Rabik i Dolan, 2007)



**Slika 1. Struktura karboplatine (lijevo) i njene lezije (desno).** Preuzeto i prilagođeno prema Johnstone *i sur*, 2015.

### 1.2.1.2. Otpornost na karboplatinu

Otpornost na karboplatinu se može razviti tijekom razvitka tumora ili češće tijekom i nakon terapije. U literaturi je do danas opisano nekoliko molekularnih mehanizama otpornosti stanica tumora na karboplatinu. Mehanizmi se mogu podijeliti na one odgovorne za reguliranje količine platine u stanici (smanjena akumulacija platine u stanicu zbog smanjenje ekspresije transmembranskih proteina, odnosno pumpe, za ubacivanje metala u stanicu ili zbog povećane ekspresije i/ili aktivnosti transmembranskih pumpi za izbacivanje ksenobiotika iz stanice), smanjene biodostupnost platine (povećana količina glutationa i/ili metalotioneina koji detoksificiraju platinu), povećan popravak DNA (promjenjene ekspresije proteina uključenih u različite mehanizme popravka DNA), te nedostatak aktivacije programirane smrti stanice. Promjena prometa kroz membranu podrazumijeva smanjen unos i povećano izbacivanje iz stanice. Osnova mehanizma je utišavanje pumpe transportera bakra Ctr1 (eng. *copper*

*transporter 1*) i pojačano ispoljavanje eksportera, Menkeovog proteina ATP7A (eng. *P-typeATPase 1*) i proteina Wilsonove bolesti ATP7B (eng. *P-typeATPase 2*) te pumpe MRP (eng. *multi-drug resistance protein*). Važnost pumpi za bakar je u tome što se karboplatina natječe s kationom bakra za vezno mjesto, a pumpa MRP nespecifično izbacuje strane biološki aktivne molekule iz stanice. Lijekovi na bazi platine svojim djelovanjem uzrokuju opsežni poremećaj regulacije ekspresije gena čime se potiče obrambeni odgovor stanice. Promjenom redoks statusa karboplatine djelovanjem antioksidansa glutationa (GSH) lijek gubi djelovanje, a poremećajem stanične signalizacije stanica usprkos djelovanju karboplatine ne ulazi u apoptozu. Oslanjane stanice na nevjerođostojni popravak DNA preko izrezivanja nukleotida NER (eng. *nucleotide excision repair*) i baza BER (eng. *base excision repair*) uzrokuje povećanje mutacija. Zbog opsežnosti obrambenog odgovora često se javlja unakrsna otpornost na druge antineoplastike u liječenju (Brozovic, 2017; Rabik i Dolan, 2007).

### **1.3. Epitelno-mezenhimska tranzicija**

Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) je evolucijski očuvan proces koji omogućuje razvojnu organizaciju organa i tkiva kroz embrionalno razdoblje počevši od gastrule, preko organizacije somita do potpuno organiziranog fetusa i obuhvaća sve promjene koje stanice epitela prolaze pri transformaciji u stanice mezenhima (Singh i Settlemann, 2010; Thiery *i sur*, 2009). EMT je značajna i u stvaranju ožiljkastog tkiva i tkivne degeneracije (fibroze). Ovaj proces podrazumijeva odlaganje kolagena oko stanica degenerirajućeg tkiva koje prolaze EMT i posljedične fibroze. EMT je neophodna i u zarastanju rana, gdje keratociti oko ozljede djelomično prolaze EMT i gube međustanične veze (Thiery *i sur*, 2009). Oblik EMT je uključen u invaziju i metastaziranje tumora pošto stanice koje poprime mezenhimske karakteristike migriraju (Brozovic, 2017).

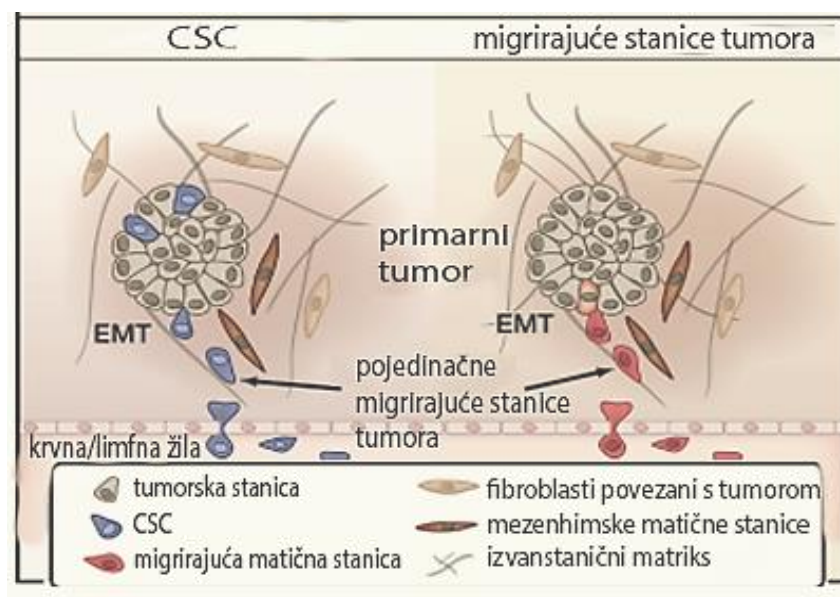
Niz promjena omogućuje epitelnim stanicama napuštanje izvorne tkivne organizacije karakteristične za epitel. Stanice epitela u pravilu su apikobazalno orijentirane i u čvrstom kontaktu sa susjednim stanicama pomoću nepropusnih i čvrstih spojeva te dezmosoma. Tako sačinjen stanični sloj održava međustaničnu komunikaciju pukotinastim spojevima i odvojen je bazalnom laminom od vezivnog tkiva na kojem leži. Ako se epitelna stanica mutacijama i promjenom ekspresije određenih gena potakne da uđe u EMT, ona izgubi neposredni kontakt sa susjednim stanicama i apikobazalnu polarnost te postaje vretenastog oblika sa sposobnošću

stvaranja filopodija uslijed preuredbe citoskeleta, posebice aktinskih vlakana (Iwatsuki *i sur*, 2010). Filopodiji stanici daju pokretljivost i omogućuju prodiranje u okolno tkivo, čineći tzv. invazivnu frontu (Thompson *i sur*, 2005). Stanica istovremeno izlučuje metaloproteinaze kojima razgrađuje međustanični matriks i na taj način prolazi kroz njega (Thiery *i sur*, 2009). Fenotipska posljedica je da polarizirane, nepokretne stanice epitela prelaze u fibroblastoidni, pokretni oblik svojstven tkivu mezenhima ili strome (Huber *i sur*, 2005; Thiery *i sur*, 2009).

Promjena fenotipa tumorske stanice iz epitelnog u mezenhimski veoma je slična normalnom fiziološkom procesu EMT u embrionalnom razdoblju i uslijed tkivne traume (Ye *i sur*, 2010). Tumor epitelnog porijekla (karcinom) u kasnom razvojnog stadiju razvija metastaze, a proces koji mu to omogućava podrazumijeva promjene sastava proteina unutar stanica primarnog tumora, njihovu migraciju te invaziju u okolna tkiva (Slika 2). Drugim riječima, stanice tumora prvo prolaze epitelno-mezenhimsku tranziciju kako bi stekle migratorno-invazivna svojstva, a zatim mezenhimsko-epitelnu tranziciju kako bi smještanjem u okolnom tkivu stvorile novo tkivo, metastazu. Veliki selektivni pritisak koji kemoterapeutici ostvaruju na stanice tumora tijekom tretmana zahtijevaju njihovu ubranu prilagodbu kako bi preživjele. Prilagodba se očituje kao pozitivna selekcija stanica koje nose mutacije povoljne za preživljenje. Pokazano je da tumorske stanice koje zaostaju nakon kemoterapije imaju u nekim slučajevima mezenhimski fenotip (Iwatsuki *i sur*, 2010; Tsai i Yang, 2013).

Proces EMT karakterizira gubitak ili smanjenje ekspresije ključnog proteina epitela, E-kadherina, te ispoljavanje karakterističnih proteina mezenhima; vimentina, fibronektina i N-kadherina (Iwatsuki *i sur*, 2010). Stanice mezenhimskog fenotipa sporije se dijele i imaju veću otpornost na apoptozu. Promijenjene mezenhimske stanice tijekom terapije izbjegnu sudbinu promijenjenih epitelnih stanica jer su zaustavljanje stanice u diobi i izazivanje apoptoze česti cilj djelovanja kemoterapeutika (Thiery *i sur*, 2009). Tumorske stanice mogu se u uznapredovalom stadiju razvitka tumora izdvojiti iz primarne tumorske mase, te prodrijeti kroz tkivo i kroz žilu u krvotok ili limfotok, što im omogućavaju karakteristike mezenhima nakon što su prošle EMT. Takve stanice zapnu i vežu se za endotel žile u području guste kapilarne mreže, prolaze kroz stijenku žile u okolno tkivo i čine začetak metastaza (Tsai i Yang, 2013). Metastaze mogu, ali i ne moraju biti promijenjene mezenhimske stanice, jer je pokazano da začeci metastaza mogu biti stanice koje nisu prošle EMT (Fischer *i sur*, 2015; Iwatsuki *i sur*, 2010; Thiery *i sur*, 2009).

Metastaze stvaraju stanice koje moraju biti sposobne iznova uspostaviti tumor, obnovljati se i diferencirati u različite podtipove tumorskih stanica (Iwatsuki *i sur*, 2010; Ye *i sur*, 2010). Tumorske stanice koje dijele ove karakteristike zovu se matične stanice tumora, CSC (eng. *cancer stem cells*) (Slika 2). Osim metastatskih stanica, one su prisutne u tumorskoj masi i odgovorne za održavanje populacije tumorskih stanica. Velika kompeticija tumorskih stanica za hranjive tvari stvara hipoksično okruženje koje pospješuje transformaciju stanica u tumorske matične stanice (Iwatsuki *i sur*, 2010). Bitna karakteristika tumorskih matičnih stanica jest da su to stanice koje imaju sposobnost prolaska kroz EMT i zadržavaju spektar karakteristika epitelnih i mezenhimskih stanica (Ye *i sur*, 2010).



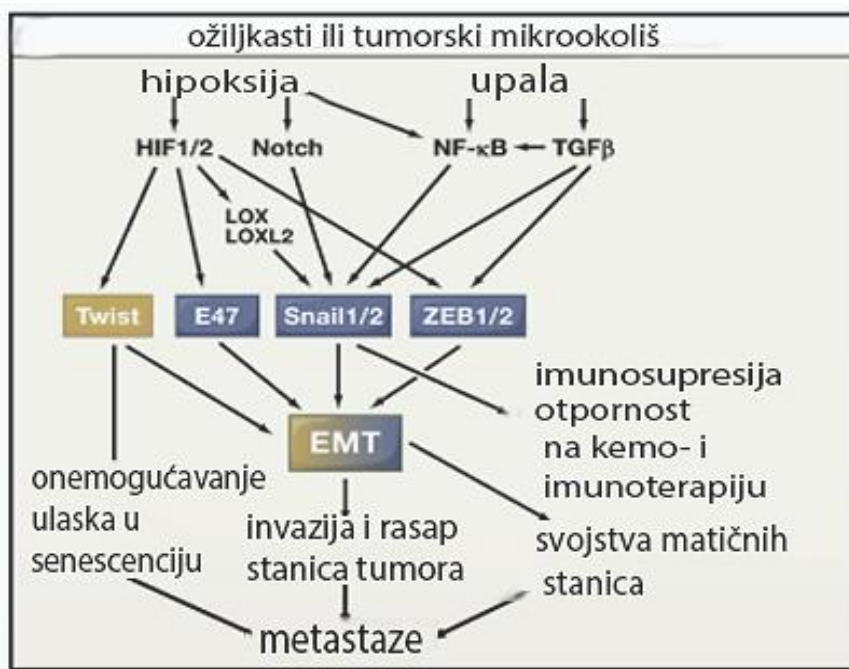
**Slika 2. EMT je povezana s matičnošću i metastaziranjem.** Preuzeto i prilagođeno prema Thiery *i sur*, 2009.

### 1.3.1. Molekularni mehanizam EMT

U tijek i regulaciju EMT uključeni su različiti signalni putevi koji konvergiraju u nekoliko ključnih točaka. Najbitniji događaj je gubitak ispoljavanja E-kadherina (*CDH1*) utišavanjem promotora *CDH1*. Utišavanje može biti posljedica somatske mutacije, hipermetilacije promotora, deacetilacije histona, ali najčešće je posljedica utišavanja specifičnim transkripcijskim faktorom (Huber *i sur*, 2005). Odgovorni transkripcijski faktori su induktori EMT i svrstavaju se u dvije skupine od kojih se jedna veže na promotor i izravno utišava ispoljavanje E-kadherina vezanjem na *E-box*-eve promotora, dok drugi dio faktora

neizravno utišava prepisivanje E-kadherina preko posrednika. Najpoznatiji faktori prve skupine su Snail, ZEB i Slug, a druge Twist, Gooseoid, E2.2 i FoxC2 (Huber *i sur*, 2005; Thiery *i sur*, 2009).

Transkripcijski faktori Snail daleko su najznačajniji i svojim vezanjem na promotor uz pomoćne faktore potiču preuredbu strukture kromatina i započinju utišavanje *CDH1*-a uz ZEB1, dok Slug i ZEB2 održavaju utišano stanje (Iwatsuki *i sur*, 2010; Thiery *i sur*, 2009). Od faktora koji neizravno utišavaju *CDH1* važno je spomenuti Twist koji utječe na citoplazmatsko smještanje E-kadherina i održavanje utišanog stanja. Između ostalog, Snail i ZEB utječu na gubitak apikobazalne polarnosti epitelne stanice i potiču lučenje metaloproteinaza u izvanstanični matriks, Snail i Twist onemogućavaju apoptozu, dok faktori Twist i ZEB sprječavaju stanicu da uđe u senescenciju. Na ovaj način EMT je u tumora povezana s otpornošću na kemoterapiju (Thiery *i sur*, 2009). Isti faktori nisu bitni u rastu primarnog tumora, ali snažno potiču metastatsku transformaciju (Huber *i sur*, 2005). Utvrđeno je kako stanice ulaskom u EMT počnu ispoljavati totipotentne transkripcijske faktore Oct-4 i Nanog. Navedeni faktori su znak da su u stanicama aktivni putevi karakteristični za matične stanice te se zaključuje da stanice prije dediferencijacije u tumorske matične stanice ulaze u EMT (Thiery *i sur*, 2009). Transkripcijski faktori krajnja su posljedica međudjelovanja mreže signalnih puteva uključenih u EMT. Superporodica TGF- $\beta$  i razni faktori rasta započinju signalne kaskade Ras-MAPK i PI3K/AKT te signalne puteve Wnt/B-*katenin*, Notch, NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B, Jak/STAT i Sonichedgehog/Gli. Navedeni signalni putevi i faktori koji ih okidaju čine zamršenu mrežu međudjelovanja koja konvergira u zajedničkoj točki, regulaciji transkripcijskih faktora E-kadherina i odgovorni su za provedbu EMT. Putevi Notch, Sonichedgehog, Jak/STAT i Wnt normalno su aktivni u matičnim stanicama, pa njihova ponovna aktivacija dovodi do dediferencijacije u promijenjenim stanicama tumora, kao i otpornosti na kemoterapeutike zbog gašenja mehanizama programirane stanične smrti. U procesu tumorske progresije ključne promjene koje dovode do aktivacije signalnih kaskada EMT uzrokovane su oblikovanjem tumorskog mikrookoliša, posebice uvjetima hipoksije i upale (Huber *i sur*, 2005; Thiery *i sur*, 2009) (Slika 3).



Slika 3. Signalni putevi uključeni u EMT. Preuzeto i prilagođeno iz Thiery *i sur*, 2009.

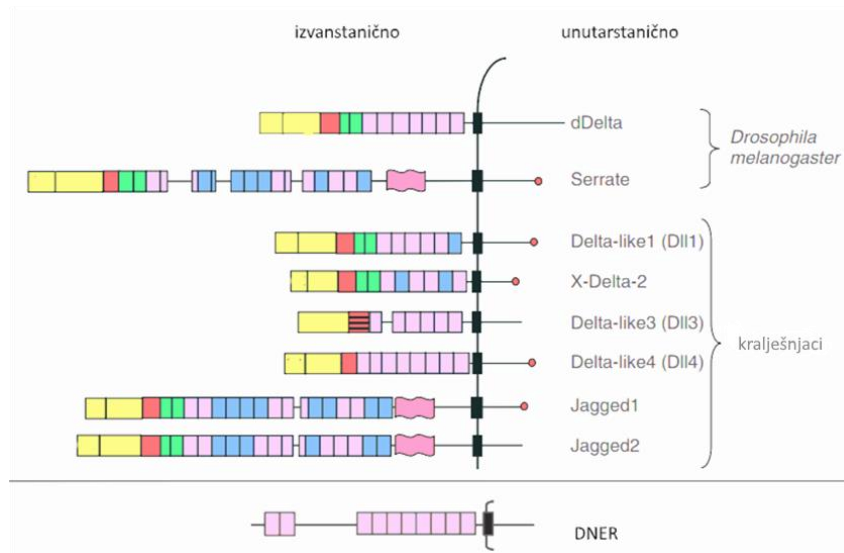
### 1.3.1.1. Karakterizacija genske ekspresije stanica koje prolaze kroz EMT

U laboratoriju dr. sc. Brozović provedena su preliminarna istraživanja usporedbe ekspresije gena između roditeljskih stanica tumora jajnika MES-OV i stanica otpornih na karboplatinu MES-OV CBP. Istraživanje je proveo mag. biol. mol. Juran Kralj u suradnji s laboratorijem prof. dr. Köhlera Svučilišta u Düsseldorfu. Otporna stanična linija MES-OV CBP razvijena je uzastopnim tretmanom rastućim koncentracijama karboplatine tijekom 72 h. Nakon svakog tretmana stanice su ostavljene u kulturi kako bi se oporavile. Dodatnim pokusima utvrđeno je da su osim otpornosti na karboplatinu, stanice MES-OV CBP unakrsno otporne na paklitaksel i ispoljavaju mezenhimske biljege. Pomoću metode RNA *microarray* uočene su razlike u količini prepisane mRNA velikog broja gena između roditeljske i otporne stanične linije MES-OV, koji su zatim filtrirani prema ulozi u otpornosti na kemoterapeutike i povezanošću s EMT. Kao jedan od faktora koji bi mogli biti uključeni u lijekom potaknutu EMT, iz rezultata *microarray*-ja i bioinformatičkih analiza izdvojio se protein DNER.



## 1.4. Protein DNER

Transmembranski receptor odnosno površinski ligand DNER (eng. *Delta/Notch-like EGF-related receptor*) protein je koji se veže za receptor NOTCH1 signalnog puta Notch i na taj način aktivira signalnu kaskadu. Strukturu izvanstaničnog dijela receptora DNER čine jedna transmembranska i jedna izvanstanična domena koja sadrži deset ponavljanja aminokiselinskog obrasca koji nalikuje na receptor epidermalnog faktora rasta EGFR (eng. *epidermal growth factor receptor*). Međutim, protein DNER se ubraja u netipične ligande receptora Notch puta budući da mu u izvanstaničnoj domeni nedostaje domena DSL koja se smatra neophodnom za vezanje za receptor. Iz tog razloga, iako je prihvaćeno da je DNER ligand puta Notch, nepobitan dokaz interakcije tek se treba pronaći (Greene *i sur*, 2016). Usporedbom strukture izvanstanične domene DNER-a s drugim proteinima utvrđeno je da najveći stupanj homologije dijeli s domenama proteina Delta i Serrate. Navedeni proteini su ligandi koji pokreću signalnu kaskadu puta Notch vezanjem za receptore NOTCH (Eiraku *i sur*, 2005; Hartman *i sur*, 2010) (Slika 4). DNER se normalno nalazi u membrani dendrita, some određenih vrsta neurona i glija stanica mozga u razvojnoj i odrasloj dobi (Du *i sur*, 2018; Eiraku *i sur*, 2002, 2005; Saito i Takeshima, 2006; Tohgo *i sur*, 2006).



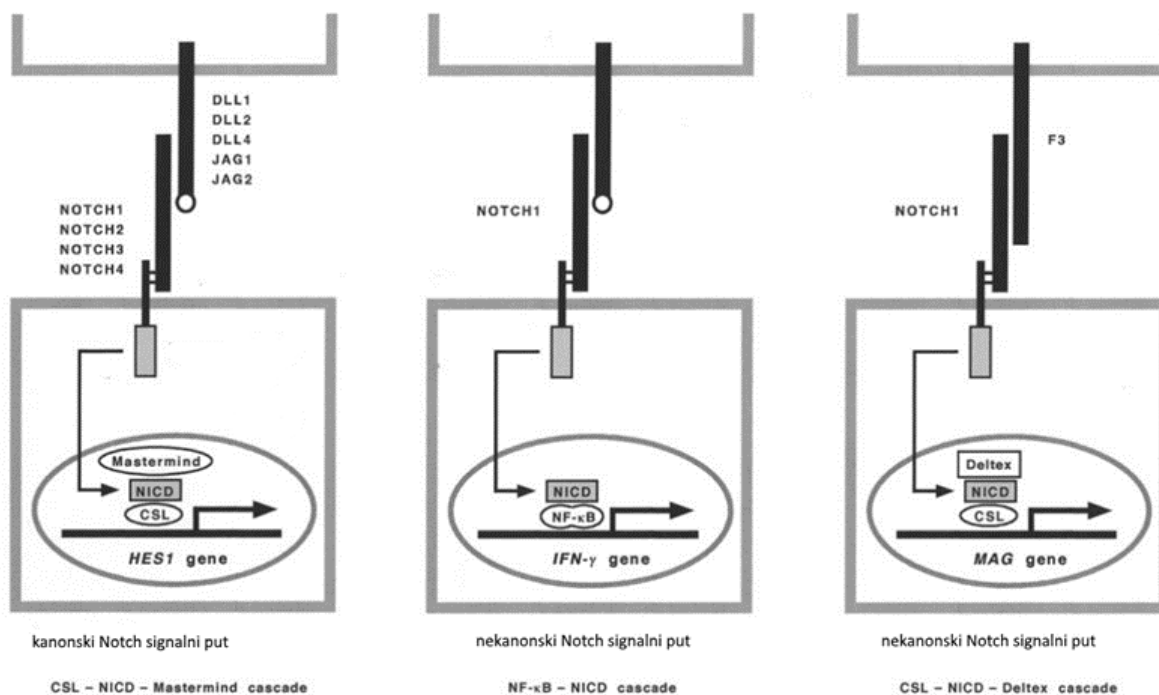
**Slika 4. Strukture kanonskih ligandata puta NOTCH te ligandata DNER.** Iznad crte prikazani su kanonski ligandi kod *Drosophila melanogaster* gdje su isprva otkriveni, te analozi u kralješnjaka; ispod crte je prikazan ligand DNER. Preuzeto i prilagođeno iz

D'Souza *i sur*, 2010.

### 1.4.1. Signalni put Notch

Notch je jedan od temeljnih signalnih puteva koji sačinjavaju signalnu mrežu matičnih stanica i potaknut je direktnom staničnom interakcijom (Katoh i Katoh, 2007; Saito i Takeshima, 2006). Signalna kaskada započinje vezanjem liganada, homologa proteina Delta, za izvanstaničnu domenu jednog iz obitelji transmembranskih heterodimernih receptora NOTCH (Katoh i Katoh, 2007). Vezanjem liganda za receptor potakne se cijepanje NOTCH-a  $\gamma$ -sekretazom i metaloproteinazom što rezultira otpuštanjem unutarstanične domene proteina Notch NICD (eng. *Notch intracellular domain*) u citoplazmu gdje ona dalje provodi signal. Postoje dva različita puta kojima signalizacija Notch može dalje teći - kanonski i nekanonski. U kanonskom putu se nakon proteolize receptora otpušta domena NICD koja ulazi u jezgru i veže za transkripcijski faktor CSL (eng. *CBF1/Supressor of Hairless/Lag1*) i aktivator transkripcije Mastermind te uz brojne regulatore transkripcije može održavati matičnost stanice sprječavanjem diferencijacije. U nekanonskom putu domena NICD se u jezgri veže se za faktor NF- $\kappa$ B i pospješuje njegovu aktivnost koja pretežno podrazumijeva upalnu reakciju. Navedeni kanonski i nekanonski put potaknuti su istim tipičnim ligandima puta Notch – homologima Delta, Delta-like (DLL) ili homologima Serrate, Jagged (JAG) koji sadrže zajedničku komponentu DSL (eng. *Delta/Serrate/Lag2*). Netipični ligandi puta Notch proteolizom NOTCH-a potiču nekanonski signalni put, gdje se pomoću NICD potiče prepisivanje tkivno specifičnih gena specifičnim transkripcijskim aktivatorom Deltex (Slika 5). Meta kompleksa je gen transkripcijskog faktora MAG, koji potiče diferencijaciju (Katoh i Katoh, 2007; Saito i Takeshima, 2006). Nekanonski put Notch stoga ima ulogu oprečnu onoj kanonskog signalnog puta.

Signalni put Notch je na primjeru leukemije i tumora dojke, gušterače, mozga, pluća, glave, vrata i jajnika pokazan kao jedan od važnijih signalnih puteva čija deregulacija potiče razvoj tumora. Točnije, u seroznom tumoru jajnika uočena je povezanost njegove aktivnosti s otpornošću na spojeve na bazi platine. Na staničnim linijama raka jajnika otpornim na kemoterapeutik, a koje su prošle EMT, u procesu razvitka otpornosti dokazana je povećana ekspresija gena faktora rasta *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST2* i *ZEB2*. Svaki od navedenih gena kodira za transkripcijske faktore u signalnom putu Notch. Utišavanjem ovih gena, stanična linija gubi neke karakteristike mezenhima i postaje osjetljivija na kemoterapeutik (Groeneweg *i sur*, 2014; Haslehurst *i sur*, 2012).



**Slika 5. Kanonski i nekanonski signalni putevi Notch aktivirani direktnim staničnim kontaktom.** Prva shema prikazuje interakciju kanonskih liganada s receptorima Notch, druge dvije sheme prikazuju vezanje nekanonskih liganada na receptor Notch1. Svaki navedeni put završava određenim kompleksom koji djeluje kao transkripcijski faktor. Preuzeto i prilagođeno iz Katoh i Katoh, 2007.

#### 1.4.2. Uloga proteina DNER u tumorskoj bolesti

DNER je netipičan ligand receptora Notch bez komponente DSL koji se veže za NOTCH1 direktnim staničnim kontaktom i potiče nekanonski signalni put posredovan proteinom Deltex ili kanonski signalni put posredovan proteinom CSL, što mu omogućuje tkivno specifično djelovanje (D'Souza *i sur*, 2008; Hartman *i sur*, 2010). Protein DNER ispoljen je u mnogim tumorima, gdje ovisno o aktivnom putu Notch ima različito djelovanje. Na primjeru glioblastoma, koji je prilično dediferenciran i sadrži velik udio tumorskih matičnih stanica, DNER uzrokuje diferencijaciju stanica preko nekanonskog Notch puta i proteina Deltex (Sun *i sur*, 2009), dok na primjeru tumora prostate DNER pokazuje promotivno djelovanje na progresiju tumora, gdje preuzima ulogu aktivatora kanonskog puta (Wang *i sur*, 2017). Postoje određene sumnje u vjerodostojnost dokaza da je DNER zaista ligand receptora

Notch, no njegova uloga u razvoju mozga i ispoljavanje u tumorskim tkivima ukazuje na uključenost u staničnoj signalizaciji koja regulira matičnost i EMT u tumorima (Greene *i sur*, 2016). Povezanost između DNER-a i otpornosti uočena je posredno na primjeru genske ekspresije stanica tumora jajnika MES-OV CBP u odnosu na staničnu liniju MES-OV koja nije prošla EMT, te postoje indikacije da je DNER uključen u uspostavu ili održavanje statusa EMT i preko toga na otpornost u tumoru jajnika. Postoji li uzorak ponavljanja i povezanost između zamijećene promjene razine ekspresije DNER i otpornosti na kemoterapeutik i kod drugih staničnih linija te ima li spomenuti protein ulogu u EMT, pitanja su na koja će se pokušati dati odgovor.

## 2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja ovog diplomskog rada jesu:

- (i) utvrditi ekspresiju gena *DNER* i proteina DNER u ljudskim stanicama tumora jajnika - roditeljskoj OVCAR-3 GFP i liniji stanica otpornoj na karboplatinu OVCAR-3 7CBP GFP.
- (ii) utvrditi moguću ulogu DNER u EMT, potaknutoj obradom stanica karboplatinom pomoću utišavanja ekspresije DNER u stanicama tumora jajnika, praćenjem njihovog preživljenja nakon tretmana karboplatinom te praćenjem ekspresije biljega EMT, E-kadherina i fibronektina.

## **3. Materijali i metode**

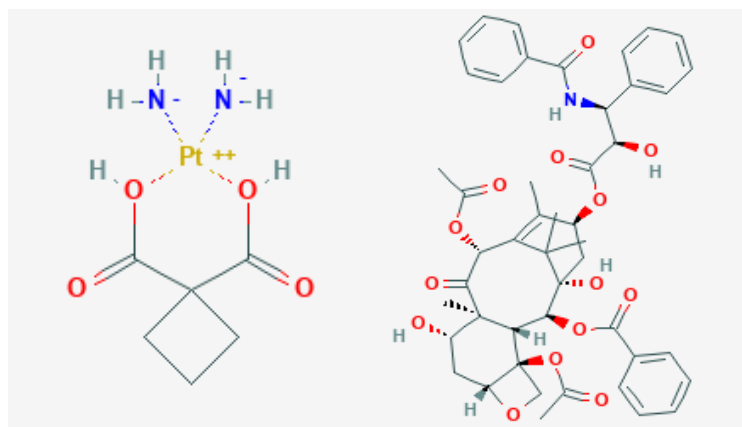
### **3.1. Materijali**

#### **3.1.1. Stanične linije**

Istraživanja na temelju kojih je napisan ovaj diplomski rad provedena su na staničnim linijama seroznog tumora jajnika; roditeljskim staničnim linijama OVCAR-3 GFP, MES-OV i SK-OV-3 i iz njih razvijenih staničnih linija otpornih na karboplatinu, OVCAR-3 7CBP GFP, MES-OV 8CBP i SK-OV-3 6CBP. Stanična linija OVCAR-3 GFP prethodno je opisana. Stanična linija MES-OV uspostavljena je u laboratoriju prof. Šikića, Sveučilišta Stanford iz ascitesa bolesnice sa seroznim tumorom jajnika (Moisan *i sur*, 2014). Linija stanica SK-OV-3 kupljena je od proizvođača American Type Culture Collection. Tri linije stanica otporne na karboplatinu razvila je dr. sc. Brozović opetovanim tretiranjem roditeljskih linija stanica s rastućim koncentracijama karboplatine tijekom 72 h. Nakon svakog tretmana stanice su ostavljene da se oporave. Sve linije stanica razvile su otpornost na kliničku dozu karboplatine te su stabilno otporne na lijek kroz veći broj generacija (neobjavljeni rezultati).

#### **3.1.2. Kemikalije**

U pokusima, u svrhu izrade ovog rada, korišteni su kemoterapeutici karboplatina (Sigma-Aldrich, SAD) i paklitaksel (Sigma-Aldrich, SAD). Ostale kemikalije i pribor upotrijebljeni u izradi rada navedeni su u tablicama 1, 2 i 3.



**Slika 6. Kemijska struktura karboplatine i paklitaksela.** Preuzeto s PubChem Database., 2019a, 2019b.

**Tablica 1. Kemikalije**

Naziv	Proizvođač
Akrilamid (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO)	Serva, Njemačka
Amonijev persulfat, APS ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Serva, Njemačka
DharmaFECT™1 transfekcijski reagens	Dharmacon, SAD
Fetalni goveđi serum	Invitrogen, SAD
McCoyjev 5A medij obogaćen L-glutaminom,s antibiotikom	Capricorn Scientific, Njemačka
McCoyjev 5A medij obogaćen L-glutaminom,bez antibiotika	Capricorn Scientific, Njemačka
N,N,N,N'-tetrametiletilediamin, TEMED (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Opti-MEM™ medij bez seruma	Thermo Fisher Scientific , UK
Proteinski marker Precision Plus Protein AllBlue Standards	Bio-Rad, SAD
Resazurin (alamarBlue™)	Bio-Rad, SAD
Tripsin-EDTA otopina 0,25%	Sigma-Aldrich, SAD
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Njemačka
Tween-20® (C <sub>56</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )	Sigma-Aldrich, SAD
Virocid 1%	Genera, Hrvatska
Western Lightning® Plus ECL Enhanced LuminolReagent Plus	PerkinElmer, SAD
Western Lightning® Plus ECL Oxidizing Reagent Plus	PerkinElmer, SAD

**Tablica 2. Uredaji i pomagala**

<b>Naziv</b>	<b>Proizvođač</b>
Mikroeprovete	Eppendorf, Njemačka
Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Sigma-Aldrich, Njemačka
Plastične eprovete (15 i 50 ml)	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj adherentnih stanica (6 i 96 bunarića)	Falcon Becton Dickinson, SAD
T-25 i T-75 bočice za uzgoj stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
ChemiDoc XRS+ (detektor)	Bio-Rad, SAD
Električna pipeta	Integra Biosciences, Švicarska
EV - 100 (vorteks)	Tehnica Železniki, Slovenija
EV – 102 (vorteks)	Tehnica Železniki, Slovenija
JB Nova (kupelj)	Grant, Engleska
KDG Zaštitni uređaj (digestor)	Klimaoprema, Hrvatska
Klimaoprema <i>custom</i> (kabinet za stanične kulture)	Klimaoprema, Hrvatska
Heraeus cell 150 (inkubator)	Thermo Electron Corporation, SAD
Heraeus Functionline Labofuge 400 (centrifuga)	Thermo Electron Corporation, SAD
Mini-PROTEAN® Tetra System (elektroforetska kadica)	Bio-Rad, SAD
NanoDrop™ (spektrofotometar)	Thermo Fisher Scientific, SAD
PowerPac™ Basic (izvor napona)	Bio-Rad, SAD
Infinite® 200 PRO (spektrofotometar)	Tecan, Švicarska
Mastercycler epigradient S (RT)	Eppendorf, Njemačka
7300 Real-Time PCR System (RT-qPCR)	Applied Biosystems, SAD
TransBlot Turbo (uređaj za suhi prijenos proteina na membranu)	Bio-Rad, SAD
Uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom (homogenizator)	Cole Palmer, SAD
Vibromix 301 EVT (tresilica)	Tehnica Železniki, Slovenija
Z2 Coulter® ParticleCountandSize Analyzer (automatski brojač i analizator stanica)	Beckman Coulter, SAD



### 3.1.3. Protutijela

Protutijela upotrijebljena u istraživačkim metodama navedena su u tablici 3.

**Tablica 3. Upotrijebljena protutijela**

	<b>Specifičnost</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Kataloški broj</b>
<b>Primarna protutijela</b>	ERK1 (K23) zečje poliklonalno	Santa Cruz Biotechnology (SAD)	sc-94
	DNER zečje poliklonalno	ThermoFisher Scientific (SAD)	PA5-43631
<b>Sekundarno protutijelo</b>	Protuzečje IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology (SAD)	sc-2370

### 3.1.4. Male interferirajuće RNA (siRNA)

U svrhu pokusa koristile su se sintetske siRNA ON-TARGETplus Non-targeting Pool (20 nmol, Cat#D-001810-10-20, Dharmacon, SAD) te siRNA ON-TARGETplus Human DNER (92737) siRNA-SMART pool (5 nmol, Cat#E-018708-00-0005, Dharmacon, SAD).

## 3.2. Metode

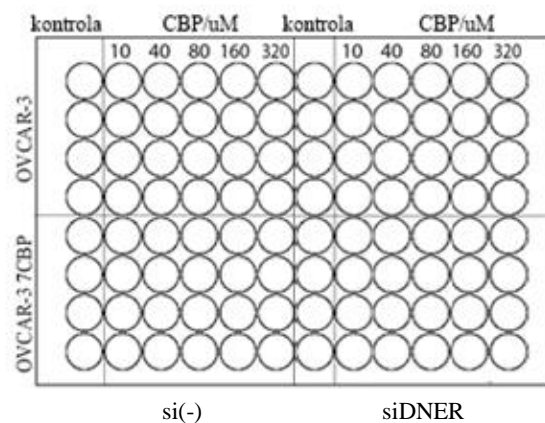
### 3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanične linije OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP su održavane u inkubatoru pri 37 °C, u atmosferi obogaćenoj s 5% CO<sub>2</sub> i kisikom, u hranjivom mediju McCoy s dodatkom antibiotika i 10 % goveđeg fetalnog seruma. Stanice su presađivane dva puta tjedno. Pri presađivanju stanice su tretirane tripsinom čijim djelovanjem se razgrađuju proteinske veze stanica s podlogom i susjednim stanicama te one plutaju u mediju čineći suspenziju. Suspenzija se razrijedila dodatkom svježeg medija kako bi se neutraliziralo djelovanje tripsina. Dio

stanične suspenzije ostavljen je u boci T-25/T-75 koja se nadopunila svježim medijem, a ostatak stanica je korišten za pokuse.

### 3.2.3. Test preživljenja stanica

U svrhu provjere osjetljivosti stanica na tretman karboplatinom korišten je test alamarBlue™. Testom se određuje preživljenje stanica mjerenjem metaboličke aktivnosti stanica, odnosno učinkovitosti djelovanja enzima mitohondrija, pri čemu se koristi indikatorska boja resazurin. Resazurin je svijetloplava boja slabe fluorescencije koju stanice mitohondrijskim, mikrosomskim i citosolnim oksidoreduktazama reduciraju u intenzivno fluorescentni ružičasti resorufin i dehidroresorufin (Anoopkumar-Dukie *i sur*, 2005). Mjerenjem fluorescencije valnih duljina karakterističnih za boju resorufin, dobije se kvantitativna mjera metaboličke aktivnosti koja se može interpretirati kao mjera preživljenja stanica i citotoksičnosti. Stanice OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP nasadene su na pločicu s 96 bunarića, 3000 stanica po bunariću (OVCAR-3 GFP) i 2500 stanica po bunariću (OVCAR-3 7CBP GFP) u volumenu 180  $\mu$ L po bunariću (Slika 7). Nakon 24 sata stanice su tretirane s po 20  $\mu$ L kemoterapeutika unaprijed pripremljenih koncentracija i ostavljene rasti u inkubatoru. U svrhu provjere osjetljivosti stanica na tretman kemoterapeutikom nakon utišavanja ekspresije proteina DNER transfekcijom sa siDNER, prikupljene stanice nasadene su na pločicu s 96 bunarića zajedno s kontrolama te obrađene na gore opisani način.



Slika 7. Shema pločice u testu preživljenja

Nakon 72 sata iz bunarića je izliven medij i dodano 110  $\mu$ L boje resazurina razrijeđene 10x McCoyjevim medijem s antibiotikom (konačna koncentracija 1x). Pločica s bojom inkubirana je 3,5 h pri 37 °C. Fluorescencija otopina iznad stanica mjerena je na čitaču pločica spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 590 nm. Iz krivulje preživljenja određena je koncentracija spoja pri kojoj preživljenje stanica iznosi 50 % ( $IC_{50}$ ).

### 3.2.2. Utišavanje gena prolaznom transfekcijom malim interferirajućim RNA

Transfekcija je provedena u pločicama sa 6 bunarića u koje su stanice dan prije pokusa nasadene u koncentracijama od 250 000 stanica/2ml (OVCAR-3 GFP) i 200 000 stanica/2ml (OVCAR-3 7CBP GFP), prije čega su izbrojane automatskim brojačem stanica. Za potrebe brojanja stanica izdvojeno je 50 ili 200  $\mu$ L volumena stanične suspenzije te je dodan volumen izotonske tekućine za brojanje stanica do 10 mL. Zbog specifičnog razrjeđenja i uzorkovanja aparata za brojanje, broj stanica je bio izračunat prema formuli  $N(st) = \text{razrjeđenje} \times 2 \times 50$ .

Stanice su 24 sata od nasadivanja tretirane sa siRNA ON-TARGETplus Non-targeting Pool (20 nmol), dalje u tekstu si(-) (negativna kontrola) te siRNA ON-TARGETplus Human DNER (9727) siRNA-SMART pool (5 nmol), dalje u tekstu siDNER, koja utiшава mRNA gena *DNER*. Konačna koncentracija siRNA u bunariću bila je 25 nmol/L, 50 nmol/L i 75 nmol/L. Tretman si(-) predstavlja negativnu kontrolu pokusa jer se navedena siRNA ne bi trebala vezati ni za jednu mRNA u ljudskoj stanici budući da sadrži sljedove mRNA karakteristične za oblića *Caenorhabditis elegans* Maupas.

Transfekcijski medij pripremljen je iz transfekcijskog reagensa (otopina B), siRNA (otopina A) i medija Opti-MEM prema protokolu proizvođača. Radne otopine siRNA pripravljene su u koncentraciji 5  $\mu$ mol/L prema protokolu za razrjeđivanje siRNA DharmaFECT iz liofilizata proizvođača, pa su se trebale razrijediti do konačne koncentracije od 25, 50 i 75 nmol/L po bunariću. U otopini A su se ciljne koncentracije siRNA pripremale dodajući 10, 20 i 30  $\mu$ L siRNA u Opti-MEM-u do konačnog volumena od 200  $\mu$ L, a otopina B od 5  $\mu$ L transfekcijskog reagensa DharmaFECT razrijeđenog 40x u Opti-MEM-u. Konačne koncentracije siRNA bile su 25 nmol/L, 50 nmol/L i 75 nmol/L. Nakon pripremljanja svaka se otopina inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi, zatim su promiješane i ostavljene stajati 20 min. Stanicama je uklonjen medij i uz 400  $\mu$ L transfekcijske otopine dodano 1600  $\mu$ L McCoyjevog medija bez antibiotika. Stanice su nakon određenog vremena sakupljene, isprane od medija u sterilnom fosfatnom

puferu (PBS, 0,2 g KCl/2,7 mmol/L; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/1,5mmol/L; 8,0 g NaCl/137 mmol/L; 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/8 mmol/L u 1000 ml deH<sub>2</sub>O), jednom u 3 mL i drugi put u 1 mL i izbrojane na brojaču stanica. Stanična suspenzija u PBS-u razdijeljena je za pripremu ekstrakata mRNA i proteina. Centrifugiranjem na brzini od 1100 okretaja u minuti (rpm) u trajanju od 10 min, suspenzija stanica se istaložila te je talog sačuvan i zamrznut na -80 °C (za izolaciju RNA), odnosno -20 °C (za izolaciju proteina).

### 3.2.3. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Količina prepisane mRNA gena od interesa određena je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real time – quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) iz cDNA dobivene reverznom transkripcijom stanične RNA. Ukupna RNA izolirana je iz stanica korištenjem kompleta *AllPrep DNA/RNA Mini Kit*<sup>®</sup> (Qiagen, SAD). Stanični talog suspendiran je u hladnom RLT puferu i centrifugiran u tubici s filterom. U profiltrirani supernatant dodan je 70%-tni etanol i do 700 µL suspenzije prebačeno je u tubice za sakupljanje RNA, nakon čega su uzorci centrifugirani. Filter koji zadržava nukleinske kiseline je zadržan i preko njega je nalijevan niz pufera kojima su uzorci isprani centrifugiranjem (RW1, dva puta RPE). Nakon svakog ispiranja profiltrirani supernatant je odbačen. U konačnici se RNA zadržana na filtru eluira vodom bez RNAza. Cijeli protokol je obavljen na ledu. Koncentracija izolirane RNA izmjerena je na uređaju NanoDrop<sup>™</sup>. Uređaj mjeri i omjere apsorbancija A260/280 i A260/230 pri čemu se procjenjuje čistoća RNA. Ukupna RNA je prepisana u cDNA korištenjem metode reverzne transkripcije pomoću kompleta *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*<sup>®</sup> (Thermo Scientific, SAD). Uzorci izolirane RNA su odmrznuti i cijelo vrijeme držani u hladnom bloku. Volumeni uzoraka u kojima je sadržan 1 µg RNA pomiješani su s 1 µL smjese nasumičnih heksamernih primera (eng. *Random Hexamer Primer*). Smjesa je nadopunjena do 12 µL vodom bez nukleaza. Uzorci su zatim inkubirani na 65 °C u trajanju od 5 min, te su vraćeni u hladni blok. Zatim je u svaki uzorak dodano 8 µL MasterMix-a sastavljenog od reakcijskog pufera koncentriranog 5x (eng. *5x Reaction Buffer*), inhibitora RNAza (eng. *RiboLock Rnase Inhibitor*), mješavine dNTP i reverzne transkriptaze (eng. *RevertAid M-MuLV RT*). Smjesa je u toplokružniku amplificirana prema programu u tablici 4.

**Tablica 4. Program reakcije RT**

korak	Aktivacija reverzne transkriptaze	Ciklus- 35x		
	/	Denaturacija	Prianjanje	Sinteza
Temperatura/°C	94	94	58	72
Vrijeme/min	3:00	0:30	0:30	0:45

Nakon sinteze, cDNA je korištena kao kalup za umnažanje DNA u reakciji RT-qPCR pomoću kompleta *PowerSYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD). Umnožena cDNA nanosena je na pločicu s 96 bunarića i razrijeđena deioniziranom vodom do 15x. Prije nanošenja na pločicu, pripravljena je MasterMix otopina koja je sadržavala interkalacijsku boju SYBRGreen koncentriranu 2x, DNA polimerazu, deoksiribonukleotide, pufer, dvovalentne ione ( $Mg^{2+}$ ). Na pločicu su nanoseni specifični setovi *forward* (fw) i *reverse* (re) početnica za prepoznavanje gena od interesa i *GAPDH*, konačne koncentracije 100 nmol/L po bunariću. U svaki bunarić je zatim ispipetirana pripravljena otopina te cDNA kalup. Na toplokružniku je program postavljen prema tablici 5.

**Tablica 5. Program reakcije RT-qPCR**

Korak	Aktivacija DNA polimeraze	Ciklus- 40x		Razdvajanje lanaca			
	/	Denaturacija	Prianjanje/sinteza*				
Temperatura/°C	95	95	60	95	60	95	60
Vrijeme/min	10:00	0:15	1:00	0:15	1:00	0:15	0:15

\* Boja SYBRGreen se detektira u fazi prianjanja/sinteze

U analizi je korištena relativna kvantifikacija genske ekspresije, a kao unutarnja kontrola (*housekeeping* ekspresija) korištena je ekspresija gena čija se ekspresija ne mijenja pod utjecajem tretmana. U ovom radu odabran je gen *GAPDH*. Količina prepisane mRNA gena od

interesa i *housekeeping* gena određena je u linearnoj fazi amplifikacije pomoću boje SYBRGreen koja nespecifično interkalira u dvolančanu DNA. Određivanjem broja ciklusa amplifikacije potrebnih da signal boje prijeđe prag detekcije ( $C_t$ ) procijenjena je količina genskog transkripta. Rezultati dobiveni za gen od interesa ( $C_{t_{cilj}}$ ) normalizirani su u odnosu na GAPDH ( $C_{t_{ref}}$ ), nakon čega je napravljena usporedba rezultata tretiranih stanica i kontrolnog uzorka:

$$\text{Relativna razina ekspresije} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{cilj}} - C_{t_{ref}})_{tret} - (C_{t_{cilj}} - C_{t_{ref}})_{kon}$$

Dobiveni koeficijent izražen je kao logaritam po bazi 2 kako bi grafički prikaz bio intuitivniji.

U amplifikacijsku krivulju u obzir je uzeta i disocijacijska krivulja kako se u obzir ne bi uzela amplifikacijska krivulja uslijed nespecifičnog vezanja boje SYBRGreen za dvolančanu DNA.

#### 3.2.4. Western blot

Proteini su izolirani iz suhog staničnog taloga. Talozni stanica odmrznuti su i pomiješani s puferom za uzorke (eng. *sample buffer*, SB, 2,5 ml Tris-HCl/1,5 mol/L, pH 6,8; 1,2 g SDS; 3 ml glicerol; 20 mg bromfenol-plavo; 1,2 ml 2-merkaptoetanol u 10 ml  $\text{biH}_2\text{O}$ ) u omjeru 5:1. Kako bi na gel bila nanešena jednaka količina uzorka, izračunat je volumen pufera za uzorke prema broju stanica izbrojanom prije taloženja. Uzorci su inkubirani pri 96 °C u trajanju od 5 min, sonicirani ultrazvukom i jednoliko nanješeni u jažice pripremljenog 10 % poliakrilamidnog gela.

Poliakrilamidni gel (10 %) bio je sastavljen od dva dijela: gela za sabijanje (eng. *stacking gel*) i gela za razdvajanje (eng. *resolving gel*) koji se razlikuju u postotku polimera poliakrilamida i pH pufera. Gustoća (%) gela odabrana je prema molekularnoj masi istraživanih proteina. Gel je pripremljen prema tablici 6.

**Tablica 6. Sastav gelova**

	Gel za sabijanje (ml) 5%	Gel za razdvajanje (ml) 10%
H <sub>2</sub> O	5,5	7,9
30 % smjesa akrilamida/bisakrilamida	1,3	6,7
Tris	1,0 (pH 6,8)	5,0 (pH 8,8)
10 % SDS	0,08	0,2
10 % APS	0,08	0,2
TEMED	0,008	0,008

Nakon nanošenja uzoraka, gel je smješten u aparaturu za elektroforezu i uronjen u Tris-glicinski pufer (10x pufer: 15,1 g Tris; 72,1 g glicin; 5 g SDS u 500 ml biH<sub>2</sub>O). Aparatura je priključena na izvor struje. Napon izvora u početku elektroforeze bio je 80 V dok se uzorci nisu sabili na granici gelova, nakon čega je napon povišen na 100 V i proteini u uzorcima su se počeli razdvajati na temelju omjera naboja i molekulske mase. Razdvajanje je provođeno u trajanju od 120 minuta. Nakon razdvajanja, gel je položen na sloj filter papira i nitroceluloznu membranu te prekriven još jednim slojem filter papira, u tzv. „sendvič“ za prijenos proteina, natopljen u pufer Towbin za prijenos (200 ml MeOH + 100 ml 10 % SDS + 700 ml deH<sub>2</sub>O). Prijenos je provođen u uređaju za polusuhi prijenos TransBlot Turbo (Bio-Rad, SAD) u trajanju od 12 min, pri naponu od 25 V i jakosti struje od 1,3 A.

Membrana je zatim obojana bojom Ponceau Red kako bi se provjerila kvaliteta prijenosa i isprana u TBS-T puferu (0,6 g Tris/10 mmol/L; 4,38 g NaCl/150 mmol/L; 0,5 ml 0,1% Tween 20 u 500 ml biH<sub>2</sub>O). Kako bi se smanjila mogućnost nespecifičnog vezanja, membrana je inkubirana sat vremena u 5% nemasnom mlijeku. Nakon blokiranja membrana je inkubirana 2 sata pri sobnoj temperaturi u otopini primarnog protutijela anti-DNER (1:1000 razrijeđeno u 5% mlijeku). Nakon inkubacije membrana je isprana u puferu TBS-T pet puta u trajanju od pet minuta te je inkubirana 2 sata u sekundarnom protutijelu (1:5000 razrijeđeno u 5% mlijeku). Sekundarno protutijelo obilježeno peroksidazom vizualizirano je u detektoru dodatkom supstrata korištenjem reagensa *Western Lightning<sup>®</sup> Plus ECL*. Nakon detekcije proteina, s membrane su isprana sva vezana protutijela puferom za uklanjanje (glicin/100 mmol/L), te je ponovno blokirana i inkubirana protutijelom specifičnim za *housekeeping* protein na već opisani način. Intenzitet signala obrađen je u programu ImageLab (Bio-Rad, SAD) i izmjeren korištenjem alata programa Image J (NIH Image, SAD).

### 3.2.5. Mjerenje sposobnosti stanica da stvaraju kolonije

Utjecaj transfekcije sa siRNA na stanice praćen je kroz sposobnost stanica da stvaraju kolonije. Stanice OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP su transficirane ili sa si(-) ili sa siDNER te nasadene na pločice s 6 bunarića, 3000 stanica/2 mL (OVCAR-3 GFP) i 2500 stanica/2 mL (OVCAR-3 7CBP GFP). Stanice su ostavljene rasti u inkubatoru 15 dana, nakon čega je uklonjen medij. Stanice su zatim isprane PBS-om, fiksirane 10 min apsolutnim metanolom. Nakon što se metanol osušio stanice su obojane bojom *Crystal Violet*. Pola sata nakon bojanja, kolonije su isprane i ostavljene da se posuše prije brojanja. Brojane su samo one kolonije koje su sadržavale najmanje 50 stanica.

### 3.2.6. Statistička analiza

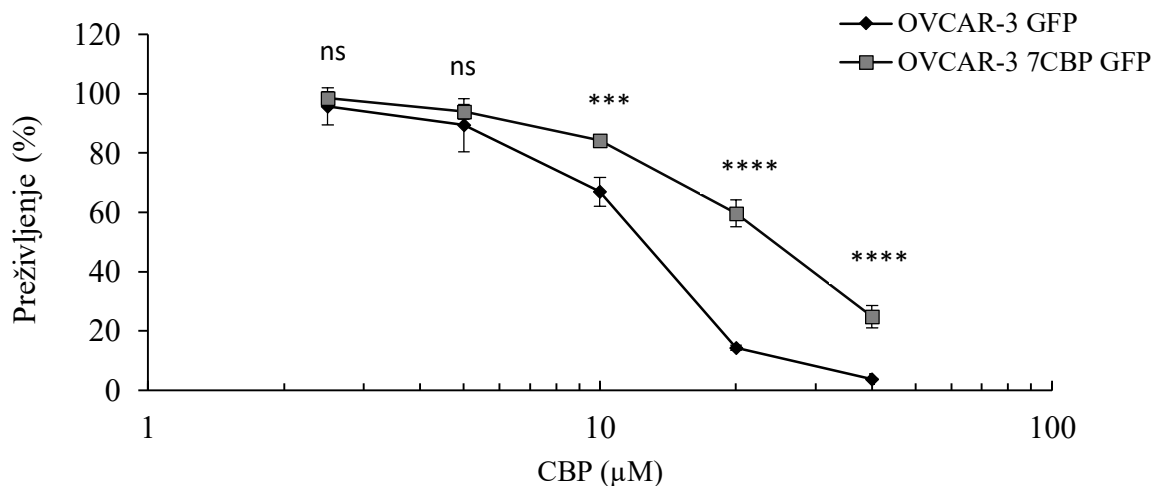
Rezultati metode alamarBlue izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice,  $\pm$  vrijednost standardne devijacije (SD). Rezultati metode RT-qPCR izraženi su kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ili  $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  vrijednost standardne devijacije (SD). Rezultati su obrađeni u programu Excel 2016. Statistička značajnost (vrijednost p) razlike između preživljenja tretiranih i kontrolnih stanica izračunata je korištenjem student T-testa na mrežnoj stranici GraphPad QuickCalcs.



## 4. Rezultati

### 4.1. Stanična linija otporna na CBP, OVCAR-3 7CBP GFP pokazuje bolje preživljenje od OVCAR-3 GFP nakon tretmana karboplatinom

Kako bi se utvrdilo je li OVCAR-3 7CBP GFP linija stanica otporna na karboplatinu (CBP) u odnosu na roditeljsku OVCAR-3 GFP liniju nakon odmrzavanja, stanice su nasađene u pločicu s 96 bunarića te 24 h nakon nasađivanja tretirane različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica mjereno je metodom alamarBlue™ 72 h nakon tretmana. Rezultati su prikazani na slici 8.

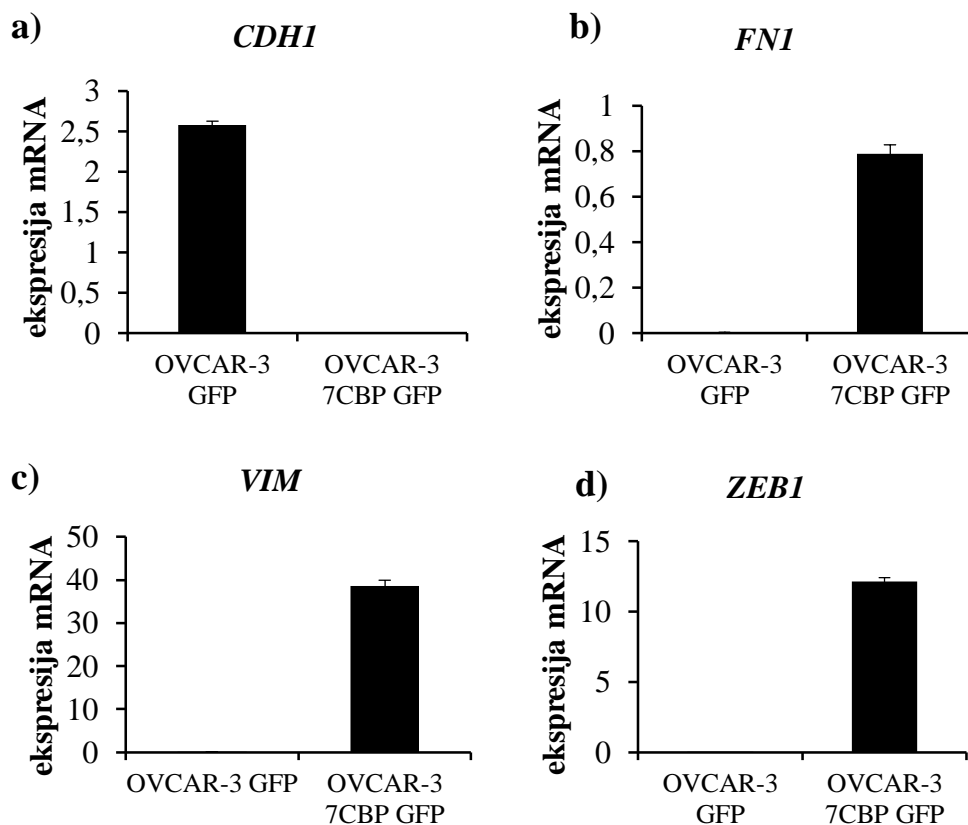


**Slika 8. Preživljenje linija stanica OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP nakon tretmana karboplatinom prikazano logaritamskom skalom.** Stanice su nasađene i nakon 24 h tretirane koncentracijama CBP od 2,5 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L, 20 μmol/L i 40 μmol/L. Kao negativna kontrola korištene su netretirane stanice. Vrijednost p dobivena je korištenjem student T-testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost p manju od 0,05. ns = nije značajno, \*\*\*= $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*= $p \leq 0,0001$

Rezultati su pokazali da su stanice OVCAR-3 7CBP GFP dva puta otpornije na CBP u odnosu na stanice OVCAR-3 GFP. Točnije,  $IC_{50}$  stanica OVCAR-3 GFP je 13,3  $\mu$ M, a OVCAR-3 7CBP GFP 25,8  $\mu$ M.

#### **4.2. Stanična linija OVCAR-3 7CBP GFP pokazuje mezenhimski fenotip u odnosu na epitelni fenotip roditeljske linije OVCAR-3 GFP**

Tijekom uspostave staničnih linija tumora jajnika otpornih na CBP (OVCAR-3 7CBP GFP, MES-OV 8CBP i SK-OV-3 6CBP) uočeno je da stanice poprimaju izduženi oblik, karakterističan za stanice mezenhima. Nakon mjerenja razine genske ekspresije biljega EMT kao što su *E-KADHERIN (CDH1)*, *VIMENTIN (VIM)*, *FIBRONEKTIN (FNI)* potvrđeno je da su stanice zadobile osobine stanica mezenhima. Isto se provjerilo i u svježe odmrznutim stanicama OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP kako bismo se uvjerali da radimo s dobrim pokusnim modelom. Pomoću metode RT-qPCR određena je količina mRNA(*CDH1*), mRNA(*FNI*), mRNA(*VIM*) i transkripcijskog faktora *ZEB1* uključenog u regulaciju EMT (Slika 9)



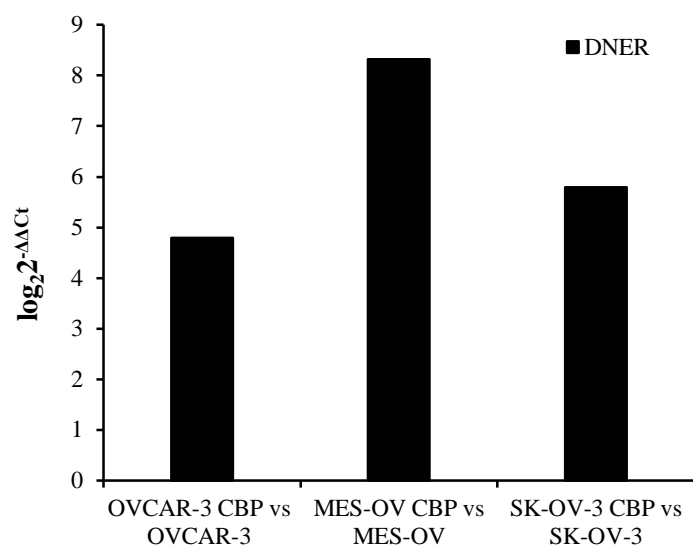
**Slika 9. Razina biljega EMT.** Prikazana je količina mRNA *CDHI* (a), *FNI* (b), *VIM* (c) i *ZEB1* (d). Pokus je napravljen najmanje tri puta.

Na temelju rezultata zaključeno je da je u staničnoj liniji OVCAR-3 CBP GFP staničnoj liniji ekspresija epitelnog biljega *CDHI* znatno snižena, dok su razine mezenhimskih biljega povišene u odnosu na one izmjerene u roditeljskim stanicama OVCAR-3 GFP. Stoga se zaključuje da je stanična linija OVCAR-3 CBP GFP mezenhimskog fenotipa.

Nakon što je dokazano da je linija stanica OVCAR-3 7CBP GFP otporna na CBP te da stanice pokazuju mezenhimski fenotip daljnji pokusi su nastavljani na ispitanom staničnom modelu.

### 4.3. Ekspresija *DNER* je povećana u tri različite linije stanica tumora jajnika otpornih na karboplatinu

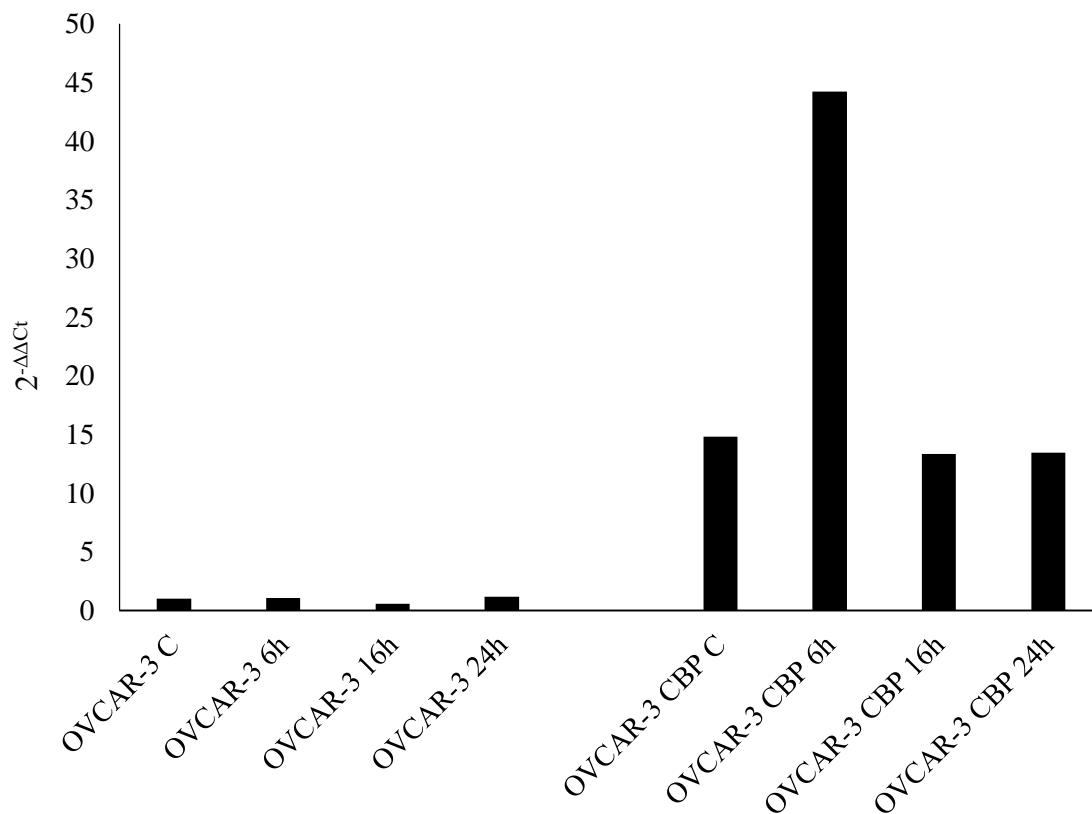
Preliminarni rezultati dobiveni su profiliranjem mRNA staničnih linija MES-OV i MES-OV 8CBP pomoću uređaja Afymetrix Array. pokazano je da je u otpornoj staničnoj liniji određen broj gena povećano eksprimiran, dok su neki geni utišani. Gen *DNER* pokazao je povećanu ekspresiju od preko 50 puta u CBP otpornoj MES-OV 8CBP liniji stanica odnosu na onu izmjerenu kod roditeljske linije stanica MES-OV. Kako bi se rezultat profiliranja mRNA potvrdio, metodom RT-qPCR određena je razina ekspresije *DNER* u još dvama staničnim parovima OVCAR-3 GFP i SK-OV-3 uz već spomenuti stanični par MES-OV. Rezultati prikazani na slici 10 pokazuju da je *DNER* povećano eksprimiran u svim stanicama otpornima na CBP te je stoga zaključeno da bi ga se trebalo dalje istraživati zbog njegove moguće uloge u otpornosti na terapiju i EMT.



**Slika 10. Količina *DNER* u tri linije stanica seroznog tumora jajnika.** Grafički prikaz prikazuje omjer ekspresije *DNER* u svakoj od tri linije otporne na karboplatinu u odnosu na njihovu odgovarajuću roditeljsku liniju. Pokus je napravljen najmanje tri puta.

#### **4.4. Količina *DNER* nakon tretmana stanica OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP s karboplatinom je različita**

Kako bi se dodatno utvrdila moguća važnost *DNER* u odgovoru stanica OVCAR-3 7CBP GFP na karboplatinu, stanice roditeljske linije i linije OVCAR-3 7CBP GFP su tretirane jedan sat kliničkom dozom karboplatine (25  $\mu\text{mol/L}$ ). Očekivano je da će ekspresija *DNER* rasti s vremenom te da će intenzitet tog rasta biti veći u roditeljskoj u odnosu na otpornu liniju stanica. Rezultati prikazani na slici 11 pokazuju da se količina *DNER* tijekom vremena (6-24 h) ne mijenja u roditeljskoj liniji stanica OVCAR-3 GFP. Ona raste 6 h od tretmana u liniji stanica OVCAR-3 7CBP GFP da bi se 16 i 24 h nakon tretmana vratila na početnu vrijednost. Iz ovog rezultata se može zaključiti da stanična linija OVCAR-3 7CBP GFP odgovara na stres izazvan karboplatinom s povećanom ekspresijom *DNER* dok to nije slučaj za roditeljske stanice. Preliminarni rezultati dobiveni profiliranjem mRNA svih sublinija MES-OV 2-8CBP stanica (nastalih tijekom razvoja otporne linije stanica MES-OV 8CBP) pokazuju da se povećana ekspresija *DNER* može mjeriti tek u stanicama koje su stabilno otporne na veće doze CBP (12.5 i 25  $\mu\text{M}$  CBP) te da ekspresija *DNER* raste s dozom (neobjavljeni rezultati). Stoga se zaključuje da je ekspresija *DNER* u stanicama OVCAR-3 7CBP GFP u odnosu na roditeljsku staničnu liniju OVCAR-3 GFP povećana i stabilna. Potrebni su daljnji pokusi kako bi se utvrdilo zašto je rast ekspresije *DNER* mjerljiv samo u CBP otpornoj liniji stanica, a nije odgovor na stres u roditeljskoj liniji stanica.

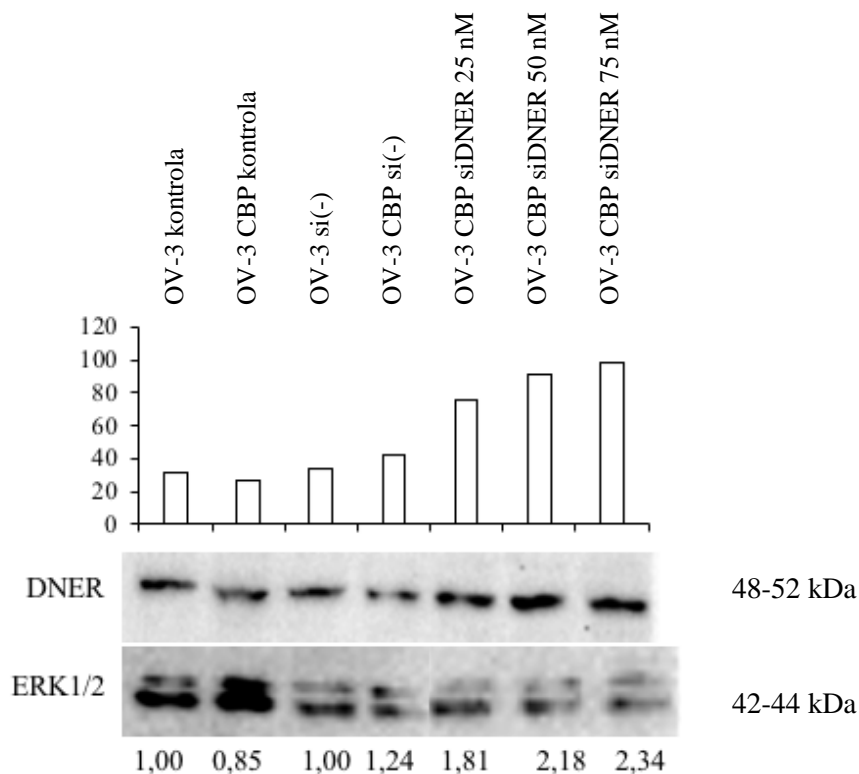


**Slika 11. Količina mRNA (*DNER*) nakon kratkotrajnog tretmana kliničkom dozom karboplatine u stanicama OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP. Ekspresija svih uzoraka normalizirana je prema  $\Delta C_t$  kontrole OVCAR-3 GFP. Rezultati su prikazani kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Prikazan je jedan pokus od napravljena dva.**

#### 4.5. Funkcionalna analiza proteina DNER u liniji OVCAR-3 7CBP GFP

Da bi se utvrdila moguća uloga DNER u otpornosti stanica na CBP i njegova eventualna uloga u EMT odlučeno je da će se ekspresija *DNER* utišati u na CBP otpornoj liniji stanica tumora jajnika. Za uspješno utišavanje proteina DNER u stanicama, bilo je potrebno pronaći djelatnu koncentraciju siRNA. Stanice linije otporne na karboplatinu OVCAR-3 7CBP GFP transficirane su s tri različite koncentracije siDNER. Koncentracija negativne kontrole si(-) bila je 75 nmol/L. Kao dodatna negativna kontrola nasadene su netransficirane stanice obaju linija. Rezultati su prikazani na slici 12. Stanice su nasadene, transficirane i inkubirane 24 h. Nakon

inkubacije, metodom Western blot analizirana je ekspresija proteina DNER koji je denzitometrijski normaliziran u odnosu na protein ERK



**Slika 12. Količina proteina DNER u stanicama linije OVCAR-3 7CBP GFP nakon utišavanja s trima različitim koncentracijama siRNA u: 25 nmol/l, 50 nmol/l i 75 nmol/l.**

Ispoljavanje proteina DNER kvantificirano je u odnosu na količinu proteina ERK 1/2.

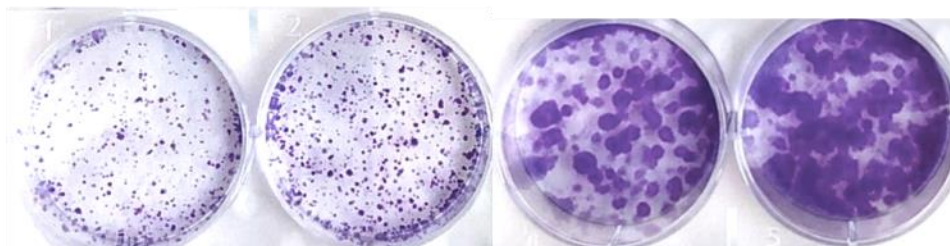
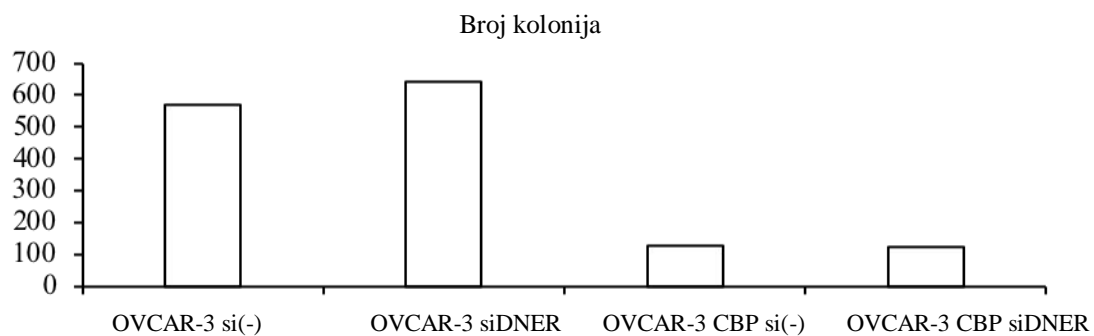
Prikazan je jedan pokus od napravljena tri.

Rezultati su pokazali da utišavanje proteina DNER korištenjem siDNER rastućih koncentracija ne smanjuje njegovu količinu u stanicama. Štoviše, razina proteina DNER bila je veća što su se stanice transficirale većim koncentracijama siDNER. Daljnja analiza rezultata ovog pokusa pokazala je da konstitutivno ispoljavanje DNER-a u stanicama OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP ne odgovara ekspresiji *DNER* za koju je prethodnim pokusima pokazano da je znatno veća u stanicama linije OVCAR-3 7CBP GFP. Usporedbom ispoljavanja DNER-a u objema vrstama stanica transficiranih sa si(-) nije primijećena značajna razlika. Protutijelo koje je korišteno bilo je specifično, ali molekulska masa proteina DNER je 78 kDa, a na membrani je detektirani protein molekulske mase oko 50 kDa.

#### **4.6. Utišavanje *DNER* ne utječe na sposobnost stanica OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP da stvaraju kolonije**

Na temelju prethodnog iskustva sa staničnim parom OVCAR-3 GFP, koje na promjenu uvjeta uslijed tretmana odgovaraju sporije nego što bi se moglo pratiti testom alamarBlue<sup>TM</sup>, početni uvjeti nužni za mjerenje utjecaja na preživljenje određeni su korištenjem testa koji mjeri sposobnost stanica da formiraju kolonije (eng. *colony formation assay*). S obzirom da stanice OVCAR-3 GFP stanice imaju epitelne osobine te im je svojstveno da im je stanična bliskost nužna za poticanje proliferacije i samog preživljenja, stanice OVCAR-3 GFP su nasađene u nešto većem broju u odnosu na stanice OVCAR-3 7CBP GFP. Ovim pokusom htjelo se utvrditi hoće li obje vrste stanica stvoriti kolonije nakon transfekcije negativnom kontrolom si(-) i siDNER. Pokušalo se odrediti hoće li se ovaj pristup moći koristiti prilikom budućeg testiranja eventualne uloge proteina DNER u otpornosti stanica na CBP. Stanice OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP su transficirane sa si(-) i siDNER koncentracije 25 nM, inkubirane 10 dana nakon čega su kolonije obojane bojom *Crystal Violet*. Rezultati prikazani na slici 13 pokazuju da obje linije stanica stvaraju kolonije pri čemu su kolonije stanica OVCAR-3 GFP znatno manje, dok su kolonije stanica OVCAR-3 7CBP GFP veće. Nakon promatranja kolonija korištenjem mikroskopa uočeno je da je razlog tome epitelni, odnosno mezenhimski fenotip pojedinih stanica; gusto pakiranje epitelnih stanica OVCAR-3 GFP rezultiralo je malim kolonijama jasnog ruba dok su stanice OVCAR-3 7CBP GFP slične mezenhimu karakterističnog izduženog oblika međusobno udaljenije, pa su njihove kolonije veće i difuznog ruba. Ovaj izgled kolonija otprije je poznat (neobjavljeni rezultati) pa je zaključeno kako transfekcija negativnom kontrolom si(-) ne mijenja stanice. Daljnja ispitivanja i proširenje pokusa nužna su za donošenje konačnih zaključaka.





**Slika 13. Sposobnost stanica da stvaraju kolonije.** Na slici su prikazane kolonije staničnih linija OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP. Pokus je napravljen samo jednom. OV-3 označava staničnu liniju OVCAR-3 GFP, a CBP staničnu liniju OVCAR-3 7CBP GFP.

## 5. Rasprava

Serozni tumor jajnika je najsmrtonosniji ginekološki tumor jer se u većini slučajeva otkriva tek u kasnijim stadijima kada se bolest već proširila po unutrašnjosti trbušne šupljine i okolnim organima. Za tumor jajnika svojstven je učestali relaps zbog razvitka otpornosti na kemoterapiju. Neoadjuvantna i adjuvantna kemoterapija seroznog tumora jajnika uključuju tretmane spojevima na bazi platine i taksanima, a u novije vrijeme i protutijelima anti-VEGF kao što je bevacizumab (Groeneweg *i sur*, 2014; van Zyl *i sur*, 2018). Danas je poznat veći broj molekulskih mehanizama koji su potencijalno uključeni u otpornost tumora na terapiju lijekovima s platinom. Najčešće su to promjene u ekspresiji i/ili aktivnosti pumpi koje sudjeluju u aktivnom prijenosu kroz membranu, ili pumpi koje sudjeluju u izbacivanju lijeka iz stanice, povećan kapacitet različiti mehanizama popravka DNA itd. (Rabik i Dolan, 2007). Posredni i opsežniji načini razvitka otpornosti karakterizirani su prilagodbom populacije matičnih stanica tumora, a uključuju deregulaciju staničnih signalnih puteva odgovornih za apoptozu i ulazak stanica u EMT. Na taj način se smanjuje učestalost staničnih dioba i stanice postanu otpornije na apoptozu, čime se izbjegavaju ključne točke djelovanja kemoterapeutika (Huber *i sur*, 2005; Thiery *i sur*, 2009).

Analizom gena čija se ekspresija razlikovala u stanicama otpornim na CBP u odnosu na roditeljsku liniju stanica tumora jajnika linije MES-OV, izdvojeni su geni kandidati koji bi mogli biti uključeni u razvitak otpornosti te povezani s EMT (neobjavljeni rezultati). Jedan od kandidata, *DNER*, poznati je gen koji djeluje u tumorigenezi glioblastoma, tumora dojke i prostate (Sun *i sur*, 2009; Wang *i sur*, 2017, 2019). U ovom se radu, korištenjem linija stanica seroznog tumora jajnika, OVCAR-3 GFP i njene varijante otporne na karboplatinu OVCAR-3 7CBP GFP, pokušalo utvrditi ima li protein DNER ulogu u otpornosti na kemoterapeutik te je li uključen u EMT.

Stanične linije OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP okarakterizirane su na temelju odgovora na tretman karboplatinom i epitelno-mezenhimski status. Pokusom je potvrđeno da je stanična linija OVCAR-3 7CBP GFP 2 do 3 puta otpornija na tretman karboplatinom u odnosu na roditeljsku staničnu liniju OVCAR-3 GFP (Slika 8). Smanjena ekspresija *CDH1*, te povećana ekspresija *FNI*, *VIM* i *ZEB1* u otpornoj liniji stanica ukazuje na to da su tijekom razvoja otpornosti stanice prolazile kroz EMT (Slike 9 i 10). E-kadherin je osnovni marker stanica epitela, a fibronektin i vimentin su proteini značajni za stanice mezenhima ili stanice

koje su prošle EMT. Transkripcijski faktor ZEB1 jedan je od glavnih faktora potrebnih za utišavanje E-kadherina i ulazak u EMT, te poticanje ulaska stanice u senescenciju, čime se vezuje uz razvitak otpornosti (Iwatsuki *i sur*, 2010; Thiery *i sur*, 2009).

Danas je poznato da serozni tumori jajnika u više od dvije trećine pacijentica recidiviraju nakon uklanjanja, te se zna da terapija potiče EMT u stanicama tumora (Coleman *i sur*, 2013; Fischer *i sur*, 2015). No, ono što još uvijek nije poznato je činjenica jesu li razvoj otpornosti i EMT međusobno povezani ključnom molekulom ili molekulama ili se radi o dva događaja koja se razvijaju neovisno kao posljedica tretmana. Preliminarnim rezultatima profiliranja mRNA u roditeljskom i otpornom paru staničnih linija tumora jajnika MES-OV razvijenih u grupi dr. sc. Brozović pokazano je da je značajnom broju gena promijenjena razina ekspresije u otpornoj liniji stanica. Jedan od gena kojem je dokazano povećanje ekspresije za više od 50 puta bio je *DNER*. Kako bi se utvrdilo je li promjena ekspresije *DNER* slučajan događaj svojstven jednoj staničnoj liniji ili biljeg koji ukazuje na razvitak otpornosti na karboplatinu, u trima parovima roditeljskih i iz njih razvijenih otpornih linija stanica, MES-OV 8CBP, OVCAR-3 7CBP i SK-OV-3 6CBP izmjerena je razina mRNA *DNER* (Slika 10). Rezultatima je potvrđena povećana ekspresija mRNA *DNER* u linijama otpornim na karboplatinu u odnosu na njihove roditeljske linije. Iz literature je poznato da *DNER*, jedan od liganada receptora NOTCH1, kod mnogih primarnih linija stanica seroznog tumora jajnika uključujući i OVCAR-3, ima povećanu ekspresiju u odnosu na tumore adenome jajnika. U staničnoj liniji izoliranoj iz seroznog tumora jajnika, u populaciji sferoidnih tumorskih matičnih pronađena je povećana ekspresija NOTCH1 u odnosu na stanice roditeljske linije (Groeneweg *i sur*, 2014).

U ovom radu je prvi put pokazano da je razina ekspresije mRNA *DNER* povećana u stanicama otpornim na karboplatinu koje su prošle kroz EMT.

Istraživanje provedeno na staničnoj liniji OVCAR-3 otpornoj na karboplatinu pokazalo je da utišavanje unutarstanične domene NCID receptora NOTCH3 dovodi do povećane osjetljivosti na kemoterapeutik (Brzozowa-Zasada *i sur*, 2015; Groeneweg *i sur*, 2014). Također je na stanicama tumora adenokarcinoma jajnika otpornim na cisplatinu, koja ima mehanizam djelovanja analogan karboplatini, pokazano da je utišavanjem gena *SNAIL* i *SLUG* postignut povratak stanica iz mezenhinskog u epitelni fenotip i osjetljivost na cisplatinu (Haslehurst *i sur*, 2012). Spomenuta istraživanja otvorila su mogućnost da je i *DNER*, ligand puta Notch, istraživana u ovom radu, uključen u EMT i otpornost na tumore.

Mogućnost uloge *DNER*-a u otpornosti na karboplatinu istražena je tretmanom staničnih linija OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP karboplatinom tijekom sat vremena i mjerenjem ekspresije *DNER* 6-24 h nakon tretmana. Rezultatima je pokazano kako stanice linije OVCAR-

3 7CBP GFP u netretiranoj kontroli imaju povećanu količinu mRNA *DNER* na konstitutivnoj razini, što je potvrda prethodnih rezultata. Međutim, uslijed tretmana stanica OVCAR-3 GFP kliničkom dozom CBP ne postoji razlika u ekspresiji *DNER*, dok u slučaju stanica OVCAR-3 7CBP GFP postoji značajno povećanje ekspresije nakon 6 sati, nakon čega se razina mRNA *DNER* vraća na razinu netretirane kontrole (Slika 11). Kratkotrajni porast transkripta *DNER* u stanicama OVCAR-3 7CBP GFP relativno brzo nakon tretmana može se interpretirati kao nespecifični odgovor stanice na stres, čime se globalno mijenja regulacija ekspresije kako bi se stanice brzo privikle na tretman. U drugu ruku *DNER* može biti aktivno uključen u otpornost i njegova ekspresija je zadržana uslijed trajne otpornosti kao stečena karakteristika stanične linije i omogućuje brz odgovor na djelovanje kemoterapeutika. Uzimajući u obzir dobivene rezultate, preliminarna istraživanja i literaturne podatke, vrlo je vjerojatno da je *DNER* uključen u mehanizam uspostave dugotrajne otpornosti, odnosno odgovor na tretman karboplatinom. Dakle, moguće je da se *DNER* odnosno signalni put čija je on sastavnica, uspostavio i istaknuo u genomu tijekom razvitka linije i izdvojio kao važna komponenta odgovora stanica na tretman karboplatinom. Prethodnu pretpostavku potvrđuje rezultat da se razlika u ekspresiji nakon tretmana vidi samo u stanicama OVCAR-3 7CBP GFP.

Kako bi se preciznije utvrdila uloga gena, odnosno proteina *DNER* u otpornosti na karboplatinu, proveden je pokus utišavanja *DNER* u stanicama otpornim na karboplatinu. Za utišavanje *DNER* korišteno je nekoliko različitih koncentracija si*DNER* i specifično protutijelo na *DNER*. Na taj način se htjela odrediti količina proteina *DNER*, ali i konstitutivna ekspresija *DNER* u stanicama linija OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP. U stanicama otpornim na karboplatinu transficiranim sa si*DNER* korištenjem triju koncentracija (25, 50, 75 nmol/L) primijećen je trend jednolikog povećanja proteina u odnosu na kontrole transficirane sa si(-). U stanicama transficiranim sa si(-) u odnosu na netransficirane kontrole također je primijećeno malo povećanje količine proteina *DNER*, što je vjerojatno posljedica stresa uslijed transfekcije. U uputama proizvođača si*DNER* navedeno je da je već koncentracija od 25 nmol/L dovoljna za utišavanje do 75% ciljane mRNA, no očito je da izbor koncentracija u ovom rezultatu nije glavni problem, već činjenica da se količina proteina u odgovoru na utišavanje pomoću siRNA povećava. Drugo objašnjenje može biti da siRNA nije dovoljno učinkovita ili specifična u utišavanju. Spomenuta siRNA korištena je i u drugim istraživanjima gdje je primijećeno utišavanje na razini mRNA (Park *i sur*, 2010), međutim treba imati na umu da se ovdje radi o tek razvijenoj liniji otpornih stanica što ostavlja mogućnost da se učinkovitost utišavanja tek treba odrediti.

Također je moguće da protutijelo naznačeno od strane proizvođača kao specifično za za protein DNER korišteno za provjeru utišavanja (Slika 12), nije odgovarajuće. Zbog velike raznolikosti anti-DNER protutijela na tržištu, odnosno različitih molekulskih masa istog proteina (izoforni) koje detektiraju, problem nespecifičnosti riješio bi se korištenjem drugog protutijela specifičnog za DNER. Novo protutijelo pomoći će objasniti primijećeno povećanje količine DNER na proteinskoj razini.

DNER je ligand receptora NOTCH1, a pokazano je da u linijama stanica tumora adenokarcinoma jajnika, nakon transfekcije unutarstaničnom domenom NCID od receptora NOTCH1, dolazi do povećanja stanične proliferacije čime je pojačana sposobnost stvaranja kolonija (Groeneweg *i sur*, 2014). Utišavanje NCID u roditeljskim linijama seroznog tumora jajnika, između ostalih i linije OVCAR-3, dovelo je do smanjenja sposobnosti proliferacije (Groeneweg *i sur*, 2014). U ovom radu korišten je test sposobnosti stanica da stvaraju kolonije kako bi se provjerilo ima li transfekcija i utišavanje *DNER* na razini transkripta vidljiv utjecaj na sposobnost stanica OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP da stvaraju kolonije (Slika 13). Obje linije su transficirane sa si(-) i siDNER istih koncentracija. Stanice OVCAR-3 GFP, bez obzira na vrstu siRNA kojom su transficirane, stvaraju sitne, kompaktne i jednolične kolonije dok stanice OVCAR-3 7CBP GFP stvaraju velike kolonije neoštarih rubova. Nadalje, rezultati pokazuju da u obje linije stanica transfekcija sa siDNER ne utječe značajno na povećanje broja kolonija, međutim kolonije su optički nešto veće u odnosu na negativnu kontrolu. Ovdje treba napomenuti da se radi o špekulacijama s obzirom da u ovom momentu ne možemo sa sigurnošću tvrditi da li je pri odabranim eksperimentalni uvjetima došlo do utišavanja DNER niti nije mjerena veličina, odnosno broj stanica u koloniji.

Linije stanica otporne na karboplatinu bi kao stanice koje su prošle EMT trebale imati slabiju sposobnost diobe. Iz literature je poznato da je EMT povezana sa karakteristikama matičnosti (Huber *i sur*, 2005; Iwatsuki *i sur*, 2010; Thiery *i sur*, 2009). Tumorske matične stanice, čije karakteristike dijeli i linija stanica OVCAR-3 7CBP GFP (neobjavljeni rezultati), izbjegavaju djelovanje kemoterapeutika ulaskom u dormanciju i smanjenjem učestalosti dioba (Weidenfeld i Barkan, 2018). Stoga bi se moglo pretpostaviti da epitelne karakteristike koje posjeduju stanice roditeljske linije omogućuju bržu proliferaciju bez obzira na učinak DNER-a, dok stanice OVCAR-3 7CBP GFP transficirane sa siDNER zbog velike količine DNER-a rastu bolje. Točan obrazac ponašanja obje linije stanica tek treba utvrditi kao i korelaciju istog s količinom pristunog DNER.

Iako zbog nedostatka specifičnog antitijela na pitanja koja su bila cilj ovog istraživanja nije pronađen odgovor, rezultati upućuju na to da bi signalni sustav Notch u pokusnom sustavu stanica tumora jajnika mogao biti veza između EMT i otpornosti na karboplatinu.

## 6. Zaključci

1. Stanična linija OVCAR-3 7CBP GFP je dva do tri puta otpornija na karboplatinu u odnosu na roditeljsku liniju OVCAR-3 GFP.
2. Stanična linija OVCAR-3 7CBP GFP pojačano eksprimira biljege stanica mezenhima, a smanjeno biljege stanica epitela čime se ukazuje da su stanice ove linije vjerojatno prošle kroz EMT.
3. Stanične linije OVCAR-3 7CBP GFP, MES-OV 8CBP i SK-OV-3 6CBP ,uzgojene kao otporne na karboplatinu u odnosu na roditeljske, pokazuju povišenu razinu ekspresije mRNA *DNER* u odnosu na roditeljske linije.
4. Povećanje ekspresije *DNER* je dio odgovora stanica OVCAR-3 7CBP GFP na kratkotrajni tretman karboplatinom.
5. Transfekcija stanica OVCAR-3 7CBP GFP sa siDNER uzrokuje povećanje količine proteina DNER molekulske težine 48-52 kDa.
6. Transfekcija stanica OVCAR-3 GFP i OVCAR-3 7CBP GFP sa si(-) i siDNER ne utječe na sposobnost stanica da stvaraju kolonije.

## 7. Literatura

- Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O’Sullivan E, Pelt FN van, Allshire A (2005). Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol* **78**: 945–947.
- Brozovic A (2017). The relationship between platinum drug resistance and epithelial–mesenchymal transition. *Arch Toxicol* **91**: 605–619.
- Brozovic A, Vuković L, Polančac DS, Arany I, Köberle B, Fritz G, *i sur* (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in the Response of Human Laryngeal Carcinoma Cells to Carboplatin but Is Absent in Carboplatin-Resistant Cells. *PLoS One* **8**: e76397.
- Brzozowa-Zasada M, Piecuch A, Segiet O, Stęplewska K, Gabriel A, Wojnicz R (2015). The complex interplay between Notch signaling and Snail1 transcription factor in the regulation of epithelial–mesenchymal transition (EMT). *Eur Surg* **47**: 218–225.
- Coleman RL, Monk BJ, Sood AK, Herzog TJ (2013). Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **10**: 211–224.
- D’Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G (2010). Canonical and non-canonical notch ligands. *Curr Top Dev Biol* **92**: 73–129.
- D’Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene* **27**: 5148–5167.
- Du J, Wang X, Zhang X, Zhang X, Jiang H (2018). DNER modulates the length, polarity and synaptogenesis of spiral ganglion neurons via the Notch signaling pathway. *Mol Med Rep* **17**: 2357–2365.
- Eiraku M, Hirata Y, Takeshima H, Hirano T, Kengaku M (2002). Delta/Notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J Biol Chem* **277**: 25400–25407.
- Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T, *i sur* (2005). DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* **8**: 873–880.
- Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, *i sur* (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to



- chemoresistance. *Nature* **527**: 472–476.
- Greene M, Lai Y, Pajcini K, Bailis W, Pear WS, Lancaster E (2016). Delta/Notch-Like EGF-Related Receptor (DNER) Is Not a Notch Ligand. *PLoS One* **11**: 1–7.
- Groeneweg JW, Foster R, Growdon WB, Verheijen RH, Rueda BR (2014). Notch signaling in serous ovarian cancer. *J Ovarian Res* **7**: 95–107.
- Hartman BH, Nelson BR, Reh TA, Bermingham-McDonogh O (2010). Delta/Notch-Like EGF-Related Receptor (DNER) is Expressed in Hair Cells and Neurons in the Developing and Adult Mouse Inner Ear. *J Assoc Res Otolaryngol* **11**: 187–201.
- Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, Nuin P, Evans K, Geraci J, *i sur* (2012). EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* **12**: 91–101.
- Huber MA, Kraut N, Beug H (2005). Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 548–558.
- Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, *i sur* (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* **101**: 293–299.
- Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, *i sur* (2004). Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **22**: 2184–2191.
- Johnstone TC, Alexander SM, Wilson JJ, Lippard SJ (2015). Oxidative halogenation of cisplatin and carboplatin: synthesis, spectroscopy, and crystal and molecular structures of Pt( iv ) prodrugs. *Dalt Trans* **44**: 119–129.
- Katoh M, Katoh M (2007). Notch signaling in gastrointestinal tract (Review). *Int J Oncol* **30**: 247–251.
- Knigavko V, Bondarenkoq M, Zaytseva O (2018). The Generalised Mutation Theory of Oncogenesis. *J Clin Diagnostic Res* **12**: 01–04.
- Maley CC, Aktipis A, Graham TA, Sottoriva A, Boddy AM, Janiszewska M, *i sur* (2017). Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat Rev Cancer* **17**:

605–619.

Moisan F, Francisco EB, Brozovic A, Duran GE, Wang YC, Chaturvedi S, *i sur* (2014). Enhancement of paclitaxel and carboplatin therapies by CCL2 blockade in ovarian cancers. *Mol Oncol* **8**: 1231–1239.

Ojima I, Lichtenthal B, Lee S, Wang C, Wang X (2016). Taxane anticancer agents: a patent perspective. *Expert Opin Ther Pat* **26**: 1–20.

Park J-R, Jung J-W, Seo M-S, Kang S-K, Lee Y-S, Kang K-S (2010). DNER modulates adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells *via* regulation of cell proliferation. *Cell Prolif* **43**: 19–28.

PubChem Database. (2019a). Carboplatin C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pt - PubChem. *Natl Cent Biotechnol Information PubChem Database* at <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carboplatin>.

PubChem Database. (2019b). Paclitaxel C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub> - PubChem. *Natl Cent Biotechnol Information PubChem Database* at <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6713921>.

Rabik CA, Dolan ME (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* **33**: 9–23.

Saito SY, Takeshima H (2006). DNER as key molecule for cerebellar maturation. *Cerebellum* **5**: 227–231.

Singh A, Settleman J (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**: 4741–4751.

Sun P, Xia S, Lal B, Eberhart CG, Quinones-Hinojosa A, Maciaczyk J, *i sur* (2009). DNER, an epigenetically modulated gene, regulates glioblastoma-derived neurosphere cell differentiation and tumor propagation. *Stem Cells* **27**: 1473–1486.

Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**: 871–890.

Thompson E, Research DN-C, 2005 U (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* **65**: 5991–5996.

Tohgo A, Eiraku M, Miyazaki T, Miura E, Kawaguchi SY, Nishi M, *i sur* (2006). Impaired

- cerebellar functions in mutant mice lacking DNER. *Mol Cell Neurosci* **31**: 326–333.
- Tsai JH, Yang J (2013). Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev* **27**: 2192–2206.
- Waldum HL, Sandvik AK, Brenna E, Fossmark R, Qvigstad G, Soga J (2008). Classification of tumours. *J Exp Clin Cancer Res* **27**: 70–74.
- Wang L, Wu Q, Zhu S, Li Z, Yuan J, Yu D, *i sur* (2017). Delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor (DNER) orchestrates stemness and cancer progression in prostate cancer. *Am J Transl Res* **9**: 5031–5039.
- Weidenfeld K, Barkan D (2018). EMT and Stemness in Tumor Dormancy and Outgrowth: Are They Intertwined Processes? *Front Oncol* **8**: 381–387.
- Ye X, Weinberg RA (2015). Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol* **25**: 675–686.
- Ye X, Weinberg RA, Singh A, Settleman J, Seelan RS, Mukhopadhyay P, *i sur* (2010). Expression and Y435-phosphorylation of Abelson interactor 1 (Abi1) promotes tumour cell adhesion, extracellular matrix degradation and invasion by colorectal carcinoma cells. *Oncogene* **27**: 871–890.

## 8. Životopis

Rođena sam 19. rujna 1990. u Zagrebu, gdje sam pohađala osnovnu školu. Upisala sam gimnaziju Lucijana Vranjanina 2005. godine i iste godine osvojila prvo mjesto na državnom natjecanju iz biologije. Godine 2009. upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu, a godine 2012. prebacila sam se na Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, na prvu godinu preddiplomskog studija molekularne biologije. Godine 2017. upisala sam diplomski studij molekularne biologije. Tijekom preddiplomskog studija s kolegicom Ivanom Bolančom izradila sam dva rada prilikom natjecanja za Rektorovu nagradu, pod voditeljstvom dr.sc. Mirte Milić i prof. dr. sc. Vesne Benković (2016) na IMI-ju (Institutu za medicinska istraživanja) te voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić-Baće (2017). Na temelju rada pod voditeljstvom dr.sc. Milić objavljen je rad „*Assessment of Listerine Cool Mint mouthwash influence on possible DNA damage measured by buccal micronucleuscytome assay - preliminary results*“ u časopisu *Genetics&Applications* Sveučilišta u Sarajevu. Na temelju rada pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivančić-Baće napravljen je plakat za sudjelovanje na SiSB (Simpozij studenata bioloških usmjerenja). Tijekom studija bila sam demonstratorica na kolegijima Biokemija 2 i Molekularna genetika. Na diplomskom studiju dobila sam stipendiju u sklopu studentske prakse Erasmus+. Praksu pod nazivom „*Istraživanje funkcije huntingtina u skeletnim mišićima na mišjim modelima*“ u trajanju od dva mjeseca sam odradila u Institutu za neuroznanost u Grenoblu pod voditeljstvom dr. sc. Mathilde Chivet. Kroz rad u laboratoriju stekla sam vještine ophođenja s laboratorijskim životinjama, primjerice određivanje identiteta miša brojanjem prstiju, davanje intraperitonealne injekcije, sekcije i izolacije tkiva, te sam se naučila koristiti metodama u molekularnoj biologiji kao što je Western blot, određivanje stanične morfologije u komet testu, elektroporacija bakterija. U sklopu izrade ovog rada na IRB-u (Institutu Ruđer Bošković) pod voditeljstvom dr. sc. Anamarije Brozović naučila sam raditi u staničnoj kulturi, provoditi RT-qPCR, test preživljenja (alamarBlue, preživljenje kolonija) te transficirati stanice. Uz materinji hrvatski jezik koristim engleski i poznajem osnove njemačkog jezika.