

Uloga proteina ITIH5 u otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom te proliferaciji i aktivnosti glavnih signalnih puteva staničnih linija melanoma čovjeka

Stepić, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:672888>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doris Stepić

**Uloga proteina ITIH5 u otpornosti na
ciljanu terapiju vemurafenibom,
proliferaciji i aktivnosti glavnih signalnih
puteva staničnih linija melanoma čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Ignacije Vlašić te komentorstvom dr.sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (modul: fiziologija i imunobiologija).

Najprije želim zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Ignaciji Vlašić i svojoj pomoćnici u nevolji dr. sc. Ani Tadijan na iznimnoj susretljivosti i iskazanom strpljenju tijekom izrade, prijave i pisanja diplomskoga rada. Veliko hvala na svim savjetima i znanju koje ste mi prenijele i što ste omogućile da cijeli ovaj proces bude jedno ugodno i motivirajuće iskustvo. Hvala voditeljici Laboratorija za proteinsku dinamiku dr. sc. Nedi Slade na pruženoj prilici za izradu diplomskoga rada. Hvala i tehničarki Martini Pehar na vječnoj spremnosti za pomoć. Također, hvala mojoj komentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na savjetima i na znanju prenesenom tijekom studiranja.

Želim zahvaliti svojim roditeljima i svojoj sestri na beskrajnoj podršci te svojim prijateljima koji su uvijek bili tu za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga proteina ITIH5 u otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom, proliferaciji i aktivnosti glavnih signalnih puteva staničnih linija melanoma čovjeka

Doris Stepić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Vemurafenib je selektivni inhibitor mutiranog proteina BRAF V600E koji se javlja u 60% melanoma. Unatoč početnim obećavajućim rezultatima, ubrzo nakon liječenja vemurafenibom dolazi do pojave stečene otpornosti stanica melanoma na ovaj lijek. Stečena otpornost često je posljedica reaktivacije signalnog puta MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) ili aktivacije alternativnog signalnog puta PI3K/AKT (engl. *phosphoinositide-3-kinase/Akt*). U mnogim je tumorima, uključujući melanom, uočena smanjena ekspresija gena *ITIH5*. Unatoč tome, njegova uloga u stečenoj otpornosti stanica melanoma na vemurafenib još nije istražena. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti učinak utišavanja ovoga gena na otpornost na vemurafenib, na signalne puteve MAPK i PI3K/AKT te na proliferaciju staničnih linija melanoma čovjeka WM793B i A375M. Utišavanje gena *ITIH5* provedeno je prolaznom transfekcijom stanica malim interferirajućim RNA koje ciljaju *ITIH5* koristeći kalcijev fosfat. Provjera ekspresije i uspješnosti utišavanja provedena je kvantitativnom polimeraznom lančanom reakcijom (qPCR). Nakon utišavanja *ITIH5* provjerena je vijabilnost i proliferacija stanica metodom MTT te razina biljega aktivnosti istraživanih signalnih puteva i proliferacije metodom Western blot. Navedene su analize pokazale da tretman vemurafenibom znatno snižava ekspresiju gena *ITIH5* te da snižena ekspresija *ITIH5* povećava proliferaciju u navedenim staničnim linijama melanoma čovjeka.

Ključne riječi: melanom, vemurafenib, otpornost, *ITIH5*, signalni putevi, proliferacija
(65 stranica, 16 slika, 13 tablica, 87 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Ignacija Vlašić, znanstveni suradnik Instituta Ruđer Bošković
Komentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor u trajnom zvanju Prirodoslovno-
matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić
Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić (zamjena)

Rad prihvaćen: 09.02.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The role of protein *ITIH5* in resistance to vemurafenib targeted therapy, proliferation and activity of major signaling pathways in human melanoma cell lines

Doris Stepić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Vemurafenib is a selective inhibitor of the mutated protein BRAF V600E, which occurs in 60% of melanomas. Despite initial promising results, shortly after treatment with vemurafenib, acquired resistance of melanoma cells develops. Acquired resistance is often the result of the reactivation of the MAPK (mitogen activated protein kinase) signaling pathway or the activation of the alternative PI3K/AKT (phosphoinositide-3-kinase/Akt) signaling pathway. Decreased expression of the *ITIH5* gene has been observed in many tumors, including melanoma. However, its role in the acquired resistance of melanoma cells to vemurafenib has not yet been investigated. The aim of this thesis was to investigate the effect of *ITIH5* silencing on the resistance to vemurafenib, on the activity of MAPK and PI3K/AKT signaling pathways, and on the proliferation of human melanoma cell lines WM793B and A375M. *ITIH5* silencing was performed by transfecting cells with small interfering RNA targeting *ITIH5* using calcium phosphate. Verification of expression and success of silencing was performed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). After the silencing of *ITIH5*, cell viability and proliferation were checked using the MTT test, while the levels of specific markers that represent the activity of signaling pathways or the proliferation was checked using the Western blot method. The results showed that the reduced expression of the *ITIH5* increases the proliferation of the human melanoma cell lines and is a consequence of vemurafenib treatment.

Keywords: melanoma, vemurafenib, resistance, *ITIH5*, signaling pathways, proliferation (65 pages, 16 figures, 13 tables, 87 references, original in: Croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. habil. Ignacija Vlašić, PhD, Research associate, Ruđer Bošković Institute

Co-mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD, Faculty of Science, University of Zagreb

Reviewers: Prof. Nada Oršolić, PhD

Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

Assoc. Prof. Duje Lisičić, PhD (substitution)

Thesis accepted: 9/2/2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Melanom čovjeka	1
1.1.1. Signalni put MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)	3
1.1.2. Liječenje ciljanim inhibitorima BRAF-a	5
1.1.3. Mehanizmi stečene otpornosti na ciljanu terapiju	7
1.2. Porodica ITI	9
1.2.1. Uloga proteina ITIH5 u tumorima čovjeka	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Otopine i puferi	14
3.1.3. Komercijalno dostupni kompleti kemikalija	15
Koristila sam komercijalno dostupne komplete kemikalija prikazanih su u Tablici 2. .	15
3.1.4. Standardi i biljezi veličine	16
3.1.5. Početnice za qPCR	16
3.1.6. Primarna i sekundarna protutijela	17
3.1.7. Stanične linije	17
3.1.8. Hranjive podloge	18
3.1.9. Uređaji i potrošni materijal	19
3.2. Metode rada sa stanicama u staničnoj kulturi	21
3.2.1. Uzgoj i presađivanje stanica u kulturi	21
3.2.2. Zamrzavanje i odmrzavanje stanica	22
3.2.3. Skupljanje taloga stanica	22
3.2.4. Brojanje živih stanica	22
3.2.5. Kratkotrajni tretman vemurafenibom	23
3.2.6. Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim RNA	23
3.2.7. Određivanje preživljenja i proliferacije stanica testom MTT	24
3.3. Analiza RNA	25
3.3.1. Izdvajanje ukupne RNA	25
3.3.2. Određivanje koncentracije RNA	26
3.3.3. Reverzna transkripcija	26
3.3.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)	27

3.4. Priprema i analiza ekspresije proteina metodom Western blot.....	28
3.4.1. Izdvajanje proteina iz stanica vrućim puferom	29
3.4.2. Priprema gelova i pufera za diskontinuiranu elektroforezu (SDS-PAGE).....	30
3.4.3. Razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu	31
3.4.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu	31
3.4.5. Bojanje i blokiranje membrane	32
3.4.6. Inkubacija membrane u otopini primarnog i sekundarnog protutijela	32
3.4.7. Kemiluminiscentna imunodetekcija proteina na nitroceluloznoj membrani	32
3.5. Statistika	33
4. REZULTATI	34
4.1. Provjera ekspresije gena <i>ITIH5</i> metodom qPCR	34
4.1.1. Provjera ekspresije gena <i>ITIH5</i> u parentalnim linijama i podlinijama otpornim na vemurafenib	35
4.1.2. Provjera ekspresije gena <i>ITIH5</i> u parentalnim linijama nakon kratkotrajnog tretmana vemurafenibom.....	36
4.1.3. Provjera ekspresije gena <i>ITIH5</i> u parentalnim linijama nakon utišavanja gena <i>ITIH5</i>	37
4.2. Određivanje otpornosti staničnih linija na tretman vemurafenibom	39
4.2.1. Provjera otpornosti parentalnih linija i podlinija otpornih na vemurafenib	39
4.2.2. Određivanje otpornosti parentalnih linija na vemurafenib nakon utišavanja gena <i>ITIH5</i>	41
4.3. Provjera proliferacije i aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT ..	43
4.3.1. Provjera proliferacije nakon utišavanja gena <i>ITIH5</i>	44
4.3.2. Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT nakon utišavanja gena <i>ITIH5</i> u parentalnim staničnim linijama	46
5. RASPRAVA	48
6. ZAKLJUČAK.....	54
7. LITERATURA	55
8. ŽIVOTOPIS.....	65

KRATICE

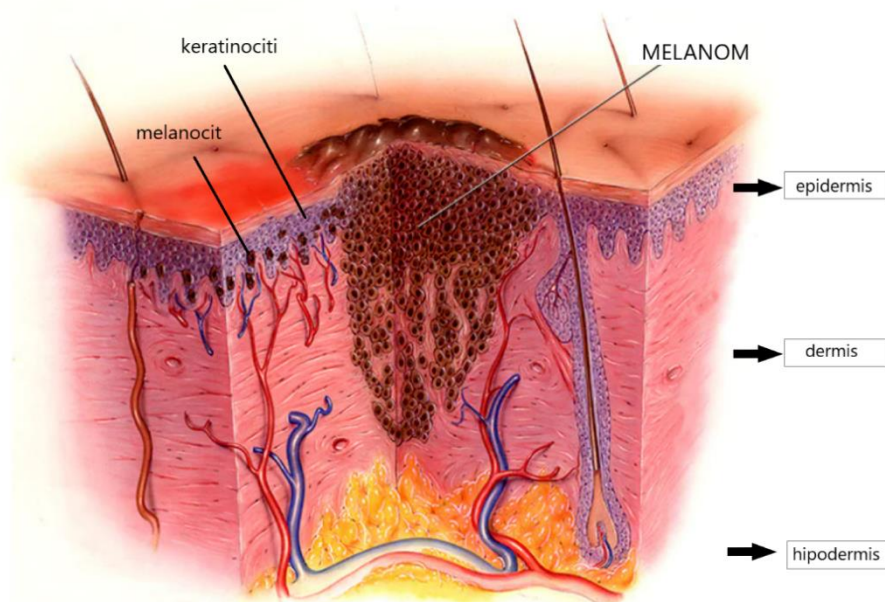
A375M_R1/R2	podlinije otporne na vemurafenib podrijetlom iz stanične linije A375M
AAS	(engl. <i>acrylamide/bisacrylamide stock</i>) matična otopina akrilamida/bisakrilamida
AKT	(engl. <i>Ak strain transforming</i>) proteinska kinaza B
APS	(engl. <i>ammonium persulfate</i>) amonijev persulfat
ATP	(engl. <i>adenosine triphosphate</i>) adenzin trifosfat
BRAF	(engl. <i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>) B-tip RAF kinaze
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
DAPK1	(engl. <i>death-associated protein kinase 1</i>) kinaza 1 povezana sa smrću
DMEM	(engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMEM-kompl.	kompletirani medij DMEM
DMEM-P/S	medij DMEM bez antibiotika
DMSO	(engl. <i>dimethyl sulfoxide</i>) dimetilsulfoksid
DNA	(engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>) deoksiribonukleinska kiselina
ECM	(engl. <i>extracellular matrix</i>) izvanstanični matriks
EGFR	(engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>) receptor epidermalnog faktora rasta
ERK	(engl. <i>extracellular signal- regulated kinase</i>) kinaza regulirana izvanstaničnim signalom
EtOH	etanol
GDP	(engl. <i>guanosine diphosphate</i>) guanozin difosfat
Grb2	(engl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>) protein koji veže receptor faktora rasta
GTP	(engl. <i>guanosine triphosphate</i>) guanozin trifosfat
HA	(engl. <i>hyaluronic acid</i>) hijaluronska kiselina
HBSS	(engl. <i>Hanks Balanced Salt Solution</i>) pufer korišten u transfekciji stanica
ITI	(engl. <i>inter-α-trypsin inhibitor family</i>)
ITIH1-5	(engl. <i>inter-α-trypsin inhibitor heavy chain</i>) teški lanci 1-5 iz porodice proteina ITI

JNK	(engl. <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>) c-Jun N-terminalna kinaza
MAPK	(engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>) signalni put proteinske kinaze aktivirane mitogenom
MEK1/2	(engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>) kinaza kinaze aktivirane mitogenom
mTORC1	(engl. <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>) ciljna molekula rapamicina u sisavaca
NRAS	(engl. <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>)
PBS	(engl. <i>phosphate buffer saline</i>) fosfatni pufer
PI3K	(engl. <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>) fosfoinozid-3 kinaza
qPCR	(engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>) kvantitativna polimerazna lančana reakcija
RAF	(engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)
RAS	(engl. <i>rat sarcoma virus homologue</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina
RPLP0	(engl. <i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>)
RPMI	(engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RPMI+VF	kompletirani medij RPMI s dodatkom vemurafeniba
RPMI-kompl.	kompletirani medij RPMI za uzgoj stanica
RTK	(engl. <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>) receptorska tirozin kinaza
SDS	(od eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>) negativno nabijeni deterdžent
siRNA	(engl. <i>small interfering RNA</i>) mala interferirajuća RNA
SOS	(engl. <i>Son of Sevenless</i>)
TBP	(engl. <i>TATA-box binding protein</i>)
TCGA	(engl. <i>The cancer genome atlas program</i>)
TSC2	(engl. <i>tuberous sclerosis complex 2</i>)
UV	ultraljubičasto zračenje
WM793B_R1/R2	podlinije otporne na vemurafenib podrijetlom iz stanične linije WM793B

1. UVOD

1.1. Melanom čovjeka

Melanom (poznat i kao maligni melanom), karcinom bazalnih stanica i karcinom pločastih stanica tri su glavna tipa tumora kože (Liu *i sur.*, 2015). Od nabrojanih, melanom je najzloćudniji jer ima vrlo visoku sklonost metastaziranju, iako se ne pojavljuje jednako velikom učestalošću kao ostali (Domingues *i sur.*, 2018). Početkom prošloga stoljeća, maligni melanom bio je relativno slabe pojavnosti, a danas se smatra da će u zapadnjačkim populacijama svaka pedeseta osoba razviti ovu bolest. Iako se većinom javlja u starijih, treći je najčešći tumor u dobnih skupina od 19 do 39 godina starosti (Dzwierzynski, 2021). Prema Europskom informacijskom sustavu za rak (ECIS engl. *European Cancer Information System*) najveću pojavnost melanoma imaju skandinavske zemlje, a najmanju Rumunjska, Bugarska i Cipar. Hrvatska se nalazi u sredini po broju slučajeva u odnosu na broj i demografiju stanovnika, ali ima jednu od najnižih stopa preživljenja na prostoru Europske unije (<https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>, pristupljeno: prosinac, 2022.).



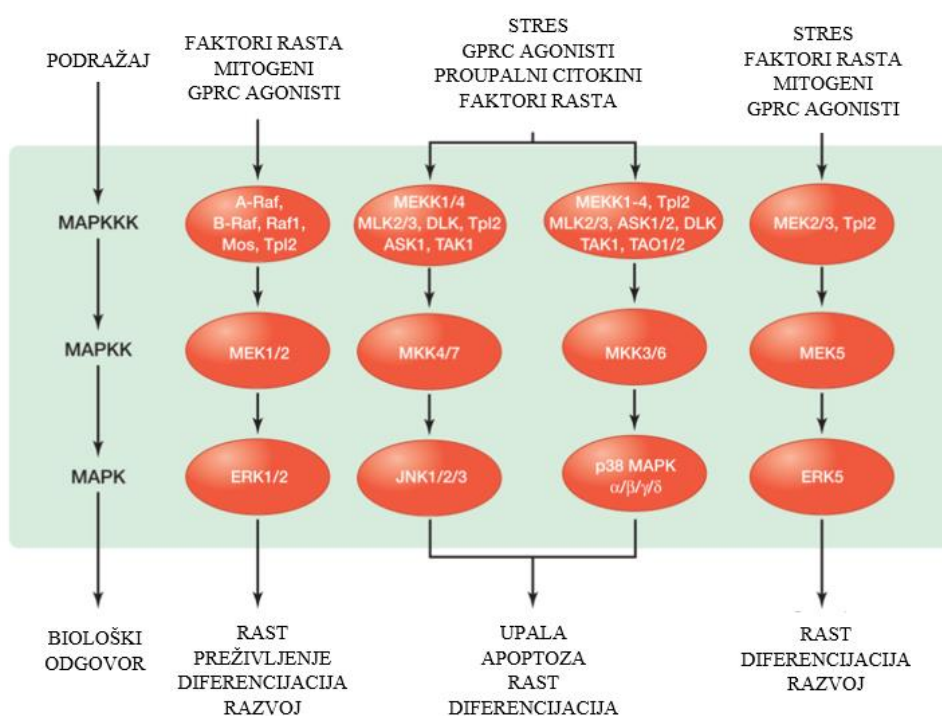
Slika 1. Presjek kože s prikazom razvoja melanoma. Na slici su prikazani osnovni slojevi kože te su istaknute glavne komponente epidermisa, melanociti iz kojih se razvija melanom i keratinociti (preuzeto i prilagođeno s <https://www.mayoclinic.org/>).

Melanom nastaje zloćudnom preobrazbom melanocita, stanica koje su specijalizirane za proizvodnju pigmenta melanina koji očima i koži daje specifično obojenje (Slika 1.). Sintetizirani melanin pakira se u organele melanosome koji putuju od melanocita do keratinocita gdje iz melanina nastaju pigmenti feomelanin (crveno-plavi) te poznatiji eumelanin (smeđe-crni) za kojega je važno da pruža zaštitu od štetnog ultraljubičastog (UV, engl. *UltraViolet*) zračenja (Sullivan *i sur.*, 2014). Melanociti se nalaze u najdubljem sloju epiderme - bazalnoj membrani gdje su u simbiotskom odnosu s keratinocitima te zajedno tvore epidermalno-melaninsku jedinicu. Kako bi melanociti proliferirali moraju se odvojiti od susjednih keratinocita, podijeliti se i putovati duž bazalne membrane gdje će interakcijom s drugim keratinocitima tvoriti novu epidermalno-melaninsku jedinicu (Haass *i sur.*, 2005). Melanociti su podrijetlom iz multipotentnih stanica neuralnog grebena koje tijekom embrionalnoga razvoja migriraju prema epidermi i dermi prilikom čega prolaze specijalizaciju do prekursora melanocita - melanoblasta. Stanični i molekularni mehanizmi uključeni u proliferaciju i migraciju melanoblasta tijekom razvoja blisko su povezani s progresijom melanoma (Liu *i sur.*, 2014).

Postoji više uzroka melanoma, ali kao i kod drugih tumora njegov je razvoj rezultat međudjelovanja genetskih predispozicija i vanjskih čimbenika. Osobe svijetle puti čiji se melanociti slabo dijele ili osobe s puno madeža čiji se melanociti češće dijele te njihova izloženost Sunčevoj svjetlosti predstavljaju glavne rizične skupine. Razvoj 60-70% melanoma potaknut je djelovanjem UV zračenja pri čemu vrlo važnu ulogu u razvoju imaju UVA i UVB zračenje. UVB zračenje stvara izravna oštećenja u molekuli DNA (ciklobutanske pirimidinske dimere i 6-4 fotoprodukte), dok UVA zračenje ima znatno veću prodornost u kožu i uzrokuje nastanak velikog broja radikalnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) (Dzwierzynski, 2021). Faktori rizika nastanka melanoma uključuju nastanak opekline uslijed izloženosti Sunčevoj svjetlosti u djetinjstvu, svijetlu put, nemogućnost tamnjenja, kozmetičku preplanulost uslijed korištenja uređaja za sunčanje u zatvorenom prostoru (solarij), prisutnost velikog broja dobroćudnih melanocitnih nevusa (madeža) i displastičnih nevusa (atipičnih madeža). Genetske predispozicije uključuju mutacije u tumor supresorskim genima, čiji su produkti uključeni u regulaciju staničnog ciklusa ili uslijed mutacija u protoonkogenima koji kodiraju komponente signalnih puteva.

1.1.1. Signalni put MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)

Postoje četiri različita signalna puta proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) koji podrazumijevaju podražaj transmembranskih receptora na površini stanice, prijenos signala preko tri uzastopne kinaze, točnije kinaze kinaze MAP kinaze (MAPKKK), kinaze MAP kinaze (MAPKK) i kinaze MAP (MAPK), pri čemu potonje mogu regulirati transkripcijske faktore u jezgri, a time i različite stanične odgovore. Svaki signalni put naziva se prema posljednjoj kinazi u signalnoj kaskadi i shodno tome dijele se na puteve ERK1/2 (engl. *Extracellular signal- Regulated Kinase*), JNK (engl. *c-Jun N-terminal Kinase*), p38 i ERK5 (Slika 2.) (Wei i sur., 2002; Morrison, 2012; Soares-Silva i sur., 2016).

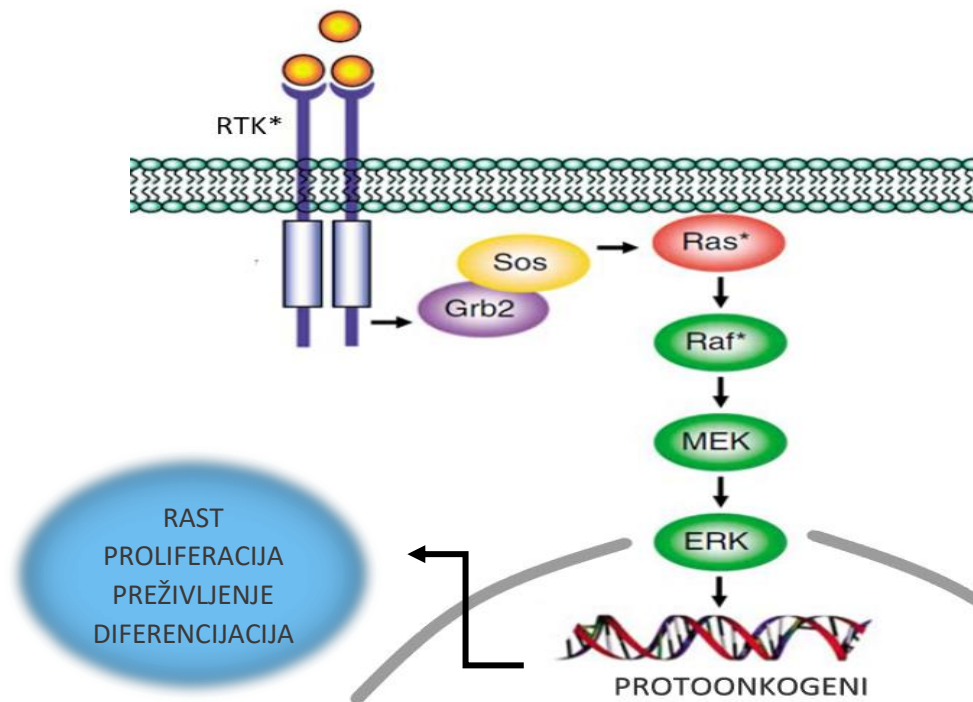


Slika 2. Prikaz različitih signalnih puteva MAPK, podražaja koji ih aktiviraju, glavnih komponenata u signalnoj kaskadi kinaza i staničnih odgovora do kojih dovode (preuzeto i prilagođeno prema Morrison, 2012).

Signalni put ERK1/2 naziva se i kanonski signalni put MAPK, a aktivira se faktorima rasta i mitogenima te regulira rast, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica. Putevi JNK i p38 aktiviraju se okolišnim stresom, proupalnim citokinima i faktorima rasta pa imaju važnu

ulogu u regulaciji apoptoze, proupalnog odgovora, metabolizma i diferencijacije. Signalni put ERK5 aktivira se stresom, faktorima rasta i mitogenima te regulira rast, razvoj i diferencijaciju stanica (Slika 2.) (Wei *i sur.*, 2002; Morrison, 2012; Soares-Silva *i sur.*, 2016).

Aktivacija kanonskog signalnog puta MAPK započinje vezanjem liganda na transmembransku receptorsku tirozinsku kinazu (RTK, engl. *Receptor Tyrosine Kinase*) (Slika 3.) što uzrokuje homodimerizaciju receptora i autofosforilaciju aminokiseline tirozin na citoplazmatskim repovima. Ovim je korakom omogućena aktivacija receptora te prijenos izvanstaničnoga signala u unutrašnjost stanice (Paul *i sur.*, 2019). Fosforilirani tirozinski ostaci receptora tada postaju mjesto visokog afiniteta za protein Grb2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*) koji potom veže protein SOS (engl. *Son of Sevenless*). Novonastali kompleks receptor-Grb2-SOS dovodi do aktivacije proteina SOS, faktora razmjene nukleotida guanina (GEF, engl. *guanine nucleotid exchange factor*), koji dovodi do zamjene GDP-a (engl. *guanosine diphosphate*) GTP-om (engl. *guanosine triphosphate*) na proteinu RAS (engl. *rat sarcoma virus homologue*) što rezultira njegovom aktivacijom. Protein RAS tada započinje signalnu kaskadu MAPK aktivacijom prve kinaze u nizu koja se naziva RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) i koja potom fosforilira sljedeću u nizu, kinazu MEK1/2 (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*). Signalna kaskada završava aktivacijom kinaze ERK1/2 koja ulazi u jezgru i regulira aktivnost transkripcijskih faktora, uključujući različite protoonkogene kao što su *c-Fos*, *c-Jun* i *c-Myc* (Slika 3.) (Dhillon *i sur.*, 2007; Inamdar *i sur.*, 2010) . Pojedine komponente signalnoga puta MAPK podložne su pojačanoj ekspresiji i/ili mutacijama što dovodi do njihove konstitutivne aktivnosti i posljedično razvoja malignih tumora. Prekomjerna ekspresija i aktivnost RTK, kao što je EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*), uočena je u različitim tipovima tumora, kao što su rak pluća, gušterače i debelog crijeva. Također, kod većine tumora gušterače i debelog crijeva uočene su mutacije u proteinima RAS, pri čemu je izoforma NRAS mutirana u 10-30% melanoma. Međutim, najčešće mutirana kinaza signalnog puta MAPK u melanomima je protein BRAF (Roberts *i sur.*, 2007; Ascierto *i sur.*, 2012).

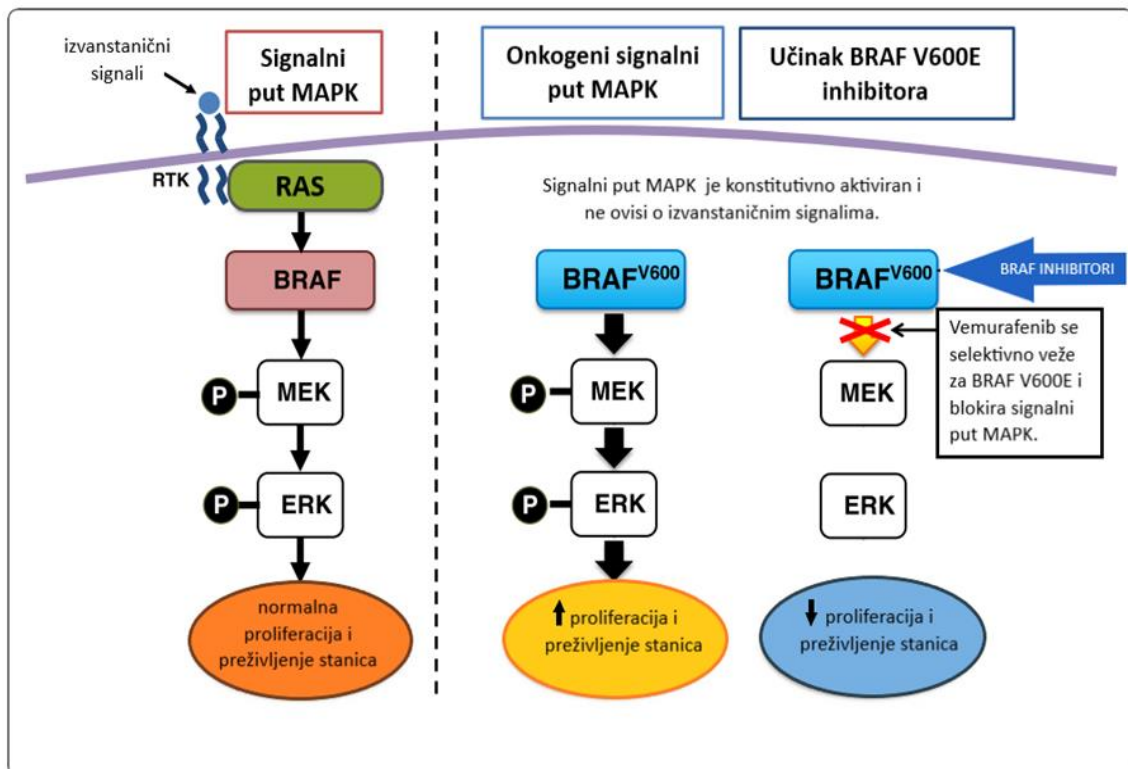


Slika 3. Prikaz signalne kaskade kanonskog signalnog puta MAPK koji završava aktivacijom kinaze ERK1/2. Ostale komponente glavne su sastavnice signalnog puta MAPK. Zvezdicom su označeni najčešće mutirani ili pojačano eksprimirani proteini uključeni u razvoj tumora. (preuzeto i prilagođeno prema Roberts *i sur.*, 2007).

1.1.2. Liječenje ciljanim inhibitorima BRAF-a

BRAF je serinska/treoninska kinaza kodirana protoonkogenom *BRAF* na kromosomu 7q. Uz BRAF, postoje još dvije izoforme, ARAF i CRAF koje su kodirane različitim genima (Matallanas *i sur.*, 2011; Fedorenko *i sur.*, 2011). Od navedenih, BRAF je najlakše aktiviran proteinom RAS, a zahvaljujući većoj kinaznoj aktivnosti glavni je aktivator kinaze MEK1/2 te samim time i kinaze ERK1/2 (Wellbrock *i sur.*, 2004). U prosjeku, 60% melanoma nosi mutaciju u genu *BRAF* od kojih 90% ima točkastu mutaciju T1799A koja uzrokuje zamjenu aminokiseline valin glutaminskom kiselinom na kodonu 600 i stvaranje mutiranog proteina BRAF V600E. Ova mutacija dovodi do konstitutivne aktivnosti proteina BRAF V600E i posljedično do prekomjerne aktivnosti signalnog puta MAPK neovisne o izvanstaničnim signalima i uzvodnoj inhibiciji što rezultira pojačanom proliferacijom i preživljenjem stanica, izbjegavanjem senescencije i apoptoze, angiogenezom, metastaziranjem te izbjegavanjem imunološkoga odgovora (Ascierto *i sur.*, 2012; Chan *i sur.*, 2017).

Upravo zbog aktivirajuće mutacije, protein BRAF V600E postao je meta u liječenju melanoma ciljanom terapijom. Prvi razvijeni inhibitor mutirane kinaze BRAF V600E je vemurafenib. Vemurafenib, poznat i kao PLX4032, mala je molekula koja inhibira vezanje ATP-a u aktivno mjesto proteina BRAF V600E i tako onemogućuje njegovu aktivaciju. Zahvaljujući tome, vemurafenib zaustavlja prienos signala i aktivnost puta MAPK što rezultira smanjenom proliferacijom i preživljenjem tumorskih stanica (Slika 4.) (Bollag *i sur.*, 2017).



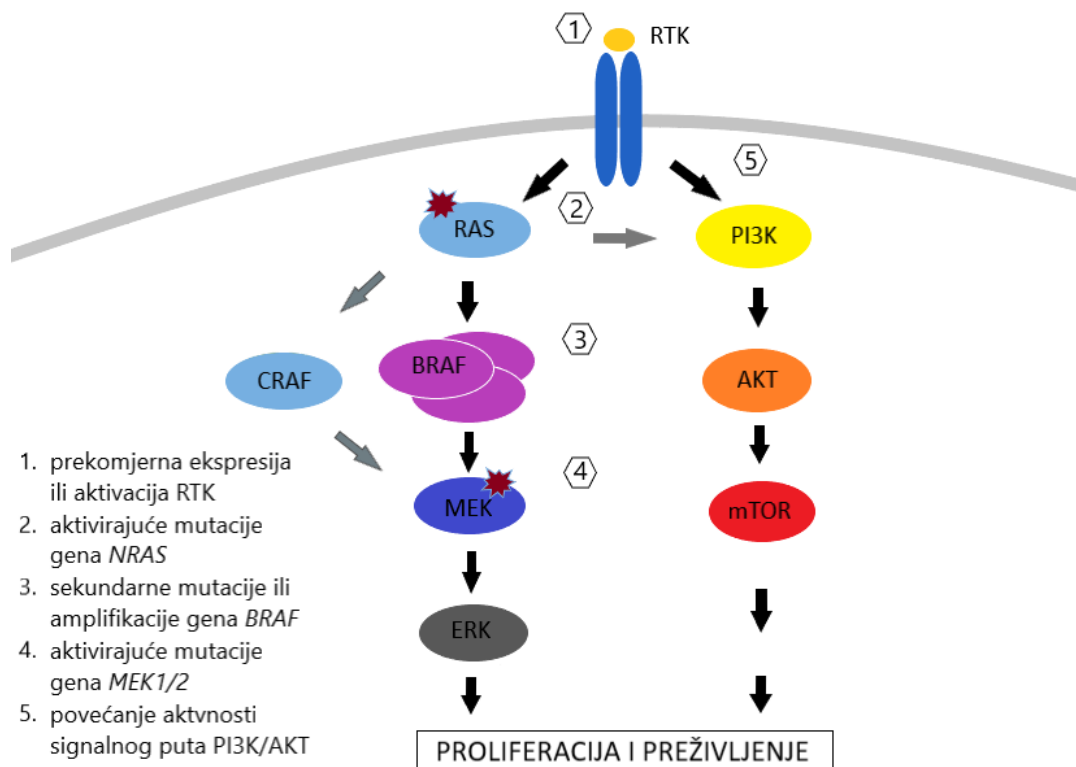
Slika 4. Usporedni prikaz normalnog i onkogenog signalnog puta MAPK te prikaz djelovanja vemurafeniba na protein BRAF V600E u onkogenom signalnom putu MAPK (preuzeto i prilagođeno prema Ascierto *i sur.*, 2012).

U prekliničkim istraživanjima, u kojima su korišteni *in vitro* i *in vivo* modeli, uočeno je da vemurafenib ima veći afinitet za mutirani BRAF V600E od divljeg tipa proteina BRAF čime je osigurana specifičnost ovoga lijeka za stanice koje sadrže mutaciju u kodonu 600 proteina BRAF (Yang *i sur.*, 2010). Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. *U.S. Food and Drug Administration*) 2011. godine odobrila je upotrebu vemurafeniba nakon obećavajućih rezultata u trećoj fazi kliničkih istraživanja. Pokazano je da terapija vemurafenibom uzrokuje

povlačenje i smanjenje tumora u pacijenata te da je preživljenje pacijenata liječenih vemurafenibom 3,6 mjeseci duže u donosu na terapiju poznatim kemoterapeutikom, dakarbazinom. Međutim, unatoč dobrim početnim rezultatima, pacijenti liječeni vemurafenibom razvijaju otpornost na ovaj lijek nekoliko mjeseci nakon spomenutih uspjeha što rezultira progresivnom bolešću. Stečena otpornost tumorskih stanica na druge inhibitore kinaza javlja se i kod liječenja drugih tipova tumora, stoga je od ključne važnosti istražiti molekularne mehanizme otpornosti te pronaći njihove biljege kako bi se predvidio mogući odgovor stanica na terapiju (Villanueva *i sur.*, 2010; Heikal *i sur.*, 2011; Fisher *i sur.*, 2012; Griffin *i sur.*, 2017)

1.1.3. Mehanizmi stečene otpornosti na ciljanu terapiju

Najčešći mehanizam stečene otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom reaktivacija je signalnog puta MAPK koja se odvija putem nekoliko mehanizama uzvodno ili nizvodno od proteina BRAF V600E. Uzvodna reaktivacija puta MAPK nastaje uslijed prekomjerne ekspresije RTK ili zbog mutiranog proteina NRAS (engl. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*). Mutirani protein NRAS aktivira druge izoforme proteina RAF (ARAF i/ili CRAF) što rezultira reaktivacijom signalnog puta MAPK, ali i aktivacijom alternativnog signalnog puta PI3K/AKT (Lim *i sur.*, 2017). Najčešći mehanizam nizvodne reaktivacije puta MAPK rezultat je mutirane kinaze MEK1/2 koja je posljedično konstitutivno aktivna. Upravo zbog toga u liječenju melanoma često se pribjegava kombiniranoj terapiji inhibitorima mutiranih proteina BRAF i MEK čija se učinkovitost pokazala klinički značajnom (Grimaldi *i sur.*, 2017). Otpornost na vemurafenib može biti uzrokovana promjenama na razini samog proteina BRAF V600E koja uključuje sekundarne mutacije (Hoogstraal *i sur.*, 2015) ili putem amplifikacije mutiranog gena koja uzrokuje njegovu povećanu ekspresiju. U slučaju amplifikacije, liječenje vemurafenibom je otežano jer fiziološki prihvatljive doze vemurafeniba nisu dostatne za inhibiciju povećane količine proteina (Shi *i sur.*, 2012). Osim toga, varijanta proteina p61BRAF V600E, nastala kao rezultat alternativnoga izrezivanja, pojačano dimerizira u odnosu na BRAF V600E, neovisno o proteinu RAS, što rezultira konstitutivnom aktivacijom puta MAPK i otpornosti na tretman vemurafenibom (Slika 5.) (Poulikakos *i sur.*, 2011).



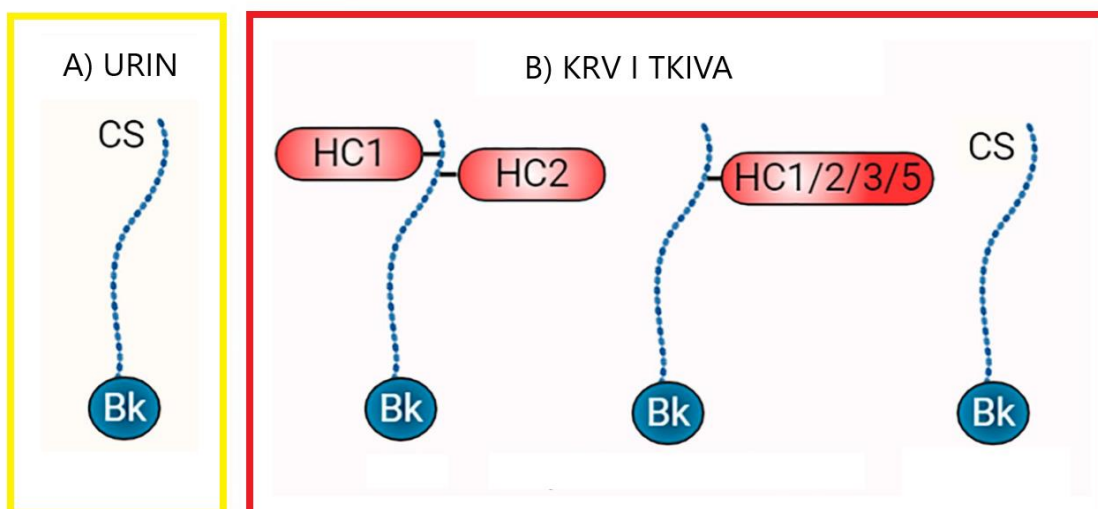
Slika 5. Neki od mehanizama stečene otpornosti stanica melanoma na ciljanu terapiju inhibitorima BRAF-a koji uključuju reaktivaciju signalnog puta MAPK i aktivaciju signalnog puta PI3K/AKT (preuzeto i prilagođeno prema Klinac *i sur.*, 2013).

Osim reaktivacije signalnog puta MAPK, jedan od čestih mehanizama stečene otpornosti aktivacija je alternativnog signalnog puta PI3K/AKT koji uključuje fosfoinozimid-3 kinazu (PI3K, engl. *phosphatidylinositol-3 kinase*) i proteinsku kinazu B (PKB, engl. *protein kinase B*), poznatiju kao AKT (engl. *Ak strain transforming*) (Mendoza *i sur.*, 2011) (Slika 5.). Signalni put PI3K/AKT, uz put MAPK, jedan je od glavnih puteva uključenih u regulaciju proliferacije, diferencijacije, metabolizma stanice i staničnog preživljenja. Aktivacija signalnog puta PI3K/AKT uključuje kaskadni prijenos signala i započinje vezanjem izvanstaničnih liganda, kao što faktori rasta, hormoni i citokini za određene RTK što dovodi do aktivacije i autofosforilacije RTK-a. Aktivirani RTK potiču vezanje kinaze PI3K za fosforilirane citoplazmatske repove RTK-a i njezinu aktivaciju. PI3K može biti aktiviran i proteinom RAS koji je bitna poveznica signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT. Aktivirani PI3K fosforilira fosfatidilinozitol bifosfat (PIP₂, engl. *phosphatidylinositol bisphosphate*) u fosfatidilinozitol trifosfat (PIP₃, engl. *phosphatidylinositol triphosphate*) i potiče aktivaciju kinaze AKT. Kinaza AKT potiče fosforilaciju i inhibiciju proteina TSC2 (engl. *tuberous*

sclerosis complex 2), što zauzvrat inhibira RHEB (engl. *Ras homologue enriched in brain*) i uzrokuje aktivaciju kompleksa mTORC1 (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*). Kompleks mTORC1, koji se sastoji od proteina mTOR, raptor i podjedinice mLST8, važna je komponenta signalnog puta PI3K/AKT koja kao nizvodna molekula potiče rast stanica, sintezu proteina i skladištenje energije (Slika 5.) (Fruman *i sur.*, 2014; Rascio *i sur.*, 2021).

1.2. Porodica ITI

Proteini ITI (engl. *inter- α -trypsin inhibitor family*) su proteoglikani građeni od lakog lanca, bikunina i od jednog ili dva teška lanca (ITIH, engl. *inter- α -trypsin inhibitor heavy chain*) koji se kovalentno vežu na bikunin preko glikozaminoglikana, hondroitin sulfata. Proteini ITI mogu se naći u različitim tkivima kao što su jetra, gušterača, bubrezi, jajnici, amnionska membrana, pluća, koža, vezivna tkiva i mozak, te u tjelesnim tekućinama uključujući krv, peritonealnu, amnionsku, cerebrospinalnu i sinovijalnu tekućinu, dok se u urinu može naći samo bikunin bez vezanog teškog lanca (Slika 6.). Postoje četiri različita teška lanca ITIH1, ITIH2, ITIH3 i ITIH5 koji su kodirani istoimenim genima i koji se vežu na hondroitin sulfat. Ekspresija gena *ITIH* razlikuje se ovisno o tkivima pa su tako geni *ITIH1-4* najviše eksprimirani u jetri (Hennies, 2015; Lord *i sur.*, 2020), dok je povišena ekspresija gena *ITIH3* uočena u jajnicima, a *ITIH4* u gušterači (Hamm *i sur.*, 2008). Gen *ITIH5* povećano je eksprimiran u tkivu dojke, adipoznom tkivu i placenti, te umjereno u koži (Hennies, 2015; Lord *i sur.*, 2020).

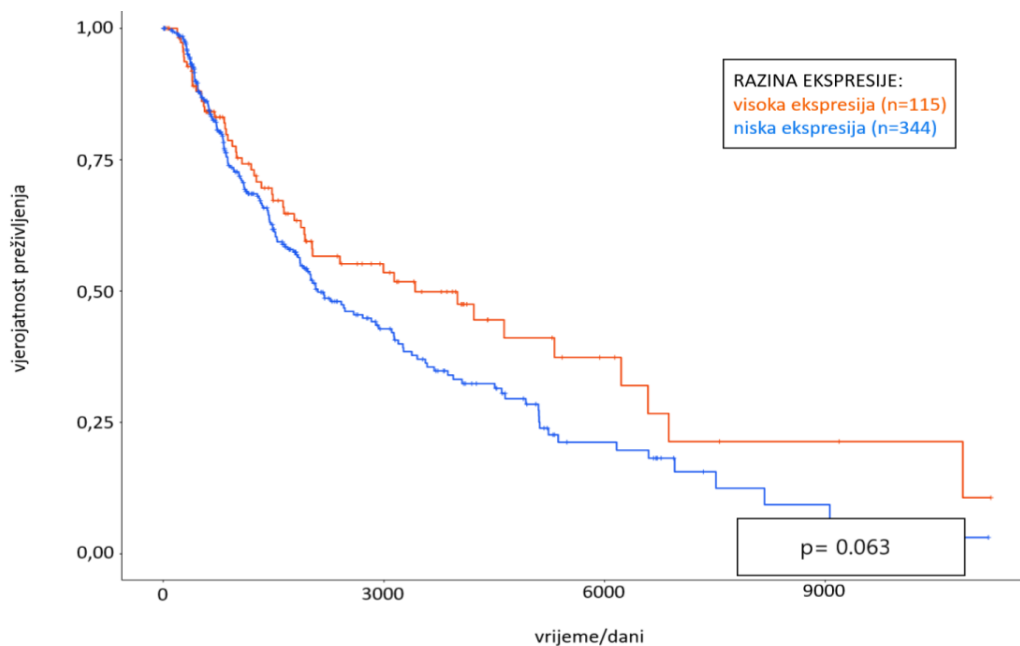


Slika 6. Najčešća pojavnost različitih vrsta proteina ITI u urinu (A) te krvi i tkivima (B). Bikunin (Bk) bez teških lanaca, ali s hondroitin sulfatom (CS) najčešće je prisutan u urinu, dok se u krvi i tkivima češće javlja bikunin vezan s dva teška lanca (HC) ili bikunin s jednim teškim lancem (preuzeto i prilagođeno prema Lord *i sur.*, 2020).

Od navedenih podjedinica, bikunin je proteazni inhibitor za kojega je pokazano da ima ulogu u upalnim procesima i u regulaciji signalnih puteva te da utječe na smanjenje proliferacije i pokretljivosti stanica (Kobayashi *i sur.*, 2003). Najpoznatija uloga teških lanaca stabilizacija je izvanstaničnog matriksa (ECM, engl. *extracellular matrix*) preko interakcije s različitim molekulama kao što su vitronektin i fibronektin te s najznačajnijim glikozaminoglikanom ECM-a, hijaluronskom kiselinom (HA, engl. *hyaluronic acid*) (Hamm *i sur.*, 2008; Lord *i sur.*, 2020). HA ključan je element ECM-a, složene trodimenzionalne mreže proteina i molekula koja ga okružuje, koji daje strukturu i funkcionalnu potporu stanicama i tkivima u organizmu. HA potiče signalne puteve i time utječe na migraciju, adheziju i komunikaciju između stanica. Poznato je da su razgradnja i narušavanje stabilnosti ECM-a među glavnim faktorima u razvoju metastaza (Amorim *i sur.*, 2021). Zanimljivo je da bikunin i pojedini proteini ITIH pokazuju antimetastatski potencijal (Paris *i sur.*, 2002; Sasaki *i sur.*, 2017; Weidle *i sur.*, 2018), pri čemu je izmijenjena ekspresija svih četiriju gena *ITIH* uočena u različitim tipovima tumora što potvrđuje njihovu povezanost s nastankom i/ili progresijom zloćudnih oboljenja, invazijom i metastaziranjem (Hiroshi *i sur.*, 1995; Paris *i sur.*, 2002; Hamm *i sur.*, 2008; Weidle *i sur.*, 2018).

1.2.1. Uloga proteina ITIH5 u tumorima čovjeka

Smanjena ekspresija *ITIH5* uočena je u mnogim tumorima kao što su tumori dojke (Himmelfarb *i sur.*, 2004), mokraćnog mjehura (Rose *i sur.*, 2021), pluća (Dötsch *i sur.*, 2015), debelog crijeva (Kloten *i sur.*, 2014), želuca (Mai *i sur.*, 2014) i grlića maternice (Dittmann *i sur.*, 2017) i povezana je s lošijim ishodom bolesti. Uzrok smanjenoj ekspresiji je hipermetilacija promotora gena *ITIH5*, a uočena je u različitim tumorima, kao što su tumori dojke (Veeck *i sur.*, 2008), debelog crijeva (Hamm *i sur.*, 2008), želuca (Mai *i sur.*, 2014), grlića maternice (Dittmann *i sur.*, 2017), mokraćnog mjehura (Rose *i sur.*, 2014) i pluća (Dötsch *i sur.*, 2015), u staničnim linijama izoliranim iz akutne mijeloidne leukemije te u uzorcima pacijenata oboljelih od akutne mijeloidne leukemije (Oing *i sur.*, 2011). Shodno tome, *ITIH5* djeluje kao tumor supresor s obzirom da njegova povećana ekspresija u različitim *in vitro* 2D ili 3D staničnim modelima smanjuje proliferaciju, invaziju i migraciju stanica te rast tumora *in vivo*. Neki od navedenih *in vitro* 2D staničnih modela uključuju stanične linije tumora mjehura (Rose *i sur.*, 2014), tumora dojke (Rose *i sur.*, 2017) tumora grlića maternice (Dittmann *i sur.*, 2017) i tumora gušterače (Sasaki *i sur.*, 2017) dok 3D model uključuje sferoide podrijetlom od stanica tumora grlića maternice (Daum *i sur.*, 2021). Uz funkciju tumor supresora, *ITIH5* je i supresor metastaziranja. Točnije, povećana ekspresija *ITIH5* u različitim staničnim linijama tumora gušterače smanjuje broj metastaza u jetri u *in vivo* modelu laboratorijskog miša (Sasaki *i sur.*, 2017), dok povećana ekspresija *ITIH5* u metastatskim staničnim linijama tumora dojke uzrokuje smanjeno metastaziranje *in vivo* u pluća laboratorijskog miša (Rose *i sur.*, 2017). Ujedno, ekspresija *ITIH5* u staničnim linijama tumora dojke mijenja ECM, povećava adhezivnost stanica i povišuje razinu integrina $\beta 1$ i $\beta 3$ te dovodi do epigenetskog reprogramiranja i povećane ekspresije poznatog tumor supresorskog gena *DAPK1* (engl. *death-associated protein kinase 1*) (Rose *i sur.*, 2017). Iako istraživanja ukazuju na tumor supresorsku ulogu proteina *ITIH5*, njegova važnost u razvoju i progresiji melanoma tek se počinje istraživati. Nedavno je pokazano da je ekspresija *ITIH5* smanjena u melanomima u odnosu na zdravo tkivo te je kod pacijenata s nižom ekspresijom *ITIH5* uočeno kraće preživljenje (Liu *i sur.*, 2021) što se može potvrditi i analizom dostupnih baza podataka, kao što je TCGA (engl. *The cancer genome atlas program*) (Tomczak *i sur.*, 2015) pomoću programa UALCAN (*The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal*) (Chandrashekar *i sur.*, 2022, <http://ualcan.path.uab.edu>, pristupljeno: prosinac, 2022.) (Slika 7.). Također, povećana ekspresija *ITIH5* smanjuje rast i migraciju stanica melanoma *in vitro* i *in vivo*. Zanimljivo, regulacija ekspresije gena *ITIH5* regulirana je tumor supresorom p53 koji potiče njegovu transkripciju (Liu *i sur.*, 2021).



Slika 7. Kaplan-Meier krivulja preživljenja pacijenata s visokom (narančasta) i niskom (plava) ekspresijom *ITIH5*. Slika je dobivena i prilagođena sa stranice UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>, pristupljeno: prosinac, 2022.), a podaci koje koristi UALCAN su iz baze podataka TCGA.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog diplomskog rada istražiti važnost proteina ITIH5 u otpornosti parentalnih staničnih linija melanoma čovjeka WM793B i A375M na ciljanu terapiju vemurafenibom pod pretpostavkom da se ekspresija *ITIH5* razlikuje u parentalnim staničnim linijama u odnosu na podlinije otporne na vemurafenib. Osim toga, cilj je i provjeriti utjecaj utišavanja *ITIH5* na proliferaciju te regulaciju signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnim staničnim linijama. Pokusi su provedeni sa svrhom boljeg razumijevanja uloge ITIH5 u stanicama melanoma čovjeka i korištenja ITIH5 kao potencijalnog prediktivnog biljega na ciljanu terapiju BRAF inhibitorom, vemurafenibom. Pri tome su korištene metode u molekularnoj biologiji i uključuju qPCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*), test MTT, Western blot i utišavanje ekspresije gena odnosno sprječavanje translacije transkripta primjenom malih specifičnih interferirajućih RNA koje ciljaju gen *ITIH5*. Metodom qPCR analizirana je ekspresija gena *ITIH5*, testom MTT provjerena je osjetljivost stanica na vemurafenib te proliferacija stanica, dok je metodom Western blot analizirana ekspresija proteina od interesa koji uključuju biljeg proliferacije (protein PCNA) i biljege aktivnosti signalnog puta MAPK (proteine pERK i ERK) i signalnog puta PI3K/AKT (proteine pAKT i AKT).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1 Kemikalije

Popis kemikalija koje sam koristila, njihova formula ili naziv, proizvođač i zemlja podrijetla:

akrilamid (Sigma Aldrich, SAD), amonijev persulfat (APS, engl. *ammonium persulfate*, $[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$, Sigma Aldrich, SAD), deionizirana voda (mqH_2O , pripravljena korištenjem uređaja *Milli Q*), destilirana voda (deH_2O), dimetil-sulfoksid (DMSO, $[\text{CH}_3]_2\text{SO}$, Kemika, Hrvatska), 70% etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Kemika, Hrvatska), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, Kemika, Hrvatska), L-glutamin (Sigma Aldrich, SAD), metanol (CH_3OH , Kemika, Hrvatska), MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid, Chemicon, SAD), naftolno plavilo (Kemika, Hrvatska), natrijev dodecil-sulfat (SDS engl. *sodium dodecyl sulphate*, Sigma Aldrich, SAD), natrijev piruvat ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$, Gibco, SAD), obrano mlijeko u prahu (Dukat, Hrvatska), serum fetusa goveda (FBS engl. *fetal bovine serum*, Gibco, SAD), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin, Sigma Aldrich, SAD), tripsin (Sigma Aldrich, SAD), Tween-20 (Sigma Aldrich, SAD), vemurafenib (PLX4032, Selleck Chemicals, SAD)

3.1.2. Otopine i puferi

Popis otopina i pufera koje sam koristila te njihov sastav prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih otopina i pufera te njihov sastav.

Otopina	Sastav
Fosfatni pufer (PBS, engl. <i>phosphate buffer saline</i>)	pH 7,4; 8 g dm^{-3} NaCl, 0,2 g dm^{-3} KCl, 1,44 g dm^{-3} Na_2HPO_4 , 0,24 g dm^{-3} KH_2PO_4 , deH_2O
Otopina MTT-a 10×	5 mg/mL MTT u PBS-u
Otopina HBSS-a 2× (engl. <i>Hank's balanced salt solution</i>) za transfekciju kalcijevim fosfatom	2,979 g HEPES-a, 4,09 g NaCl, 53 mg Na_2HPO_4 , 186,25 g KCl, 250 mL deH_2O , pH 7,04
Otopina APS-a za pripremu poliakrilamidnog gela	10% (w/v) APS
Matična otopina akrilamida i bisakrilamida (AAS, engl.	29,2% (w/v) akrilamid, 0,8% (w/v) bisakrilamid

<i>acrylamide/bisacrylamide stock</i>)	
6× vrući pufer za izolaciju proteina (HLB engl. <i>hot lysis buffer</i>)	0,5 mol dm ⁻³ Tris- HCl, 18% (w/v) SDS, 45% (v/v) glicerol, 0,3 (w/v) bromfenolno plavilo, 18% (v/v) 2-merkaptioetanol
Otopina za blokiranje membrane	5% (w/v) mlijeka u prahu u puferu TBST
Otopina SDS-a za pripravu poliakrilamidnog gela	10% (w/v) SDS
Otopina tripsanskog modrila za brojanje stanica	0,03% (w/v) tripsansko modrilo, 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid, engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>), 1 g dm ⁻³ BSA
Otopina tripsina za odvajanje stanica od podloge	0,25% (w/v) tripsin, 1 mmol dm ⁻³ EDTA
Otopina za bojanje membrane	1 g dm ⁻³ naftalnog plavila, 10% (v/v) metanol, 2% (v/v) octena kiselina, deH ₂ O
Otopina za odbojavanje membrane	50% (v/v) metanol, 7% (v/v) octena kiselina
10x pufer za elektroforezu (RB engl. <i>running buffer</i>)	0,025 mol dm ⁻³ Tris, 0,192 mol dm ⁻³ glicin, 0,1% (w/v) SDS, deH ₂ O
10× pufer za prijenos proteina (TB engl. <i>transfer buffer</i>)	184 mmol dm ⁻³ Tris, 140 mmol dm ⁻³ , glicin, deH ₂ O
1× pufer za prijenos proteina	10% (v/v) 10×TB, 20% (v/v) metanol, 70% (v/v) deH ₂ O
10x otopina pufera za ispiranje membrana (TBST engl. <i>Tris buffered saline+Tween-20</i>)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, deH ₂ O, pH 7,5
Pufer za pripravu poliakrilamidnog gela za razdvajanje	1,5 M Tris, pH 8,8
Pufer za pripravu poliakrilamidnog gela za sabijanje	1,0 M Tris, pH 6,8

3.1.3. Komercijalno dostupni kompleti kemikalija

Koristila sam komercijalno dostupne komplete kemikalija prikazanih su u Tablici 2.

Tablica 2. Komercijalno dostupni kompleti kemikalija, proizvođač te njihova primjena.

Naziv	Proizvođač	Primjena
<i>Absolutely RNA miRNA Kit</i>	Agilent Technologies, SAD	Za izolaciju RNA iz stanica
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, SAD	Za prepisivanje RNA u cDNA

<i>ITI-H5 siRNA (h): sc-90320</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	Smjesa malih interferirajućih RNA za utišavanje ekspresije gena <i>ITIH5</i>
<i>ON-TARGETplus control siRNA, Non-Targeting siRNA#1</i>	Dharmacon, SAD	Mala nespecifična interferirajuća RNA
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen, Njemačka	Za razgradnju DNA tijekom izolacije RNA
<i>Takyon™ Low ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP</i>	Eurogentec, Belgija	Nespecifična fluorescentna boja SYBR za qPCR
<i>Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate</i>	PerkinElmer, SAD	Za detekciju proteina kemiluminiscencijom

3.1.4. Standardi i biljezi veličine

Koristila sam standarde i biljege veličine prikazane u Tablici 3.

Tablica 3. Standardi i biljezi veličine.

Naziv	Proizvođač	Primjena
<i>Precision Plus Protein Standards Dual Color</i>	BioRad, SAD	Biljeg za određivanje molekularne mase proteina raspona 10-250 kDa

3.1.5. Početnice za qPCR

Koristila sam početnice za qPCR prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Početnice za qPCR

Gen	Slijed	Proizvođač
<i>ITIH5</i> (engl. <i>inter-alpha-trypsin</i>)	F 5'-TTCCCGTTATGCCTTCACTAC-3'	MilliporeSigma,

<i>inhibitor heavy chain 5)</i>	R	5'-TTTCGCCCTGATACACCTTG-3'	SAD
<i>RPLP0 (engl. ribosomal protein lateral strak unit P0)</i>	F	5'-GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG-3'	BioRad, SAD
	R	5'-TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC-3'	
<i>TBP (engl. TATA-binding protein)</i>	F	5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3'	Sigma Aldrich, SAD
	R	5'-TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC-3'	

3.1.6. Primarna i sekundarna protutijela

Koristila sam primarna i sekundarna protutijela prikazana u Tablici 5.

Tablica 5. Primarna i sekundarna protutijela.

Naziv protutijela	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
pAkt (Ser473)	kunić	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD
Akt (pan)	miš	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD
Fosfo-p44/42 Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	kunić	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD
ERK	kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, SAD
PCNA	kunić	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD
β -aktin	miš	1:10000	Proteintech, SAD
Anti-rabbit (HRP-linked)	koza	1:5000	Cell Signaling Technology, SAD
Anti-mouse (HRP-linked)	konj	1:5000	Cell Signaling Technology, SAD

3.1.7. Stanične linije

Za potrebe ovoga rada koristila sam komercijalno dostupne adherentne stanične linije melanoma čovjeka A375M i WM793B dobivene ljubaznošću dr. sc. Danielea Bergamaschija

(Blizard Institute, London, Ujedinjeno Kraljevstvo). Obje stanične linije eksprimiraju mutirani protein BRAF V600E i time su osjetljive na vemurafenib. U radu sam koristila i 4 stanične podlinije otporne na vemurafenib (A375M_R1/_R2 i WM793B_R1/_R2) koje su razvijene iz parentalnih linija A375M i WM793B, a dobivene višemjesečnim izlaganjem rastućoj koncentraciji vemurafeniba te uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom (RPMI+VF) (Tadijan *i sur.*, 2021; Radić *i sur.*, 2022).

3.1.8. Hranjive podloge

Hranjive podloge koje sam koristila za uzgoj stanica prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Hranjive podloge.

Kratica	Naziv hranjive podloge	Proizvođač	Sastav
RPMI-P/S	Tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica RPMI 1640 bez antibiotika (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>)	Lonza, Švicarska	Hranjiva podloga u koju je dodan 10% (v/v) FBS, 2 mmol dm ⁻³ L-glutamina i 1 mmol dm ⁻³ natrijeva piruvata
RPMI-kompl.	Kompletirana tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica RPMI 1640 s antibiotikom (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>)	Lonza, Švicarska	RPMI, 100 µg cm ⁻³ penicilina, 100 µg cm ⁻³ streptomicina
RPMI+VF	Kompletirana tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica RPMI-1640 s vemurafenibom - (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>)	Lonza, Švicarska	RPMI-kompl. te vemurafenib s konačnim koncentracijama 1, 2 ili 4 µM
DMEM-P/S	Tekuća hranjiva podloga DMEM za uzgoj stanica bez antibiotika (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD	Hranjiva podloga DMEM u koju je dodan 10% (v/v) FBS, 2 mmol dm ⁻³ L-glutamina i 1 mmol dm ⁻³ natrijeva piruvata

DMEM-kompl.	Kompletirana tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica DMEM s antibiotikom	Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD	DMEM, 100 µg cm ⁻³ penicilina, i 100 µg cm ⁻³ streptomicina
Medij za smrzavanje stanica	Kompletirana tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica RPMI 1640 (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>) s dodatkom DMSO-a	Lonza, Švicarska	RPMI-kompl., 5% DMSO

3.1.9. Uređaji i potrošni materijal

Uređaje koje sam koristila prikazani su u Tablici 7., a potrošni materijal koji sam koristila prikazan je u Tablici 8.

Tablica 7. Uređaji.

Uređaj	Proizvođač
Centrifuga <i>Harrier 18/80</i> s hlađenjem	MSE, Ujedinjeno Kraljevstvo
Centrifuga tip 5414 R	Eppendorf, Njemačka
Fotoapararat uređaja <i>Redmi Note 10</i>	Xiaomi, Kina
Inkubator za uzgoj stanica	Kambič, Slovenija
Kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Iskra, Slovenija
Kružna miješalica <i>Gyro-rocker SSL3 Stuart®</i>	Cole-Parmer Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo
Magnetska miješalica <i>MSH Basic</i>	Ika, Njemačka
Spektrofotometar za mjerenje čistoće uzoraka <i>NanoPhotometer® N60</i>	Implen, Njemačka
Spektrofotometar za mikrotitrarske pločice <i>ELISA Multiscan MS</i>	Labsystems, Finska
Spremnik za tekući dušik	MVE Cryogenics, SAD
Sustav za elektroforezu <i>Mini-Protean II</i>	BioRad, SAD
Sustav za prijenos proteina <i>Mini Trans-Blot</i>	BioRad, SAD

Uređaj za obrnuto prepisivanje <i>Applied Biosystems 7300</i>	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD
Uređaj za qPCR <i>BioRad CFX96 Real Time</i>	BioRad, SAD
Termoblok <i>Thermomixer Comfort</i>	Eppendorf, Njemačka
Tresilica za mikrotitarske pločice tip 715	Asal, Italija
Ultrazvučna sonda <i>Labsonic® M</i> promjera 1 mm	Montreal Biotech, Kanada
Uređaj za vizualizaciju i fotografiranje kemiluminiscentnog signala <i>Alliance 4.7</i>	Uvitec, Ujedinjeno Kraljevstvo
Vaga tip <i>PM 4000</i>	Mettler Toledo, SAD
Zibalica <i>PMR-30 Rocker-Shaker</i>	Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo

Tablica 8. Potrošni materijal.

Materijal	Proizvođač
Ampule za smrzavanje stanica od 2 mL	Greiner Bio-One, Njemačka
Petrijeve zdjelice Falcon® promjera 60 mm i 100 mm za kulturu stanica	Corning Incorporated, SAD
Pločice za kulturu stanica sa 6, 12 ili 24 bunarića	Corning Incorporated, SAD
Mikrotitarske pločice Falcon® s 96 bunarića za kulturu stanica	Corning Incorporated, SAD
Mikroeprovete za qPCR	Sarsted, Njemačka
Mikroeprovete, od 1,5 ili 2,0 mL	Eppendorf, Njemačka
Plastične epruvete Falcon®	Corning Incorporated, SAD
Silikonska strugalica <i>Cell Scraper</i>	Sarsstedt, SAD
Komorica za brojanje stanica Neubauer površine 0,0025 mm ³	Blaubrand Brand, Njemačka
Nitrocelulozna membrana za prijenos proteina Protran BA 85 veličine pora 0.2 μm	GE Healthcare Life Sciences, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.2. Metode rada sa stanicama u staničnoj kulturi

3.2.1. Uzgoj i presađivanje stanica u kulturi

Stanice sam uzgajala na Petrijevim zdjelicama (promjera 100 mm) u tekućem hranjivom mediju i čuvala u inkubatoru na 37 °C. Sve stanice su adherentne i rastu u jednom sloju. Stanice sam presađivala u laminaru dva puta tjedno, odnosno kada bi konfluencija bila oko 80% što sam provjeravala pod invertnim mikroskopom. Hranjive podloge, pufere i sve sterilne otopine koje sam koristila za presađivanje stanica prije korištenja sam zagrijala na 37 °C u termo kupelji. Sve što sam unosila u laminar prethodno sam dezinficirala sa 70% EtOH. Nakon uklanjanja tekućeg medija, stanice sam isprala PBS-om volumena 2 mL i inkubirala u 1 mL otopine tripsina za odvajanje stanica od podloge na 37 °C par minuta. Odvojenost stanica od površine provjerila sam na invertnom mikroskopu te ako je tripsinizacija bila uspješna, daljnje djelovanje tripsina spriječila sam dodatkom medija u omjeru 1:4 (tripsin:medij). Takvu smjesu dobro sam resuspendirala te 1/10 smjese stanica vratila u Petrijevu zdjelicu i dodala medij tako da ukupan volumen bude 10 mL. Ostatak stanica sam zamrznula, skupila taloge ili prebrojala pa koristila za pokuse.

Za parentalne linije A375M i WM793B koristila sam podlogu RPMI-kompl., a za održavanje staničnih podlinija otpornih na vemurafenib RPMI+VF. Konačna koncentracija vemurafeniba u podlozi RPMI+VF razlikovala se ovisno o podlinijama. Za podliniju A375M_R1 iznosila je 1 µM, za podliniju A375M_R2 iznosila je 2 µM, a za podlinije WM793B_R1 i WM793B_R2 iznosila je 4 µM.

Sav rad sa stanicama izvodila sam u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim strujanjem sterilnog zraka pri čemu sam koristila sterilne otopine i pribor.

Otpornost staničnih podlinija na vemurafenib potvrđena je usporedbom preživljenja parentalnih staničnih linija i podlinija otpornih na vemurafenib pri istoj koncentraciji vemurafeniba. U tu svrhu provela sam test MTT pri čemu sa za izračun preživljenja koristila formulu:

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica}}{\text{apsorbancija netretiranih stanica}} \times 100.$$

Na staničnoj liniji WM793B i podlinijama otpornima na vemurafenib WM793B_R1 i WM793B_R2 najviša koncentracija vemurafeniba kojoj su bile izložene sve stanične linije

bila 10 μM . Pri toj koncentraciji preživljenje parentalne stanične linije WM793B bilo je 47%, dok je za podliniju WM793B_R1 bilo 68%, a za podliniju WM793B_R2 63%. Za staničnu liniju A375M i podlinije A375M_R1 i A375M_R2 najviša koncentracija vemurafeniba kojoj su bile izložene iznosila je 0,1 μM . Preživljenje parentalne stanične linije A375M pri toj koncentraciji iznosilo je 11%. Učinak vemurafeniba ove koncentracije na podliniju A375M_R1 nije uočljiv, odnosno preživljenje je 104% u odnosu na netretiranu kontrolu, dok je preživljenje A375M_R2 linije 95%.

3.2.2. Zamrzavanje i odmrzavanje stanica

Tijekom rada sa stanicama dio stanične kulture pojedine linije sam odvojila, zamrzнула i tako sačuvala za daljnje korištenje. Stanice odvojene od podloge otopinom tripsina resuspendirala sam u mediju za uzgoj stanica i prebacila u epruvetu odgovarajućega volumena te spustila na dno centrifugiranjem 5 minuta na 1200 rpmi pri 4 °C. Talog stanica resuspendirala sam u 1 mL medija za zamrzavanje te prebacila u ampulu za zamrzavanje. Ampule su čuvane u zamrzivaču na -80 °C i u spremniku za tekući dušik. Zamrznute stanice koje su mi bile potrebne odmrzavala sam naglo u termo kupelji na 37 °C nakon čega sam sav sadržaj prebacila u Petrijevu zdjelicu odgovarajućeg promjera u koju sam prethodno stavila 10 mL RPMI-kompl. zagrijanoga na 37 °C.

3.2.3. Skupljanje taloga stanica

Talog staničnih kultura čiji mi je stanični materijal bio potreban za pokuse skupila sam metodom struganja na ledu. Stanice pričvršćene na podlogu isprala sam PBS-om te sastrugala u PBS-u na ledu silikonskom strugalicom koju sam prethodno dezinficirala 70% EtOH. Dobivenu suspenziju stanica prenijela sam u epruvetu od 15 mL i centrifugirala 5 minuta na 1200 rpmi i 4 °C. Suhi talog stanica pohranila sam u zamrzivač na -80 °C.

3.2.4. Brojanje živih stanica

Za određivanje broja stanica u suspenziji koristila sam Neubauer komorice za brojanje stanica. Iz suspenzije stanične kulture pripremljene podizanjem od podloge otopinom tripsina, uzela sam 20 μL i pomiješala s 80 μL tripanskoga modrila. Takvu smjesu nanijela sam ispod pokrovnice na Neubauer komorici. Pod invertnim mikroskopom pronašla sam

iscrtanu mrežicu na komorici i prebrojala broj stanica u četiri kutna kvadrata. S obzirom da uzorak za brojanje sadrži pet puta razrijeđenu staničnu suspenziju, ukupan broj stanica u suspenziji po mililitru dobila sam uvrštavanjem vrijednosti u formulu:

$$\text{broj stanica / mL} = \frac{\text{ukupan broj stanica}}{\text{broj izbrojanih kvadrata}} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 10^4$$

(broj izbrojanih kvadrata= 4, faktor razrjeđenja= 5).

3.2.5. Kratkotrajni tretman vemurafenibom

Za provjeru učinka vemurafeniba na ekspresiju gena *ITIH5* napravila sam kratkotrajni tretman vemurafenibom na staničnim linijama WM793B i A375M. U pločicu s 12 bunarića nasadila sam 6×10^5 stanica po bunariću u mediju RPMI-kompl. Drugi dan od nasađivanja jednom setu stanica koji se sastojao od dva tehnička replikata zamijenila sam RPMI-kompl. RPMI+VF-om pri čemu sam za staničnu liniju WM793B koristila medij konačne koncentracije vemurafeniba $4 \mu\text{M}$, a za staničnu liniju A375M $2 \mu\text{M}$. Drugom setu stanica koji je predstavljao netretirane kontrolne uzorke stavila sam novi RPMI-kompl. Sutradan sam skupila taloge te ih pohranila za sljedeće pokuse.

3.2.6. Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim RNA

U svrhu prolaznoga utišavanja ekspresije gena *ITIH5* u staničnim linijama A375M i WM793B koristila sam metodu prolazne transfekcije stanica malim interferirajućim RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*) pomoću kalcijevog fosfata. Transfekciju sam provela na stanicama uzgojenima u pločicama s 12 bunarića. U svaki sam bunarić nasadila 1×10^5 stanica u $400 \mu\text{L}$ tekućeg medija DMEM-P/S. Transfekciju stanica provela sam metodom izravnog utišavanja. Dan nakon utišavanja pripremila sam transfekcijsku smjesu sastava prikazanog u Tablici 9. U mikroepruvetu sam dodala siRNA, CaCl_2 i deioniziranu vodu te lagano pomiješala smjesu mikropipetom. Nakon toga sam dodala pufer $2 \times \text{HBSS}$, sve zajedno pomiješala i pričekala jednu minutu. U svaki sam bunarić nanijela po $40 \mu\text{L}$ transfekcijske smjese u kojoj je konačna koncentracija siRNA bila $0,55 \mu\text{M}$ u obliku kapljica s ciljem

pokrivanja što veće površine. Za prolazno utišavanje ekspresije gena *ITIH5* koristila sam komercijalno dostupnu smjesu siRNA koja se sastoji od tri individualne siRNA koje ciljaju sekvence mRNA *ITIH5*, a kao negativnu kontrolu koristila sam nespecifičnu siRNA. Dan nakon nanošenja transfekcijske smjese takve sam stanice nasadila na mikrotitarske pločice za provođenje testa MTT ili sam skupila taloge za daljnje pokuse.

Tablica 9. Sastav i volumen kemikalija za prolaznu transfekciju stanica kalcijevim fosfatom na pločicama s 12 bunarića.

Sastavnica	Volumen po jednoj jažici/ μL
siRNA (5 μM)	4,4
CaCl ₂ (2,5 M)	2
mqH ₂ O	13,6
HBSS 2x	20
ukupan volumen	40

3.2.7. Određivanje preživljenja i proliferacije stanica testom MTT

Test MTT kolorimetrijska je metoda za određivanje metaboličke aktivnosti stanica što je usporedivo s preživljenjem stanica. Dodatkom tetrazolijeve soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) koja je žute boje, u metabolički aktivnim stanicama ta boja reducirana je u ljubičaste kristale formazana zahvaljujući NAD(P)H-ovisnim staničnim oksidoreduktazama. Nastali netopljivi kristali trebaju se otopiti u dimetilsulfoksidu (DMSO) te se njihova koncentracija tada mjeri spektrofometrijski na 570 nm. Upravo zbog toga, ovaj test može služiti kao test vijabilnosti stanica tijekom izlaganja nekoj supstanci gdje je koncentracija nastaloga formazana proporcionalna broju živih, odnosno metabolički aktivnih stanica (Berridge *i sur.*, 2005).

Test MTT provela sam tijekom pet dana na pločicama s 96 bunarića. Prvi dan nasadila sam 2×10^3 stanica po bunariću u 90 μL pri čemu sam svaku staničnu liniju nasađivala u triplikatima. Sljedećeg dana tretirala sam stanice serijskim razrjeđenjima vemurafeniba i nakon toga uzgajala u inkubatoru na 37 °C. Peti dan od nasađivanja odstranila sam sadržaj iz bunarića pri čemu su u bunarićima ostale samo pričvršćene (žive) stanice. U svaki bunarić dodala sam 40 μL otopine $1 \times$ MTT i vratila pločicu u inkubator u trajanju od tri sata na 37 °C. Nakon toga dodala sam 170 μL DMSO-a po bunariću pri čemu je otapanje formazana

pospješeno na tresilici za mikrotitarske pločice u trajanju od 30 minuta. Kada bi se svi kristali otopili i boja ravnomjerno rasporedila, apsorbanciju sam očitala na spektrofotometru za mikrotitarske pločice pri 570 nm. Preživljenje stanica izračunala sam na temelju srednje vrijednosti dobivenih apsorbancija kojima sam oduzela slijepu probu (bunarići u koje sam nanosila 40 μL otopine $1\times$ MTT i 170 μL DMSO-a) pri čemu sam apsorbancije normalizirala na odgovarajuće netretirane uzorke.

Test MTT koristila sam i za utvrđivanje proliferacije stanica nakon transfekcije siRNA. U tu svrhu u staničnim linijama WM7935 i A375M utišala sam *ITIH5* transfekcijom male interferirajuće RNA. Drugi dan nakon transfekcije, nasadila sam četiri mikrotitarske pločice s 96 bunarića. Po bunariću sam nasadivala 2×10^3 stanica u 100 μL medija, a svaki biološki uzorak (kontrole i stanice transfecirane malom interferirajućom RNA) nasadivala sam u peteroplikatima. Na pločicama sam provodila test MTT u četiri različite vremenske točke od nasađivanja. Pločicu koja se uzima za vremensku točku od 0 sati predstavlja pločica na kojoj je test MTT proveden 24 sata nakon nasađivanja. Isto sam ponovila i za pločice koje predstavljaju 24 sata (48 sati nakon nasađivanja), 72 sata (96 sati nakon nasađivanja) i 96 sat (120 sati nakon nasađivanja) od nasađivanja. Svaki sam tretman nasadivala u tehničkim peteroplikatima. Proliferaciju stanica izračunala sam prema srednjim vrijednostima dobivenih apsorbancija koje sam usporedila kroz različite vremenske točke za svaki tretman.

3.3. Analiza RNA

3.3.1. Izdvajanje ukupne RNA

Za analizu ekspresije gena u stanicama qPCR-om prvo je potrebno izolirati ukupnu RNA. Za izolaciju ukupne RNA u stanicama koristila sam komplet za izolaciju RNA prema uputama proizvođača. Detaljnije, talog stanica lizirala sam puferom (engl. *Lysis Buffer*) uz dodatak 10% β -2-merkaptoetanolu i homogenizirala provlačenjem kroz 21-gauge špricu 7 puta. U tako pripremljeni homogenat dodala sam 70% EtOH i vorteksirala 15 sekundi pazeći da nije ostao vidljivi talog. Uzorke sam zatim propustila kroz filter membranu kolonice i centrifugirala 15 sekundi na $12\ 000 \times g$ na sobnoj temperaturi. Kako bih uklonila DNA iz uzorka, nakon centrifugiranja na kolonicu sam dodala 80 μL otopine enzima DNaze u puferu RDD koja se sastojala od 10 μL DNaze i 70 μL pufera RDD. Nakon 10 minuta membranu sam isprala sa 700 μL pufera za ispiranje pod brojem 1 (engl. *Wash Buffer I*) i centrifugirala

u trajanju od 15 sekundi na 12 000 x g pri sobnoj temperaturi. Membranu sam zatim isprala dva puta s 500 µL pufera za ispiranje pod brojem 2 (engl. *Wash Buffer II*), centrifugirala pri istim uvjetima i bacila konačni filtrat. Membranu s vezanom RNA dodatno sam osušila centrifugiranjem kolonice dvije minute pri istim uvjetima. Kolonicu s membranom zatim sam postavila u novu mikroeprijetvu te dodala 30 µL vode bez ribonukleaza (engl. *RNase-free water*), inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi i centrifugirala dvije minute pri prethodno navedenim uvjetima kako bih eluirala RNA. RNA sam čuvala u mikroeprijetvama u zamrzivaču na -80 °C.

3.3.2. Određivanje koncentracije RNA

Učinkovitost izolacije RNA provjerila sam mjerenjem kvalitete i koncentracije RNA na spektrofotometru za mjerenje čistoće uzoraka. Kao slijepu probu koristila sam vodu bez ribonukleaza jer je u toj otopini RNA eluirana. Čistoću izolacije RNA s obzirom na prisutnost proteina provjerila sam prema omjeru A260/A280 gdje je prihvatljiva vrijednost za RNA iznosila 2,0-2,2, a čistoću s obzirom na soli omjerom A260/A230 gdje je prihvatljiva vrijednost također iznosila 2,0-2,2.

3.3.3. Reverzna transkripcija

Izoliranu RNA prepisala sam u komplementarnu DNA (cDNA) (engl. *reverse transcription*) koristeći kemikalije iz komercijalnog kompleta za prepisivanje RNA u cDNA (Tablica 10.) prateći upute proizvođača.

Tablica 10. Potrebne kemikalije i njihovi volumeni za jednu reakciju reverzne transkripcije.

Sastavnica	Volumen/µL
pufer za reverznu transkripciju <i>RT Buffer</i> 10x	2,0
nukleozid trifosfati <i>dNTP mix</i> 25x (100 mM)	0,8
nasumične početnice <i>Random Primers</i> 10x	2,0
reverzna transkriptaza <i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	1,0
mqH ₂ O + RNA (do 2 µg)	prema izračunu
ukupan volumen	20

Sve kemikalije čuvala sam na ledu. Matičnu otopinu sastavljenu od pufera za reverznu transkripciju, nukleozid trifosfata, nasumičnih početnica te reverzne transkriptaze pipetirala sam u svaku mikroeprevetu, a zatim dodala volumen RNA do konačne količine od 2 µg. Ovisno o volumenu RNA, dodala sam deioniziranu vodu tako da ukupni volumen u svakoj reakcijskoj smjesi bude 20 µL nakon čega sam sadržaj smjese promiješala pipetom nekoliko puta. Nakon kratkog centrifugiranja pripremljene sam uzorke stavila u uređaj za reverznu transkripciju i pokrenula program prema uvjetima u Tablici 11.

Tablica 11. Uvjeti programa za reverznu transkripciju.

Koraci	1	2	3	4
Temperatura/°C	25	37	85	4
Vrijeme/min	10	120	5	∞

3.3.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

Kvantitativna polimerazna lančana reakcija ili qPCR je metoda kojom je omogućeno istovremeno umnožavanje, ali i kvantifikacija uzorka DNA (Higuchi *i sur.*, 1993). Za uspješnu qPCR reakciju potrebno je imati DNA kalup od interesa, DNA polimerazu, DNA početnice komplementarne 3'- kraju DNA od interesa, nukleotide, katione (uglavnom Mg²⁺) koji su kofaktori za DNA polimerazu te puferu koji pružaju optimalan kemijski okoliš za izvođenje reakcije. Cijela se reakcija temelji na ciklusima izmjene temperature, a izvodi se u qPCR uređaju. Ciklus započinje denaturacijom ili razdvajanjem DNA lanaca što se izvodi na 94-98 °C tijekom približno 30 sekundi do 5 minuta (ovisno o duljini DNA te nukleotidima od kojih se sastoji) nakon čega slijedi prijanjanje početnica na sada jednolančanu DNA od interesa što se postiže snižavanjem temperature na 45-65 °C u trajanju 20-30 sekundi. Zadnji korak je produljenje lanaca ili elongacija koji se odvija zahvaljujući polimerazi i nukleotidima u reakcijskoj smjesi. Temperatura ovoga koraka ovisi o polimerazi koja se koristi i duljini DNA od interesa. Najčešće korištena DNA polimeraza je polimeraza Taq koja ima optimum replikacije na 70-80 °C (van Pelt-Verkuil *i sur.*, 2008). Kvantifikacija

novosintetizirane DNA moguća je zahvaljujući fluorescentnoj boji ili fluorescentno označenim probama koje uređaj za qPCR može prepoznati. Najpoznatija fluorescentna boja je SYBR Green koja se ugrađuje u novosintetiziranu dvolančanu DNA što pojačava njezinu fluorescenciju. Napredovanjem qPCR reakcije pojačava se fluorescencija takvih boja. Fluorescentno označene probe vežu se na sekvencu od interesa. Na takvim probama fluorescentna boja je na jednom kraju, a molekula koja utišava fluorescenciju na drugom kraju probe. Probe su komplementarne dijelu kalupa pa se vežu na denaturiranu jednolančanu DNA. Egzonukleaznom 5'-3' aktivnošću polimeraze Taq u sljedećem ciklusu qPCR reakcije proba bude pocijepana čime je onemogućeno daljnje utišavanje fluorescencije (Arya *i sur.*, 2005).

Za provjeru ekspresije gena *ITIH5* u uzorcima, pripremila sam matičnu otopinu qPCR reakcije ovisno o broju uzoraka prema Tablici 12. Nakon što sam ispipetirala 9 μL matične otopine u svaku mikroeprovetu dodala sam po 1 μL cDNA od interesa ili DNA referentnog gena čija mi je ekspresija poslužila za normalizaciju reakcije na početnu količinu DNA u uzorku. Tako pripremljene mikroeprovete kratko sam centrifugirala kako bi se sastav mikroeprovete spustio na dno. Nakon toga sam mikroeprovete s uzorcima stavila u uređaj za qPCR prema programu u kojemu se razdvajanje lanaca odvijalo tijekom 10 sekundi na 95 °C, a prijanjanje i produljenje tijekom 50 sekundi na 60 °C. Ovakav ciklus ponovio se 40 puta.

Tablica 12. Potrebne kemikalije i njihovi volumeni za jednu qPCR reakciju.

Sastavnica	Volumen za jednu reakciju/ μL
SYBR Green	5
uzvodna početnica (10 μM)	0,4
nizvodna početnica (10 μM)	0,4
mqH ₂ O	3,2
DNA kalup (25 ng/ μL)	1
ukupan volumen	10

3.4. Priprema i analiza ekspresije proteina metodom Western blot

Metoda Western blot koristi se za razdvajanje i analizu proteina iz smjese. Metoda se sastoji od tri osnovna koraka. Najprije se proteini razdvajaju na temelju mase zahvaljujući SDS-elektroforezi u poliakrilamidnom gelu. SDS (eng. *sodium dodecyl sulfate*) negativno je

nabijeni deterdžent koji je sastavni dio gela i koji denaturira oligomerne proteine iz uzorka omogućujući stvaranje kompleksa između SDS-a i polipeptidnih lanaca proteina čiji je naboj negativan zahvaljujući SDS-u. Time je omogućeno njihovo razdvajanje na temelju molekularne mase s obzirom da sada svi oligomerni proteini imaju jednak omjer mase i naboja. Propuštanjem struje kroz gel, negativno nabijeni proteini putuju prema anodi pri čemu manji proteini kroz pore gela putuju brže. Sljedeći je korak prijenos proteina iz poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu. Prijenos je omogućen slaganjem gela i membrane jedno na drugo. Propuštanjem struje kroz gel okomito s obzirom na površinu gela, proteini putuju u smjeru anode i time se prenose na membranu u rasporedu prema kojemu su bili razdvojeni u elektroforezi. Membranu s vezanim proteinima potrebno blokirati što sprječava nespecifično vezanje primarnog protutijela na membranu. Slijedi inkubacija membrane s otopinom primarnog protutijela. Primarna protutijela životinjskog su podrijetla i visoke su specifičnosti za proteine od interesa što omogućuju njihovu interakciju. Vizualizacija mjesta i količine vezanja primarnih protutijela na protein od interesa omogućena je sekundarnim protutijelom. Sekundarna protutijela moraju biti podrijetlom iz iste životinje kao i primarna što omogućuje njihovu interakciju. Nakon vezanja sekundarnoga na primarno protutijelo, na membranu se dodaje kemiluminiscentni supstrat. Zahvaljujući enzimu, najčešće hrenovoj peroksidazi (HRP engl. *horseradish peroxidase*), koji je vezan na sekundarno protutijelo, kemiluminiscentni supstrat se razgrađuje što dovodi do stvaranja kemiluminiscentnog signala koji se zatim fotografira i dalje analizira (Gwozdz *i sur.*, 2017).

3.4.1. Izdvajanje proteina iz stanica vrućim puferom

Za analizu Western blot prvo je potrebno izdvojiti proteine iz stanica. Izdvajanje proteina radila sam 1x vrućim puferom koji se priprema iz koncentriranog 6x vrućeg pufera za izdvajanje proteina. Za analizu proteina, stanice sam uzgajala na pločicama od 24 bunarića, zatim sam ih isprala PBS-om i u svaki bunarić dodala 50 μ L 1x vrućeg pufera kojeg sam prethodno zagrijala na 96 °C. Sadržaj stanica zatim sam prenijela u mikroeprevetu i grijala u termobloku na 96 °C 5 minuta. Svaki uzorak nakon što se ohladio sonicirala sam 10 sekundi ultrazvučnom iglom promjera 1 mm pri amplitudi od 80 Hz uz razmak od 5 sekundi na ledu. Tako pripremljene uzorke nanijela sam na gel ili pohranila za daljnje korištenje na -20 °C.

3.4.2. Priprema gelova i pufera za diskontinuiranu elektroforezu (SDS-PAGE)

Za diskontinuiranu elektroforezu potrebno je pripremiti dva različita poliakrilamidna gela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje. Svrha gela za sabijanje je koncentriranje svih proteina u uzorku u jednoj horizontalnoj liniji, dok se u gelu za razdvajanje proteini razdvajaju na temelju molekularne mase. Zbog različitih uloga u elektroforezi gelovi su različitoga sastava i pripremaju se u različitim puferima prema Tablici 13. Također, koncentracija poliakrilamida u gelu za razdvajanje ovisi o veličini promatranih proteina gdje se gelovi veće koncentracije poliakrilamida koriste za proučavanje manjih proteina, dok se gelovi manje koncentracije koriste za proučavanje većih proteina. Za razliku od gela za razdvajanje, gel za sabijanje je uvijek 5%-tni poliakrilamidni gel.

Tablica 13. Sastav smjese gelova za sabijanje i razdvajanje.

GEL ZA SABIJANJE 5% (3 mL)	
Sastavnica	Volumen/mL
deH ₂ O	2,1
AAS 30%	0,5
Tris pufer 1M (pH 6,8)	0,38
SDS 10%	0,03
APS 10%	0,03
TEMED	0,003

GEL ZA RAZDVAJANJE 10% (10 mL)	
Sastavnica	Volumen/ mL
deH ₂ O	4,0
AAS 30%	3,3
Tris pufer 1,5M (pH 8,8)	2,5
SDS 10%	0,1
APS 10%	0,1
TEMED	0,004

Gelove sam pripremila izlivanjem između stakalaca za elektroforezu s razmakom od 1,5 mm. Prije izlivanja stakalca sam dobro pritislula plastičnim hvataljkama i pričvrstila na

postolje za pripremu gelova. Prvo sam dodala smjesu gela za razdvajanje ispunivši tako dvije trećine prostora između stakalaca. Zatim sam na smjesu gela dodala destiliranu vodu i ostavila barem 45 min dok se gel ne bi polimerizirao. Nakon toga, odlila sam vodu i na gel za razdvajanje dodala sam gel za sabijanje do vrha pokrovnoga stakalca. U gel za sabijanje umetnula sam češljic zahvaljujući kojemu se oblikuju jažice u koje se poslije unose uzorci te pričekala da se gel za sabijanje polimerizira za što je bilo dovoljno 20 minuta.

3.4.3. Razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu

Nakon polimerizacije gelova, odstranila sam češljic iz gela za sabijanje. Stakalca s gelovima postavila sam u sustav za okomitu elektroforezu koji sam ispunila 1x puferom za elektroforezu koji se priprema razrjeđivanjem 10x pufera za elektroforezu. U prvu jažicu gela dodala sam 2 μ L biljega za određivanje molekularne mase proteina, dok sam u ostale jažice nanijela 20 μ L uzorka. Nakon nanošenja uzoraka gelovi su spremni za elektroforezu pri čemu sam sustav za elektroforezu spojila na uređaj za napajanje i započela elektroforezu prvih 30 min pri konstantnom naponu od 80 V. Nakon ulaska uzorka u gel za sabijanje elektroforezu sam provodila pri konstantnom naponu od 120 V. Zahvaljujući boji koja se nalazi u biljegu i u vrućem puferu u kojemu su uzorci pratila sam frontu putovanja uzorka u gelu. Elektroforezu sam zaustavila kada bi fronta bila pri kraju gela za razdvajanje.

3.4.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu

Razdvojene proteine nakon elektroforeze potrebno je prenijeti s gela na nitroceluloznu membranu. Stakalca pažljivo sam izvadila iz sustava za vertikalnu elektroforezu, nakon čega sam razdvojila gel od stakalca te odstranila gel za sabijanje. Za prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu koristila sam tehniku mokrog prijenosa koja uključuje sastavljanje sendviča za prijenos (engl. *transfer sandwich*) u 1x puferu za prijenos. Sendvič za prijenos uključuje spužvice, dva filter papira, nitroceluloznu membranu i gel koje je prethodno potrebno uravnotežiti u 1x puferu za prijenos. Sendvič se slaže između nosača za prijenos, pri čemu se prvo stavlja spužvica, zatim dva filter papira, nitrocelulozna membrana i gel. Mjehuriće zraka koji se mogu pojaviti između gela i membrane odstranila sam malim valjkom. Na gel sam potom nanijela dva filter papira i spužvicu te zatvorila nosač. Nosač sam smjestila okomito u sustav za prijenos u koji sam dodala 1x pufer za prijenos, kadicu s ledom

za hlađenje cijelog sustava i magnet. Prijenos se odvija na magnetskoj mješalici preko noći pri konstantnom naponu od 13 V na hladnom.

3.4.5. Bojanje i blokiranje membrane

Za utvrđivanje uspješnosti prijenosa i za vizualizaciju odvojenih proteina, membranu je potrebno obojati. Membranu sam bojala u otopini za bojanje membrane u trajanju od 30 sekundi na zibalici, nakon čega sam ju isprala dva puta po 1 minutu u otopini za odbojavanje dok ne bi ostali vidljivi samo proteini. Membranu sam zatim isprala 1x puferom za ispiranje membrane na zibalici u trajanju od 5 min i nakon toga fotografirala. Za blokiranje membrane koristila sam otopinu za blokiranje koja se sastoji od 5%-tne otopine mlijeka u prahu otopljenog u 1x puferu za ispiranje membrane. Blokiranje membrane traje 30 minuta na zibalici, a sprječava nespecifično vezanje protutijela na membranu.

3.4.6. Inkubacija membrane u otopini primarnog i sekundarnog protutijela

Nakon blokiranja, membranu sam inkubirala u otopini primarnoga protutijela na zibalici preko noći na 4 °C. Otopinu primarnog protutijela pripremila sam u otopini za blokiranje membrane razrjeđenja navedenog u Tablici 4. Sutradan sam membranu isprala 1x puferom za ispiranje membrane tri puta po 5 minuta kako bih uklonila otopinu primarnog protutijela. Membranu sam zatim inkubirala u otopini sekundarnog protutijela 1 sat na zibalici na sobnoj temperaturi. Prije imunodetekcije, isprala sam ju tri puta po 5 minuta na zibalici s 1x otopinom za ispiranje membrane kako bih uklonila višak otopine sekundarnog protutijela.

3.4.7. Kemiluminiscentna imunodetekcija proteina na nitroceluloznoj membrani

Za kemiluminiscentnu detekciju proteina koristila sam komercijalno dostupan komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom u kojem se nalaze dvije otopine, luminol i peroksid. Otopine sam pomiješala u omjeru 1:1 i na membranu nanijela 700-1000 µL kemiluminiscentnog supstrata. Uzimajući u obzir da sekundarna protutijela imaju vezan enzim hrenovu peroksidazu koja cijepa luminol u prisutnosti peroksida, dodatkom

kemiluminiscentnog supstrata na membranu nastaje kemiluminiscentni signal koji se fotografira uređajem *Uvitec Alliance* u mraku.

3.5. Statistika

Statističku obradu podataka radila sam u programu GraphPad Prism (v.8, Dotmatics, UK). Za izračun standardne devijacije koristila sam Excelovu ugrađenu funkciju STDEV.S. Podaci su provjereni za odudaranje od Gaussove (normalne) raspodjele i za homogenost varijance u programu GraphPad Prism. Ako su podaci pratili Gaussovu raspodjelu te su im varijance bile homogene, statističku značajnost računala sam studentovim t-testom, a u slučajevima s dva ili više setova podataka koristila sam analizu ANOVA s post-hoc testom Tukey. U suprotnom, koristila sam neparametrijski test Mann-Whitney, a kod više setova test Kruskal-Wallis s post-hoc testom Dunnet. Dobivene p-vrijednosti smatrala sam statistički značajnima ako su bile manje ili jednake od $p = 0,05$.

4. REZULTATI

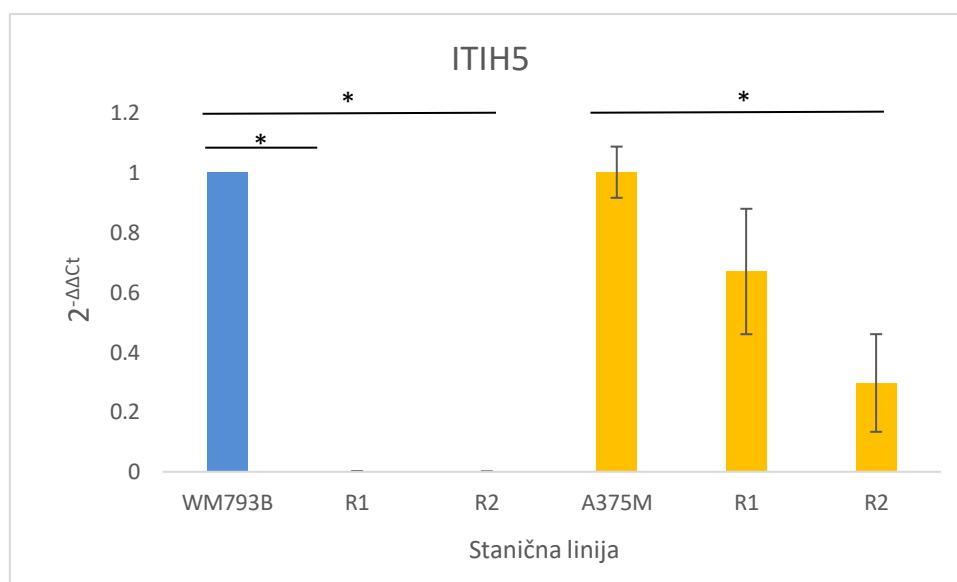
U sklopu ovoga diplomskoga rada provjerila sam razliku u ekspresiji gena *ITIH5* između parentalnih staničnih linija (WM793B i A375M) i pripadajućih podlinija otpornih na vemurafenib (R1 i R2) te utvrdila utječe li utišavanje gena *ITIH5* na otpornost parentalnih linija na terapiju vemurafenibom, na proliferaciju stanica i na aktivnost signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT. Ekspresiju gena *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama i podlinijama otpornima na vemurafenib provjerila sam metodom qPCR. Također, qPCR-om sam na razini ekspresije gena provjerila i učinkovitost utišavanja *ITIH5* u parentalnim linijama nakon prolazne transfekcije malim specifičnim interferirajućim RNA (siRNA) metodom kalcijevog fosfata. Osjetljivost na vemurafenib parentalnih linija, podlinija otpornih na vemurafenib i parentalnih linija nakon utišavanja gena *ITIH5* provjerila sam testom MTT. Testom MTT provjerila sam i proliferaciju parentalnih linija nakon utišavanja gena *ITIH5*. Metodom Western blot provjerila sam razinu proteina PCNA (biljega proliferacije), proteina pERK i ERK (biljega aktivnosti signalnog puta MAPK) te proteina pAKT i AKT (biljega aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT) u stanicama parentalnih linija nakon utišavanja gena *ITIH5*.

4.1. Provjera ekspresije gena *ITIH5* metodom qPCR

Ekspresiju gena *ITIH5* provjeravala sam metodom qPCR na kalupu cDNA koja je prepisana iz izolirane RNA reverznom transkripcijom. Metoda uključuje eksponencijalni rast produkta svakim ciklusom reakcije koji se prati ugradnjom fluorescentne boje SYBR Green u novosintetizirane DNA lance i povećanjem fluorescencije. Broj ciklusa potreban da fluorescentni signal poraste iznad praga detekcije naziva se Ct (engl. *cycle threshold*) i obrnuto je proporcionalan količini DNA u uzorku. Prema tome, ako je gen *ITIH5* manje eksprimiran, kasnije će se prijeći prag detekcije, a vrijednost Ct za taj uzorak bit će veća u odnosu na uzorak s više eksprimiranim genom *ITIH5*. Rezultate sam analizirala metodom $\Delta\Delta Ct$ koja uključuje Ct vrijednosti ciljnog gena *ITIH5* i referentnih gena *RPLP0* ili *TBP* u tretiranom/utišanom uzorku i u netretiranom/kontrolnom uzorku. Ekspresija gena *ITIH5* može se izraziti razinom ekspresije kao promjenom u ekspresiji ciljnog *ITIH5* u odnosu na referentni gen ($\Delta Ct = Ct(\text{ciljni gen}) - Ct(\text{referentni gen})$) i relativnom promjenom u ekspresiji ($\Delta\Delta Ct$) tretiranog/utišanog uzorka u odnosu na kontrolni uzorak ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tretirani/utišani uzorak}) - \Delta Ct(\text{kontrolni uzorak})$).

4.1.1. Provjera ekspresije gena *ITIH5* u parentalnim linijama i podlinijama otpornim na vemurafenib

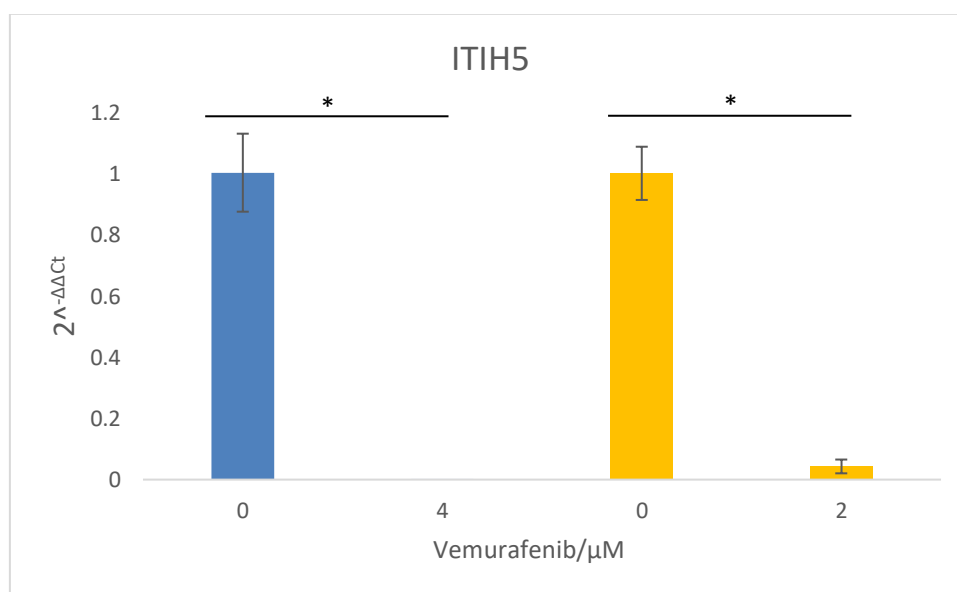
Kako bih utvrdila ekspresiju *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama WM793B (plavo) i A375M (žuto) te pripadajućim podlinijama otpornima na vemurafenib (R1 i R2) provela sam metodu qPCR na cDNA koja je dobivena reverznom transkripcijom iz RNA izolirane iz tih stanica. Rezultate sam analizirala metodom $\Delta\Delta C_t$ gdje sam kao referentni gen koristila *RPLP0*, a kao kontrolu odgovarajuću parentalnu staničnu liniju. Rezultati pokazuju da je *ITIH5* slabije eksprimiran u podlinijama otpornima na vemurafenib u odnosu na parentalne linije (Slika 8.). Rezultati ukazuju da tretman vemurafenibom utječe na ekspresiju gena *ITIH5*.



Slika 8. Ekspresija gena *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama WM793B (plavo) i A375M (žuto) te u pripadajućim podlinijama otpornima na vemurafenib R1 i R2 utvrđena metodom qPCR. Rezultati prikazuju relativnu ekspresiju gena *ITIH5* normaliziranu prema referentnom genu *RPLP0* i parentalnoj liniji. Na grafu je prikazana i standardna devijacija te p -vrijednost ($*p < 0,05$). Statistička analiza provedena je u programu GraphPad Prism koristeći test ANOVA s post-hoc metodom Tukey zasebno za A375M i WM793B set staničnih linija. Prikazan je reprezentativni od ukupno tri ponovljena pokusa u kojima je svaki biološki replikat napravljen u tehničkim triplikatima.

4.1.2. Provjera ekspresije gena *ITIH5* u parentalnim linijama nakon kratkotrajnog tretmana vemurafenibom

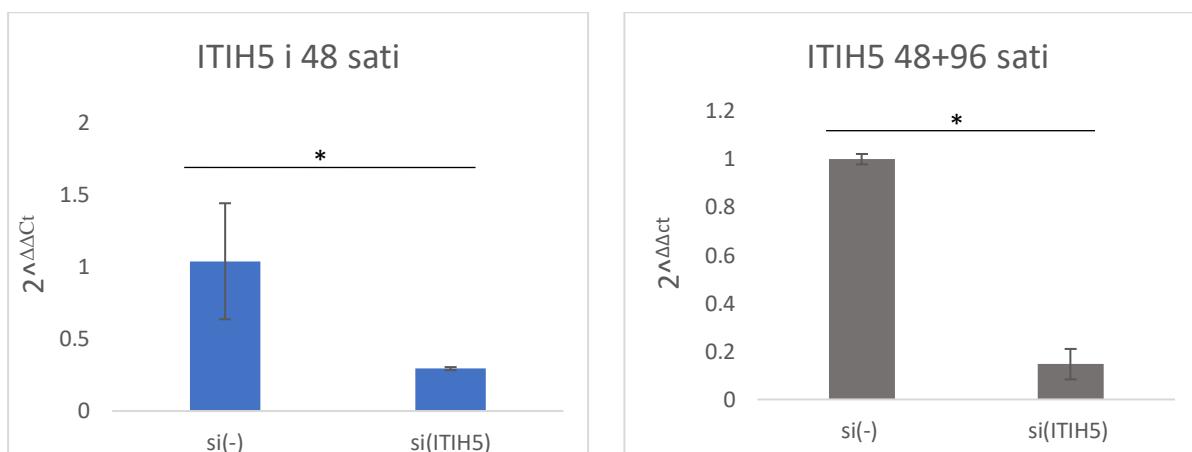
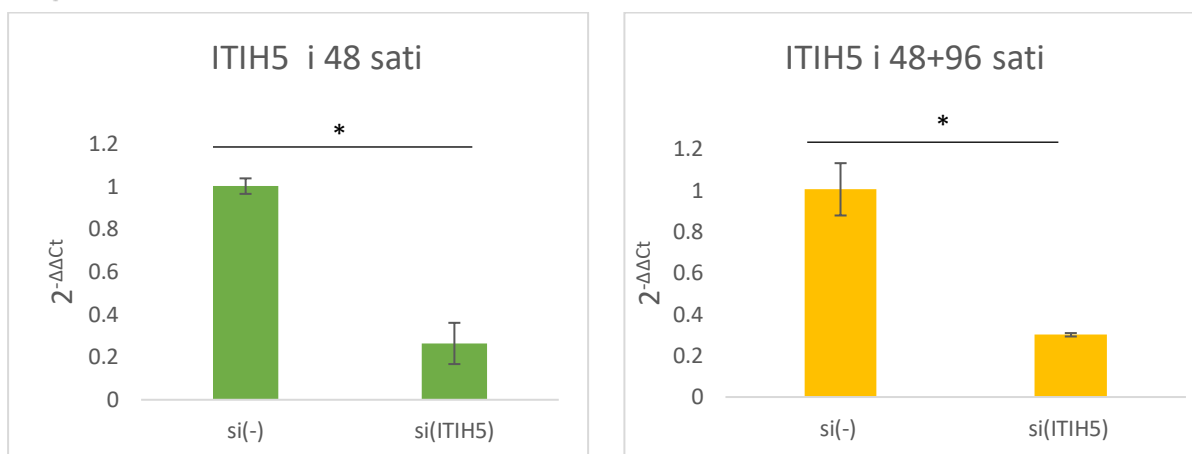
Kako bih provjerila utječe li vemurafenib na ekspresiju gena *ITIH5* u staničnim linijama WM793B (plavo) i A375M (žuto), stanice sam tretirala 24 sata različitim krajnjom koncentracijom vemurafeniba ovisno o koncentraciji vemurafeniba u kojoj se uzgajaju pripadajuće podlinije otporne na vemurafenib (potpoglavlje 3.2.5.). Staničnu liniju WM793B tretirala sam vemurafenibom krajnje koncentracije 4 μM , dok sam staničnu liniju A375M tretirala vemurafenibom krajnje koncentracije 2 μM . Nakon 24 sata od početka tretmana, provela sam qPCR. Rezultate sam analizirala $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodom gdje sam kao referentni gen koristila *TBP*, a kao kontrolni uzorak stanice koje nisu tretirane vemurafenibom. Rezultati pokazuju da kratkotrajni tretman vemurafenibom znatno snižava ekspresiju gena *ITIH5* u staničnim linijama WM793B i A375M (Slika 9.).



Slika 9. Ekspresija gena *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama WM793B (plavo) i A375M (žuto) nakon kratkotrajnog izlaganja vemurafenibu (24 sata) koncentracije 4 μM za WM793B te 2 μM za A375M. Rezultati prikazuju relativnu ekspresiju gena *ITIH5* u odnosu prema referentnom genu *TBP* i kontrolnom, netretiranom uzorku (označen „0“ ispod stupca). Na grafu su prikazane srednje vrijednosti i standardna devijacija te p -vrijednost ($*p < 0,05$). Statistička analiza provedena je u programu GraphPad Prism koristeći test Mann-Whitney. Prikazan je reprezentativni od ukupno tri ponovljena pokusa u kojima je svaki biološki uzorak napravljen u tehničkim duplikatima.

4.1.3. Provjera ekspresije gena *ITIH5* u parentalnim linijama nakon utišavanja gena *ITIH5*

S obzirom da je snižena razina gena *ITIH5* uočena u podlinijama otpornima na vemurafenib u odnosu na pripadajuće parentalne linije, provela sam prolaznu transfekciju parentalnih stanica malim specifičnim siRNA koje ciljaju *ITIH5* sa svrhom utišavanja ekspresije gena *ITIH5*, odnosno sprječavanja translacije transkripta *ITIH5*. Uspješnost prolaznog utišavanja ekspresije gena *ITIH5* u parentalnim stanicama provjerila sam u dva vremenska perioda od transfekcije stanica koja su bitna za test MTT. Test MTT koristila sam kako bih provjerila utječe li utišavanje gena *ITIH5* na osjetljivost parentalnih stanica na vemurafenib (potpoglavlje 4.2.2.). Prvi vremenski period bio je 48 sati nakon transfekcije i odgovara vremenu kada su stanice nasadene za test MTT, dok drugi vremenski period iznosi 6 dana (48 + 96 sati) nakon transfekcije, a odgovara vremenu dodatka otopine MTT. Rezultate sam analizirala metodom $\Delta\Delta C_t$ gdje sam kao referentni gen koristila *RPLP0*, a za kao kontrolni uzorak stanice transfecirane nespecifičnom siRNA (Slika 10.). Rezultati ukazuju da je transfekcija parentalnih stanica bila uspješna i da je tijekom cijelog vremena izvođenja testa MTT utišavanje ekspresije gena *ITIH5* u obje stanične linije bilo učinkovito.

A)**B)**

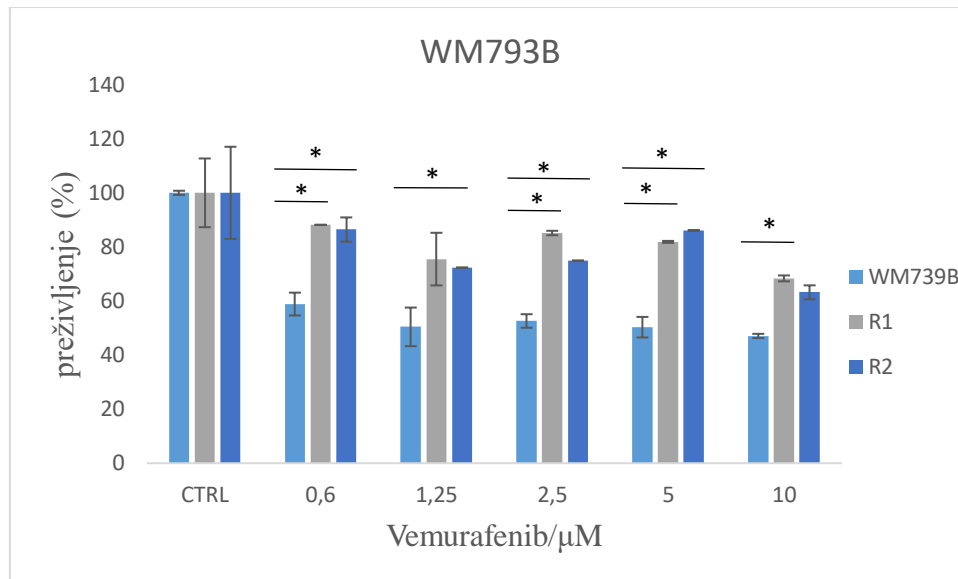
Slika 10. Ekspresija gena *ITIH5* nakon transfekcije parentalnih stanica WM793B (A) i A375M (B) sa siRNA koje specifično ciljaju *ITIH5* (si(*ITIH5*)). Oznaka si(-) odnosi se na stanice transfecirane nespecifičnom siRNA i predstavljaju negativnu kontrolu. Slike lijevo prikazuju ekspresiju gena *ITIH5* 48 sati nakon transfekcije stanica, a slike desno 6 dana (48 sati + 96 sati) nakon transfekcije stanica. Na grafu je prikazana srednja vrijednost i standardna devijacija te p -vrijednost ($*p < 0,05$). Statistička analiza provedena je u programu GraphPad Prism koristeći test Mann-Whitney. Prikazan je reprezentativni od ukupno tri ponovljena pokusa pri čemu je svaki biološki replikat napravljen u tehničkim duplikatima.

4.2. Određivanje otpornosti staničnih linija na tretman vemurafenibom

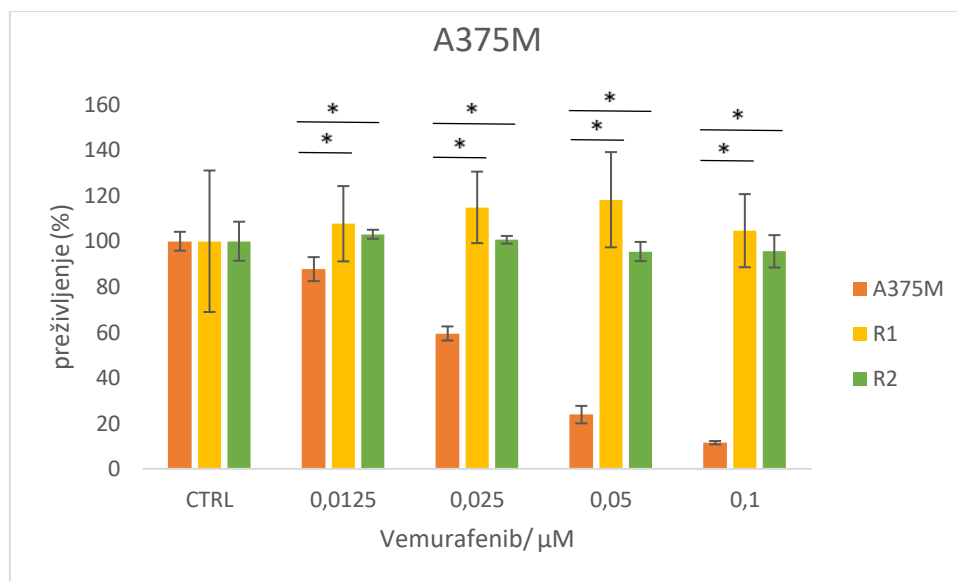
Otpornost na vemurafenib parentalnih staničnih linija i podlinija otpornih na vemurafenib te parentalnih linija nakon utišavanja gena *ITIH5* određivala sam izlaganjem stanica rastućim koncentracijama vemurafeniba nakon čega sam provela test MTT. Metoda uključuje redukciju MTT-a u ljubičaste kristale formazana u metabolički aktivnim stanicama koji se potom otapaju u DMSO-u. Nastala se koncentracija formazana mjeri pri 570 nm spektrofotometrom i proporcionalna je broju živih stanica. Otpornost, odnosno preživljenje nakon tretmana rastućim koncentracijama vemurafeniba parentalnih staničnih linija i podlinija otpornih na vemurafenib te parentalnih linija nakon utišavanja *ITIH5* odredila sam omjerom apsorbancija stanica tretiranih vemurafenibom i odgovarajućih stanica koje nisu tretirane vemurafenibom, odnosno prikazala sam relativno na uzorak koji nije tretiran vemurafenibom.

4.2.1. Provjera otpornosti parentalnih linija i podlinija otpornih na vemurafenib

Iako su podlinije otporne na vemurafenib već razvijene i opisane u Laboratoriju za proteinsku dinamiku (Tadijan *i sur.*, 2021; Radić *i sur.*, 2022) nakon svakih nekoliko pasaža potrebno je provjeriti otpornost tih stanica na vemurafenib testom MTT. Slike 11. i 12. prikazuju preživljenje parentalnih linija WM793B i A375M te pripadajućih podlinija otpornih na vemurafenib nakon tretmana rastućim koncentracijama vemurafeniba. Kao kontrolne uzorke koristila sam odgovarajuće netretirane linije. Rezultati ukazuju da izlaganje stanica vemurafenibu smanjuje postotak preživljenja stanica parentalnih linija (Slika 11.). Ujedno, postotak preživljenja podlinija otpornih na vemurafenib ne mijenja se drastično u odnosu na kontrolne uzorke što je posebno uočljivo pri niskim koncentracijama vemurafeniba za obje stanične linije. Ovakvi rezultati ukazuju da su parentalne linije značajno osjetljivije na vemurafenib u odnosu na podlinije otporne na vemurafenib (Slika 11. i 12.).



Slika 11. Preživljenje parentalne stanične linije WM793B i podlinija otpornih na vemurafenib R1 i R2 nakon izlaganja rastućim koncentracijama vemurafeniba. Oznaka CTRL se u parentalnoj liniji WM793B odnosi na kontrolne stanice koje nisu izložene vemurafenibu, a za podlinije R1 i R2 na stanice izložene vemurafenibu u koncentraciji u kojoj su rasle pripadajuće podlinije (4 µM za obje podlinije R1 i R2). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju te p -vrijednost ($*p < 0,05$). Statistička analiza provedena je u programu GraphPad Prism koristeći test dvostruke ANOVA-e s post-hoc metodom Dunnet. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena pri čemu je svaki biološki replikat napravljen u tehničkim triplikatima.

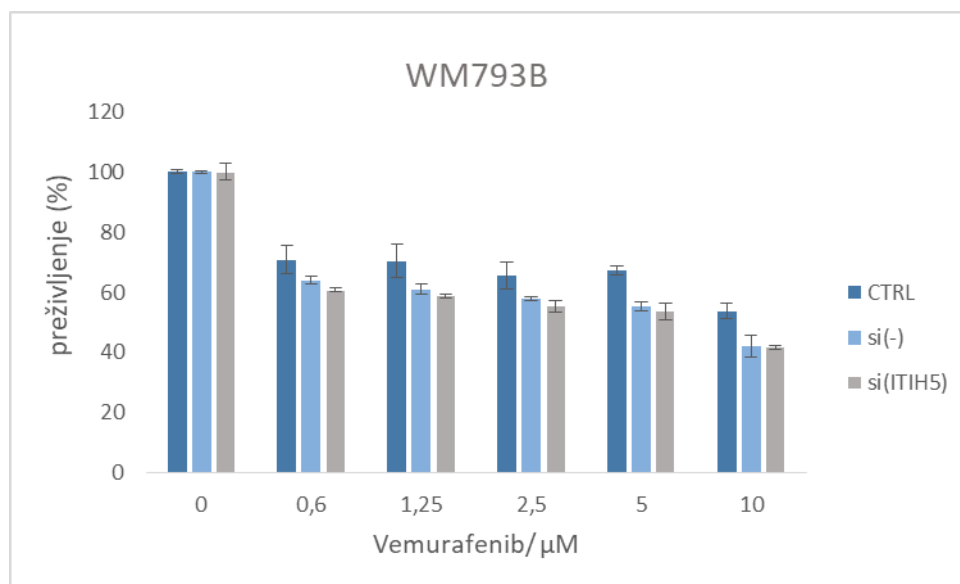


Slika 12. Preživljenje parentalne stanične linije A375M i podlinija otpornih na vemurafenib R1 i R2 nakon izlaganja rastućim koncentracijama vemurafeniba. Oznaka CTRL se u parentalnoj liniji WM793B odnosi na kontrolne stanice koje nisu izložene vemurafenibu, a za podlinije R1 i R2 na stanice izložene vemurafenibu u koncentraciji u kojoj su rasle pripadajuće podlinije (1 μM za podliniju R1 i 2 μM za podliniju R2). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju te p -vrijednost ($*p < 0,05$). Statistička analiza provedena je u programu GraphPad Prism koristeći test dvostruke ANOVA-e s post-hoc metodom Dunnet. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena pri čemu je svaki biološki replikat napravljen u tehničkim triplikatima.

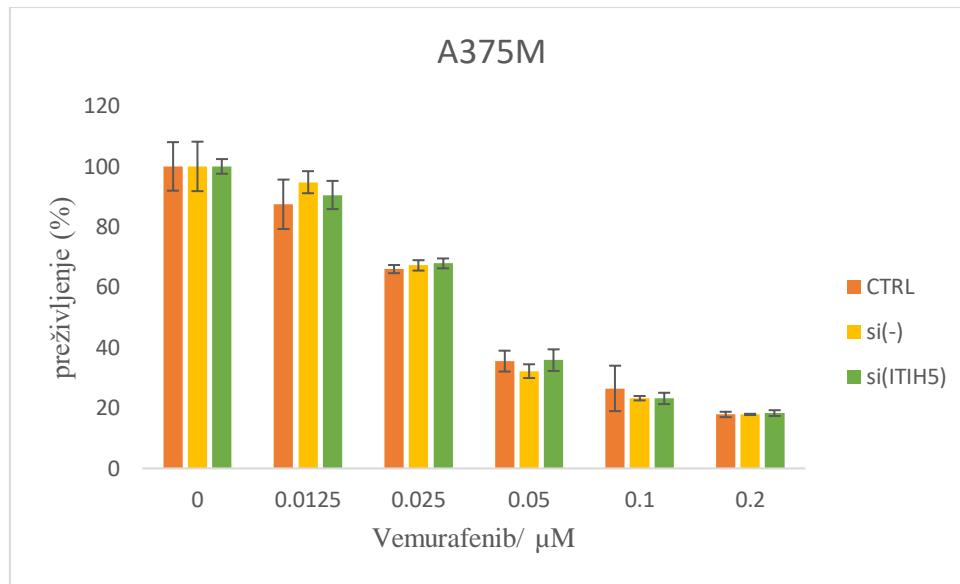
4.2.2. Određivanje otpornosti parentalnih linija na vemurafenib nakon utišavanja gena *ITIH5*

Nakon učinkovitog utišavanja gena *ITIH5* u parentalnim linijama A375M i WM793B (potpoglavlje 4.1.3.), otpornost na vemurafenib provjerila sam testom MTT. Stanice su 48 sati nakon transfekcije kontrolnom nespecifičnom siRNA (si(-)) ili specifičnim siRNA koje ciljaju *ITIH5* (si(*ITIH5*)), tretirane vemurafenibom. Slike 13. i 14. prikazuju preživljenje stanica WM793B i A375M pri rastućim koncentracijama vemurafeniba. Vijabilnost sam mjerila u staničnim linijama koje nisu transfecirane (CTRL), koje su transfecirane kontrolnom nespecifičnom siRNA (si(-)) ili specifičnim siRNA koje ciljaju *ITIH5* (si(*ITIH5*)). Stanice nakon utišavanja *ITIH5* pokazuju sličnu vijabilnost kao i kontrolne, netransfecirane stanice i transfecirane stanice kontrolnom, nespecifičnom siRNA. Ovakvi

rezultati otvaraju mogućnost da prolazno utišavanje gena *ITIH5* nema utjecaj na preživljenje parentalnih staničnih linija WM793B (Slika 13.) i A375M (Slika 14.) nakon izlaganja vemurafenibu.



Slika 13. Preživljenje parentalne stanične linije WM793B sa smanjenom ekspresijom gena *ITIH5* nakon izlaganja rastućim koncentracijama vemurafeniba. Oznaka si(-) odnosi se na stanice transfecirane kontrolnom nespecifičnom siRNA, si(*ITIH5*) odnosi se na stanice transfecirane specifičnim siRNA koje ciljaju transkript gena *ITIH5*. Na grafu su prikazani i rezultati za kontrolne uzroke koji nisu transfecirani (CTRL). Statistička analiza provedena koristeći test dvostruke ANOVA-e s post-hoc metodom Dunnet nije pokazala značajnu razliku. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena u kojima je svaki biološki replikat napravljen u tehničkim triplikatima.



Slika 14. Preživljenje parentalne stanične linije A375M sa smanjenom ekspresijom gena *ITIH5* nakon izlaganja rastućim koncentracijama vemurafeniba. Oznaka si(-) odnosi se na stanice transfecirane kontrolnom nespecifičnom siRNA, si(ITIH5) odnosi se na stanice transfecirane specifičnim siRNA koje ciljaju transkript gena *ITIH5*. Na grafu su prikazani i rezultati za kontrolne uzroke koji nisu transfecirani (CTRL). Statistička analiza provedena koristeći test dvostruke ANOVA-e s post-hoc metodom Dunnet nije pokazala značajnu razliku. Prikazan je reprezentativni pokus od tri ponovljena u kojima je svaki biološki replikat napravljen u tehničkim triplikatima

4.3. Provjera proliferacije i aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT

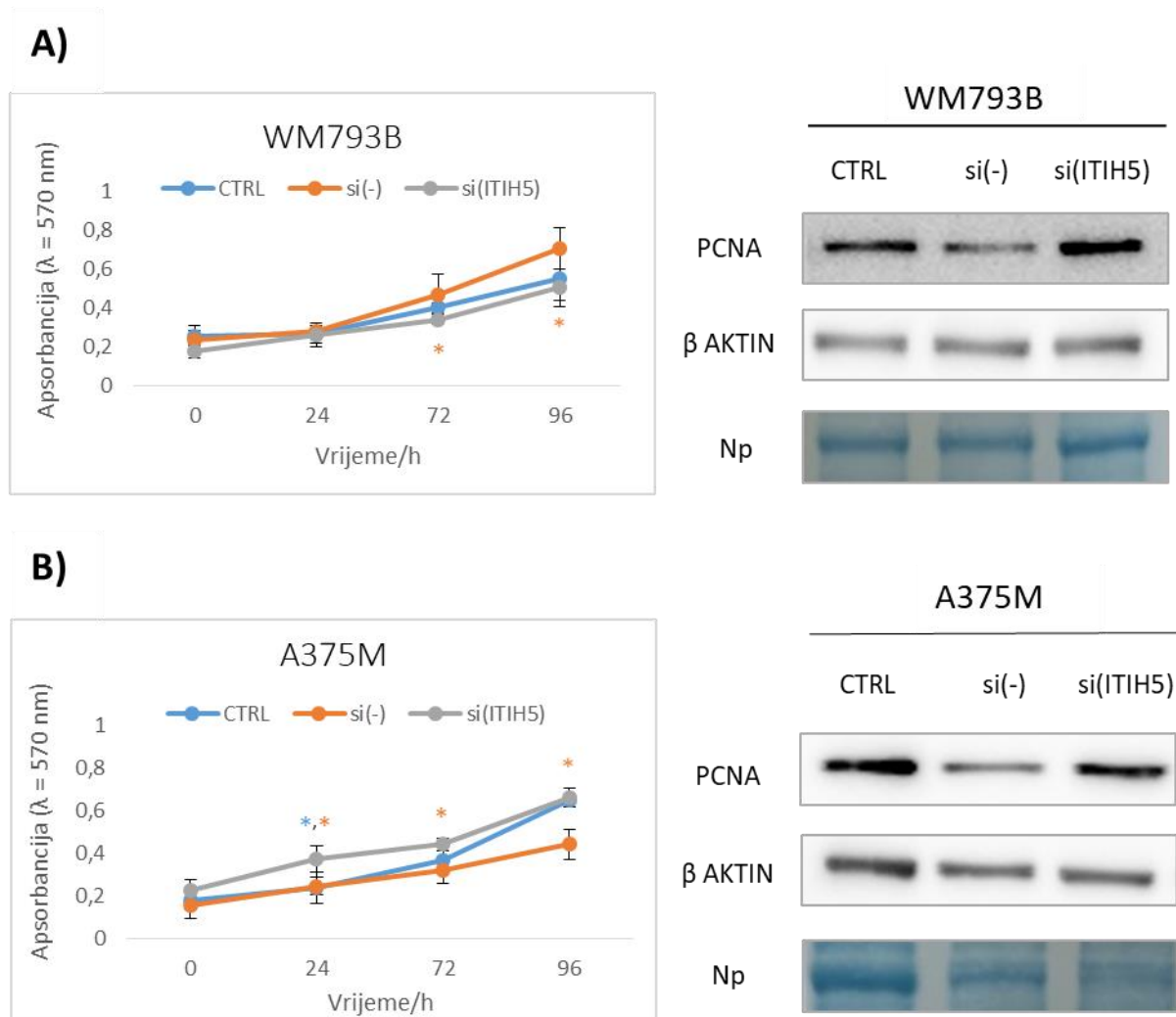
Proliferaciju parentalnih staničnih linija WM793B i A375M nakon utišavanja gena *ITIH5* provjerila sam dvjema metodama, testom MTT i analizom Western blot. Prva metoda uključivala je nasađivanje stanica nakon utišavanja gena *ITIH5* malim specifičnim siRNA na četiri mikrotitarske pločice. Svaka pločica predstavljala je određenu vremensku točku (0, 24, 72 i 96 sati) od nasađivanja pri kojoj sam provodila test MTT. Iz dobivene apsorbancije koja je proporcionalna broju stanica izračunala sam srednje vrijednosti. Za provjeru učinka utišavanja *ITIH5* na proliferaciju analizom Western blot koristila sam protein PCNA za kojega je poznato da ima bitnu ulogu u replikaciji DNA (Juríková *i sur.*, 2016). Proteine koje sam koristila za provjeru proliferacije izdvojila sam iz staničnih taloga 72 sata nakon transfekcije specifičnim siRNA te sam na njima provela analizu Western blot. Kao kontrolne

uzorke u objema metodama provjere proliferacije koristila sam stanice kojima gen *ITIH5* nije utišan te stanice koje su transfecirane nespecifičnom siRNA.

Osim toga, analizom Western blot provjerila sam i aktivnost signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnim staničnim linijama nakon utišavanja *ITIH5* transfekcijom siRNA. Proteine potrebne za analizu izolirala sam iz staničnih taloga 72 sata nakon transfekcije. Za provjeru aktivnosti signalnog puta MAPK koristila sam usporedbu ekspresije fosforiliranog proteina ERK (pERK1/2) i ukupnog proteina ERK, a za provjeru aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT koristila sam usporedbu ekspresije fosforiliranog proteina pAKT i ukupnog proteina AKT (Greengard, 1978).

4.3.1. Provjera proliferacije nakon utišavanja gena *ITIH5*

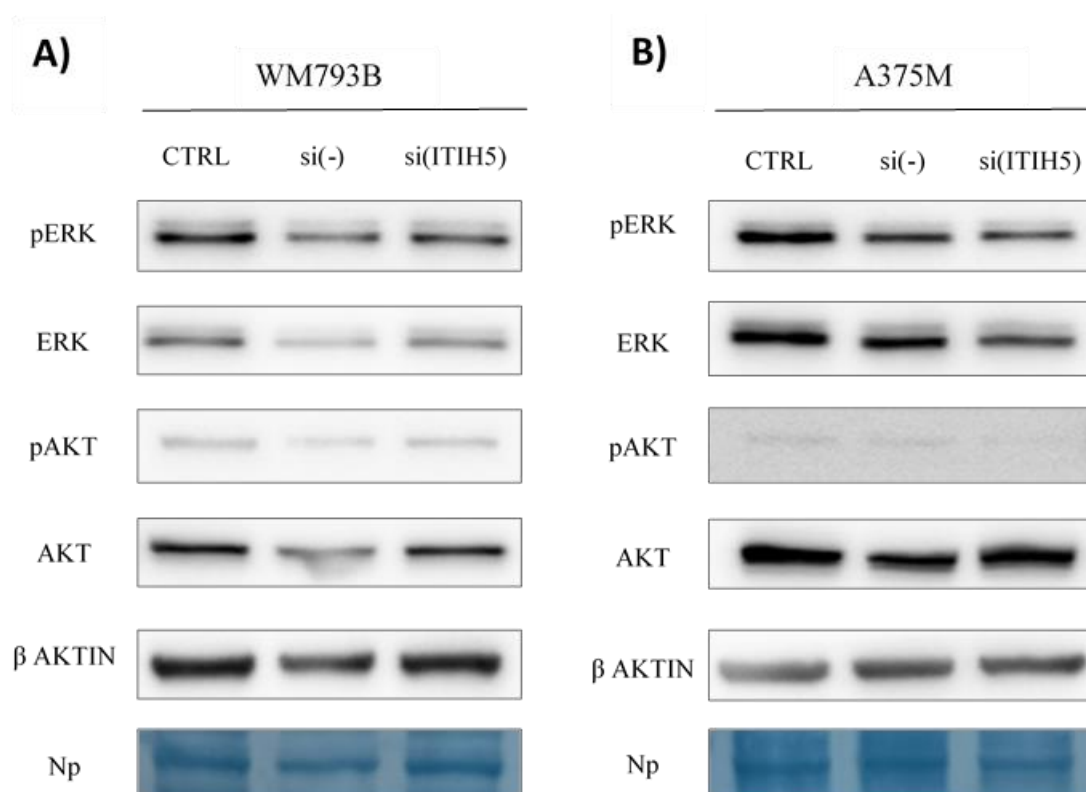
S obzirom da nije uočena promjena u osjetljivosti stanica parentalnih staničnih linija na vemurafenib nakon utišavanja gena *ITIH5* (potpoglavlje 4.2.2.) pristupila sam provjeri proliferacije stanica. Slika 15. prikazuje rezultate dobivene analizom proliferacije stanica u parentalnim linijama WM793B (A) i A375M (B) nakon utišavanja gena *ITIH5*. Proliferacija je određena u stanicama u kojima je utišan gen *ITIH5* (si(*ITIH5*)), te kontrolnim stanicama koje nisu transfecirane (CTRL) ili koje su transfecirane kontrolnom, nespecifičnom siRNA (si(-)). Iz rezultata je vidljivo da utišavanje gena *ITIH5* u stanicama linije WM793B negativno utječe na proliferaciju stanica u krajnjim vremenskim točkama mjerenim testom MTT (Slika 15.A, lijevo), dok povećava proliferaciju stanica u staničnoj liniji A375M (Slika 15.B, lijevo). Međutim, utišavanje gena *ITIH5* povećava ekspresiju proteina PCNA u stanicama obje stanične linije WM793B i A375M (Slika 15.A i B, desno).



Slika 15. Analiza proliferacije u staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B) nakon utišavanja gena *ITIH5*. Grafovi lijevo prikazuju proliferaciju mjerenu testom MTT za tri biološka replikata sa standardnim devijacijama, pri čemu je svaki biološki replikat napravljen u tehničkim petereplikatima. Statistička analiza provedena je koristeći test dvostruke ANOVA-e s post-hoc metodom Tukey. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti i standardnu devijaciju te p -vrijednost ($*p < 0,05$). Zvezdica plave boje odnosi se na usporedbu si(ITIH5) s CTRL, a zvezdica narančaste boje odnosi se na usporedbu si(ITIH5) sa si(-). Proliferacija je analizirana i razinom ekspresije proteina PCNA metodom Western blot (desno) pri čemu je kao kontrola nanosa ukupnih proteina korištena razina proteina β AKTIN i prikaz obojenja membrane naftolnim plavilom (Np). Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri biološka replikata.

4.3.2. Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT nakon utišavanja gena *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama

S obzirom da aktivnost signalnih puteva utječe na različite biološke funkcije stanica, uključujući proliferaciju stanica, u sljedećem koraku odredila sam aktivnost signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnim staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B) nakon utišavanja gena *ITIH5* (Slika 16.). Kao kontrolne uzorke u analizi rezultata koristila sam stanice kojima gen *ITIH5* nije utišan te stanice koje su transfecirane nespecifičnom siRNA. Analiza uzoraka staničnih linija WM793B i A375M sa smanjenom genskom ekspresijom *ITIH5* (si(*ITIH5*)) pokazala je da nema promjena u aktivnosti signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u odnosu na kontrolne uzorke u kojima gen nije utišan (CTRL) te na kontrolne uzorke koji su transfecirani nespecifičnom siRNA (si(-)) (Slika 16.).



Slika 16. Analiza aktivnosti signalnih puteva PI3K/AKT i MAPK u staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B) nakon utišavanja gena *ITIH5* metodom Western blot. Analizirana je ekspresija proteina pERK i ERK, kao biljega aktivnosti signalnog puta MAPK te proteina pAKT i AKT, kao biljega aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT u kontrolnim stanicama koje nisu transfecirane (CTRL), u stanicama u kojima je utišan gen *ITIH5* transfekcijom specifičnim siRNA si(*ITIH5*) ili u stanicama koje su transfecirane nespecifičnom,

kontrolnom siRNA (si(-)). Kao kontrola nanosa ukupnih proteina korištena je razina proteina β AKTIN i prikaz obojenja membrane naftolnim plavilom (Np). Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri biološka replikata.

5. RASPRAVA

Melanom, kao jedan od najagresivnijih tipova tumora, predstavlja velik izazov u liječenju (Fedorenko *i sur.*, 2011). Jedan od glavnih uzroka razvoja melanoma mutacije su u genima koji kodiraju komponente signalnog puta MAPK, jednog od najvažnijih signalnih puteva u kontroli staničnog rasta i proliferacije (Burotto *i sur.*, 2014). U čak 60% melanoma uočena je aktivirajuća mutacija u genu *BRAF*, koji kodira važnu komponentu puta MAPK, i dovodi do nastanka mutiranog proteina BRAF V600E te shodno tome, konstitutivne aktivacije signalnog puta MAPK (Ascierto *i sur.*, 2012). Poznavanje mutacije koja primarno dovodi do razvoja tumora otvara mogućnost liječenja ciljanom terapijom. Prvi razvijeni selektivni inhibitor proteina BRAF V600E je vemurafenib. Unatoč obećavajućim početnim rezultatima, nedugo nakon liječenja vemurafenibom dolazi do pojave stečene otpornosti stanica melanoma na ovaj lijek što često dovodi do razvoja agresivnijeg oblika bolesti. Razvoj otpornosti na ciljane inhibitore nije iznenađujuć u tumorima, a ni u vrlo heterogenim melanomskim stanicama. Također, istraživanja usmjerena na molekularne mehanizme stečene otpornosti od velikoga su značaja s obzirom da je tretman kombinacijom inhibitora koji ciljaju različite komponente signalnog puta MAPK pokazan kao obećavajući pristup liječenju melanoma (Griffin *i sur.*, 2017).

Teški lanci ITIH iz porodice proteina ITI imaju bitnu ulogu u stabilizaciji ECM-a. Narušavanje ECM-a pokazalo se kao bitni faktor u razvoju metastaza. Upravo se za ove proteine pokazalo da imaju smanjenu ekspresiju u različitim tumorima (Hamm *i sur.*, 2008). Uočeno je da je ekspresija gena *ITIH5* snižena u mnogim tumorima uključujući tumore mjehura (Rose *i sur.*, 2014), grlića maternice (Daum *i sur.*, 2021), akutne mijeloidne leukemije (Oing *i sur.*, 2011), tumora gušterače i dojke (Sasaki *i sur.*, 2017; Rose *i sur.*, 2017). Ujedno, snižena ekspresija ovog gena uočena je u primarnim tumorima i metastazama melanoma čovjeka u odnosu na zdravo tkivo (Liu *i sur.*, 2021). Upravo se zbog toga razvija potreba za dubljim shvaćanjem uloge tumorskog supresora *ITIH5* u melanomima te istraživanjem njegove potencijalne uloge u mehanizmima otpornosti stanica melanoma na ciljanu terapiju. U ovom diplomskom radu koristila sam dvije komercijalno dostupne parentalne stanične linije melanoma čovjeka WM793B koja je podrijetlom iz primarnog tumora i A375M koja je podrijetlom iz metastaza te 4 podlinije otporne na vemurafenib A375M_R1 i A375M_R2 te WM793B_R1 i WM793B_R2 (Tadijan *i sur.*, 2021; Radić *i sur.*, 2022). Metodom kvantitativnog PCR-a provjerila sam razlikuje li se ekspresija gena *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama i podlinijama otpornima na vemurafenib. Rezultati qPCR-a

(Slika 8.) pokazali su da je ekspresija *ITIH5* u linijama otpornima na vemurafenib znatno snižena u odnosu na razinu ekspresije u pripadajućim parentalnim linijama. Ovakvi rezultati ukazuju na potencijalni utjecaj proteina *ITIH5* na otpornost stanica melanoma koje nose mutirani protein BRAF V600E na vemurafenib. U tu svrhu koristila sam male interferirajuće RNA zahvaljujući kojima sam smanjila ekspresiju *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama što sam utvrdila qPCR-om. Takvim sam stanicama provjerila otpornost na vemurafenib testom MTT izlažući ih rastućim koncentracijama vemurafeniba. Rezultati testa MTT (Slika 13. i 14.) ukazuju da utišavanje *ITIH5* ne utječe na otpornosti parentalnih staničnih linija na vemurafenib.

Provjerila sam i utjecaj kratkotrajne izloženosti vemurafenibu na ekspresiju *ITIH5* u parentalnim staničnim linijama provedbom qPCR-a. Analiza (Slika 9.) je pokazala značajan učinak vemurafeniba na smanjenje ekspresije gena *ITIH5* u staničnim linijama WM793B i A375M. Smanjenje ekspresije bilo je puno jače u odnosu na smanjenje postignuto malim interferirajućim RNA. Ovakav rezultat ukazuje da je smanjena ekspresija *ITIH5* u podlinijama otpornima na vemurafenib posljedica izloženosti vemurafenibu i može biti jedan od čimbenika koji doprinosi razvoju stečene otpornosti.

Poznato je da *ITIH5* kao tumor supresor ima negativan utjecaj na proliferaciju. Uočeno je da povećana ekspresija *ITIH5* snižava proliferaciju, dok obrnuto, smanjena ekspresija *ITIH5* povećava proliferaciju u staničnim linijama nekoliko različitih tumora, kao što su tumor dojke (Rose *i sur.*, 2017), debelog crijeva (Kloten *i sur.*, 2014) te grlića maternice (Daum *i sur.*, 2021). Za provjeru učinka utišavanja *ITIH5* na proliferaciju parentalnih staničnih linija WM793B i A375M napravila sam test MTT u vremenskim točkama 0, 24, 72 i 96 sati od nasađivanja na mikrotitarsku pločicu te analizu Western blot u kojoj sam pratila količinu proteina PCNA, biljega proliferacije stanica. Rezultati dobiveni testom MTT pokazali su povećanje proliferacije samo u staničnoj liniji A375M, dok je u objema staničnim linijama povećana količina proteina PCNA (Slika 15.). Važno je za primijetiti da početni broj stanica testnog i kontrolnih uzoraka u vremenskoj točki 0 sati nije jednak za obje stanične linije što može utjecati na dobivene rezultate. Umjesto testa MTT, bilo bi dobro provesti test bojanja stanica kristal violetom (Saotome *i sur.*, 1989) ili neku drugu metodu za provjeru proliferacije i rasta stanica pa usporediti te rezultate s rezultatima MTT-a i analize Western blot. Ujedno, pokazano je da povišena ekspresija *ITIH5* u nekim stanicama tumora mjehura ne utječe na rast stanica nakon 96 sati analizirano testom XTT, no negativan utjecaj na rast stanica se uočava nakon 10 dana mjereno testom bojanja stanica

(Rose i sur., 2021). U skladu s tim, možda je duži vremenski period potreban kako bi se uočio utjecaj utišavanja *ITIH5* na proliferaciju stanica parentalne linije WM793B. Rezultati dobiveni analizom ekspresije proteina PCNA (Slika 15., desno) dovode do zaključka o povećanju proliferacije u obje stanične linije nakon utišavanja *ITIH5*. Takvi su rezultati u skladu s rezultatima koje su dobili Liu i sur. (2021) na drugim melanomskim staničnim linijama. Liu i suradnici uočili su da povišena ekspresija *ITIH5* smanjuje rast stanica melanoma SK-Mel-28 i ME4405, dok utišavanje *ITIH5* povećava rast stanica melanoma Mel-RM i Mel-CV mjereno testom bojanja stanica kristal violetom (Liu i sur., 2021).

Nadalje, moguć je učinak proteina *ITIH5* na signalne puteve. Iz literature je poznato da do otpornosti na vemurafenib može doći zbog reaktivacije signalnog puta MAPK, uslijed različitih mehanizama koji uključuju sekundarne mutacije u *NRAS* ili *MEK1* te povećane ekspresije proteina *NRAS*, što rezultira povećanom aktivnosti proteina, komponenti puta MAPK (Trunzer i sur., 2013; Lidsky i sur., 2014; Hui Goh i sur., 2021). Osim sekundarnih mutacija u komponentama puta MAPK, jedan od poznatih mehanizama stečene otpornosti stanica melanoma je i prekomjerna aktivacija signalnog puta PI3K/AKT, također bitnoga za stanični rast i proliferaciju (Shi i sur., 2014; Tran i sur., 2021). U podlinijama otpornima na vemurafenib koje sam koristila u svome radu, a dobivenima iz stanične linije A375M uočena je povećana količina fosforiliranog proteina ERK1/2 u odnosu na parentalne što pretpostavlja da je u tim staničnim linijama došlo do reaktivacije signalnog puta MAPK. Međutim, u objema podlinijama otpornima na vemurafenib koje su dobivene iz parentalne stanične linije WM793B uočena je povećana količina fosforiliranog proteina AKT u odnosu na parentalnu liniju što upućuje na aktivaciju signalnog puta PI3K/AKT (Tadijan i sur., 2021; Radić i sur., 2022). S obzirom da se u podlinijama otpornima na vemurafenib ekspresija *ITIH5* znatno razlikuje i niža je u odnosu na parentalne linije, sljedeće sam provjerila utjecaj utišavanja *ITIH5* na aktivnost signalnog puta MAPK i signalnog puta PI3K/AKT u linijama WM793B i A375M. Gen *ITIH5* utišala sam korištenjem smjese malih interferirajućih RNA koje ciljaju *ITIH5*, dok sam analizom razine fosforiliranog i ukupnog proteina ERK1/2 provjerila aktivnost signalnog puta MAPK, a analizom razine fosforiliranog i ukupnog proteina AKT provjerila aktivnost signalnog puta PI3K/AKT. Provjerom količine aktivnih proteina ERK1/2 i AKT u objema parentalnim staničnim linijama nakon utišavanja *ITIH5*, nisam uočila da utišavanje *ITIH5* utječe na signalne puteve MAPK i PI3K/AKT (Slika 16.).

Dobiveni rezultati ipak ne isključuju mogućnost utjecaja ovoga proteina na proučavane signalne puteve. Naime, poznato je da su količine tumor supresora potrebne za

uspješnu inhibiciju razvoja tumora dosta niske (Guo *i sur.*, 2014). Shodno tome, moguće je da smanjenje ekspresije uzrokovano malim interferirajućim RNA nije bilo dostatno za uočljiv učinak na aktivnost navedenih signalnih puteva. Kako bi se to provjerilo, potrebno je potpuno ukinuti ekspresiju gena *ITIH5* metodom genskog uređivanja CRISPR-Cas9 i zatim provjeriti utjecaj na signalne puteve.

Navedeni rezultati otvaraju puno novih smjerova u istraživanjima. Moguć je utjecaj snižene ekspresije *ITIH5* kao posljedice tretmana vemurafenibom na druge signalne puteve uključene u proliferaciju i preživljenje. Iz literature je poznato da *ITIH5* utječe na komponente nekanonskog signalnog puta WNT (engl. *Wingless/Integrated*), Rac1 (engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i RhoA (engl. *Ras homologous*) u tumorskim staničnim linijama dojke pozitivnom regulacijom razine β -integrina, posebno integrina $\beta 1$ za koji je pokazano da regulira aktivnost RhoA i integrina $\beta 3$ koji regulira aktivnost Rac1 (Rose *i sur.*, 2017). Za protein Rac je poznato da povećava aktivaciju proteina JNK, posljednje kinaze u jednom od signalnih puteva MAPK (Katoh, 2017). Prekomjerna aktivacija signalnog puta JNK u melanomskim staničnim linijama dovodi do povećane stanične proliferacije, migracije i invazije (Hammouda *i sur.*, 2020). Ujedno, *ITIH5* smanjuje aktivnost proteina Rac1, što je u skladu s tumor supresorskom ulogom ovoga proteina, i potiče aktivnosti proteina RhoA u stanicama tumora dojke (Rose *i sur.*, 2017). Pokazano je da proteini Rho reguliraju aktivnost proteina YAP (engl. *Yes-associated protein*) i TAZ (od engl. *Taffazin*) pri čemu povećana aktivnost YAP/TAZ u melanomskim staničnim linijama potiče proliferaciju i metastaziranje stanica te otpornost na vemurafenib (Thompson, 2020; Kim *i sur.*, 2017). Ujedno je pokazano da komponente nekanonskog signalnog puta mogu aktivirati put PI3K/AKT i utjecati na otpornost stanica melanoma na vemurafenib (Anastas *i sur.*, 2014; Katoh, 2017). Shodno tome, bilo bi zanimljivo istražiti utjecaj *ITIH5* na aktivnost komponenti signalnog puta WNT u stanicama melanoma. Signalizacija koja uključuje Rho-ROCK (engl. *RHO-associated protein kinase*) utječe na stabilnost i sastav ECM-a, potiče rast, invaziju i migraciju tumorskih stanica kao i pokretljivost fibroblasta i limfocita povezanih s tumorom (Johan *i sur.*, 2019). Ujedno, povišena aktivnost proteina RhoA povezana je s otpornosti stanica melanoma na vemurafenib (Misek *i sur.*, 2020). Ako postoji povezanost *ITIH5* sa signalizacijom Rho-ROCK za pretpostaviti je da bi smanjenje aktivnosti *ITIH5* uzrokovalo smanjenje aktivnosti proteina ROCK uslijed smanjenja proteina Rho i time dovelo do promjena u staničnoj proliferaciji, migraciji te interakciji stanica s izvanstaničnim matriksom u melanomima. Međutim, vezu *ITIH5*-Rho-ROCK potrebno je ispitati u

stanicama melanoma. Također, u melanomskim staničnim linijama otpornima na vemurafenib uočena je snižena ekspresija proteina NF2 (engl. *neurofibromin 2*), poznatog tumor supresora (Shalem *i sur.*, 2014). Snižena ekspresija NF2 utječe na cjelovitost signalnoga puta Hippo za čije je komponente YAP/TAZ dokazano da imaju bitnu ulogu u melanomima i da povećavaju invazivnost i metastatski potencijal melanomskih stanica (Kim *i sur.*, 2013; Nallet-Staub *i sur.*, 2014). Iako interakcija s ovim proteinom još nije uočena, bilo bi korisno provjeriti postoji li utjecaj sniženja *ITIH5* na signalni put Hippo i njegove komponente.

Razvoj otpornosti na vemurafenib u melanomskim stanicama potaknut je promjenama i u ostalim procesima u stanici kao što su stanični ciklus i translacija, a primijećene su i mnoge epigenetske promjene (Hui Goh *i sur.*, 2021). Zanimljivo je da je u staničnim linijama tumora dojke uočen utjecaj smanjene ekspresije *ITIH5* na epigenetski status mnogih gena povezanih s napretkom tumora. Jedan od takvih gena je tumor supresorski gen *DAPK1* (engl. *death-associated protein kinase 1*) koji je hipometiliran u stanicama tumora dojke s povećanom ekspresijom *ITIH5* (Rose *i sur.*, 2017). Ujedno, *ITIH5* utječe na metilaciju promotora gena *ENG* za kojeg je pokazana pozitivna korelacija u ekspresiji s *ITIH5* u stanicama tumora dojke. Također, *ITIH5* negativno regulira aktivnost nekih komponenti signalnog puta TGF β , kao što je *Id1*, poznatog promotora metastaziranja (Rose *i sur.*, 2018). Shodno navedenom, moguće je da smanjenje ekspresije *ITIH5* nakon izlaganja vemurafenibu i u melanomskim stanicama utječe na epigenetski status gena bitnih za napredak tumora.

Osim na signalne puteve, primarna je uloga proteina *ITIH5* interakcija s ECM-om. Za destabilizaciju ECM-a poznato je da potiče razvoj tumora, a posebno metastaziranje, mobilnost i adherenciju stanica (Amorim *i sur.*, 2021). S obzirom da vemurafenib smanjuje razinu *ITIH5*, bilo bi zanimljivo istražiti na koji način tretman vemurafenibom utječe na komponente ECM-a i na vezu *ITIH5* s ECM-om. Pokazano je da povećanje ekspresije *ITIH5* u staničnim linijama tumora mjehura potiče osjetljivost na kemoterapiju, točnije na cisplatinu i gemcitabin. Sami mehanizam otpornosti najvjerojatnije uključuje povezanost s površinskim receptorom CD44 koji interagira s komponentom ECM-a, hijaluronskom kiselinom, za koju je poznato da se kovalentno veže s *ITIH5*. Osim toga, za hijaluronsku kiselinu je pokazano da utječe na mobilnost stanica te na diferencijaciju zahvaljujući povezanosti s HABP (engl. *HA binding proteins*) kao što je CD44 (Rose *i sur.*, 2021; Zhuo *i sur.*, 2004; Misra *i sur.*, 2015).

Također, osim pristupa koji uključuje smanjenje ekspresije *ITIH5*, zanimljivo bi bilo

i provjeriti utjecaj povećanja ekspresije *ITIH5* na navedene stanične procese u parentalnim linijama ili podlinijama otpornima na vemurafenib korištenjem sustava kao što su CRISPR-Cas9, ZFN (engl. Zinc Finger Nucleases), TALEN (engl. *Transcription activator-like effector nucleases*) ili uvođenjem plazmida s *ITIH5* (Laufer *i sur.*, 2015). Drugačiji bi pristup bio postignut i nasađivanjem stanica na podlogu obloženu proteinom ITIH5 (Ambriović Ristov *i sur.*, 2007) ili unošenjem proteina ITIH5 elektroporacijom, mikroinjiciranjem ili nekim drugim metodama unosa proteina u stanicu (Chau *i sur.*, 2020).

6. ZAKLJUČAK

Prema dobivenim rezultatima, došla sam do nekoliko zaključaka o ulozi gena *ITIH5* u otpornosti melanomskih staničnih linija na ciljanu terapiju vemurafenibom. Prije svega, važno je napomenuti uočenu znatno smanjenu ekspresiju ovoga gena u podlinijama otpornima na vemurafenib u odnosu na parentalne linije WM793B i A375M. Pokazano je da je uzrok navedene razlike u ekspresiji rezultat izloženosti stanica vemurafenibu. Analize utjecaja proteina *ITIH5* na aktivnost signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT nisu pokazale uočljive promjene. Iako utjecaj na signalne puteve nije uočen, moguće je da utišavanje malim interferirajućim RNA nije bilo dovoljno za vidljivu promjenu. Nadalje, primijećen je utjecaj utišavanja *ITIH5* na proliferaciju stanica zahvaljujući povećanoj količini proteina PCNA što otvara mogućnost utjecaja *ITIH5* na druge signalne puteve koji su uključeni u regulaciju proliferacije stanica.

7. LITERATURA

- Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007). Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 840-842.
- Amorim, S., Reis, C.A., Reis, R.L. i Pires, R.A. (2021). Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials, *Trends in Biotechnology*, 39(1), 90–104.
- Anastas, J.N., Kulikauskas, R.M., Tamir, T., Rizos, H., Long, G. V., Von Euw, E.M., Yang, P.T., Chen, H.W., Haydu, L., Toroni, R.A., Lucero, O.M., Chien, A.J. i Moon, R.T. (2014). WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors, *Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 2877–2890.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. i Patel, H.R.H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219.
- Ascierio, P.A., Kirkwood, J.M., Grob, J.J., Simeone, E., Grimaldi, A.M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F.M. i Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma, *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1–9.
- Backsch, C. (2021). ITIH5 shows tumor suppressive properties in cervical cancer cells grown as multicellular tumor spheroids, *American Journal of Translational Research*, 13(9), 10298–10314.
- Berridge, M. V, Herst, P.M. i Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, *Biotechnology Annual Review*, 11(05), 127–152.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Habets, G., Burton, E.A., Wong, B., Tsang, G., West, B.L., Powell, B., Shellooe, R., Marimuthz, A., Nguyen, H., Zhang, K.Y.J., Artis, D.R., Schlessinger, J., Su, F., Higgins, B., Iyer, R., D'Andrea, K., Koehler, A., Stumm, M., Lin, P.S., Lee, R.J., Grippo, J. F., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J. A., Chapman, P.B., Flaherty, K. T., Xu, X., Nathanson, K.L., Nolop, K. (2017). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma, *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148.

- Burotto, M., Chiou, V.L., Lee, J.M. i Kohn, E.C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective, *Cancer*, 120(22), 3446–3456.
- Chan, X.Y., Singh, A., Osman, N. i Piva, T.J. (2017). Role played by signalling pathways in overcoming BRAF inhibitor resistance in melanoma, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–13.
- Chandrashekar, D.S., Karthikeyan, S.K., Korla, P.K., Patel, H., Shovon, A.R., Athar, M., Netto, G.J., Qin, Z.S., Kumar, S., Manne, U., Crieghton, C.J. i Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform, *Neoplasia*, 25(C), 18–27, <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGA-survival1.pl?genenam=ITIH5&ctype=SKCM> , pristupljeno: prosinac, 2022.
- Chau, C., Actis, P. i Hewitt, E. (2020) Methods for protein delivery into cells: From current approaches to future perspectives, *Biochemical Society Transactions*, 357–365.
- Daum, A.K., Dittmann, J., Jansen, L., Peters, S., Dahmen, U., Heger, J.I., Hoppe-Seyler, F., Gille, A., Clement, J.H., Runnebaum, I.B., Dürst, M. i Backsch, C. (2021). ITIH5 shows tumor suppressive properties in cervical cancer cells grown as multicellular tumor spheroids, *American Journal of Translational Research*, 13(9), 10298–10314.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O. i Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer, *Oncogene*, 26(22), 3279–3290.
- Dittmann, J., Ziegfeld, A., Jansen, L., Gajda, M., Klotten, V., Dahl, E., Runnebaum, I.B., Dürst, M. i Backsch, C. (2017). Gene expression analysis combined with functional genomics approach identifies ITIH5 as tumor suppressor gene in cervical carcinogenesis, *Molecular Carcinogenesis*, 56(6), 1578–1589.
- Domingues, B., Lopes, J.M., Soares, P. i Pópulo, H. (2018). Melanoma treatment in review, *ImmunoTargets and Therapy Open*, 35–49.
- Dötsch, M.M., Klotten, V., Schlenzog, M., Heide, T., Braunschweig, T., Veeck, J., Petersen, I., Knüchel, R. i Dahl, E. (2015). Low expression of ITIH5 in adenocarcinoma of the lung is associated with unfavorable patients' outcome, *Epigenetics*, 10(10), 903–912.
- Dzwierzynski, W.W. (2021). Melanoma Risk Factors and Prevention, *Clinics in Plastic Surgery*, 48(4), 543–550.
- Europski informacijski sustav za rak (ECIS), [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?\\$0-0\\$1-All\\$2-All\\$4-1,2\\$3-27\\$6-0.85\\$5-](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?$0-0$1-All$2-All$4-1,2$3-27$6-0.85$5-)

[2020,2020\\$7-7\\$CEstByCountry\\$X0 8-3\\$X0 19-AE27\\$X0 20-No\\$CEstBySexByCountry\\$X1 8-3\\$X1 19-AE27\\$X1 -1-1\\$CEstByIndiByCountry\\$X2 8-3\\$X2 19-AE27\\$X2 20-No\\$CEstRelative\\$X3 8-3\\$X3 9-AE27\\$X3 19-AE27\\$CEstByCountryTable\\$X4 19-AE27,](#) pristupljeno: prosinac, 2022.

- Fedorenko, I. V., Paraiso, K.H.T. i Smalley, K.S.M. (2011). Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma, *Biochemical Pharmacology*, 82(3), 201–209.
- Fisher, R. i Larkin, J. (2012). Vemurafenib: a new treatment for BRAF-V600 mutated advanced melanoma, *Cancer Management and Research*, 243–252.
- Fruman, D.A. i Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities, *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(2), 140–156.
- Greengard, P. (1978). Phosphorylated proteins as physiological effectors. Protein phosphorylation may be a final common pathway for many biological regulatory agents, *Science*, 199(1), 146–152.
- Griffin, M., Scotto, D., Josephs, D.H., Mele, S., Crescioli, S., Bax, H.J., Pellizzari, G., Wynne, M.D., Nakamura, M., Hoffmann, M., Ilieva, K.M., Cheung, A., Spicer, J.F., Lacy, K.E. i Karagiannis, S.N. (2017). BRAF inhibitors: resistance and the promise of combination treatments for melanoma, *Oncotarget*, 8(44), 78174–78192.
- Grimaldi, A.M., Simeone, E., Festino, L., Vanella, V., Strudel, M. i Ascierto, P.A. (2017). MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors, *American Journal of Clinical Dermatology*, 18(6), 745–754.
- Guo, X.E., Ngo, B., Modrek, A.S. i Lee, W. (2014). Targeting Tumor Suppressor Networks for Cancer Therapeutics, *Current Drug Targets*, 15(1), 2–16.
- Gwozdz, T. i Dorey, K. (2017). Western Blot, *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, Academic Press, Elsevier, SAD, 99-117.
- Hamm, A., Veeck, J., Bektas, N., Wild, P.J., Hartmann, A., Heindricks, U., Kristiansen, G., Werbowetski-Ogilvie, T., Del Maestro, R., Knuechel, R. and Dahl, E. (2008). Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: A systematic expression analysis, *BMC Cancer*, 8, 1–15.
- Hammouda, M.B., Ford, A.E., Liu, Y. i Zhang, J.Y. (2020). The JNK Signaling Pathway in Inflammatory Skin Disorders and Cancer, *Cells*, 9(4), 1–22.

- Heakal, Y., Kester, M. i Savage, S. (2011). Vemurafenib (PLX4032): An Orally Available Inhibitor of Mutated BRAF for the Treatment of Metastatic Melanoma, *Annals of Pharmacotherapy*, 45, 1399–1405.
- Hennies, H.C. (2015). All is balanced: Inter- α -trypsin inhibitors as unseen extracellular matrix proteins in epidermal morphology and differentiation, *Experimental Dermatology*, 24(9), 661–662.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. i Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11(9), 1026–1030.
- Himmelfarb, M., Klopocki, E., Grube, S., Staub, E., Klamann, I., Hinzmann, B., Kristiansen, G., Rosenthal, A., Dürst, M. i Dahl, E. (2004). ITIH5, a novel member of the inter- α -trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer, *Cancer Letters*, 204(1), 69–77.
- Hiroshi, K., Gotoh, J., Hirashima, Y., Fujie, M., Saguino, D. i Terao, T. (1995). Inhibitory Effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro, *The Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 8361–8366.
- Hoogstraat, M., Gadellaa-van Hooijdonk, C.G., Ubink, I., Besselink, N.J.M., Pieterse, M., Veldhuis, W., van Stralen, M., Meijer, E.F.J., Willems, S.M., Hadders, M.A., Kuilman, T., Krijgsman, O., Peeper, D.S., Koudijs, M.J., Cuppen, E., Voest, E.E. i Lolkema, M.P. (2015). Detailed imaging and genetic analysis reveal a secondary BRAFL505H resistance mutation and extensive inpatient heterogeneity in metastatic BRAF mutant melanoma patients treated with vemurafenib, *Pigment Cell and Melanoma Research*, 28(3), 318–323.
- Hui Goh, C.J., Wong, J.H., El Farran, C., Tan, B.X., Coffill, C.R., Loh, Y.H., Lane, D. i Arumugam, P. (2021). Identification of pathways modulating vemurafenib resistance in melanoma cells via a genome-wide CRISPR/Cas9 screen, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 11(2).
- Inamdar, G.S., Madhunapantula, S.R. V. i Robertson, G.P. (2010). Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail, *Biochemical Pharmacology*, 80(5), 624–637.
- Johan, M.Z. i Samuel, M.S. (2019). Rho – ROCK signaling regulates tumor-microenvironment interactions, *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 101–108.

- Juríková, M., Danihel, E., Polák, Š. i Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer, *Acta Histochemica*, 118(5), 544–552.
- Katoh, M. (2017). Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches : Cellular heterogeneity , omics reprogramming , targeted therapy and tumor plasticity *International Journal of Oncology*, 1357–1369.
- Kim, J.E., Finlay, G.J. i Baguley, B.C. (2013). The role of the Hippo pathway in melanocytes and melanoma, *Frontiers in Oncology*, 3:123
- Kim, M.H. i Kim, J. (2017). Role of YAP/TAZ transcriptional regulators in resistance to anti-cancer therapies, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(8), 1457–1474.
- Klinac, D., Gray, E.S., Millward, M. i Ziman, M. (2013). Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring, *Frontiers in Oncology*, 3: 54.
- Kloten, V., Rose, M., Kaspar, S., von Stillfried, S., Knüchel, R. i Dahl, E. (2014). Epigenetic inactivation of the novel candidate tumor suppressor gene ITIH5 in colon cancer predicts unfavorable overall survival in the CpG island methylator phenotype, *Epigenetics*, 9(9), 1290–1301.
- Kobayashi, H., Suzuki, M., Hirashima, Y. i Terao, T. (2003). The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent, *Biological Chemistry*, 384(5), 749–754.
- Laufer, B.I. i Singh, S.M. (2015). Strategies for precision modulation of gene expression by epigenome editing : an overview, *Epigenetics & Chromatin*, 1–12.
- Lidsky, M., Antoun, G., Speicher, P., Adams, B., Turley, R., Augustine, C., Tyler, D. i Ali-Osman, F. (2014) Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) hyperactivation and enhanced NRAS expression drive acquired vemurafenib resistance in V600E BRAF melanoma cells, *Journal of Biological Chemistry*, 289(40), 27714–27726.
- Lim, S.Y., Menzies, A.M. i Rizos, H. (2017). Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma, *Cancer*, 123, 2118–2129.
- Liu, J., Cao, F., Li, Xiaojie, Zhang, L., Liu, Z., Li, Xiaodong, Lin, J. i Han, C. (2021). ITIH5, a p53-responsive gene, inhibits the growth and metastasis of melanoma cells by downregulating the transcriptional activity of KLF4, *Cell Death and Disease*, 12(5).
- Liu, Y. i Sheikh, M.S. (2015). Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management, *Molecular and Cellular Pharmacology*, 6(3).

- Lord, M.S., Melrose, J., Day, A.J. i Whitelock, J.M. (2020). The Inter- α -Trypsin Inhibitor Family: Versatile Molecules in Biology and Pathology, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 68(12), 907–927.
- Mai, C., Zhao, J.J., Tang, X.F., Wang, W., Pan, K., Pan, Q.Z., Zhang, X.F., Jiang, S.S., Zhao, B.W., Li, Y.F., Xia, J.C. i Zhou, Z.W. (2014). Decreased ITIH5 expression is associated with poor prognosis in primary gastric cancer, *Medical Oncology*, 31(7).
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A. i Kolch, W. (2011). Raf family kinases: Old dogs have learned new tricks, *Genes and Cancer*, 2(3), 232–260.
- Mendoza, M.C., Er, E.E. i Blenis, J. (2011). The Ras-ERK i PI3K-mTOR pathways : cross-talk and compensation, *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 320–328.
- Misek, S.A., Appleton, K.M., Dexheimer, T.S., Lisabeth, E.M., Lo, R.S., Larsen, S.D., Gallo, K.A. i Neubig, R.R. (2020). Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells, *Oncogene*, 39(7), 1466–1483.
- Misra, S., Hascall, V.C., Markwald, R.R. i Ghatak, S. (2015). Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer, *Frontiers in Immunology*, 6:201.
- Morrison, D.K. (2012). MAP kinase pathways, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), 1–6.
- Nallet-Staub, F., Marsaud, V., Li, L., Gilbert, C., Dodier, S., Bataille, V., Sudol, M., Herlyn, M. i Mauviel, A. (2014). Pro-invasive activity of the hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma, *Journal of Investigative Dermatology*, 134(1), 123–132.
- Oing, C., Jost, E., Dahl, E., Wilop, S., Brümmendorf, T.H. i Galm, O. (2011). Aberrant DNA hypermethylation of the ITIH5 tumor suppressor gene in acute myeloid leukemia, *Clinical Epigenetics*, 2(2), 419–423.
- Paris, S., Sesboué, R., Delpech, B., Chauzy, C., Thiberville, L., Martin, J.P., Frébourg, T. i Diarra-Mehrpour, M. (2002). Inhibition of tumor growth and metastatic spreading by overexpression of inter-alpha-trypsin inhibitor family chains, *International Journal of Cancer*, 97(5), 615–620.
- Paul, M.D. i Hristova, K. (2019). The RTK Interactome: Overview and Perspective on RTK Heterointeractions, *Chemical Reviews*, 119(9), 5881–5921.

- Poulidakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., Salton, M., Dahlman, K.B., Tadi, M., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Kelley, M.C., Misteli, T., Chapman, P.B., Sosman, J.A., Graeber, T.G., Ribas, A., Lo, R.S., Rosen, N. i Solit, D.B. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E), *Nature*, 480(7377), 387–390.
- Radić, M., Vlašić, I., Jazvinščak Jembrek, M., Horvat, A., Tadijan, A., Sabol, M., Dužević, M., Herak Bosnar, M. i Slade, N. (2022) Characterization of Vemurafenib-Resistant Melanoma Cell Lines Reveals Novel Hallmarks of Targeted Therapy Resistance, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17).
- Rascio, F., Spadaccino, F., Rocchetti, M.T., Castellano, G., Stallone, G., Netti, G.S. i Ranieri, E. (2021). The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: an updated review, *Cancers*, 13(16).
- Roberts, P.J. i Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer, *Oncogene*, 3291–3310.
- Rose, M., Gaisa, N.T., Antony, P., Fiedler, D., Heidenreich, A., Otto, W., Denzinger, S., Bertz, S., Hartmann, A., Karl, A., Knüchel, R. i Dahl, E. (2014). Epigenetic inactivation of ITIH5 promotes bladder cancer progression and predicts early relapse of pT1 high-grade urothelial tumours, *Carcinogenesis*, 35(3), 727–736.
- Rose, M., Kloten, V., Noetzel, E., Gola, L., Ehling, J., Heide, T., Meurer, S.K., Gaiko-shcherbak, A., Sechi, A.S., Huth, S., Weiskirchen, R., Klaas, O., Antonopoulos, W., Lin, Q., Wagner, W., Veeck, J., Gremse, F., Steitz, J., Knüchel, R. i Dahl, E. (2017). ITIH5 mediates epigenetic reprogramming of breast cancer cells, *Molecular Cancer*, 16(1), 1–22.
- Rose, M., Meurer, S.K., Kloten, V., Weiskirchen, R., Denecke, B., Antonopoulos, W., Deckert, M., Knüchel, R. i Dahl, E. (2018). ITIH5 induces a shift in TGF- β superfamily signaling involving Endoglin and reduces risk for breast cancer metastasis and tumor death, *Molecular Carcinogenesis*, 57(2), 167–181.
- Rose, M., Noetzel, E., Kistermann, J., Eschenbruch, J., Rushrush, S., Gan, L., Knüchel, R., Gaisa, N.T. i Dahl, E. (2021). The ECM modulator ITIH5 affects cell adhesion, motility and chemotherapeutic response of basal/squamous-like (BASQ) bladder cancer cells, *Cells*, 10(5).

- Saotome, K., Morita, H. i Umeda, M. (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs, *Toxicology in Vitro*, 3(4), 317–321.
- Sasaki, K., Kurahara, H., Young, E.D., Natsugoe, S., Ijichi, A., Iwakuma, T. i Welch, D.R. (2017). Genome-wide in vivo RNAi screen identifies ITIH5 as a metastasis suppressor in pancreatic cancer, *Clinical and Experimental Metastasis*, 34(3–4), 229–239.
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., D.A., S., S., M.T., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G. i Zhang, F. (2014). Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells, *Science*, 343, 84–87.
- Shi, H., Hong, A., Kong, X., Koya, R.C., Song, C., Moriceau, G., Hugo, W., Yu, C.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Kefford, R.F., Ribas, A., Long, G. V. i Lo, R.S. (2014). A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition, *Cancer Discovery*, 4(1), 69–79.
- Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.K., Lee, H., Koya, R.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlman, K.B., Sosman, J.A., Kefford, R.F., Long, G. V., Nelson, S.F., Ribas, A. i Lo, R.S. (2012). Melanoma whole-exome sequencing identifies V600E B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance, *Nature Communications*, 3, 724–728.
- Soares-Silva, M., Diniz, F.F., Gomes, G.N. i Bahia, D. (2016). The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids, *Frontiers in Microbiology*, 7:183.
- Tadijan, A., Precazzini, F., Hanžić, N., Radić, M., Gavioli, N., Vlašić, I., Ozretić, P., Pinto, L., Škreblin, L., Barban, G., Slade, N. i Ciribilli, Y. (2021) Altered expression of shorter p53 family isoforms can impact melanoma aggressiveness, *Cancers*, 13(20).
- Thompson, B.J. (2020). YAP / TAZ : Drivers of Tumor Growth , Metastasis , and Resistance to Therapy, *BioEssays*, 42(5), 1–16.
- Tomczak, K., Czerwińska, P. i Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge, *Wspolczesna Onkologia*, 1A, A68–A77.
- Tran, K.B., Kolekar, S., Jabed, A., Jaynes, P., Shih, J.H., Wang, Q., Flanagan, J.U., Rewcastle, G.W., Baguley, B.C. i Shepherd, P.R. (2021). Diverse mechanisms activate the PI 3-kinase/mTOR pathway in melanomas: implications for the use of PI

3-kinase inhibitors to overcome resistance to inhibitors of BRAF and MEK, *BMC Cancer*, 21(1), 1–12.

- Trunzer, K., Pavlick, A.C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Kim, K.B., Weber, J.S., Hersey, P., Long, G. V., Lawrence, D., Ott, P.A., Amaravadi, R.K., Lewis, K.D., Puzanov, I., Lo, R.S., Koehler, A., Kockx, M., Spleiss, O., Schell-Steven, A., Gilbert, H.N., Cockey, L., Bollag, G., Lee, R.J., Joe, A.K., Sosman, J.A. i Ribas, A. (2013). Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma, *Journal of Clinical Oncology*, 31(14), 1767–1774.
- van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A. i Hays, J.P. (2008). A Brief Comparison Between In Vivo DNA Replication and In Vitro PCR Amplification, *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, 9–15.
- Veeck, J., Chorovicer, M., Naami, A., Breuer, E., Zafrakas, M., Bektas, N., Du, M., Kristiansen, G., Hartmann, A., Knuechel, R. i Dahl, E. (2008). The extracellular matrix protein ITIH5 is a novel prognostic marker in invasive node-negative breast cancer and its aberrant expression is caused by promoter hypermethylation, *Oncogene*, 27, 865–876.
- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., Santiago-Walker, A.E., Letrero, R., D’Andrea, K., Pushparajan, A., Hayden, J.E., Brown, K.D., Laquerre, S., McArthur, G.A., Sosman, J.A., Nathanson, K.L. i Herlyn, M. (2010). Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K, *Cancer Cell*, 18(6), 683–695.
- Wei, Z. i Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, *Cell Research*, 12(1), 9–18.
- Weidle, U.H., Birzele, F. i Tiefenthaler, G. (2018). Potential of Protein-based Anti-metastatic Therapy with Serpins and Inter α -Trypsin Inhibitors, *Cancer Genomics & Proteomics*, 238(15), 225–238.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. i Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11), 875–885.
- Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Go, Z., Iyer, R., Kolis, S., Zhao, S., Lee, R., Grippo, J.F., Schostack, K., Simcox, M.E., Heimbrook, D., Bollag, G. i Su, F. (2010). RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent

antitumor activity in preclinical melanoma models, *Cancer Research*, 70(13), 5518–5527.

- Zhuo, L., Hascall, V.C. i Kimata, K. (2004). Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan- protein complex, *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38079–38082.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Novoj Gradiški 1996. godine. Pohađala sam Osnovnu školu Ivan Goran Kovačić u Starom Petrovom Selu te sam srednjoškolsko obrazovanje stekla u Općoj gimnaziji Nova Gradiška. Upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije nakon kojega sam upisala diplomski studij eksperimentalne biologije, modul: fiziologija i imunobiologija. Tijekom studiranja odradila sam laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Frane Paića. 2021. godine sudjelovala sam na znanstvenom kongresu *Zagreb International Medical Summit* s grupnom prezentacijom. Također, sudjelovala sam u organizaciji i izvođenju radionica na Noći biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu 2016. i 2017. godine.