

Utjecaj polimorfizama TLR5 (rs2072493) i TLR7 (rs5935436) na transkriptom i metabolom u staničnom modelu karcinoma pluća nemalih stanica

Baranašić, Jurica

Doctoral thesis / Doktorski 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:217:259171>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Jurica Baranašić

**Utjecaj polimorfizama *TLR5* (rs2072493)
i *TLR7* (rs5935436) na transkriptom i
metabolom u staničnom modelu
karcinoma pluća nemalih stanica**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Jurica Baranašić

**Influence of *TLR5* (rs2072493) and *TLR7*
(rs5935436) polymorphisms on
transcriptome and metabolome of *in vitro*
model of metastatic non-small cell
lung carcinoma**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023

“Ovaj je doktorski rad izrađen u Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom naslovne doc. dr. sc. Jelene Knežević, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.“

INFORMACIJE O MENTORICI

Dr. sc. Jelena Knežević diplomirala je 1995. godine Prehrambenu tehnologiju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 2004. godine magistrirala je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2008. godine postala je doktor znanosti, na istom fakultetu, iz područja prirodnih znanosti, znanstveno polje biologija. Poslije doktorata usavršavala se u Njemačkom centru za istraživanje raka (DKFZ) u Heidelbergu u Njemačkoj, te se nakon usavršavanja 2011. godine zaposlila kao znanstvena suradnica na Institutu Ruđer Bošković. 2020. godine izabrana je u naslovno nastavno zvanje docentice iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja temeljne medicinske znanosti na Zavodu za integrativnu medicinu Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo, Sveučilišta u Osijeku.

Fokus njenih istraživanja je genetička varijabilnost receptora urođene imunosti i zajedničkih signalnih molekula kod osoba oboljelih od kronične plućne bolesti i karcinoma pluća, bolesti koje su prema epidemiološkim studijama značajno povezane. Bila je voditeljica DAAD/MZOS bilateralnog projekta, te HRZZ projekta „HRZZ-IP-1441-Genetički i epigenetički biomarkeri urođene imunosti u KOPBu i karcinomu pluća“.

Objavila je 37 znanstvenih radova i 3 poglavlja u knjigama. Dobitnica je stipendije za sudjelovanje u 18. ljetnoj školi imunologije i 33. godišnjem sastanku Skandinavskog društva za imunologiju. 2009. godine dobila je stipendiju za boravak u DKFZ-u, te 2010. godine dobila stipendiju od DKFZ-a za nastavak započete suradnje. Članica je Hrvatskog društva za kliničku genetiku, Hrvatskog društva za humanu genetiku, Hrvatskog društva za istraživanje raka, te Hrvatskog imunološkog društva.

Zahvaljujem se naslovnoj doc.dr. sc. Jeleni Knežević što mi je pružila priliku da pod njenim vodstvom izradim doktorsku disertaciju. Zahvalan sam na svom strpljenju i pomoći, te raspravama i mogućnostima prilikom izrade doktorata.

Zahvaljujem voditelju kao i svim članovima Laboratorija za naprednu genomiku na poticajnom znanstvenom okruženju za rad kao i zanimljivim raspravama.

Hvala dr. sc. Asti Försti i njezinoj grupi s Njemačkog centra za istraživanje raka u Heidelbergu na pomoći na mojim počecima bioinformatičkih analiza.

Zahvaljujem se suradnicima iz Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, kao i Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku koji su mi pomogli oko analiza metaboloma, posebice dr. sc. Željku Debeljaku.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci, strpljenju i razumijevanju!

Utjecaj polimorfizama *TLR5* (rs2072493) i *TLR7* (rs5935436) na transkriptom i metabolom u staničnom modelu karcinoma pluća nemalih stanica

JURICA BARANAŠIĆ

Institut Ruđer Bošković

Karcinom pluća je jedna od najčešćih i najsmrtonosnijih malignih bolesti u svijetu. Uz izloženost duhanskom dimu, važan čimbenik u nastanku i razvoju navedene bolesti je i genetska podloga. Aktivacijom receptora *Toll-like* (TLR) pokreće se složeni signalni put koji u konačnici kulminira oslobađanjem različitih transkripcijskih čimbenika. Istraživanja koja su prethodila doktorskoj disertaciji pokazala su povezanost polimorfizma u genima *TLR5* (rs2072493) i *TLR7* (rs5935436) s nastankom karcinoma pluća. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj ovih polimorfizama na transkriptom i metabolom u uvjetima *in vitro*. Rezultati analize transkriptoma pokazuju da polimorfizam rs2072493 utječe na promjene u aktivnosti signalnog puta receptora spregnutim s proteinima G (GPCR). Rezultati analize metaboloma pokazuju da prisutnosti polimorfizma rs2072493 mijenja aktivnosti metabolizma triptofana. Nadalje, povećanjem ekspresije gena *TLR7*, metastatske stanice karcinoma pluća, H1299, postaju osjetljivije na kotretman imikvimodom i paklitakselom. Također, promjena u ekspresiji *TLR7* utječe na promjene u aktivnosti staničnog puta glikolize, signalnog puta HIF-1, i signalnog puta AMPK.

(124 stranica, 24 slika, 25 tablica, 145 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: karcinom pluća, polimorfizmi, *TLR5*, *TLR7*, imunosni odgovor

Mentor: naslovna doc. dr. sc. Jelena Knežević, znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Nada Oršolić

naslovni doc. dr. sc. Petar Ozretić, viši znan. suradnik

dr. sc. Dragomira Majhen, znan. savjetnica

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Influence of *TLR5* (rs2072493) and *TLR7* (rs5935436) polymorphisms on transcriptome and metabolome of *in vitro* model of metastatic non-small cell lung carcinoma

JURICA BARANAŠIĆ

Rudjer Boskovic Institute

Lung cancer is one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide. Exposure to smoke is the main cause of developing lung cancer, genetic background also has a significant role. Activation of Toll-like receptors (TLR) starts a complex signaling pathway, which in the end releases transcriptional factors. Previous associations studies linked polymorphisms in *TLR5* (rs2072493) and *TLR7* (rs5935436) with higher susceptibility of developing lung cancer. The aim of this research was to examine the effect of these polymorphisms on the transcriptome and metabolome *in vitro*. The results of the transcriptome analysis show that the rs2072493 polymorphism affects changes in the activity of the G protein-coupled receptor (GPCR) signaling pathway. The results of the metabolome analysis show that the presence of the rs2072493 polymorphism changes the activity of tryptophan metabolism. Furthermore, metastatic lung cancer cells, H1299, overexpressing TLR7 are more sensitive to co-treatment with imiquimod and paclitaxel. Also, the change in TLR7 expression affects the activity of glycolysis metabolism, the HIF-1 signaling pathway, and the AMPK signaling pathway.

(124 pages, 24 figures, 25 tables, 145 references, original in croatian)

Keywords: lung cancer, polymorphisms, TLR5, TLR7, immune response

Supervisor: Dr. Jelena Knežević, Senior Scientist

Reviewers: Dr. Nada Oršolić, Associate Professor

Dr. Petar Ozretić, Senior Research Associate

Dr. Dragomira Majhen, Senior Scientist

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	6
2.1. Karcinom pluća.....	6
2.2. Uloga mutacija u tumorigenezi.....	9
2.3. Promjene u metabolomu karcinoma	11
2.4. Imunosni sustav i odgovor.....	12
2.5. Uloga upale u tumorigenezi.....	14
2.6. Receptori <i>Toll-like</i>	15
2.7. Receptor <i>Toll-like 5</i>	18
2.8. Receptor <i>Toll-like 7</i>	19
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. Materijali	22
3.1.1. Korišteni bakterijski sojevi	22
3.1.2. Korištene stanične linije.....	22
3.2. Metode	23
3.2.1. Rad sa bakterijskim kulturama i priprema SP_61 plazmidnog konstrukta.....	23
3.2.1.1. Uzgoj elektrokompetentnih stanica.....	23
3.2.1.2. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija.....	23
3.2.1.3. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina	25
3.2.1.4. Restriksijsko cijepanje plazmidne DNA.....	25
3.2.1.5. Elektroforeza na gelu agaroze.....	26
3.2.1.6. Reakcija LR sustava <i>Gateway</i>	27
3.2.1.7. Transformacija bakterija plazmidnom DNA	28
3.2.2. Rad sa staničnim kulturama	30
3.2.2.1. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi.....	31
3.2.2.2. Unos nukleinskih kiselina u stanice	31
3.2.2.2.1. Trasnfekcija stanica	32
3.2.2.2.2. Infekcija stanica	33
3.2.2.3. Tretiranje stanica inhibitorom enzima NAMPT	34
3.2.2.4. Izolacija ukupne RNA iz stanica.....	34
3.2.2.5. Uklanjanje zaostalih molekula DNA (DNazni tretman).....	35

3.2.2.6. Sinteza komplementarne DNA (cDNA)	35
3.2.2.7. Kvantitativna lančana reakcije polimeraze (qPCR).....	36
3.2.2.8. Određivanje preživljenja stanica (MTT test)	37
3.2.3. Analiza transkriptoma	38
3.2.3.1. Priprema uzoraka za analizu transkriptoma	38
3.2.3.2. Provjera kvalitete nukleinskih kiselina	39
3.2.3.3. Priprema knjižnice za sekvenciranje.....	40
3.2.3.4. Provjera kvalitete neobrađenih sekvenci i poravnanje na referentni genom	40
3.2.3.5. Analiza diferencijalne ekspresije gena.....	42
3.2.3.6. Analiza genske ontologije i GSEA	43
3.2.4. Analiza metaboloma	44
3.2.4.1. Priprema uzoraka za analizu metaboloma	45
3.2.4.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina (analiza pomoću bikonične kiseline, BCA).....	46
3.2.4.3. Određivanje postotka utišavanja gena westernskom metodom otiska.....	47
3.2.4.4. Ekstrakcija metabolita.....	48
3.2.4.5. Snimanje masenih spektara uzoraka metodom MALDI-TOF	49
3.2.4.6. Bioinformatička analiza masenih spektara	50
3.2.5. Cjelogenomske analize povezanosti biljega s nastankom karcinoma pluća.....	50
3.2.6. Statistička analiza.....	52
4. REZULTATI.....	53
4.1. Rezultati utjecaja polimorfizama gena <i>TLR5</i> (rs2072493) na promjene ukupnog transkriptoma u staničnim linijama H1299 i WI-38.....	53
4.1.1. Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena	53
4.1.2. Rezultati analize GO	58
4.1.3. Rezultati analize GSEA	60
4.2. Rezultati analize utjecaja povećane ekspresije gena <i>TLR7</i> na preživljenje metastatskih stanica karcinoma pluća.....	61
4.2.1. Rezultati analize pripreme plazmidnog konstrukta.....	62
4.2.2. Rezultati analize transfekcije stanica H1299	63
4.2.3. Rezultati analize ekspresije gena <i>TLR7</i>	63
4.2.4. Rezultati analize preživljenja stanica.....	64
4.3. Rezultati analize metaboloma.....	67
4.3.1. Rezultati analize validacije utišavanja gena <i>NME4</i>	68
4.3.2. Rezultati analize validacije tretiranja stanica H1299 inhibitorom enzima NAMPT	74

4.3.3. Rezultati analize utjecaja polimorfizama <i>TLR5</i> (rs2072493) na promjene u metabolomu staničnih linija H1299, WI-38 i THP-1.....	79
4.3.4. Rezultati analize utjecaja povećane i smanjene ekspresije gena <i>TLR7</i> na promjene metaboloma stanica H1299.....	86
4.4. Rezultati povezanosti polimorfizama u genima koji sudjeluju u imunosnom odgovoru s nastankom karcinoma pluća	95
5. RASPRAVA.....	100
6. ZAKLJUČAK	111
7. LITERATURA.....	112
8. ŽIVOTOPIS	124

1. UVOD

Karcinom pluća druga je najučestalija vrsta karcinoma u Hrvatskoj i vodeći uzrok smrtnosti od malignih bolesti u svijetu. Prema patohistološkim karakteristikama, dijeli se u dva glavna tipa: karcinom pluća malih stanica i karcinom pluća nemalih stanica. Najčešći podtipovi karcinomi pluća nemalih stanica su adenokarcinom i karcinom pločastih stanica [1]. Glavnim predisponirajućim čimbenikom za obolijevanje od karcinoma pluća smatra se pušenje, iako samo 20 % aktivnih pušača razvije karcinom pluća. Istraživanja su pokazala da postoji i genetska podloga za razvoj tumora pluća, kao što su mutacije ili promjene u regulaciji ekspresije gena za tumorske supresore i onkogene [2]. Također, poznato je i da kronična upala sudjeluje u poticanju nastanka karcinoma pluća [3].

Imunosni sustav ima značajnu ulogu u tumorigenezi. U ranijim fazama bolesti imunosti sustav pokušava suzbiti rast tumora uništavanjem tumorskih stanica. Kako bi imunosti sustav razorio stanice tumora, nužna je detekcija tumorskih antigena koja rezultira dovođenjem ubilačkih stanica, kao što su citotoksični limfociti, makrofazi i prirodno ubilačke stanice, koje uništavaju stanice tumora [4]. Imunosni sustav također može i pospješiti razvoj tumora sudjelovanjem u stvaranju imunosupresivnog mikrookoliša u samom tkivu tumora. Urođeni imunosti sustav predstavlja prvu liniju obrane organizma od mikroba, za razliku od adaptivnog imunosti odgovora koji je sporiji ali specifičniji [5]. Poremećaji povezani uz imunosti sustav mogu dovesti do različitih oboljenja, pa tako i nastanak karcinoma. Primjerice kronična upala stvara pogodne uvjete za nastanak karcinoma. Nerazriješena upala nastala zbog lošeg imunosti odgovora može dovesti do promjene u ekspresiji gena povezanih s nastankom i progresijom tumora, te posttranslacijskih modifikacija proteina koji sudjeluju u staničnom ciklusu, popravku DNA i apoptozi [6].

Receptori *Toll-like* (TLR) su skupina transmembranskih glikoproteina koji imaju značajnu ulogu u aktivaciji i regulaciji urođene imunosti i ranoj obrani organizma od patogena [7]. Do sada je identificirano 10 ljudskih TLR-a koji prepoznaju različite patogene pridružene molekularne sljedove, PAMP-ove (*engl. pathogen-associated molecular patterns*) i molekularne sljedove povezane s oštećenjem, DAMP-ove (*engl. danger-associated molecular patterns*). Vežanjem liganda dolazi do aktivacije TLR-a i pokretanja složenog signalnog puta čija je krajnja točka aktivacija transkripcijskih čimbenika, kao što su nuklearni čimbenik κB (NF- κB), aktivatorski protein 1 (AP-1) te interferon regulirajući čimbenici (*engl. interferon regulatory factors*, IRFs), koji induciraju sintezu ili otpuštanje pro- i anti-upalnih molekula

(kemokina i citokina) [8,9]. TLR-i su građeni od izvanstanične, transmembranske i citoplazmatske domene. Izvanstanična domena prepoznaje i veže ligand, a citoplazmatska domena, Toll / IL-1R (TIR), ključna je u mobilizaciji adaptorskih molekula i provođenju signala. Najčešća adaptorna molekula kod aktivacije TLR signalnog puta je MyD88 (*engl. myeloid differentiation primary-response protein 88*) [10]. Do sada su opisana dva signalna puta aktivacije TLR-a, signalni put ovisan i neovisan o adaptorskoj molekuli MyD88. Kod signalnog puta ovisnog o MyD88, aktivacijom TLR-a dolazi do vezanja MyD88 na TIR domenu, što dovodi do interakcije MyD88 s proteinima iz porodice IRAK (*engl. interleukin-1 receptor-associated kinase*), aktivacije TRAF6 (*engl. tumor necrosis factor receptor associated factor 6*), TGF- β -aktivirane proteinske kinaze 1 (*engl. transforming growth factor- β -activated proteinkinase 1*, TGF- β -TAK1), degradacije IKK (*engl. inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex*) i u konačnici oslobađanja transkripcijskog čimbenika NF- κ B. Signalni put neovisan o MyD88 podrazumijeva prijenos signala preko TRIF-a (*engl. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), koji potom aktivira TRAF6 i u konačnici NF- κ B.

Različite TLR-e eksprimiraju gotovo sve stanice imunskog sustava, ali i epitelne i endotelne stanice, uključujući i stanice tumora [8,11]. Ovisno o vrsti liganada koje prepoznaju, TLR-i su smješteni na različitim membranama. TLR-i koji prepoznaju nukleinske kiseline (TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9) smješteni su na membranama unutarstaničnih vezikula, dok su ostali TLR-i (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6) smješteni na izvanstaničnoj membrani [10]. TLR7 uključen je u prepoznavanje virusne jednolančane RNA, dok TLR5 prepoznaje flagelin koji je strukturna sastavnica bičastih bakterija. Uz prirodne ligande, TLR-i se mogu aktivirati i različitim sintetskim ligandima. Na primjer, pokazano je da imikvimod, analog nukleozida, stimulira proizvodnju i sekreciju proupalnih citokina aktivacijom signalnog puta preko TLR7 [12].

Dosadašnja istraživanja upućuju na to da su TLR5 i TLR7 povezani s nastankom i progresijom karcinoma pluća. Tako su Zhou i suradnici [13] pokazali da je povećana ekspresija *TLR5* kod pacijenata s karcinomom pluća nemalih stanica povezana s boljim preživljenjem. Nadalje su pokazali da povećana ekspresija *TLR5* u stanicama karcinoma pluća dovodi do inhibicije proliferacije, migracije i invazije tumorskih stanica, što ukazuje na antitumorsko djelovanje TLR5 u karcinomu pluća [13]. U istraživanjima *in vivo* je također pokazano kako stimulacija stanica adenokarcinoma pluća CBLB502-om, sintetskim agonistom TLR5, dovodi do usporenog rasta karcinoma, a inhibicija receptora TLR5 ubrzava rast karcinoma pluća [14]. Osim za TLR5, postoje istraživanja vezana i za receptor TLR7 koja su pokazala da pacijenti s većom ekspresijom TLR7 imaju lošiju sveukupnu stopu preživljenja. Također je pokazano da

stanice adenokarcinoma pluća stimulirane s loksoribinom (sintetskim ligandom TLR7), imaju bolje preživljenje u odnosu na nestimulirane stanice. Prilikom stimulacije s agonistom TLR7 dolazi do povećane ekspresije antiapoptotskog proteina BCL-2, što u konačnici uzrokuje bolje preživljenje tumorskih stanica. Stanice adenokarcinoma pluća koje su prije tretmana s citostatikom (cikloheksamidom, cisplatinom, karboplatinom, doksorubicinom i Navelbinom) stimulirane s loksoribinom pokazuju otpornost na učinak citostatika, ukazujući da TLR7 ima protumorsko djelovanje [15,16]. Protumorski učinak TLR7 dokazan je i u eksperimentima *in vivo* na mišjem modelu, gdje je pokazano da stimulacija agonistom TLR7 dovodi do povećanja mijeloidnih supresorskih stanica (MDSC, *engl. myeloid-derived suppressor cells*) u tumorski mikrookoliš [17]. Međutim, još uvijek ne postoje istraživanja koja bi opisale učinke direktno povezale s genskom podlogom, tj. specifičnim mutacijama.

Rezultati istraživanja povezivanja, koje su prethodile ovom istraživanju, pokazale su da su polimorfizmi gena *TLR5* (rs2072493) i *TLR7* (rs5935436) statistički značajno povezani s nastankom karcinoma pluća. Polimorfna varijanta gena *TLR5*, rs2072493, smještena je na prvom kromosomu na poziciji 223.111.257 i zahvaća kodirajuću regiju samog gena. Karakterizira je promjena adenina u gvanin, što za posljedicu ima promjenu aspartata na mjestu 592 u serin na proteinskoj razini. Istraživanja povezivanja su pokazala kako se ova genska varijanta povezuje s lošijim preživljenjem osoba s karcinomom debelog crijeva [18]. Također je pokazano da su metastatske tumorske stanice pluća, zbog prisutnosti polimorfizma rs2072493, senzitivnije na tretman kemostaticima (cisplatinom, karboplatinom i paklitaksel). Pokazano je da kod stanica fibroblasta pluća dolazi do smanjenja aktivnosti transkripcijskog čimbenika NF- κ B, a povećanja aktivnosti transkripcijskog čimbenika AP-1, zbog prisutnosti polimorfizma rs2072493/N592S gena *TLR5*. Nadalje, polimorfizam rs2072493/N592S utječe na fosforilaciju p38 i ERK, koji utječu na aktivaciju transkripcijskih čimbenika [19]. Polimorfizam rs5935436 je smješten na kromosomu X na poziciji 12.865.772, nalazi se u promotorskoj regiji gena *TLR7* i karakterizira ga promjena citozina u timin. Rezultati analize luciferazne aktivnosti, koji su također prethodili ovom istraživanju, pokazali su da prisustvo ovog polimorfizma povećava aktivnost promotora gena *TLR7*. Druga istraživanja pokazala su povezanost polimorfizam rs5935436 s nastankom sistemskog eritemskog lupusa i astme [20,21].

Posljednjih godina, kao posljedica razvoja naprednih tehnologija, sve je veći interes za izučavanje tzv. metaboloma tumora, koji se očituje kao promjena u količini malih molekula, a nastaje kao direktna posljedica promjena na genetskoj, transkriptomskoj ili proteomskoj razini tkiva tumora. Dosadašnje integrativne analize metabolomskih i transkriptomskih podataka, koje

su još u povojima, pokazuju kako kod tumora pluća nemalih stanica dolazi do raznih promjena u metabolizmu nukleotida i aminokiselina te sintezi i metabolizmu masnih kiselina [22–24].

Kako navedeni polimorfizmi (rs2072493 i rs5935436), koji su povezani s nastankom karcinoma pluća, nisu dovoljno funkcionalno okarakterizirani, tema ovog doktorskog rada je proučiti njihovu ulogu u metastatskim stanicama karcinoma pluća. Dobivena saznanja o ulozi gena *TLR5* i *TLR7* u tumorigenezi metastatskog karcinoma pluća bi u budućnosti mogla doprinijeti i pronalasku boljih načina liječenja metastatskog oblika karcinoma pluća. Uz navedene polimorfne biljege koji su povezani s nastankom karcinoma pluća, važno je pronaći nove polimorfne biljege kako bi se proširilo znanje o genetskoj podlozi razvoja karcinoma pluća.

Polazna hipoteza doktorskog rada je da polimorfizmi gena *TLR5* (rs2072493) i *TLR7* (rs5935436) dovode do promjena u transkriptomu i metabolomu metastatskih stanica karcinoma pluća.

Stoga je cilj ovog doktorskog rada analizirati utjecaj polimorfnih biljega smještenih u genima *TLR5* i *TLR7*, za koje je prethodno pokazano da su povezani s rizikom za razvoj karcinoma pluća, na metabolom i transkriptom metastatskih stanica karcinoma pluća. Također, cilj ovog istraživanja je i identifikacija potencijalno novih polimorfnih biljega pomoću cjelogenomske metode povezanosti (*engl. genome-wide association study, GWAS*).

Specifični ciljevi doktorskog rada su:

1. Ispitati povezanost prisutnosti mutacije s ukupnim ekspresijskim profilom gena u stanicama netumorskog i tumorskog porijekla, te promijenjeno eksprimiranim genima dodijeliti funkcionalne anotacije i odrediti signalne puteve u kojima sudjeluju.
2. Ispitati povezanost prisutnosti mutacije s promjenom metaboloma u stanicama tumorskog i netumorskog porijekla.
3. Ispitati povezanost povećane ekspresije gena *TLR7* s preživljenjem stanica tumorskog porijekla.
4. Identificirati potencijalno nove gene/biljege povezane s nastankom tumora pluća.

Utjecaj polimorfizma gena *TLR5* na ukupne promjene u transkriptomu i metabolomu tumorskih i netumorskih stanica pluća u ovom je doktorskog radu istražen je korištenjem stanica inficiranih adenovirusom koji sadrži divlji tip odnosno mutiranu, N592S, varijantu gena *TLR5*. Zatim je istražen utjecaj povećane ekspresije gena *TLR7*, koja je posljedica polimorfnog biljega rs5935436, na proliferaciju metastatskih stanica karcinoma pluća, kao i utjecaj na promjene metaboloma. Također je ispitan utjecaj utišavanja gena *TLR7* na promjene u metabolomu metastatskih stanica karcinoma pluća. Analizom rezultata GWAS identificirani su

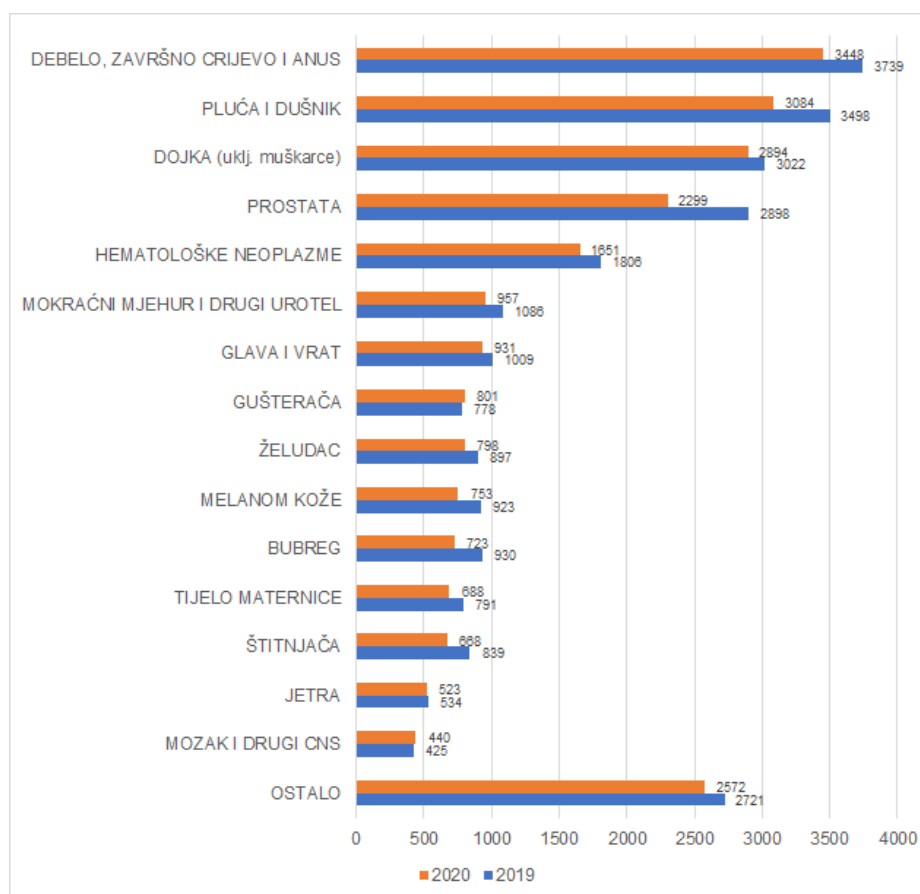
potencijalno novi polimorfni biljezi povezani s nastankom karcinoma pluća.

U izradi ovog rada korištene su metode uzgoja staničnih linija pluća tumorskog i netumorskog porijekla, te infekcija i transfekcija istih stanica, te test proliferacije stanica (test MTT). Zatim uzgoj i transformacija bakterija i izolacija plazmidne DNA, i kloniranje pomoću sustava *Gateway*. Korištena je metoda izolacije ukupne RNA za analizu kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom (RT-qPCR), te za pripremu knjižnice za sekvenciranje sljedećom generacijom. Korištene su i metode za izolaciju proteina i metabolita iz staničnih linija, te westernska metoda otiska za detekciju proteina i analiza metabolita masenom spektrometrijom. U svrhu analize dobivenih rezultata korišteni su različiti bioinformatički alati FastQC, fastp, STAR, Salmon, DESeq2, FELLA, te GSEA.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Karcinom pluća

Karcinom pluća je jedan od najčešće dijagnosticiranih malignih oboljenja na svijetu u oba spola. Prema bazi podataka GLOBOCAN, procijenjeno je da je u svijetu 2020. godine dijagnosticirano 2,2 milijuna novih slučajeva karcinoma pluća. Prema posljednjim podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), karcinomi pluća i dušnika su druga po učestalosti dijagnosticirana vrsta karcinoma u Hrvatskoj u 2020. godini (Slika 1.). Uzimajući u obzir spol, karcinom pluća je drugi najčešće dijagnosticirani oblikom karcinoma kod muškaraca (nakon karcinoma prostate), odnosno treći kod žena (nakon karcinoma dojke i debelog crijeva) [25].



Slika 1. Broj dijagnoza različitih vrsta karcinoma u Hrvatskoj u 2019. (plavo) i 2020. godini (narančasto). Preuzeto i prilagođeno s <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/bilten-incidencija-raka-u-hrvatskoj-2020-godine/>

Maligna oboljenja su među vodećim uzrocima smrtnosti u cijelome svijetu. Iako se posljednjih nekoliko godina bilježi pad stope smrtnosti od karcinoma pluća i dalje je vodeći

uzrok smrtnosti od malignih bolesti kod muškaraca, odnosno drugi po redu uzrok smrti kod žena (nakon karcinoma dojke), zbog čega karcinom pluća predstavlja veliki javnozdravstveni problem na globalnoj razini [26].

Pronalaženjem novih znanstvenih saznanja o karcinomu pluća mijenjala se njegova klasifikacija kroz povijest. Tradicionalno, karcinom pluća se na temelju morfoloških karakteristika dijeli u dvije glavne skupine: karcinom pluća nemalih stanica (*engl. non-small cell lung cancer*, NSCLC) i karcinom pluća malih stanica (*engl. small cell lung cancer*, SCLC). Novim saznanjima dodana je nova kategorija karcinoma pluća nazvana neuroendokrini karcinomi pluća, koja ima neke zajedničke karakteristike obiju skupina. Sukladno s novom podjelom SCLC je svrstan u ovu skupinu zajedno s nekim karcinomima velikih stanica [27]. Najčešća podskupina NSCLC-a u oba spola je adenokarcinom pluća, s učestalošću oko 40 %. Sljedeći po učestalosti je karcinom pluća pločastih (skvamoznih) stanica, s pojavnnošću od 20-30 % od ukupnih dijagnoza, te zatim ostale podvrste karcinoma pluća. Karcinom pluća nemalih stanica je najčešće dijagnosticirana vrsta karcinoma pluća, čineći 80-85 % od ukupnih dijagnoza karcinoma pluća, dok karcinom pluća nemalih stanica čini 15-20 % od ukupnih dijagnoza [28]. Razvojem i primjenom naprednih visokoprotočnih metoda, poput sekvenciranja sljedeće generacije, dolazi do boljih spoznaja biologije, patogeneze kao i pokretačkih mutacija karcinoma pluća, koje se uzimaju u obzir pri novijim klasifikacijama.

Osim prema morfologiji, karcinom pluća kao i ostala maligna oboljenja, možemo podijeliti prema proširenosti bolesti u tijelu. Najpoznatija podjela karcinoma koja se temelji na proširenosti bolesti je TNM-klasifikacija, koja se bazira na karakteristikama karcinoma, poput veličine tumora (*engl. tumor*, T), zahvaćenosti limfnih čvorova (*engl. nodes*, N) i prisutnosti metastaza (*engl. metastasis*, M). Prema TNM-klasifikaciji karcinom pluća se dijeli u četiri stadija, pri čemu viši stadij bolesti ukazuje na proširenu bolest. Zadnja, osma revizija TNM-klasifikacije objavljena je u siječnju 2017. godine [29]. Određivanje stadija karcinoma pluća važno je za procjenu prognoze bolesti, kao i za odabir vrste liječenja.

Karcinom pluća je kompleksna bolest i na njegov nastanak i progresiju utječu brojni čimbenici. Glavnim predisponirajućim čimbenikom za obolijevanje od karcinoma pluća smatra se pušenje, iako samo 20 % aktivnih pušača razvije karcinom pluća. Istraživanja su također pokazala da postoji i genetska podloga za razvoj karcinoma pluća, kao što su mutacije ili promjene u regulaciji ekspresije gena za tumorske supresore i onkogene [2]. Upravo zbog navedenih utjecaja dolazi do postupne zloćudne transformacije epitelnih stanica pluća. Plućni epitel pritom prolazi kroz nekoliko faza morfoloških promjena nazvanih hiperplazija, metaplazija, displazija i karcinom *in situ*, a daljnjom proliferacijom premaligne lezije mogu

prijeći u invazivni karcinom [30].

Karcinom pluća dijeli glavna obilježja s drugim solidnim tumorima. Karakteriziraju ga povećana proliferacija tumorskih stanica, poticanje angiogeneze, izbjegavanje apoptoze, izbjegavanje raznih supresora rasta, deregulacija staničnog metabolizma, te je često praćen upalom koja potiče daljnji rast karcinoma, kao i mnogobrojnim akumuliranim mutacijama u stanicama karcinoma [31].

Liječenje pacijenata s dijagnozom karcinoma pluća ovisi o nekoliko važnih čimbenika: stadiju bolesti u trenutku dijagnoze, histološkom tipu karcinoma pluća (karcinom nemalih stanica adenokarcinom, karcinom pločastih stanica te karcinom malih stanica) i molekularnim karakteristikama karcinoma. Pacijenti s karcinomom pluća nemalih stanica stadija I, II ili III liječe se kirurškim zahvatom uz kemoterapiju, radioterapiju ili kombiniranim pristupom ovisno o stadiju bolesti. Liječenje lokalno uznapredovanog karcinoma pluća koji zahvaća obližnje limfne čvorove, također uključuje ili samostalno uklanjanje tumora operacijom ili kombinaciju primjene neoadjuvantne kemoterapije i operacije. Za liječenje ne-operabilnih tumora pluća stadija III, moguća je i primjena imunoterapije. Za liječenje stadija IV, karcinom pluća s metastazama, moguća je primjena sistemske kemoterapije bazirane na platini, kao i primjena ciljane terapije ili imunoterapije [32].

Imunoterapija se bazira na upotrebi protutijela koji blokiraju vezanje imunosupresivnih receptora ili liganada karcinomskih stanica na limfocite T, čime se povećava citotoksična aktivnost limfocita T. U liječenju karcinoma pluća koriste se inhibitori kontrolnih točaka PD-1 (*engl. Programmed cell Death protein 1*) i PD-L1 (*engl. Programmed Death-Ligand 1*), dok se inhibitori CTLA-4 (*engl. Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) koriste rjeđe [33]. PD-1 je receptor eksprimiran na aktiviranim citotoksičnim limfocitima T, dok se PD-L1 konstitutivno eksprimira na površini makrofaga, antigen-predočnim stanicama, limfocitima B i T. U normalnim uvjetima ovi receptori sprječavaju prekomjernu aktivnost limfocita T i posljedičnu autoimunost [34]. Međutim, ovaj mehanizam koriste stanice karcinoma koje eksprimiraju PD-L1 na svojoj površini, te njegovim vezanjem na receptor PD-1 na citotoksičnim limfocitima T izbjegavaju imunosni odgovor organizma [35]. Ciljana terapija podrazumijeva uporabu lijekova koji inhibiraju djelovanje prekomjerno aktiviranih staničnih puteva u stanicama karcinoma, koji su posljedica raznih mutacija. S obzirom na to da mutacije u stanicama karcinoma najčešće nastaju u genima koji sudjeluju u kontroli proliferacije, primjenom ciljane terapije nekontrolirana stanična proliferacija se inhibira te se tako sprječava daljnja progresija karcinoma. Istraživanja su ukazala na mnoge pokretačke (*engl. driver*) mutacije, te se razvijaju lijekovi koji ciljaju određene mutacije. Neke od meta ciljane terapije

su geni *EGFR* (engl. *epidermal growth factor receptor*), *ALK* (engl. *anaplastic lymphoma kinase*), *ROS1* (engl. *c-ros oncogene 1*), *MET* (engl. *MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase*), *RET* (engl. *ret proto-oncogene*), te mnogi drugi geni [33].

2.2. Uloga mutacija u tumorigenezi

Karcinomi su kompleksna bolest karakterizirana kao abnormalan i nekontroliran rast stanica primarno uzrokovan genetskim mutacijama. Mutacije koje dovode do tumorigeneze nazivaju se pokretačke mutacije. Pod pojmom mutacija, podrazumijevamo točkaste mutacije, odnosno polimorfizme jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), te delecije i insercije. Osim mutacija postoje i druge somatske promijene u genomu koje doprinose tumorigenezi. Neke od tih promjena su amplifikacija ili delecija genomskih regija, reorganiziranje genoma, te razne epigenetske promjene [36]. Najčešći tip genske varijabilnosti jesu točkaste mutacije koje se u populaciji pojavljuju s učestalošću $\geq 1\%$. Prema utjecaju na fenotip dijele se na funkcionalne i nefunkcionalne. Funkcionalne točkaste mutacije su one koje utječu na promjene u aminokiselinskom slijedu proteina i mogu dovesti do promjena u strukturama i funkciji proteina, dok se nefunkcionalne mutacije nalaze u nekodirajućim dijelovima genoma [37]. Razvoj visokoprotočnih tehnologija omogućilo je sve više spoznaja o raznim mutacijama koje dovode do tumorigeneze. Osim u proučavanju mutacija u tumorigenezi, one se također proučavaju u kontekstu ciljane terapije i kao genomski prognostički biomarkeri odgovora na terapiju [36].

Poznato je da mutacije u genima za tumorske supresore *BRCA1* i *BRCA2* dovode do povećanog rizika od obolijevanja od različitih malignih karcinoma, uključujući karcinom dojke, karcinom jajnika, ali i također karcinoma debelog crijeva, želuca i gušterače. Oba proteina sudjeluju u popravku DNA putem homologne rekombinacije, gubljenje njihovih funkcija dovodi do genske nestabilnosti koja rezultira onkogenom transformaciju netumorskih stanica. Do danas je poznato više od 1 000 nasljednih mutacija u svakom od gena, a čak 70-80 % tih mutacija dovodi do nefunkcionalnih proteina [38]. 185AGdel i 5382insC su dvije najčešće mutacije u genu *BRCA1*, detektirane u više populacija, koje su povezane s nastankom karcinoma dojke. Nosioci mutacije 185AGdel imaju vjerojatnost od 66 % da tijekom života obole od karcinoma dojke [39].

Mnoge mutacije su također povezane s nastankom karcinoma pluća. Istraživanja su pokazala da SNP rs6183 u genu za receptor hormona rasta (engl. *growth hormone receptor*, *GHR*) je povezan s nastankom karcinoma pluća. Navedena genska promjena rezultira

zamjenom prolina na mjestu 495 u treonin. Zbog ove promjene dolazi do produljenje signalizacije i smanjene degradacije samog receptora. Poznato je da hormon rasta može inducirati signalni put EGFR, koji utječe na bolje preživljenje karcinoma pluća, pa bi stoga ova varijanta mogla biti povezana s progresijom bolesti [40]. Kod karcinoma pluća često se prate i mutacije u genu *EGFR*. Naime, jedan od načina liječenja karcinoma nemalih stanica je primjena inhibitora tirozinskih kinaza (*engl. tyrosine kinase inhibitors, TKIs*). Pomoću TKI blokira se signalni put EGFR, koji zbog prisutnosti određenih mutacija može biti pojačan u stanicama karcinoma, što za posljedicu ima povećano preživljenje stanica karcinoma. Primjenom TKI u prvoj liniji liječenja tumora, tumor može razviti rezistenciju na lijek, najčešće u obliku nastanka novih mutacija koje su mete druge generacije TKI. TKI prve i druge generacije vežu se na EGFR te mijenjaju konformaciju veznog mjesta adenzin-3-fosfata (ATP), supstrata navedenog enzima, što u konačnici rezultira aktivnim signalnim putem EGFR. Primjerice, mutacija T790M, zbog koje dolazi do promjene tirozina na mjestu 790 u metionin, te u konačnosti zbog nastale steričke smetnje ne može doći do vezanja TKI prve i druge generacije. Osobe s EGFR pozitivnim tumorom, koje primaju TKIs prve i druge generacije ne odgovaraju na ovu vrstu terapije, te je potrebno koristiti TKI sljedećih generacija [41].

Novi polimorfizmi, odnosno mutacije, povezani sa nekom bolešću se često istražuju pomoću analiza GWAS. Provedena su razna istraživanja GWAS koja su pronašla povezanost polimorfizma u genima koji sudjeluju u apoptozi, popravku DNA kao i nikotinskim receptorima s nastankom karcinoma pluća [42]. Provedena istraživanja GWAS rijetko su se fokusirala na imunosni odgovor u nastanku karcinoma pluća, koji može imati ulogu u nastanku i progresiji karcinoma pluća kao i zaštitnu ulogu. Primjerice, Wang i suradnici [43] proveli su istraživanje GWAS na kohorti pacijenata s ranijim stadijem NSCLC. Nakon provedene genotipizacije, u analizi GWAS fokusirali su se na gene koji sudjeluju u imunosnom odgovoru limfocita T u tumorigenezi. Nakon pretrage više baza podataka odlučili su se fokusirati na ukupno 314 gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru limfocita T u tumorigenezi, te su uključeni u 25 staničnih puteva vezanih uz imunosni odgovor. Njihovi rezultati pokazuju povezanost sedam SNP-ova s recidivom NSCLC-a u ranijim stadijima, te sedam SNP-ova koji su povezani s preživljenjem pacijenata s NSCLC-om. Dobiveni SNP-ovi koji su statističku najviše povezani s recidivom NSCLC-a su rs1964986 i rs1573618, smješteni na lokusu gena *TRB* (*engl. T cell receptor beta chain*). SNP rs10108662 povezan je lošijim preživljenjem pacijenta s NSCLC-om. Navedeni SNP nalazi se u genu *IDO1*, koji kodira protein indolamin-2,3-dioksigenu 1, koja može inducirati disfunkciju efektorskih limfocita T smanjujući količinu triptofana i proizvodnjom kinurenina [43]

2.3. Promjene u metabolomu karcinoma

Metabolizam je generalni naziv koji opisuje sve biokemijske reakcije u organizmu koje se odvijaju pod regulacijom gena i proteina, a male molekule ($\leq 1\ 500$ Da) koje su uključene u raznim biokemijskim reakcijama nazivaju se metaboliti. Metaboliti imaju ključnu ulogu u održavanju fiziološke funkcije stanica i organa, te su ključne komponente u međustaničnom provođenju signala. Proučavanje metaboloma, kompletnog skupa metabolita u stanici, nam daje informaciju o trenutnom stanju organizma, te nam govori do kojih promjena je došlo kao posljedica promijene na razini genoma, transkriptoma i proteoma [44]. Kako do razvoja karcinoma dolazi zbog genetskih i epigenetskih promjena u stanicama, navedene promjene rezultiraju i promjenom u metabolomu stanica. Već od 20-tih godina prošlog stoljeća poznato je kako stanice karcinoma troše i do 200 puta veću količinu glukoze u aerobnim uvjetima. Iako u takvim uvjetima stanice imaju dovoljnu količinu kisika, piruvat koji nastaje glikolizom se dalje pretvara u laktat kako bi stanica dobila energiju. Pri normalnim uvjetima nastao piruvat bi se dalje koristio u ciklusu limunske kiseline, te zatim oksidativne fosforilacije za dobivanje energije. Stoga, glavni put dobivanja energije u stanicama karcinoma jest procesom glikolize, te se navedeni učinak naziva se Warburgov učinak. Usprkos ovom otkriću interes o povezanosti metabolizma u stanicama tumora i potencijalnom liječenju bolesti ciljajući metaboličke procese slabo je napredovao [45]. U posljednjih nekoliko godina, razvojem metoda sljedećih generacija, kao što je masena spektrometrija, i povećanom dostupnošću raznih baza, ponovno se povećao interes u istraživanju metaboloma stanica tumora. Istraživanja metaboloma dovela su do identifikacije metabolitskih biomarkera karcinoma, takozvanih onkometabolita. Među prvim identificiranim onkometabolitima bio je 2-hidroksiglutarat. Povišene razine 2-hidroksiglutarata pronađene su kod pacijenata dijagnosticiranih s gliomom ili akutnom mijeloidnom leukemijom, kao posljedica mutacija u genu za enzim izocitrat-dehidrogenaza [46].

Također, provedena su istraživanja metaboloma karcinoma pluća u kojima su Lim i sur. [47] uspoređivali metabolome šest različitih staničnih linija karcinoma pluća u odnosu na stanice pluća nekarcinomskog porijekla (stanična linija SAEC). U svoje istraživanje uključili su stanične linije adenokarcinoma pluća (A549 i HCC827), karcinoma pluća pločastih stanica (NCI-H226 i NCI-H520), karcinoma pluća velikih stanica (NCI-H460), te karcinoma pluća malih stanica (NCI-H526). Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da je došlo do značajnih promjena u metabolizmu aminokiselina, nukleotida, te masnih kiselina u stanicama karcinoma

pluća u odnosu na kontrolne stanice. Također su uspoređivali metabolome staničnih linija unutar iste histološke podgrupe. Uočili su razliku u količini fosfolipida između staničnih linija adenokarcinoma. Stanična linija HCC827 koja sadrži mutirani gen *EGFR* pokazuje veću razinu fosfolipida, u odnosu na staničnu liniju A549, koja sadrži mutiran gen *KRAS*. Dobivene razlike u metabolomima između staničnih linija posljedica su porijekla samih staničnih linija, te prisutnosti različitih mutacija među testiranim staničnim linijama [47]. Moreno i sur. [48] analizirali su metabolom tkiva karcinoma pluća, ukupno su analizirali 68 uzoraka karcinoma pluća i njihovih podudarnih zdravih tkiva. U istraživanje su uključili pacijente sa skvamoznim tipom karcinoma pluća i adenokarcinomom pluća, te su također uspoređivali razlike u metabolomu ova dva podtipa. Njihovi rezultati pokazuju da dolazi do promjene u enzimskim reakcijama metabolizmu glukoze, glutaciona, masnih kiselina, jednog ugljika, te nukleotida. Utvrdili su da postoje razlike u količini oksidiranog glutaciona, cisteina i glicina između adenokarcinomskog podtipa i skvamoznog podtipa, kao i da postoji razlika ekspresije ksantozin-5'-fosfata i urata između proučavanih podtipova karcinoma pluća [48].

U posljednjih nekoliko godina često se koriste integrativne analize, koje uključuju rezultate dobivene analizom transkriptoma i metaboloma, kako bi se dobio detaljniji uvid u promjene u stanicama karcinoma. Integracijom rezultata analize metaboloma seruma pacijenata s karcinomom pluća i transkriptoma utvrđeno je da dolazi do promjene u signalnom putu kalcija, koji utječe na proliferaciju stanica. Otpuštanjem iona kalcija iz endoplazmatskog retikuluma dolazi do aktivacije signalnog puta mitogen-aktivirajuće protein kinaze (MAPK), koji uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanica karcinoma. Istraživanje je pokazalo kako je ekspresija gena *MAPK2* povećana, a količina mio-inozitola smanjena u serumu uzoraka karcinoma pluća, pri čemu oboje sudjeluju u staničnom putu kalcija [49].

2.4. Imunosni sustav i odgovor

Glavnu ulogu obrane organizma od raznih infekcija patogena (virusa, bakterija, gljivica i parazita), njihovih kemijskih supstanci (toksina), kao i vlastitih transformiranih (npr. tumorskih) ili istrošenih stanica, izvršava imunosni sustav. Razlikujemo dvije vrste imunosti, stečenu (specifičnu) i urođenu (nespecifičnu) imunost [50].

Urođena imunost ima važnu ulogu u obrani organizma od infekcije, jer signalizira prisutnost patogena i to već nakon nekoliko minuta do nekoliko sati od pojave patogena [51]. Iako urođeni imunosni odgovor generalno može efikasno ukloniti patogene, ponekad zbog

velike količine ili virulencije patogena nije u mogućnosti u potpunosti ih ukloniti. U takvim situacijama dolazi do aktivacije stečenog imunskog odgovora, koji omogućava prepoznavanje i eliminaciju patogena. Uspostavljanje stečene imunosti traje nekoliko tjedana i ključan je čimbenik u obrani organizma u kasnijim fazama infekcije, kao i kod sekundarnih infekcija zbog „memorijske“ sposobnosti gdje je učinak puno učinkovitiji [52].

U aktivaciji urođenog imunskog odgovora sudjeluju brojne stanice koje kruže krvotokom u organizmu, kao što su neutrofili, monociti i makrofazi, koji imaju sposobnost fagocitoze inficiranih stanica. Dio urođenog imunskog odgovora također čine bazofili, mastociti i eozinofili, koji otpuštaju različite medijatore upale, kao i prirodno ubilačke stanice (*engl. natural killer cells*, NK) koje induciraju apoptozu zaražene stanice [53]. Dolaskom u tkiva i organe fagociti i NK stanice pronalaze, fagocitiraju i razgrađuju mikroorganizme i različite strane tvari, kao i vlastite aberantne stanice, te imaju citotoksičan učinak. Nasuprot njima mononuklearne stanice, kao primjerice monociti i makrofazi, posjeduju receptore za antitijela koja se vežu za površinu stranih čestica i procesom opsonizacije fagocitiraju strane čestice. Granulociti (neutrofili, bazofili i eozinofili) su stanice nepravilnog oblika koje migriraju na mjesto oštećenja, gdje zajedno s makrofazima imaju ulogu fagocitnih stanica, te sudjeluju u produkciji citokina i efektorskih proteina [54]. Limfociti B i T sudjeluju u stečenom imunskom odgovoru [55]. Aktivirani limfociti B transformiraju se u plazma stanice, koje imaju sposobnost stvaranja protutijela. Protutijela omogućuju stanicama prirođenog imuniteta da ih prepoznaju i uklone. Transformacija limfocita B u plazma stanice odvija se uz pomoć podskupine Th2 limfocita T ili neovisno o njima, što ovisi o vrsti antigena. Limfociti T sudjeluju u staničnom imunskom odgovoru, a uloga im je uklanjanje unutarstaničnih antigena. Najčešće se dijele u dvije skupine, pomagačke limfocite T (*engl. T helper*, Th) i citotoksične limfocite T (*engl. T cytotoxic*, Tc). Budući da inficirana stanica predočava strane antigene, oni budu prepoznati od strane citotoksičnih limfocita T (stanica CD8+), koji zatim uništavaju zaražene stanice. Pomagački limfociti T (stanice CD4+) dijele se u dvije podskupine, stanice Th1 i Th2 koje se međusobno razlikuju po citokinima koje izlučuju. Limfociti Th1 izlučuju proupalne citokine kao što su IL-2 i IFN- γ izazivajući upalni odgovor, čime kontroliraju umnažanje unutarstaničnih patogena. Limfociti Th2 izlučuju citokine IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 potičući stvaranje protutijela u limfocitima B [56].

Osim samih imunskih stanica, u imunskom odgovoru bitnu ulogu imaju i citokini. Citokine čini grupa peptida malih molekularnih masa koje sintetiziraju razne stanice, te utječu na različite stanične puteve. Stanice ih najčešće izlučuju kao odgovor na neki podražaj, te se vežu na druge stanice koje na staničnoj membrani sadrže odgovarajući receptor, što citokine

čini medijatorima komunikacije između stanica. Vežanje citokina na receptor dovodi do indukcije unutarstanične signalizacije koja rezultira u modifikaciji transkripcije gena koji sudjeluju u različitim staničnim putevima, kao što su proliferacija, diferencijacija i upalni odgovor [57]. Istraživanja su pokazala kako prevelika produkcija ili nedovoljna produkcija citokina može biti povezana s različitim bolestima, uključujući i karcinom. Citokini također mogu sudjelovati u indukciji i promociji rasta karcinoma [58]. Primjerice, IL-6 može stimulirati proliferaciju stanične linije karcinoma pluća A549 putem signalnog puta PI3K/Akt. Također je pokazano da može povećati proliferaciju matičnih stanica karcinoma [59].

S obzirom na dvojak u ulogu imunskog sustava, vrlo je bitna mogućnost njegovog finog podešavanja. Uključivanje imunskog sustava važno je pri napadu patogena i obrani organizma od transformiranih stanica, no njegova prekomjerna aktivacija može dovesti do oštećenja organizma. Stoga je podešavanje imunskog odgovora bitno u regulaciji staničnih i organskih funkcija [60].

2.5. Uloga upale u tumorigenezi

Upala je imunski odgovor organizma na obranu od raznih štetnih tvari, koja podrazumijeva procese od eliminacije tvari koja su uzrokovala oštećenja do regeneracije tkiva. Dugotrajna izloženost upali i aktivacija imunskih stanica najčešće dovodi do razvoja kronične upale, koja u konačnici dovodi do oštećenja tkiva. Već od 19. stoljeća poznata je povezanost između kronične upale i nastanka karcinoma. Kod oboje vrste bolesti pronađene su stanice imunskog sustava. Otprilike oko 10 % vrsta karcinoma nastaje kao posljedica raznih mutacija. Međutim, kod većine ostalih karcinoma pokazani su uzroci vanjskog utjecaja, često povezani s kroničnom upalom, te su imunosne stanice prisutne na mjestu karcinoma i prije pojave bolesti. Upalni procesi povezani s malignom transformacijom stanice, nastankom karcinoma i regrutacijom imunskih stanica su pod utjecajem ekstrinzičnih (vanjskih) kao i unutarnjih (intrinzičnih) čimbenika [61].

Kod intrinzičnog puta upale, stanice karcinoma zbog različitih genetskih poremećaja proizvode pro-upalne citokine, kemokine i čimbenike rasta [62]. Poznato je da mutacije u genu *EGFR* dovode do prekomjerne aktivacije staničnog puta EGFR, te utječu na regulaciju i aktivaciju STAT3. Aktivacija STAT3 posredovana je pro-upalnim citokinom IL-6, te u konačnici STAT3-ovisnu regulaciju procesa proliferacije [35]. Urođen imunski odgovor je prva linija obrane organizma od različitih patogena. Kod pojave patogena, PRR prepoznaju

PAMP-ove i DAMP-ove, te induciraju imunski odgovor kako bi se uklonio patogen. Upravo zbog navedene funkcije, PRR imaju važnu ulogu u ovom primjeru ekstrinzičnog upalnog puta poticanja nastanka karcinoma [62]. Iako je HMGB1 (*engl. high-mobility group box-1*) nuklearni protein čija funkcija je DNA šaperon, može također imati ulogu DAMP-a. HMGB1 može dospjeti u izvanstanični matriks iz nekrotičnih stanica ili aktiviranih imunskih stanica, te takav izvanstanični HMGB1 može biti prepoznat od nekoliko PRR. U takvom obliku HMGB1 sudjeluje u različitim imunskim procesima kao što su sazrijevanje imunskih stanica, te aktivacija i produkcija citokina. Primjerice, vezanje HMGB1 na TLR-e (TLR2, TLR4, i TLR9) dolazi do aktivacije staničnog puta TLR-a, te u konačnici rezultira aktivacijom transkripcijskog čimbenika NF- κ B i staničnog puta interferon regulirajućih čimbenika (*engl. interferon regulatory factors, IRFs*). NF- κ B i IRF-ovi stimuliraju proizvodnju citokina i kemokina koji sudjeluju u upali [63]. Također može stupiti u interakciju s citokinima, primjerice s CXCL11, kako bi pojačao imunski odgovor [64], te je pokazano da HMGB1 utječe na proliferaciju, staničnu smrt i proces metastaziranja stanica karcinoma [65].

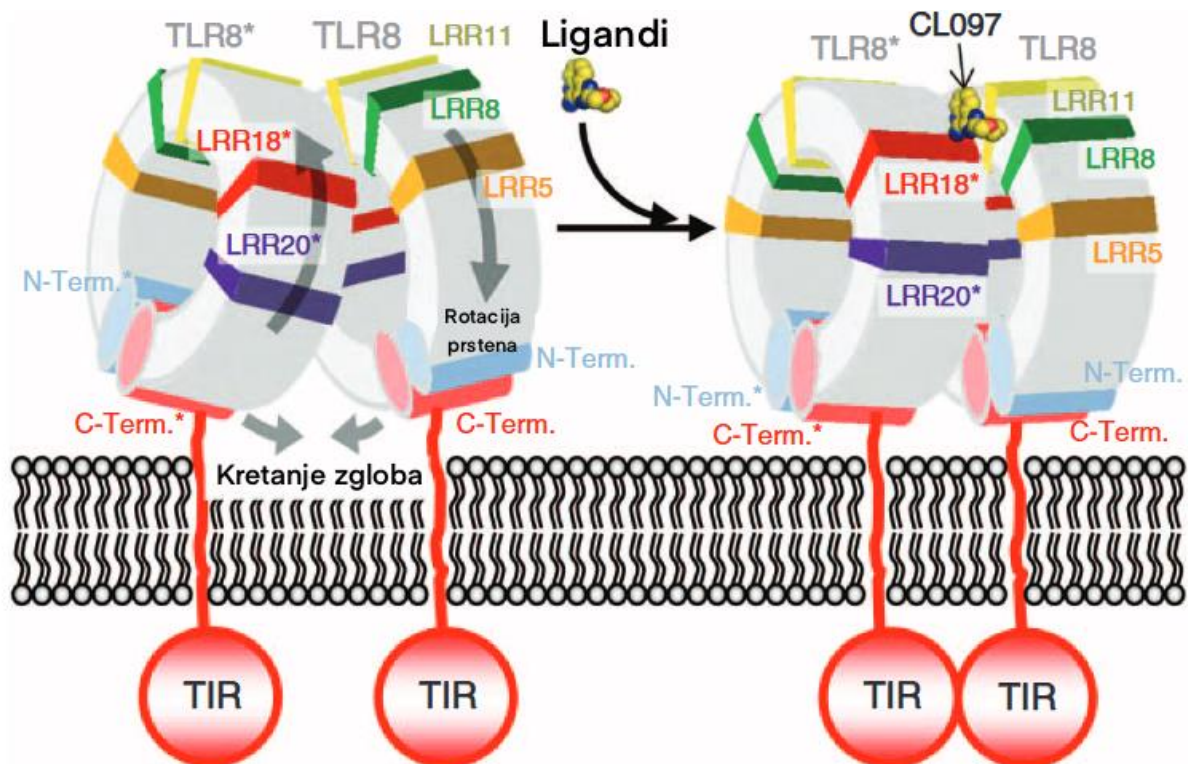
2.6. Receptori *Toll-like*

PRR su skupina proteina koji prepoznaju različite PAMP-ove i DAMP-ove. PAMP-ovi uključuju različite dijelove patogena kao lipoproteine, glikoproteine, flagelu te nukleinske kiseline, dok DAMP-ovi uključuju molekule koje stanice otpuštaju kao odgovor na oštećenje, kao npr. HMGB1 te neki proteini toplinskog stresa (*engl. heat-shock proteins, HSP*) [66]. U skupinu proteina PRR svrstavaju se pet grupa proteina: receptori *Toll-like* (TLR), lektinski receptori tipa C (*engl. C-type lectin receptors, CLR*), receptori *NOD-like* (*engl. nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors, NLR*), receptori *RIG-I-like* (*engl. retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors, RLR*), te receptori *AIM2-like* (*engl. absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors, ALR*) [67]. Prepoznavanjem PAMP-ova i DAMP-ova dolazi do njihove aktivacije, te aktivacije nizvodnih staničnih puteva kao što su opsonizacija/fagocitiranje, aktivacija sustava komplementa, kemotaksija te izlučivanje proupalnih izvršnih molekula [68,69].

TLR-i su najviše proučavana skupina PRR-a. Pripadaju skupini transmembranskih glikoproteina čija glavna uloga je obrana domaćina od patogena gdje sudjeluju u aktivaciji i regulaciji imunskog odgovora [70]. Prvi otkriven TLR je bio u vinskoj mušici gdje sudjeluje u razvoju dorzo-ventralne osi tijekom embriogeneze, a kasnije u obrani od gljivičnih infekcija.

Kod sisavaca, najprije je otkriven TLR4, koji je analogan TLR1 vinske mušice, a zatim su otkriveni ostali TLR-i [71]. TLR-i su građeni od tri domene: vanjske domene s ponavljajućim sljedovima bogatim leucinom (*engl. leucine-rich repeats, LRR*) koja služi za prepoznavanje liganda, transmembranske domene kojom su receptori usidreni u membranu, te citoplazmatske domene, Toll / IL-1R (TIR) koja inicira nizvodni signalni put.

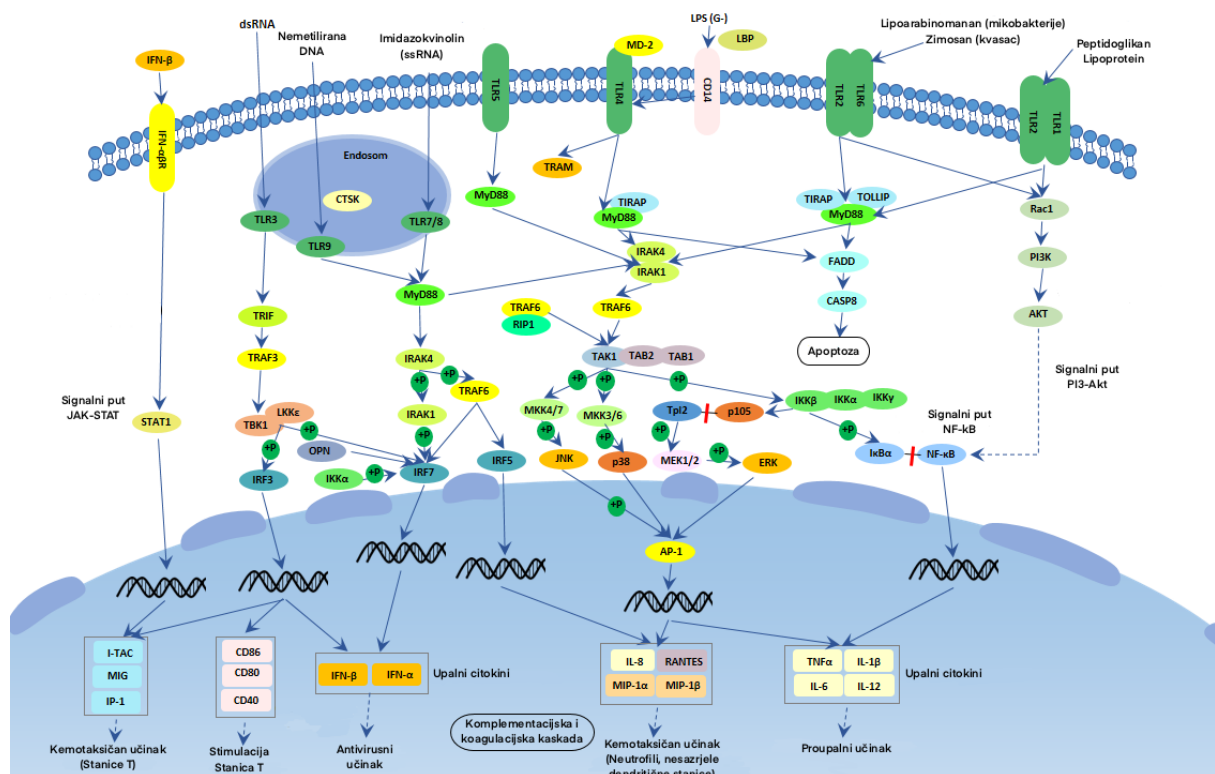
Vežanjem liganda (PAMP-a ili DAMP-a) na izvanstaničnu regiju receptora dolazi do dimerizacije s istovjetnim TLR-om (homo-dimerizacije) ili s različitim TLR-om (hetero-dimerizacija). Stvaranjem dimera dolazi do promjene u konformaciji domena TIR nastalog dimera, pri čemu dolazi i do promjene orijentacije domena TIR i u konačnici novačenje adaptornih molekula, MyD88 i TRIF [72]. Shematski prikaz aktivacije TLR8 prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz promjene konformacije TLR8 tijekom vezanja liganda. Preuzeto i prilagođeno iz Tanji i suradnici, Science 2013. [73]

U ovisnosti o vrsti unovačene adaptorne molekule, provodi se signalni put koji može biti MyD88-ovisan ili MyD88-neovisan put. Kod signalnog puta ovisnog o MyD88, aktivacijom TLR-a dolazi do vezanja MyD88 na TIR domenu, što dovodi do interakcije MyD88 s proteinima iz porodice IRAK. Proteini IRAK zatim dovode do autofosforilacije i novačenja TRAF6 (*engl. tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*). Funkcija TRAF6 je aktivacija

TGF- β -aktivirane proteinske kinaze 1 (*engl. transforming growth factor- β -activated proteinkinase 1*, TGF- β -TAK1) koja stimulira oslobađanje transkripcijskog čimbenika NF- κ B posredovano degradacijom IKK (*engl. inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex*). TGF- β -TAK1 također sudjeluje u oslobađanju transkripcijskog čimbenika AP-1 putem aktivacije kinaza MAPK. Signalni put neovisan o MyD88 podrazumijeva prijenos signala preko molekule TRIF-a (*engl. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), koji potom aktivira TRAF6 i u konačnici NF- κ B [11]. Shematski prikaz signalnog puta receptora *Toll-like* prikazan je na Slici 3.



proliferacija i preživljenje [75,76].

U početku se mislilo da TLR-e ekspimiraju isključivo stanice imunskog sustava, no istraživanja su otkrila da su TLR-i također ekspimirani na epitelnim i endotelnim stanicama, uključujući i stanice tumora [8,11]. Ovisno o vrsti liganada koje vežu, TLR-i su smješteni na različitim membranama. TLR-i koji vežu nukleinske kiseline (TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9) smješteni su na membranama unutarstaničnih vezikula. TLR-i (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6) koji uglavnom vežu komponente bakterija, kao što su lipidi, lipoproteini i proteini, smješteni na staničnoj membrani [77]. TLR7 uključen u vezanje virusne jednolančane RNA, dok TLR5 veže flagelin koji je strukturna sastavnica bičastih bakterija. Uz prirodne ligande, TLR-i se mogu aktivirati i različitim sintetskim ligandima. Pokazano je da imikvimod, analog nukleozida, stimulira proizvodnju i sekreciju proupalnih citokina aktivacijom signalnog puta TLR7 [78].

2.7. Receptor *Toll-like 5*

Receptor TLR5 smješten je na staničnoj membrani, te je jedan od rijetkih receptora iz ove skupine koji veže proteinski ligand. Njegov jedini do sada otkriveni ligand je flagelin, kuglasti protein koji je osnovna građevna jedinica flagele (bič), koja omogućuje pokretljivost bakterija. Flagelin se svojom C-terminalnom domenom visokim afinitetom veže na vanjsku domenu TLR5, pri čemu dolazi do aktivacije signalnog puta [79]. Ovaj receptor, osim u imunskim stanicama, izražen je i u epitelnim stanicama pluća [80] i crijeva gdje ima važnu ulogu u kontroli sadržaja mikrobiote odnosno crijevne flore [81]. Proučavanjem ekspresije proteina TLR5 kod pacijenata s karcinomom debelog crijeva, utvrđeno je da pacijenti s povećanom ekspresijom TLR5 imaju bolje preživljenje, te da bi upravo TLR5 mogao služiti kao prognostički biomarker kod karcinoma debelog crijeva [82]. Istraživanja su također pokazala da stanice karcinoma prostate (LNCaP i DU-145) ekspimiraju TLR5, te da flagelin aktivira signalni put TLR5 u navedenim stanicama. Ekspresija gena *TLR5* također je potvrđena kod pacijenata oboljelih od karcinoma prostate, te je pokazano da pacijenti s povećanom ekspresijom gena *TLR5* imaju bolje preživljenje [83]. Kako je pokazana poveznica između TLR5 i karcinoma prostate nedavno je završena prva faza kliničkog ispitivanja Mobilana (M-VM3) [84]. Mobilan je zapravo adenovirusni konstrukt koji sadrži gene za *TLR5* i farmakološki optimizirani derivat flagelina. Infekcija tumorskih stanica Mobilanom dovodi do farmakološki aktivacije signalnog puta TLR5 što rezultira pokretanjem urođenog imunskog odgovora, te kasnije razvoj adaptivnog antitumorskog imunskog odgovora. Završena je prva faza kliničkog

ispitivanja Mobilana, te je pokazano da ga osobe oboljele od karcinoma prostate dobro podnose, no potrebna su daljnja klinička istraživanja o učinku Mobilana.

Također postoje istraživanja koja povezuju polimorfizme gena *TLR5* s malignim oboljenjima. Rezultati istraživanja Shuang i suradnika [85] pokazuju da je polimorfizam rs5744168 u genu *TLR5* povezan s nastankom karcinoma dojke. Polimorfizam rs5744168 rezultira nastajanjem uranjenog STOP kodona, te u konačnici nastankom krnjeg proteina TLR5 [85]. Nischalke i suradnici [86] pronašli su da je polimorfizam rs5744174 povezan s nastankom hepatocelularnog karcinoma. Uočili su da se polimorfizam rs5744174 genotipa TT češće pojavljuje kod pacijenata dijagnosticiranih u kasnijem stadiju hepatocelularnog karcinoma, te da pacijenti navedenog genotipa imaju znatno manji medijan preživljenja. Nadalje, kada su stimulirali monocite izolirane iz zdravih osoba, flagelinom, uočili su da dolazi do povećane proizvodnje kemokina IL-8 i CXCL1 kod monocita s gore navedenim genotipom u odnosu na divlji tip [86]. Polimorfizam rs5744174 također je povezan s nastankom karcinoma želuca [87]. Uz navedeni polimorfizam, polimorfizmi rs1640827 i rs17163737 povezani su s nastankom karcinomom želuca. Navedeno istraživanje je također povezalo polimorfizme rs1640827 i rs17163737 s povećanom infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori*, koja sadrži protein flagelin [88].

Istraživanja koja povezuju TLR5 s nastankom i progresijom karcinoma pluća su pokazala da je povećana ekspresija *TLR5* kod pacijenata s karcinomom pluća nemalih stanica povezana s boljim preživljenjem. Nadalje su pokazali da povećana ekspresija *TLR5* u stanicama karcinoma pluća dovodi do inhibicije proliferacije, migracije i invazije tumorskih stanica, što ukazuje na antitumorsko djelovanje TLR5 u karcinomu pluća [13]. U istraživanjima *in vivo* je također pokazano kako stimulacija stanica adenokarcinoma pluća CBLB502-om, sintetskim agonistom TLR5, dovodi do usporenog rasta karcinoma, a inhibicija receptora TLR5 ubrzava rast karcinoma pluća [14].

2.8. Receptor *Toll-like 7*

Receptor TLR7, smješten je na stjenkama endoplazmatskog retikuluma. Ekspresija gena *TLR7* dokazana je u raznim stanicama imunskog sustava uključujući plazmocitne i mijeloidne dendritičke stanice, makrofage, limfocite B i NK stanice [89]. Osim u imunskim stanicama, ekspresija TLR7 utvrđena je i u epitelnim i endotelnim stanicama [90]. Istraživanja su pokazala da i stanice tumora također ekspimiraju funkcionalni receptor TLR7 gdje ima dvojaku funkciju. Stimulacijom specifičnim ligandima može doći do progresije tumora ili rezistencije

na anti-tumorsku terapiju [91]. Vrlo je dobro poznato da TLR7 veže virusnu jednolančanu RNA (*engl. single stranded RNA*, ssRNA), kao i sintetske, gvaninom bogate, sekvence RNA kao što su imikvimod, R848, gardikvimod, te loksoribin. Infekcijom stanice virusom ili stimulacijom sintetskim ligandom, ssRNA odnosno agonist ulazi u endosom autofagijom ili endocitozom potpomognutom receptorom, gdje dolazi do aktivacije receptora TLR7 i pokretanja signalnog puta koji u konačnici rezultira aktivacijom transkripcijskih čimbenika [92].

Povećana ekspresija TLR7 utvrđena je u izraslinama (polipima) crijeva u odnosu na normalno crijevno tkivo. Nasuprot normalnim uvjetima, kod pacijenata s karcinomom debelog crijeva dolazi do smanjene ekspresije TLR7 u izraslinama, što može ukazati da smanjena ekspresija TLR7 u normalnom tkivu može uzrokovati transformaciju u karcinomske stanice [93]. Nadalje, pokazano je kako osobe s metastatskim karcinomom debelog crijeva, koji su homozigotni nosioci polimorfizma rs3853839 imaju bolje preživljenje nakon kemoterapije bazirane na cetuksimabu, te bi tako prisutnost ovog polimorfizma mogao biti prediktivni biomarker kod metastatskog oblika karcinoma debelog crijeva za odgovor na kemoterapiju baziranu na cetuksimabu [94]. Povećana razina TLR7, na transkripcijskoj i translacijskoj razini, ustanovljena je i kod pacijenata s adenokarcinomom želuca. Povećana ekspresija TLR7 kod pacijenata s adenokarcinomom želuca povezana je s kasnijim stadijem kao i s lošijim preživljenjem. Također, povećana ekspresija TLR7 pozitivno korelira s infiltracijom imunskih stanica kao i s ekspresijom proteina koji sudjeluju u kontroli imunskih točaka. Sve to upućuje na važnu ulogu TLR7 u tumorigenezi adenokarcinoma želuca [95]. Kod melanoma povećana ekspresija gena *TLR7* povezana je s boljim preživljenjem pacijenata, neovisno o dobi, spolu i stadiju. Daljnja analiza je pokazala pozitivnu korelaciju ekspresije gena *TLR7* s markerima dendritičnih stanica i kemokinskim receptorima (CCR2, CCR5, CCL3 i CCL5). Ekspresija gena *TLR7* također je značajno korelirana s ekspresijom CD8 kao i s ostalim funkcionalnim markerima stanica pozitivnih na CD8 [96]. Povećana ekspresija proteina TLR7 povezana je sa smanjenjem preživljenja pacijenata oboljelih od dukalnog adenokarcinoma gušterače. Nadalje, *in vitro* istraživanja su pokazala da tretman stanica karcinoma gušterače, Lon560, koje pojačano ekspimiraju TLR7, inhibitorom TLR7 (IRS-954) rezultira smanjenom vijabilnosti stanica, te upućuje na ulogu TLR7 u tumorigenezi karcinoma gušterače [97]. Imikvimod, agonist TLR7, odvodi stanice karcinoma bazalnih stanica u apoptozu, te se u obliku kreme, odobrene od strane Američke agencije za lijekove i hranu (*engl. Food and Drug Administration*, FDA), koristi za liječenje navedenog tipa karcinoma [98].

Također postoje istraživanja vezana uz receptor TLR7 i karcinom pluća. Rezultati tih istraživanja pokazali su da pacijenti s dijagnosticiranim karcinomom pluća stadija I-III s većom

ekspresijom proteina TLR7 imaju lošiju sveukupnu stopu preživljenja, u odnosu na pacijente s manjom ekspresijom proteina TLR7. Također je pokazano da stanice adenokarcinoma pluća stimulirane loksoribinom (sintetskim ligandom TLR7), imaju bolje preživljenje u odnosu na nestimulirane stanice. Prilikom stimulacije agonistom TLR7 dolazi do povećane ekspresije antiapoptotskog proteina BCL-2, što u konačnici uzrokuje bolje preživljenje tumorskih stanica. Stanice adenokarcinoma pluća koje su prije tretmana citostatikom (cikloheksamidom, cisplatinom, karboplatinom, doksorubicinom i Navelbinom) stimulirane loksoribinom pokazuju otpornost na učinak citostatika, ukazujući da TLR7 ima protumorsko djelovanje [15,16]. Protumorski učinak TLR7 dokazan je i u eksperimentima *in vivo* na mišjem modelu, gdje je pokazano da stimulacija agonistom TLR7 dovodi do povećanja mijeloidnih supresorskih stanica (MDSC, *engl. myeloid-derived suppressor cells*) u tumorski mikrookoliš [17]. Uz navedena istraživanja koja pokazuju protumorski učinak TLR7, postoje istraživanja koja ukazuju da TLR7 može imati i antitumorski učinak. Povećana ekspresija gena *TLR7* povezana je s povećanjem medijatora koji razrješavaju upalu, te sa smanjenjem medijatora angiogeneze. Pokazano je da upravo aktivacijom signalnog puta TLR7 dolazi do aktivacije signalnih puteva MAPK i STAT3, koji bi mogli objasniti navedeni učinak [99]. Nadalje, povećana ekspresija gena TLR7 kod osoba dijagnosticiranih s NSCLC-om povezana je s boljim preživljenjem [99,100].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Korišteni bakterijski sojevi

Prilikom izrade doktorske disertacije, u svrhu pripreme plazmidne DNA koja sadrži gen TLR7, korišten je soj DH5 α bakterije *Escherichia coli* (Thermo Scientific, SAD). Bakterije su uzgajane u mediju LB u inkubatoru na 37 °C. Ovisno o svrsi u medij je dodan odgovarajući antibiotik, kao selekcijski reagens. Također su pripravljene elektrokompetentne bakterije *E. coli* DH5 α za unos plazmidnih DNA, postupak pripreme je opisan u poglavlju 3.2.1.1.

3.1.2. Korištene stanične linije

U izradi ove doktorske disertacije za potrebe praćenja utjecaja polimorfizama *TLR5* (rs2072493) i *TLR7* (rs5935436) na transkriptom i metabolom korištene su stanične linije fibroblasta pluća netumorskog podrijetla (WI-38), epitelne metastatske stanice ne-malih stanica karcinoma pluća (H1299), te stanice monocita (THP-1). Također su korištene epitelne stanice bubrega iz embrija (HEK293) kao i stanice karcinoma jetre (HepG2). Popis svih korištenih staničnih linija kao i njihov opis prikazan je u Tablici 1. Stanične linije uzgajane su u inkubatoru na 37 °C u vlažnoj atmosferi, obogaćenju s 5 %-tnim CO₂ u odgovarajućem hranjivom mediju.

Tablica 1. Korištene stanične kulture

Ime	ATCC® kod	Opis
WI-38	CCL-75™	stanična linija fibroblasta pluća nekarcinomskog podrijetla
H1299	CRL-5803™	epitelne metastatske stanice ne-malih stanica karcinoma pluća
THP-1	TIB-202™	stanice monocita
HEK293T	CRL-1573™	epitelne stanice bubrega iz embrija
HepG2	HB-8065™	stanice karcinoma jetre

U svrhu praćenja utjecaja polimorfizama *TLR5* (rs2072493) na promjene transkriptoma korištene su stanične linije H1299 i WI-38, dok se za praćenja promjena metaboloma koristile stanične linije H1299, WI-38 i THP-1. U svrhu praćenja utjecaja polimorfizama *TLR7*

(rs5935436) na preživljenje metastatskih stanica karcinoma, kao i proučavanja promjene metaboloma, korištena je stanična linija H1299. U svrhu validacije bioinformatičke metode za analizu masenih spektara korištene su stanične linije H1299, WI-38, HEK293T i HepG2.

3.2. Metode

3.2.1. Rad sa bakterijskim kulturama i priprema SP_61 plazmidnog konstrukta

3.2.1.1. Uzgoj elektrokompetentnih stanica

Za umnažanje plazmidnih konstrukata korišten je elektrokompetentni soj bakterije *E. coli* DH5 α . Bakterije su uzgojene preko noći u 100 mL tekućeg medija LB (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton), na temperaturi 37 °C i uz rotaciju 250 rpm u inkubatoru Forma Scientific 4520 (Forma Scientific, SAD). Sljedeći dan suspenzija bakterija inkubirana je na ledu 30 min, nakon čega je centrifugirana 5 minuta pri 6 000 x g i temperaturi 4 °C u centrifuge Sovall Lynx 4000 (Thermo scientific, SAD). Potom je talog bakterija resuspendiran je u sterilnoj otopini CaCl₂ (50 mM), te je ponovno centrifugirana 5 minuta pri 6 000 x g i temperaturi 4 °C. Dobiveni talog je na kraju resuspendiran u 10 mL prethodno pripremljene otopine CaCl₂ s 25 %-tnim glicerolom (Gram mol, Hrvatska). Suspenzija bakterija je alikvotirana po 100 μ L, te su ovako pripremljene bakterija pohranjene na -80°C do uporabe.

3.2.1.2. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Za potrebe kloniranja pomoću sustava *Gateway* potreban je gen *TLR7* u ulaznom klonu, te destinacijski vektor (plazmidna DNA SP61). Laboratorij za naprednu genomiku posjeduje knjižnicu kodirajućih okvira čitanja humanih proteina (*engl. open reading frame*, ORFeom, verzija 1.1) koja također sadrži i gen *TLR7*. Svi okviri čitanja, uključujući i gen *TLR7*, ugrađeni su u vektor pDONR223 između homolognih mjesta *attL1* i *attL2*, te se nalaze u bakterijama *Escherichia coli*. Kako se obje plazmidne DNA nalaze u bakterija, bilo je najprije potrebno izolirati ih iz bakterija.

Za izolaciju plazmidnih DNA najprije su uzgojene prekonoćne bakterijske kulture. U 5 mL medija dodan je odgovarajući antibiotik. Budući da plazmidnom DNA SP61 sadrži gen koji bakterijama daje otpornost na ampicilin, kod uzgoja bakterija koje sadrže ovu plazmidnu DNA

korišten je ampicilin konačne koncentracije 100 µg/mL. Dok je kod uzgoja bakterija sa plazmidnom DNA pDONR223 dodan streptomycin konačne koncentracije 50 µg/mL, pošto pDONR223 sadrži gen za rezistenciju na antibiotik streptomycin. Nastavkom za pipete uzet je mali alikvot glicerolskog štoka bakterija, koje su zatim inkubirane u inkubatoru na 37 °C uz protresanje (200 rpm) preko noći. Sljedeći dan kada su se bakterije razmnožile iz njih je izolirana plazmidna DNA pomoću komercijalnog kompleta *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, 3 mL prekonoćne bakterijske kulture se centrifugira u plastičnoj mikroepruveti od 1,5 mL i centrifugira 1 minutu pri sobnoj temperaturi i 12 000 x g, pelet stanica se zatim resuspendira u 600 µL vode, te se doda 100 µL pufera za lizu stanica i promiješa se invertiranjem 6 puta. Zatim se doda 350 µL hladne otopine za neutralizaciju i dobro se promiješa invertiranjem. Smjesa se zatim centrifugira 3 minute na sobnoj temperaturi pri 12 000 x g, te se supernatant prebaci na *PureYield™ Minicolumn* i centrifugira 1 minutu pri 12 000 x g kako bi došlo do vezanja nukleinskih kiselina na kolonu za pročišćavanje. Zatim se doda 200 µL pufera za uklanjanje endotoksina, te se kolona ispere centrifugiranjem 1 minute pri 12 000 x g. Ukloni se otopina nakon centrifugiranja, te se doda 400 µL otopine za ispiranje, te se kolona ispere centrifugiranjem 1 minute pri 12 000 x g. Ukloni se otopina nakon centrifugiranja te se kolona stavi u novu mikroepruvetu od 1,5 mL te se doda 30 µL otopine za eluciju. Kolona se inkubira 2 minute na sobnoj temperaturi kako bi se pospješila elucija nukleinskih kiselina s kolone, te se zatim centrifugira 1 minutu pri 12 000 x g. Izoliranim nukleinskim kiselinama izmjeri se koncentracija, te se pohrane na -20 °C do daljnje uporabe.

U svrhu dobivanja veće količine plazmidne DNA, rađen je tkz. postupak *MidiPrep*. U tu svrhu, bakterije su uzgojene u 200 mL medija LB s dodatkom ampicilna preko noći na 37 °C uz protresanje (200 rpm), te je izolirana plazmidna DNA koristeći komplet *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, 100 mL prekonoćne bakterijske kulture centrifugirano je 10 minuta na sobnoj temperaturi pri brzini 5 000 x g. Supernatant je maknut, te je pelet bakterija resuspendiran u 3 mL otopine za resuspenziju stanica. Kako bi došlo do lize stanica dodano je 3 mL otopine za lizu stanica, te je smjesa promiješana invertiranjem 5 puta, te inkubirana na sobnoj temperaturi 3 minute. Nakon inkubacije dodano je 5 mL otopine za neutralizaciju, te je smjesa promiješana i centrifugirana 15 minuta na sobnoj temperaturi pri 15 000 x g. Plazmidna DNA koja se nalazila u supernatantu, prenijeta je na kolonu za čišćenje, koja se nalazila iznad kolone za vezanje. Primjenom vakuuma smjesa je prošla kroz obje kolone te se plazmidna DNA vezala za kolonu za vezanje. Plazmidna DNA je zatim pročišćena dodavanjem 5 mL pufera za odstranjivanje endotoksina, te zatim 20

mL otopine za ispiranje kolone. Kolona je nakon ispiranja stavljena iznad mikroepruveta od 1,5 mL, te je dodano 600 μ L redestilirane vode kako bi se plazmidna DNA eluirala. Nakon inkubacije koja je trajala 1 minutu, primijenjen je vakuum te je plazmidna DNA eluirana u mikroepruvetu. Plazmidnoj DNA izmjerena je koncentracija (poglavlje 3.2.1.3.), te je zatim pohranjena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.3. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Nukleinske kiseline građene su od dušičnih baza koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje valne duljine 260 nm. S toga je mjerenje apsorbancije otopine nukleinskih kiselina pogodna i brza metoda za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina. Uz sami podatak o koncentraciji nukleinskih kiselina, ovom metoda može dati i informacije o samoj čistoći nukleinskih kiselina, mjerenjem vrijednosti apsorbancija pri valnim duljinama od 230 i 280 nm. Elektromagnetsko zračenje valne duljine 280 nm apsorbiraju proteini i fenol, koji mogu zaostati tijekom same izolacije, tako nam omjer 260/280 daje informaciju o mogućoj kontaminaciji nukleinskih kiselina proteinima i fenolom. Omjer 260/280 $\sim 1,8$ smatra se kao čista DNA, dok omjer 260/280 $\sim 2,0$ se smatra kao čista RNA, dok najčešće omjer 260/280 manje od navedenih vrijednosti ukazuje na moguće onečišćenje. Elektromagnetsko zračenje valne duljine 230 nm najčešće apsorbiraju soli koje se koriste pri izolaciji nukleinskih kiselina, stoga omjer 260/230 može ukazivati na kontaminaciju soli nakon izolacije. Generalno omjer 260/230 u rasponu 2,0-2,2 se smatra čistom nukleinskom kiselinom.

U svrhu određivanja koncentracije i čistoće izoliranih nukleinskih kiselina koristio se uređaj BioSpec-nano (Shimadzu, Japan). Kako bi se pratila apsorbancija samo nukleinskih kiselina, najprije se očita apsorbancija 1 μ L redestilirane vode bez DNaza i RNaza, koja je služila za resuspenziju nukleinskih kiselina. Zatim se 1 μ L uzorka nukleinskih kiselina očita koncentracija te omjeri apsorbancija 260/280 i 260/230.

3.2.1.4. Restriksijsko cijepanje plazmidne DNA

Restriksijske endonukleaze su skupina enzima koji cijepaju nukleinske kiseline. U molekularnoj biologiji često se koriste za linearizaciju plazmidnih DNA, izrezivanje odsječaka DNA iz nukleinskih kiselina, te uvođenje dvolančanih lomova. Za potrebe izrade ove disertacije restriksijske endonukleaze su se koristile za linearizaciju plazmidnih DNA, kako bi se mogla

provjeriti njihova veličina elektroforezom na agaroznom gelu. Netaknute plazmidne DNA se u otopini mogu nalaziti u više oblika, najčešće u superzavijenom obliku, koji tijekom elektroforeze ne putuju ovisno o veličini. Linearizacijom plazmidne DNA omogućava se da ona putuje kroz agarozni gel ovisno o njezinoj veličini.

Kako bi se elektroforezom na gelu agaroze mogla provjeriti veličina plazmidnih DNA, najprije se uz pomoć restrikcijske endonukleaze lineariziraju. U tu svrhu koristi se restrikcijska endonukleaza koja određenu plazmidnu DNA cijepaju na samo jednom mjestu. Za cijepanje plazmidne DNA SP61 korišten je enzim *HindIII* (New England Biolabs (NEB), SAD) i pufer NEB 2,1 (NEB, SAD, sastav: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/mL BSA (pH 7,9 @ 25 °C)), za plazmidne DNA pDONR223_TLR7 korišten je enzim *NcoI* (NEB, SAD) i pufer NEB 3,1 (NEB, SAD, sastav: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/mL BSA (pH 7,9 @ 25 °C)), te za plazmidne DNA SP61_TLR7 korišten je enzim *NheI* (NEB, SAD) i pufer NEB 2 (NEB), SAD, sastav: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, (pH 7,9 @ 25 °C)) kao i *BsrGI* (NEB, SAD) i pufer NEB2.1. Reakcijska smjesa se sastojala od 500 ng plazmidne DNA, 2,5 µL pufera pogodnog za određenu restrikcijsku endonukleazu, 0,5 µL restrikcijske endonukleaze koncentracije 10 U/µL, te po potrebi redestilirana voda do ukupnog volumena reakcijske smjese 25 µL. Restrikcija je trajala 3 h u termobloku pri 37 °C.

3.2.1.5. Elektroforeza na gelu agaroze

Elektroforeza je pogodan način karakterizacije makromolekula na temelju njihove brzine kretanja u električnom polju. Kako su po prirodi nukleinske kiseline negativno nabijene zbog posjedovanja fosfatnih skupina, lako se kreću pod utjecajem električnog polja. Agarozna nam služi kao molekulsko sito pa s obzirom na činjenicu da je omjer naboja i mase gotovo jednak za sve polinukleotide dolazi do odvajanja manjih nukleotida od većih. Manji ulomci lakše prolaze kroz pore, te tako brže putuju od većih. Ako na gelu uz ispitivane uroke imamo biljeg s poznatim veličinama nukleinskih kiselina, možemo procijeniti veličinu naših uzorka.

Za pripremu 1 %-tnog gela agaroze potrebno je 1 g agaroze otopi u 100 mL pufera TAE (0,04 mol/L Tris-acetat (Roth, Njemačka), 0,001 mol/L EDTA (Honeywell Fluka, SAD), pH 7,9) uz zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici. Nakon što se otopina ohladi doda se etidij-bromid (Roche, Švicarska) finalne koncentracije 0,5 µg/mL, koji se interkalira između baza nukleinskih kiselina te kasnije služi za njihovu detekciju pod UV svjetlom. Otopina se zatim izlije u odgovarajuću kadu, te se doda češalj za formiranje jažica. Kada se gel polimerizira izvadi se

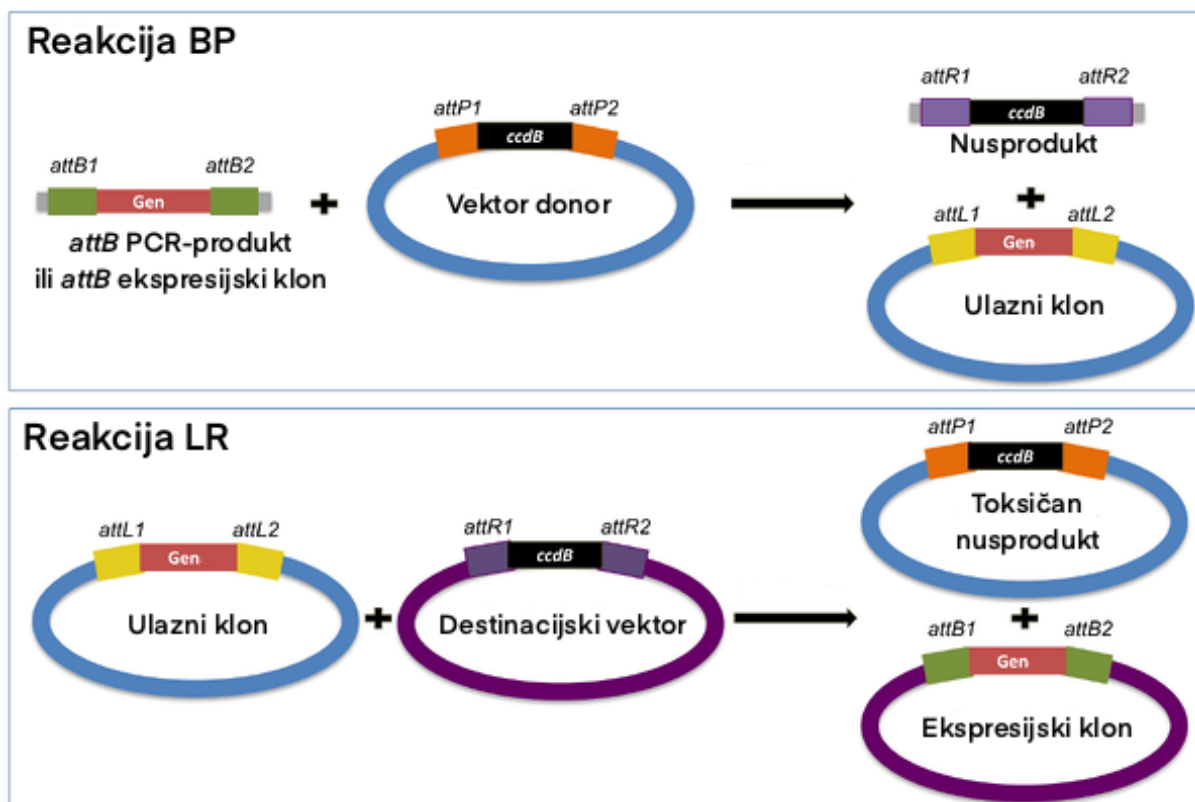
češalj, te je spreman za korištenje.

Pripremljeni gel stavi se u kadnicu za elektroforezu u kojoj se nalazi TAE pufer. Prije nanošenja uzorci su pomiješani sa 6x smjesom za nanošenje nukleinskih uzoraka na gel (10 mM Tris-HCl (Roth, Njemačka) (pH 7,6), 0,03 % (v/v) bromfenol plavo, 0,03 % (v/v) ksilencijanil FF, 60 % (v/v) glicerol, 60 mM EDTA (Honeywell Fluka, SAD)), tako da je finalna koncentracija smjese 1x. U jažice se nanio tako pripremljen uzorak, a u dodatnu jednu jažicu dodao se biljeg s poznatim veličinama nukleinskih kiselina *Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder* (NEB, SAD). Nakon što se nanese uzorci pokrene se elektroforeza pri 120 V u trajanju od 20 do 30 minuta. Nakon elektroforeze nukleinske kiseline detektiraju se pomoću transiluminatora Uvitec BXT-20-M (Uvitec, UK).

3.2.1.6. Reakcija LR sustava *Gateway*

U svrhu praćenja promjene transkriptoma i metaboloma u staničnim kulturama uslijed povećane ekspresije gena *TLR7*, pripremljen je plazmid koji sadrži gen *TLR7*. Za pripremu navedenog plazmidnog konstrukta korišten je sustav *Gateway* koji gen od interesa, u ovom slučaju gen *TLR7*, iz početne plazmidne DNA homolognom rekombinacijom ugradi u destinacijsku plazmidnu DNA.

Sustav *Gateway* je pogodna metoda za ugradnju gena od interesa (GOI) u odgovarajući ekspresijski vektor, a da se održi otvoreni okvir čitanja, pomoću homolognih rekombinaza. Sustav se odvija u dvije reakcije BP i LR, a glavni preduvjet je da komponente imaju odgovarajuća homologna mjesta kako bi moglo doći do homologne rekombinacije. Najprije se pomoću reakcije BP pripremi ulazni klon, odnosno plazmid sa željenim GOI između homologna mjesta *attL*. Za reakciju BP je potreban GOI između homolognih mjesta *attB* (bilo u obliku PCR-produkta ili u ekspresijskom klonu), te vektor donor s homolognim mjestima *attP*. U reakciji BP, BP-klonaza, homolognom rekombinacijom mjesta *attB* i *attP*, dobivamo produkt, ulazni klon, koji sadrži GOI ugrađen između novo nastalih mjesta *attL*. Dobiveni ulazni klon zajedno s destinacijskim klonom koji sadrži odgovarajuća homologna mjesta *attR* ulazi u reakciju LR. U reakciji LR, LR-klonaza homolognom rekombinacijom između mjesta *attL* i *attR* mjesta, prebacuje GOI iz ulaznog klona u destinacijski vektor, te kao rezultat dobivamo ekspresijski klon koji nosi GOI, koji sadrži potrebne genetske elemente, kao promotorska regija i signala poli(A) signal, da se GOI može eksprimirati u željenim stanicama. Na Slici 4. shematski su prikazane reakcije sustava *Gateway*.



Slika 4. Shematski prikaz BP i LR reakcije u sustavu *Gateway*. Preuzeto i prilagođeno s <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning>

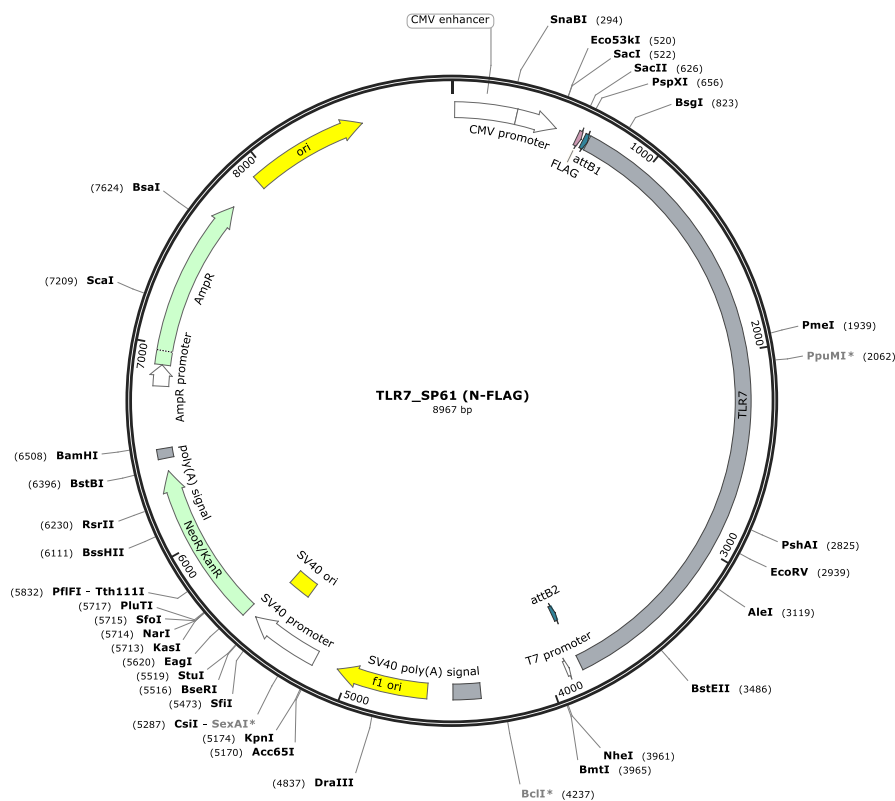
Izolirane plazmidne DNA, SP61 i pDONR223_TLR7, sadrže potrebna homologna mjesta *attL* i *attR* za reakciju LR, priprema ulaznih plazmidnih DNA pomoću reakcije BP za reakciju LR sustava *Gateway* nije bila potrebna. Pripremljena je reakcijska smjesa koja je sadržavala 50 ng pDONR223_TLR7 plazmidne DNA, 150 ng SP61 plazmidne DNA, 1 μ L *LR Clonase™ II enzyme mix* (Invitrogen, SAD), te pufer TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (Honeywell Fluka, SAD)) do ukupnog volumena 5 μ L. Smjesa je zatim promiješana, te nakratko centrifugirana i inkubirana 1 sat na 25 °C. Nakon inkubacije dodano je 0,5 μ L proteinaze K iz kompleta, te je smjesa inkubirana 10 minuta na 37 °C, te je dobivena smjesa zatim korištena za transformaciju stanica.

3.2.1.7. Transformacija bakterija plazmidnom DNA

Transformacija, unos strane plazmidne DNA u stanice bakterija, je izvedena pomoću elektroporacije. Kod elektroporacije primjenjuje se kratak i snažan električni puls zbog kojeg dolazi do kratkotrajne promjene strukture stanične stijenke bakterija što rezultira povećanom

permeabilnošću za molekule DNA i time mogućnošću njenih ulaska u stanicu. Plazmidne DNA korištene kod transformacije sadrže mjesto replikacije, čime je omogućeno umnažanje same plazmidne molekule DNA u bakterijskim stanicama, kako bi se mogla proizvesti veća količina plazmidne DNA.

U svrhu provjere i dobivanja veće količine plazmidne DNA nakon LR reakcije, 1 μ L smjese nakon LR reakcije je dodan u 50 μ L elektrokompetentnih *E. coli* DH5 α stanica. Smjesa je zatim prebačena u hladnu kivetu za elektroporaciju te su bakterije podvrgnute električnom pulsom pomoću elektroporatora *GenePulser XcellTM* (Bio-Rad, Austrija). Neposredno nakon elektroporacije stanice su resuspendirane u 1 mL LB medija sobne temperature i inkubirane 1 sat na 37 °C uz potresanje. Po završetku inkubacije 200 μ L suspenzije stanica nasadeno je na selekcijske podloge koje se sastoje od medija LB kojem je dodan agar (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton, 13 g/L agar) i ampicilin. Podloge su inkubirane preko noći na 37 °C u inkubatoru Jouan EB18 (Jouan/Thermo Fisher, SAD) pri čemu su na selektivnim podlogama rasle samo bakterije koje su primile plazmid s genom za rezistenciju na ampicilin. Sljedeći dan nasumično je odabrano 5 naraslih kolonija iz kojih je izolirana plazmidna DNA (poglavlje 3.2.1.2.), zatim je linearizirana restriksijskom endonukleazom *NheI* (poglavlje 3.2.1.4.), te provjerena elektroforezom na agaroznom gelu (poglavlje 3.2.1.5.). Ukoliko je došlo do uspješne transformacije i izolacije tražene plazmidne DNA, određeni alikvot transformiranih bakterijskih stanica pomiješa se s 50 %-tnom vodenom otopinom glicerola (v/v) u omjeru 1:1, te su tako transformirane bakterije pohranjene na -80 °C. Shematski prikaz dobivene plazmidne DNA (SP61_TLR7) prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz SP61_TLR7 plazmidne DNA.

3.2.2. Rad sa staničnim kulturama

U izradi ove doktorske disertacije za potrebe praćenja utjecaja polimorfizama *TLR5* (rs2072493) i *TLR7* (rs5935436) na transkriptom i metabolom korištene su stanične linije fibroblasta netumorskog podrijetla (WI-38), epitelne metastatske stanice ne-malih stanica karcinoma pluća (H1299), te stanice monocita (THP-1). Također su korištene epitelne stanice bubrega iz embrija (HEK293) kao i stanice karcinoma jetre (HepG2), uz H1299 i WI-38 stanične linije, u svrhu validacije bioinformatičke analize promjena u metabolomu. Stanice WI-38, HEK293 i HepG2 uzgajane su u tekućem hranjivom mediju MEM (*engl. Minimum Essential Medium Eagle*) obogaćenim s 10 %-tnim serumom govedeg albumina (*engl. Fetal Bovine Serum*, FBS, Sigma, SAD). Stanice H1299 uzgajane su u tekućem hranjivom mediju DMEM (*engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) obogaćenim s 10 %-tnim FBS-om, dok su se stanice THP-1 uzgajale u tekućem hranjivom mediju RPMI 1640 (*engl. Roswell Park Memorial Institute*) obogaćenim s 10 %-tnim FBS-om. Stanice u mediju su uzgajane u sterilnim

uvjetima, u sterilnoj prostoriji za rad sa staničnim kulturama, u plastičnim posudicama u inkubatoru HERACELL vios 160i (Thermo Fisher, SAD) na 37 °C u vlažnoj atmosferi, obogaćenoj s 5 %-tnim CO₂.

3.2.2.1. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Za uspostavu staničnih kultura, uzet je alikvot stanica pohranjen u tekućem dušiku u tekućem mediju uz dodatak 5 %-tnog (v/v) DMSO (Gram mol, Hrvatska). Stanice su brzo odmrznute te je dodan 1 mL svježeg medija ovisno o korištenoj staničnoj liniji. Suspenzija stanica je zatim prebačena u tubicu za centrifugiranje od 15 mL te je centrifugirana 5 minuta pri sobnoj temperaturi i brzini od 280 x g. Nakon centrifugiranja maknuo se supernatant u kojem se nalazio DMSO, te su stanice resuspendirane u 10 mL svježeg medija i prebačene u plastičnu posudicu za uzgoj stanice, te stavljene u inkubator.

Nakon što stanice dosegnu ~90 % konfluentnosti bile su presađene i/ili korištene za izvođenje daljnjih eksperimenata. Stanične linije WI-38, H1299, HEK293 i HepG2 rastu kao adherentne stanice, s toga je kod njihovog presađivanja najprije maknut medij, te su stanice isprane s 3 mL fosfatnog pufera (*engl. Phosphate buffered saline, PBS*). Kako bi se stanice odvojile od dna posudice, dodan je 1 mL otopine tripsina (0,05 % (w/v) tripsin, 1 mM EDTA), te su stanice inkubirane 5 minuta u inkubatoru. Nakon što su se stanice odvojile, dodano je 9 mL hranjivog medija za uzgoj, te je alikvot stanica prebačen u novu posudicu za uzgoj i nadopunjen sa svježim medijem za uzgoj stanica. Za razliku od navedenih stanica, THP-1 stanice rastu u suspenziji, stoga nije potreban tretman s tripsinom. Kod presađivanja THP-1 stanica uzet je alikvot stanica i prebačen u novu posudicu za uzgoj, te su stanice nadopunjene sa svježim medijem. Ako je kod presađivanja stanica i izvođenja eksperimenata bio potreban određen broj stanica, uzet je alikvot stanica od 150 µL nakon tretmana tripsinom i dodatkom 9 mL medija, te je 100 µL stanične suspenzije korišteno za brojanje stanica pomoću brojača stanica Beckman Coulter Z2 (Beckman Coulter, SAD), te je kao rezultat dobiven broj stanica po mililitru.

3.2.2.2. Unos nukleinskih kiselina u stanice

3.2.2.2.1. Transfekcija stanica

Kako bi u metastatskim stanicama karcinoma pluća H1299 postigli povećanu ekspresiju gena *TLR7*, pripremljeni plazmidni konstrukt SP61_TLR7 bilo je potrebno unijeti u stanice. Također je korištena plazmidna DNA SP61 koja je služila kao kontrolni uvjet. Iako se kod humanih staničnih linija može koristiti metoda elektroporacije za unos nukleinskih kiselina u stanice, a koja se koristila za unos plazmidne DNA u stanice bakterija, učinkovitost elektroporacije kod humanih staničnih linija nije toliko učinkovita. Kako bi se povećao unos plazmidne DNA u stanice korištena je metoda transfekcije. Kod transfekcije najprije se inkubira transfekcijski reagens, koji se sastoji od lipida, koji stvara kompleks s nukleinskim kiselinama, te pomoću stvorenog kompleksa nukleinske kiseline ulaze u stanice.

Na sljedeći način pripremljene su stanice za analizu MTT testom. Za transfekciju H1299 stanica najprije je nasađeno 500 000 stanica po jažici u 3 mL DMEM medija. Sljedeći dan dodana je transfekcijska smjesa koja je sadržavala 1 250 ng SP61_TLR7 plazmidne DNA odnosno samo SP61 plazmidne DNA i 1 250 ng plazmidne DNA koja je sadržavala gen *eGFP* (*engl. enhanced green fluorescent protein*), te 7,5 μ L Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, SAD) u ukupnom volumenu od 500 μ L u mediju Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon 4 h inkubacije, medij je zamijenjen sa svježim DMEM medijem. Sljedeći dan uspješnost transfekcije potvrđena je praćenjem stanica pomoću fluorescentnog mikroskopa Evos Flouid (Thermo scientific, SAD).

Na sljedeći način pripremljene su stanice za izolaciju i analizu metaboloma. U Petrijevoj posudici, promjera 100 mm, za uzgoj stanica nasađeno je 2 milijuna H1299 stanica u DMEM mediju ukupnog volumena 10 mL. Sljedeći dan dodana je transfekcijska smjesa koja je sadržavala 2 500 ng SP61_TLR7 plazmidne DNA odnosno samo SP61 plazmidne DNA i 2 500 ng plazmidne DNA koja je sadržavala gen *eGFP*, te 15 μ L Lipofectamina 2000 u ukupnom volumenu od 1,5 mL u mediju Opti-MEM. Nakon 4 h transfekcije, medij je zamijenjen sa svježim DMEM medijem. Sljedeći dan dodan je imikvimod, sintetski ligand TLR7, finalne koncentracije 5 μ g/mL, te su stanice inkubirane 24 h.

Osim transfekcije stanica plazmidnom DNA u svrhu povećanja ekspresije gena, također su se u izvedbi ove disertacije koristile male interferirajuće molekule RNA koje su se u stanicu unijele transfekcijom. Koristila se siTLR za utišavanje gena *TLR7* u H1299 stanicama, siNME4 za utišavanje gena *NME4* u WI-38, H1299, HepG2 i HEK293 stanicama. Također se koristila nasumična RNA (*engl. small interfering RNA*, siRNA), kao kontrolni uvjet u svim navedenim stanicama. Priprema navedenih stanica opisana je nadalje. Za utišavanje odabranih gena

korištena je metoda reverzne transfekcije. Kod ove metode stanice u suspenziji, koje još nisu adherentne, se dodaju na smjesu transfekcijskog reagensa i siRNA, što pospješuje proces transfekcije. Najprije se Petrijevu posudicu, promjera 100 mm, za uzgoj stanica dodaju 20 µL transfekcijskog reagensa Lipofectamin RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, SAD) i 980 µL medija Opti-MEM, te 100 nM siRNA pripremljena u Opti-MEM-u finalnog volumena 1 mL. Pripremljena smjesa je inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi, te je dodano 1,5 milijuna stanica po posudici u odgovarajućem mediju, te je finalni volumen iznosio 10 mL, a finalna koncentracija siRNA 10 nM. Stanice su inkubirane 24 h.

3.2.2.2. Infekcija stanica

Infekcija je također metoda unosa nukleinskih kiselina u stanice. U izradi ove disertacije koristila se za unos divljeg tipa, odnosno mutirane (1775A>G, N592S) verzije gena *TLR5* pomoću adenovirusnih konstrukata (virus Adeno-5). Priprema adenovirusnih konstrukata i uvjeti infekcije određeni su ranije, za potrebe prijašnjih istraživanja u Laboratoriju za naprednu genomiku na Institutu Ruđer Bošković.

Priprema stanica za analizu transkriptoma priređena je na sljedeći način. U posudice za uzgajanje staničnih linija površine 25 cm² nasađeno je 700 000 stanica WI-38 odnosno H1299 u 3 mL odgovarajućeg hranjivog medija. Sljedeći dan stanice su isprane fosfatnim puferom i tretirane tripsinom kako bi im se odredio broj stanica (poglavlje 3.2.2.1.). Zatim su stanice inficirane adenovirusnim konstruktom (virus Adeno-5) koji sadrži divlji tip, odnosno mutiranu (1775A>G, N592S) verziju gena *TLR5* tako da u smjesi bude 10 000 virusnih čestica po WI-38 stanici, odnosno 5 000 po H1299 stanici. Nakon sat i pola infekcije, medij s virusom je zamijenjen sa svježim odgovarajućim medijem. Sljedeći dan stanice su tretirane medijem koji je sadržavao flagelin finalne koncentracije 50 ng/mL, te su stanice inkubirane 24 sata.

Kako bi ispitali utjecaj polimorfizma u genu *TLR5* na promjene u metabolomu WI-38 i H1299, te stanica imunskog sustava (THP-1) stanice su najprije inficirane s virusom Adeno-5 koji sadržava divlju, odnosno mutiranu (1775A>G, N592S) verziju gena *TLR5*, na sljedeći način. Za infekciju nasađeno je 1,5 milijuna navedenih stanica u odgovarajućem mediju u Petrijevoj posudici, promjera 100 mm, za uzgoj stanica u ukupnom volumenu od 10 mL. Zatim su stanice inficirane adenovirusnim konstruktom (virus Adeno-5) koji sadrži divlji tip, odnosno mutiranu (1775A>G, N592S) verziju gena *TLR5* tako da u smjesi bude 10 000 virusnih čestica po WI-38 stanici, odnosno 5 000 po H1299 stanici, 10 000 po THP-1 stanici. Dan nakon infekcije zamijenjen je medij s odgovarajućim medijem za uzgoj stanica koji je sadržavao 50

ng/mL flagelina, te su stanice inkubirane 24 sata.

3.2.2.3. Tretiranje stanica inhibitorom enzima NAMPT

U svrhu inhibicije aktivnosti enzima NAMPT, za validaciju bioinformatičke metode analize metaboloma tretirane su stanične linije WI-38, H1299, HepG2 i HEK293 FK866, inhibitorom enzima NAMPT. Stanice su tretirane na sljedeći način. U Petrijeve posudice, promjera 100 mm, za uzgoj stanica nasađeno je 1,5 milijuna stanica po posudici u odgovarajućem mediju. Sljedeći dan zamijenjen je medij koji je sadržavao 5 nM inhibitora FK866 (Sigma, SAD), te su stanice inkubirane 24 h.

3.2.2.4. Izolacija ukupne RNA iz stanica

Za izolaciju ukupne RNA korišten je komercijalno dostupan komplet *RNeasy Plus Mini Kit* (QIagen, SAD). Nakon što su stanice uzgojene u željenim uvjetima, isprane su fosfatnim puferom i tripsinizirane. Zatim su centrifugirane kako bi se odstranio medij. Na pelet stanica doda se 600 μ L pufera RLT, te se dobro izmiješaju pomoću vorteksa. Nakon homogenizacije smjesa se prebaci na kolonu za uklanjanje genomske DNA, te se centrifugira 1 minutu pri 8 000 x g. Kolona se baci, te se u preostalu otopinu doda 600 μ L 70 %-tnog (v/v) etanola i dobro promiješa. Smjesa se zatim prenese na *RNeasy* kolonu te se centrifugira 1 minutu pri 8 000 x g. Nakon centrifugiranja kolona se najprije ispere sa 700 μ L pufera RW1, te se centrifugira 1 minutu pri 8 000 x g. Zatim slijedi ispiranje sa 500 μ L pufera RPE i centrifugiranje 1 minutu pri 8 000 x g, te još jedno ispiranje sa 500 μ L pufera RPE i centrifugiranje 2 minute pri 8 000 x g. Kako bi se uklonio sam etanol, kolona se prebaci u čistu mikroepruvetu te se dodatno centrifugira 1 minutu pri 8 000 x g. Kolona se zatim stavi u novu mikroepruvetu od 1,5 mL, doda se 40 μ L redestilirane vode bez prisutnih RNaza i DNaza, te se inkubira 2 minute. Nakon inkubacije ukupna RNA se eluira s kolone centrifugiranjem 1 minutu pri 8 000 x g. Izoliranoj RNA izmjeri se koncentracija (poglavlje 3.2.1.3.).

3.2.2.5. Uklanjanje zaostalih molekula DNA (DNazni tretman)

Kako bi se uklonila genomske DNA, koja može zaostati tijekom izolacije RNA, a može smetati pri daljnjoj analizi, provodi se DNazni tretman. DNaza specifično prepoznaje i cijepa molekule DNA, dok RNA molekule ostaju netaknute. Za uklanjanje zaostale DNA korišten je komplet *TURBO DNA-free*TM (Invitrogen, SAD), prema uputama proizvođača. Ukupno 10 µg RNA je dodano u mikroeprijetu od 1,5 mL, te je dodana redestilirana voda do ukupnog volumena 44 µL. Zatim se u reakcijsku smjesu doda 5 µL pufera za DNazu, te 1 µL DNaze. Smjesa se promiješa, te se ukratko centrifugira, te se inkubira 20 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije doda se 5 µL reagensa za inaktivaciju DNaze, te se inkubira na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Nakon inaktivacije DNaze smjesa se centrifugira 2 minute pri 10 000 x g. Supernatant, gdje se nalazi RNA, se prebaci u novu plastičnu mikroeprijetu od 1,5 mL te se RNA izmjeri koncentracija (poglavlje 3.2.1.3).

3.2.2.6. Sintaza komplementarne DNA (cDNA)

Ekspresija gena često se određuje kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom (*engl. quantitative polymerase chain reaction, qPCR*). U reakcijama qPCR-a DNA-polimeraza umnaža određene dijelove DNA kako bi se odredila ekspresija gena. Iz tog razloga je potrebno RNA prevesti u komplementarnu DNA (cDNA), koja je kalup u reakciji s DNA-polimerazom. Za pretvorbu RNA u cDNA korišten je komercijalan komplet *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, SAD). Reakcije su izvedene prema uputama proizvođača.

Najprije se u mikroeprijetu za PCR dodaje reakcijska smjesa koja se sastoji od 2 µL pufera za reverznu transkriptazu, 0,8 µL mješavine nukleotida (dNTP), 2,0 µL nasumičnih početnica, 1 µL reverzne transkriptaze, te 4,2 µL redestilirane vode ta ukupan volumen bude 10 µL. U pripremljenu reakcijsku smjesu se zatim doda 1 µg RNA, kojoj je prema potrebi dodana redestilirana voda kako bi konačan volumen ukupne RNA bio 10 µL. Reakcijska smjesa od 20 µL se zatim nakratko centrifugira i stavi u termoblok, te pokrene proces reverzne transkripcije. Proces se najprije odvija 10 minuta pri 25 °C, zatim 120 minuta pri 37 °C, te na kraju 5 minuta pri 85 °C nakon čega je cDNA spremna za daljnju analizu.

3.2.2.7. Kvantitativna lančana reakcije polimeraze (qPCR)

Kako bi se odredila razine ekspresije gena *TLR7*, odnosno da li nakon transfekcije H1299 stanica sa plazmidnom DNA SP61_TLR7 dolazi do povećane ekspresije gena *TLR7*, koristila se metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR) koristeći specifične *TaqMan* probe. PCR je metoda umnažanja ciljanog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*, pomoću termostabilne polimeraze i dvije oligonukleotidne početnice. Reakcija se odvija u tri koraka, koja se zatim ponavlja u nekoliko ciklusa, obično 30 do 40 ciklusa. Prvi korak je denaturacije kalupa DNA kako bi se u drugom koraku omogućilo vezanje početnice na komplementarna mjesta jednog lanca DNA, te konačno u trećem koraku DNA-polimeraza produljuje početnice na temelju kalupa jednog lanca DNA. Osim za umnažanje željenih odsječaka DNA, PCR metoda se može koristiti i za kvantifikaciju DNA, odnosno RNA koja je prevedena u cDNA. U izradi ove disertacije *TaqMan* hidrolizirajuće sonde. Hidrolizirajuća sonda je oligonukleotidini odsječak visoko komplementaran kalupu DNA i sadrži fluorescencijsku probu (*engl. reporter*) i prigušujuću probu (*engl. quencher*). Kada je prigušujuća proba u blizini fluorescencijske probe, ne dolazi do pojave signala. Kako bi došlo do pojave signala navedene probe se moraju udaljiti što se događa tijekom same reakcije PCR. Naime, korištena DNA-polimeraza posjeduje 5'-3' egzonukleaznu aktivnost, te kada tijekom produljenja početnica dođe do sonde, cijepa je čime dolazi do razdvajanja fluorescencijske i prigušujuće probe te u konačnici dolazi do pojave signala.

Za određivanje razine ekspresije gena koristila se relativna kvantizacija $\Delta\Delta C_t$ metoda [101]. Ova metoda podrazumijeva usporedbu signala gena od interesa (GOI) i endogene kontrole (EK), gena čija ekspresija se ne mijenja u promatranim uvjetima. U procesu kvantifikacije najprije se odredi vrijednost C_t , tj. broj ciklusa pri kojem fluorescencija prelazi graničnu vrijednost fluorescencije, GOI i EK u istom uzorku i uvjetu (npr. stanice s endogenom ekspresijom gena *TLR7*), te se izračuna ΔC_t vrijednost prema formuli

$$\Delta C_t = \Delta C_t(\text{GOI}) - \Delta C_t(\text{EK}).$$

Također se odredi ΔC_t vrijednost za kalibrator, uvjet koji promatramo (npr. stanice s povećanom ekspresijom gena *TLR7*). Kako bi se utvrdilo postoji li razlika u ekspresiji GOI, dobivena ΔC_t vrijednost za uzorak se uspoređuje sa ΔC_t vrijednosti kalibratora te se tako dobije - $\Delta\Delta C_t$ vrijednost prema formuli

$$-\Delta\Delta C_t = -(\Delta C_t(\text{uzorak}) - \Delta C_t(\text{kalibrator})).$$

Da bi se dobio omjer ekspresije GOI između uzorka i kalibratora, $-\Delta\Delta C_t$ vrijednost uvrsti se u jednadžbu (omjer količine gena od interesa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Broj 2 predstavlja efikasnost umnažanja.

Pošto ova metoda podrazumijeva da je umnažanje svih gena jednako ili slično može se uvrstiti vrijednost 2 kao efikasnost umnažanja, što bi značilo da se iz jedne molekule kalupa nakon jednog ciklusa PCR dobiju dvije molekule DNA.

U svrhu određivanja povećane ekspresije gena *TLR7* u stanicama koje su transfecirane plazmidom DNA SP61_TLR7 u odnosu na stanice transfecirane s kontrolnom plazmidnom DNA SP61, koristile su se komercijalno dostupne hidrolizirajuće sonde za gene *TLR7* i β -aktin, koji je služio kao endogena kontrola. Pripremljene su jedinične reakcijske smjese koje se sastoje od 7,5 μ L univerzalne smjese za qPCR, *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD), 0,75 μ L hidrolizirajuće sonde, 1 μ L uzorka cDNA, te 5,75 μ L redestilirane vode. Hidrolizirajuća sonda za gen *TLR7* koristila se sonda Hs00152971_m1 (Applied Biosystems, SAD), a za gen β -aktin, Hs9999903_m1 (Applied Biosystems, SAD). Sve reakcije za pojedinačni gen po uzorku su rađene u tehničkim duplikatima. Reakcije su se odvijale u uređaju za qPCR *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD) prema uvjetima prikazanim u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti qPCR metode za određivanje ekspresije gena *TLR7*

Broj ciklusa	Ciklus	Temperatura / °C	Vrijeme
1	Početna denaturacija	95	10 min
40	Denaturacija	95	15 s
40	Sparivanje početnica i sinteza	60	1 min

3.2.2.8. Određivanje preživljenja stanica (MTT test)

Za procjenu utjecaj povećane ekspresije gena *TLR7* na preživljenje H1299 korišten je metil tiazolil tetrazolij (MTT) test. MTT je kolorimetrijska metoda kojom se ispituje metabolička aktivnost stanica. Temelji se na tome da vijabilne stanice imaju sposobnost redukcije tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) u kristale formazana, čijim otapanjem nastaje ljubičasto obojenje, što omogućava apsorpcijsko praćenje vijabilnosti stanica.

Stanice su najprije transfecirane s SP61 odnosno SP61_TLR7 plazmidnom DNA (Poglavlje 3.2.2.2.1.), te je provjerena ekspresije gena *TLR7* qPCR metodom (Poglavlje 3.2.2.7.). Nakon provjere uspješnosti transfekcije i povećane ekspresije gena *TLR7*, nasadeno je 5 000 stanica u 90 μ L medija DMEM po jažici na pločici sa 96 jažica. Uz gore navedena 2

uvjeta, također su nasađene i netransfecirane H1299 stanice kao kontrola utjecaja transfekcije na preživljenje stanica. Sljedeći dan stanice su tretirane rastućom koncentracijom imikvimoda ($\gamma = 10, 50, 150 \mu\text{g/mL}$) po $10 \mu\text{L}$, paklitaksela ($c = 25 \text{ nM}$), kotretmanom imikvimodom i paklitakselom ($\gamma(\text{imikvimod}) = 10 \mu\text{g/mL} + c(\text{paklitaksel}) = 25 \text{ nM}$, $\gamma(\text{imikvimod}) = 50 \mu\text{g/mL} + c(\text{paklitaksel}) = 25 \text{ nM}$, $\gamma(\text{imikvimod}) = 150 \mu\text{g/mL} + c(\text{paklitaksel}) = 25 \text{ nM}$), te samim medijem za uzgoj stanica, DMEM. Konačne koncentracije imikvimoda su iznosile 1, 5 i 15 $\mu\text{g/mL}$, a paklitaksela 2,5 nM. Stanice su zatim inkubirane 72 h u inkubatoru. Nakon stimulacije maknut je supernatant sa stanica, nakon čega je dodano 30 μL otopine MTT Sigma, SAD, ($\gamma = 5 \text{ mg/mL}$), te su stanice inkubirane 4 h. Tijekom inkubacije stanice pretvaraju MTT u formazan, koji je netopiv u polarnom mediju, stoga je nakon inkubacije dodano je 160 μL DMSO, te je pločica protresena 10 minuta. Zatim je izmjerena apsorbancija pri 570 nm na spektrofotometru za očitavanje pločica s 96 jažica Multiskan EX (LabSystems, SAD).

3.2.3. Analiza transkriptoma

Napredak u razvoju tehnologije doveli su do poboljšanja i dostupnosti različitih *omics*-metoda, kao genomike, transkriptomike, proteomike i metabolomike. Navedene metode nam daju detaljniji uvid u molekularne mehanizme različitih bioloških i fizioloških procesa. Transkriptomika, najčešće korištena *omics*-metoda, je metoda koja proučava transkriptom, koji se sastoji od RNA transkripata eksprimiranih s gena u određenim stanicama ili tkivima. U izradi ovog rada analiza transkriptoma je korištena da se ustanovi utjecaj prisutnosti polimorfnog biljega rs2072493 u genu *TLR5* na ukupnu promjenu razine ekspresije gena i promjene u staničnim putevima kod staničnih linija WI-38 i H1299. Po svakoj staničnoj liniji i uvjetu priređene su tri biološke replike.

3.2.3.1. Priprema uzoraka za analizu transkriptoma

Kako bi pratili utjecaj polimorfizma rs2072493 na promjene transkriptoma WI-38 i H1299 stanica potrebno je bilo unijeti odgovarajući konstrukt u stanice. Za unos konstrukata koristio se adenovirusni vektor (virus Adeno-5) koji je sadržavao divlji tip, odnosno mutiranu (1775A>G, N592S) verziju gena *TLR5*. Infekcija stanica opisana je u poglavlju 3.2.2.22..

Nakon infekcije stanice su isprane s fosfatnim puferom te je izolirana ukupna RNA pomoću kompleta *RNeasy Plus Mini Kit* (poglavlje 3.2.2.4.), izmjerena je koncentracija ukupne RNA (poglavlje 3.2.1.3.), te su na kraju uklonjene eventualno zaostale molekule DNA (poglavlje 3.2.2.5.). Kako bi se za pripremu knjižnice uzela jednaka količina RNA, izmjerena je koncentracija ukupne RNA (poglavlje 3.2.1.3.).

3.2.3.2. Provjera kvalitete nukleinskih kiselina

Provjera očuvanosti RNA u uzorku važan je korak u pripremi knjižnica za sekvenciranje. Kvaliteta RNA u uzorku procjenjuje se pomoću vrijednosti RIN (*engl. RNA Integrity Number*) izračunate na temelju omjera fluorescentnog signala 28S i 18S rRNA. Vrijednost RIN može iznositi između 1 i 10. 10 označava vrlo očuvanu RNA, dok vrijednost 1 označava degradiranu RNA čija prisutnost može znatno utjecati na kvalitetu rezultata daljnjih analiza. Za provjeru kvalitete RNA korišten je komercijalni komplet *RNA Nano 6000 Kit* (Agilent, SAD), te uređaj BioAnalyzer 2100 (Agilent, SAD). Princip rada uređaja BioAnalyzer temelji se na razdvajanju i analizi fragmenata RNA kapilarnom elektroforezom koji se mogu detektirati zbog prisustva fluorescentne boje.

Ukratko, u gel za elektroforezu je dodana fluorescentna boja, koja se veže na nukleinske kiseline, te se gel pročistio na kolonama za pročišćavanje, iz kompleta, centrifugiranjem kroz 10 minuta, kako bi se uklonili mogući zaostaci većih komadića gela. Točno 9 μL gela je potom nanijeto na čipove zajedno s 1 μL uzorka i 5 μL biljega po jažici. Standard uzorka (1 μL) s poznatih veličina ulomaka RNA (*engl. ladder*) dodan je u zasebnu jažicu. Čip je potom vorteksiran 1 minutu pri 2 400 rpm, te je stavljen na uređaj BioAnalyzer 2100 i pokrenuta je kapilarna elektroforeza. Esej je uspješan ako se na elektroferogramu standarda mogu vidjeti dobro razdvojene vrpce fragmenata RNA samog standarda, jedna vrpca koja potječe od biljega.

Ovom metodom je također provjerena kvaliteta pripremljene knjižnice za sekvenciranje (Poglavlje 3.2.3.3.). Važno je provjeriti kvalitetu knjižnice, odnosno njezinu veličinu, kako bi samo sekvenciranje bilo uspješno. Kako se knjižnica za sekvenciranje sastoji od lanca DNA, za provjeru njezine kvalitete korišten je komplet *DNA High Sensitivity Kit* (Agilent, SAD). Postupak uporabe ovog kompleta je jednak kao i gore navedeni postupak korištenja kompleta za analizu RNA.

3.2.3.3. Priprema knjižnice za sekvenciranje

Provjerom kvalitete izolirane ukupne RNA, ustanovljeno je da svi uzorci imaju RIN-vrijednost 10, što ukazuje da je ukupna RNA nije degradirana, te je pogodna za daljnju pripremu knjižnice za sekvenciranje. Za pripremu knjižnice za sekvenciranje korišten je komplet *Universal Plus mRNA-Seq* (NuGEN, Švicarska). Priprema knjižnice pomoću navedenog kompleta zasniva se najprije na izdvajanju poli(A) transkripata, uključujući mRNA, pomoću paramagnetskih kuglica koje na sebi sadrže oligo(dT)-sljedove, te zatim slijedi sinteza cDNA i u konačnici ligacija adaptera.

Za pripremu knjižnice korišteno je 1 µg ukupne RNA. Prema uputama proizvođača, prvi korak protokola je izdvajanje poli(A)-transkripata. U ovom koraku se uzorak RNA pomiješa sa paramagnetskim kuglicama koje na sebi sadrže oligo(dT)-sljedove na koje se vežu poli(A)-sljedovi. Ispiranjem paramagnetskih kuglica iz smjese se odstranjuju nevezane nukleinske kiseline i soli, te se na kraju vezane molekule RNA eluiraju s paramagnetskih kuglica. Eluirana RNA je zatim fragmentirana na fragmente prosječne veličine 151 pb, jer je u izradi ove disertacije korišten proces sekvenciranja koje se sastoji od 151 ciklus PCR reakcije PCR, gdje se u svakom ciklusu početnica produlji za 1 nukleotid. Kako bi se mogao provesti PCR, dobivenu RNA potrebno je prevesti u oblik cDNA. Najprije se sintetizira prvi lanac cDNA, te u sljedećem koraku drugi lanac, te kao produkt nastaje dvolančana cDNA. Dobivena cDNA je zatim pomoću paramagnetskih kuglica pročišćena od korištenih soli i komponenata za sintezu cDNA, koji bi mogli smetati u daljnjoj obradi. Pročišćenoj cDNA su zatim popravljani krajevi, odnosno proces u kojem cDNA poprima tupe krajeve kako bi se u sljedećem koraku mogli ligirati adapteri. Nakon koraka ligacije slijedi obogaćivanje DNA ulomaka pomoću reakcije PCR. U ovom koraku umnažaju se samo oni DNA ulomci kod kojih je došlo do ligacije adaptera, te se ujedno i pripremljena knjižnica obogaćuje. Sam proces PCR-a proveden je u 18 ciklusa, te je nakon reakcije knjižnica pročišćena pomoću paramagnetskih kuglica. U konačnici knjižnica je provjerena pomoću uređaja BioAnalyzer 2100 korištenjem *DNA High Sensitivity* kompleta (poglavlje 3.2.3.2) kako bi se provjerila veličina knjižnice. Knjižnice su potom razrijeđene i sekvencirane na platformi HiSeqX (Illumina, SAD).

3.2.3.4. Provjera kvalitete neobrađenih sekvenci i poravnanje na referentni genom

Nakon sekvenciranja dobiveni su neobrađeni podaci u formatu .fastq. Prije daljnje obrade i

analize podataka sekvenciranja, potrebno je provesti provjeru kvalitete sirovih podataka. U svrhu provjere kvalitete neobrađenih podataka korišten je program FastQC (Braham Bioinformatics, UK, verzija v.0.11.9). Kvaliteta očitanih sekvenci se ispituje kako bi se osiguralo da su dodijeljene baze u sekvenci očitane s visokom pouzdanošću, da udio nukleotida GC u sekvencama odgovara očekivanoj distribuciji, da motivi kratkog niza (*engl. k-mers*) nisu previše zastupljeni i da je stopa dupliciranih sekvenci prihvatljiva. Kvalitete očitane sekvence izražava se pomoću vrijednosti Phred, te označava vjerojatnost da je očitani nukleotid u sekvenci zaista točno očitani. Phred-vrijednost izražava se u postocima, te veći postotak govori da je velika vjerojatnost da je očitani nukleotid točno očitani.

Prije poravnanja neobrađenih podataka na genom potrebno je ukloniti sekvence korištenih adaptera. Uklanjanje sekvenci adaptera s neobrađenih očitavanja će povećati mapiranje odnosno očitavanje samih neobrađenih podataka na genom, što znatno utječe na daljnju analizu. Za uklanjanje sekvenci adaptera iz neobrađenih podataka korišten je program fastp ([102], verzija 0.21.0). Ako nam je poznata sekvenca adaptera korištenih u pripremi knjižnice, sekvenca se može unijeti u program fastp, koji će zatim iz neobrađenih podataka ukloniti sekvencu. Ako nije poznata sekvenca korištenih adaptera, program fastp može prepoznati ponavljajuće sekvence na početku neobrađenih podataka, odnosno sekvence adaptera, te ih zatim uklanja. U izradi ove disertacije korištena je opcija automatskog prepoznavanja i uklanjanja sekvenci adaptera iz neobrađenih podataka.

Nakon uklanjanja adaptera podatke je potrebno poravnati na referentni genom. Za poravnavanje na referentni genom korišten je program *Spliced Transcripts Alignment to a Reference* (STAR, [103], verzija 2.7.2b), a kao referentni genom korištena je verzija humanog genoma GRCh38.p13. STAR sekvence na referentni genom poravnava u dva koraka: najprije traži *seed* sekvence, te ih kasnije grupira. U prvom koraku STAR traži za maksimalnim prefiksom koji se može poravnati (*engl. Maximal Mappable Prefix, MMP*) počevši od prve baze sekvence te zatim se pretraga MMP ponavlja za neporavnati dio očitavanja te ih poravnava na pripadajući dio genoma. U drugoj fazi algoritma, STAR poravnava cijele sekvence čitanjem i spajanjem svih dobivenih sekvenci *seed* iz prve faze. U konačnici se poravnata očitavanja kvantificirane metodom kvazi-mapiranja pomoću programa Salmon ([104], verzija v0.99.0), gdje se očitavanja najprije mapiraju na referentni genom, te se zatim kvantificiraju kako bi dobili broj očitavanja po genu. Tijekom same kvantifikacije Salmon uzima u obzir potencijalne sistematske pogreške (*engl. bias*) koje su specifične za metodu RNA-Seq, kao što su razlika u dubini čitanja sekvenci ovisno o poziciji, *bias* na 5'- i 3'-krajevima očitane sekvence koji je specifičan za sekvencu, udjela baza GC u fragmentima sekvenci, *bias* koji nastaje zbog

korištenja specifičnih protokola za pripremu knjižnice i u distribuciji duljine ulomaka. Na kraju se dobije popis kvantificiranih transkripata u svakom uzorku koji se dalje obrađuju.

3.2.3.5. Analiza diferencijalne ekspresije gena

Kako bi se na temelju dobivenih kvantificiranih transkripata, ustanovio utjecaj polimorfne varijante gena *TLR5* na promjene u transkriptomu, napravljena je analiza diferencijalne ekspresije gena. Za ovu analizu korišten je paket DESeq2 ([105], verzija 3.9) u programu R (Posit, USAR Core Team, Novi Zeland, verzija 3.6.1). Prilikom analize diferencijalno ekspresiranih gena možemo se susresti s nekoliko problema. Na primjer, rangiranje gena prema promjeni razini ekspresije može biti komplicirano za gene kod kojih je očitani mali broj sekvenci. DESeq2 je alat koji omogućava kvantitativnu analizu podataka RNA-Seq koristeći procjenitelje skupljanja za disperziju (*engl. Shrinkage estimators for dispersion*) i logaritamsku promjenu ekspresije (*engl. Logarithmic Fold Change, log₂FC*), uključujući rangiranje gena prema promjeni ekspresije i njihovu vizualizaciju, testiranje nulte hipoteze ispod i iznad granice (*engl. threshold*), kao i procjenu kvalitete i klasteriranje prekomjerno raspršenih očitanih sekvenci pomoću regulirane logaritamske transformacije (*engl. Regularized Logarithm transformation, rlog*). U svojim algoritmima DESeq2 uzima u obzir gene s malo očitanih sekvenci, što dobivene rezultate čini pouzdanijima. Za analizu diferencijalne ekspresije potrebno je najprije pripremiti matricu u kojoj su geni poredani u redovima, a uzorci u kolonama. Vrijednosti u matrici označavaju kvantificirane očitane sekvence (*engl. reads*) nakon kvantifikacije za svaki gen u uzorku. Zatim za svaki gen DESeq2 radi generalizirani linearni model (*engl. Generalized Linear Model, GLM*) kako bi se dobio koeficijent koji ukazuje na sveukupnu snagu ekspresije gena i log₂FC vrijednost između skupina. DESeq2 prilikom izračuna također u obzir uzima varijabilnost između replikata koju modelira disperzijskim parametrom gdje pretpostavlja da geni slične ekspresije imaju sličnu disperziju. Točna procjena disperzijskog parametra je kritična za statističku snagu analize diferencijalne ekspresije gena, posebice u analizama koje uključuju mali broj uzoraka. Za analizu pomoću programa DESeq2, prvo su pojedinačne datoteke s kvantificiranom ekspresijom gena u pojedinom uzorku pomoću alata Salmon spojene u jednu ekspresijsku matricu gena. Uzorci stanica H1299 i WI-38 inficirani adenovirusom koji sadrži varijantu N592S gena *TLR5* označeni su kao testna skupina, a stanice H1299 i WI-38 inficirane adenovirusom koji sadrži divlji tip gena *TLR5* kao kontrolna skupina. Geni su okarakterizirani kao statistički diferencijalno ekspresirani na temelju postavljene granične vrijednosti $|\log_2FC| \geq 1,5$ i

prilagođene statističke značajnosti $p < 0,05$, prema metodi Benjamin-Hochberg.

3.2.3.6. Analiza genske ontologije i GSEA

Analiza genske ontologije (GO) je jedna od najčešće korištenih metoda analize rezultata RNA-Seq. Analiza genske ontologije, na temelju baze podataka GO, pokušava objasniti funkciju gena u listi diferencijalno eksprimiranih gena. Baza podataka GO strukturirana je korištenjem formalne ontologije u kojem svaki pojam ima definiranu vezu s jednim ili više pojmova unutar iste kategorije. U bazi GO dostupno je oko 45 000 pojmova, zajedno s 134 000 opisanih međuodnosa pojmova, te pokriva tri različita aspekta funkcije gena poredanih u tri kategorije: kategorija Molekularne funkcije, kategorija Stanične komponente, te kategorija Biološki procesi. Kategorija Molekularne funkcije opisuje aktivnost genskog produkta na molekularnoj razini; kategorija Stanične komponente opisuje lokaciju u odnosu na biološke strukture u kojoj genski produkt vrši svoju funkciju, te kategorija Biološki procesi koja opisuje procese koji koriste molekularnu funkciju gena. Analiza genske ontologije često se koristi u analizama obogaćenih pojmova (*engl. enrichment*), često zvanih i analiza staničnih puteva. U svrhu ove analize potrebno je na mrežnoj stranici projekta unijeti listu gena sa statistički značajno promijenjenom ekspresijom, pri čemu se potom oni uspoređuju s listom ljudskih protein-kodirajućih gena. Računalnom obradom se sortiraju funkcije gena i stvaraju grupe prema funkciji, te se na kraju određuje statistička značajnost pripadnosti unesene liste gena određenoj grupi.

U analizi genske ontologije diferencijalno eksprimiranih gena, u sklopu izrade ove disertacije, korišten je mrežni alat Gorilla, dostupan na mrežnoj stranici <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>. Za analizu je napravljena lista diferencijalno eksprimiranih gena, rangirana prema \log_2FC vrijednostima, te je prilikom analize odabran je način rada rangirane liste, te *Homo sapiens* kao promatrani organizam. Analiza je napravljena za sve tri kategorije GO: kategoriju Biološki procesi, kategoriju Stanične komponente i kategoriju Molekularne funkcije. Prekomjerno zastupljeni pojmovi GO sa statističkom značajnošću korigirane p -vrijednosti manje od 0,05, prema metodi Benjamin-Hochberg, smatrani su statistički značajnima, te su ti pojmovi vizualizirani u obliku stupčastih grafova u programu R pomoću paketa ggplot2.

Osim analize genske ontologije, napravljena je i analiza obogaćivanja setovima gena (*engl. Gene Set Enrichment Analysis, GSEA*). GSEA metoda omogućava lakše razumijevanje biološke uloge gena s promijenjenom razinom ekspresije, pomoću definiranih setova gena. Za

analizu je potrebna lista gena, koja se najčešće temelji na rangiranim genima prema željenoj vrijednosti, poput \log_2FC vrijednosti. Tako pripremljena liste se zatim analizira u tri glavna koraka. U prvom koraku se izračunava vrijednost obogaćivanja (*engl. enrichment score*, ES) koja predstavlja razinu prekomjerne zastupljenosti gena iz *a priori* definiranih setova gena, u drugom koraku se procjenjuje razina statističke značajnosti ES-a, te u zadnjem trećem koraku dobiveni podaci korigiraju na višestruko testiranje hipoteza.

U našim analizama, za analizu obogaćivanja setovima gena koristili smo računalni alat GSEA ([106], verzija 4.1.0) i kolekciju setova gena C2 s održavanom bazom KEGG (*engl. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Postavke za analizu postavljene su na slijedeći način: odabrana je analiza obogaćivanja setovima gena iz ponderirane rangirane liste gena s 1 000 permutacija; odabrani su setovi gena koji imaju više od 10 (minimalno 10 gena) i manje od 500 gena u setu (maksimalno 500 gena). Geni s promijenjenom ekspresijom su poredani prema vrijednostima \log_2FC , od najveće prema najmanjoj vrijednosti i uneseni u alat GSEA, zajedno s fenotipskim oznakama (mutacija N592S odnosno divlji tip). Rezultati analize su vizualizirani u programu R pomoću paketa ggplot2.

3.2.4. Analiza metaboloma

Metaboliti, odnosno male molekule ($\leq 1\ 500$ Da), nam mogu dati bolji opis između odnosa genotipa i fenotipa samih stanica. Stanice karcinoma pluća imaju podosta promijenjen metabolizam, pa time i metabolite, ponajprije kako bi se povećala proliferacija, ali i drugi stanični procesi [107]. Iz tog razloga je važno proučavati i promjene u metabolitima karcinoma. Upravo proučavanjem metabolita se bavi metabolomika, jedna od *-omics* metoda. Napretkom u tehnologiji u posljednje vrijeme dolazi do sve češće primjene izučavanja metaboloma u raznim malignim bolestima. U odnosu na ostale *-omics* metode koje proučavaju samo jednu vrstu molekula, metabolomika proučava širok spektar metabolita kao što su šećeri, lipidi, organske kiseline, te ostale polarne molekule različitih fizikalnih svojstava. Osim širokog spektra metabolita, analizu otežavaju i različiti načini pripreme uzoraka, kao i različiti načini dobivanja podataka, što interpretaciju dobivenih podataka čini vrlo kompleksnom. Za analizu metabolita može se koristiti više metoda. Prvi korak u odabiru odgovarajuće metode je da li je analiza ciljana ili neciljana. Ciljana analiza podrazumijeva da se unaprijed odabere nekolicina metabolita čija promjena se želi pratiti, te se analiziraju specifični omjeri m/z koji pripadaju odabranim metabolitima. Za razliku od ciljane analize, kod neciljane analize analiziraju se svi dobiveni omjeri m/z koji potječu od ukupnog metaboloma. Dvije najčešće metode za analizu

metabolita su masena spektrometrija (MS) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR), koje često znaju biti spregnute s kromatografskim metodama u svrhu razdvajanja metabolita.

Matricom-potpomognuta laserska desorpcija i ionizacija uz detekciju praćenja vremena leta uzoraka (*engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight, MALDI-TOF*) jedna je metode spektrometrije masa koja se koristi za praćenje metabolita. Kod metode MALDI-TOF uzorak se pomiješa zajedno s matricom, organski spojevi malih struktura, gdje tijekom isparavanja otapala dolazi do kristalizacije matrice i uklapanja metabolita u kristalnu strukturu matrice. Matrica štiti uzorak od raspadanja, te pomaže kod ionizacije u daljnjem koraku. Da bi došlo do ionizacije, uzorak je podvrgnut kratkom i jakom laserskom zračenju, pri čemu nastaje „oblak“ metabolita u plinskom stanju. Nastali ionizirani metaboliti se potom izdvajaju primjenom električnog polja, te putuju prema detektoru, u ovom slučaju detektor koji prati vrijeme leta. Kod ove vrste detektora ioni su ubrzani pomoću električnog polja, te će ioni dalje putovati ovisno o njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Ioni koji imaju jednak naboj imat će i jednaku kinetičku energiju, te u takvim uvjetima njihovo vrijeme leta ovisit će samo o njihovoj masi, gdje će lakši ioni putovati brže od težih. Kao rezultat ove analize dobije se kromatogram za pojedini uzorak, koji prikazuje intenzitet pikova ovisan o vremenu leta, odnosno ako se koristi kalibrator poznatih omjera m/z i vremena leta, dobije se intenzitet pikova ovisan o omjeru m/z . Dobiveni rezultati se dalje koriste u bioinformatičkoj analizi.

U svrhu izrade ove disertacije, MALDI-TOF se najprije koristio za validaciju bioinformatičke metode, gdje su se inhibirali ili utišali pojedini geni, s očekivanjem da ćemo namjerno izazvane promjene detektirati bioinformatičkom analizom. Zatim validiranu metodu analize primijeniti za ispitivanje utjecaja promatranih polimorfizama gena *TLR5* i *TLR7* na promjene metaboloma metastatskih stanica karcinoma pluća.

3.2.4.1. Priprema uzoraka za analizu metaboloma

Kako bi validirali bioinformatičku metodu za analizu masenih spektara, najprije su priređeni stanični sustavi u kojima su uvedene željene promjene. Bioinformatička metoda uključuje korištenje FELLA paketa u programu R, koji pretražuje bazu podataka KEGG. Literaturnim pregledom odabrani su geni, odnosno enzimi koji su dobro opisani u navedenoj bazi. Kao odabrani gen čija transkripcija će se utišati korištenjem siRNA uzet je gen koji kodira za nukleozid-difosfat-kinazu (*NME4*). Kao kontrola se koristila nasumična siRNA, koja se ne bi trebala utjecati na transkripciju ijednog gena u stanicama, dakle transkripcija svih gena u stanici bi trebala biti nepromijenjena. Unos siRNA i priprema stanica opisani su u poglavlju 3.2.2.2.1.

Kao enzim čija aktivnost će se smanjiti korištenjem specifičnog inhibitora odabrana je nikotinamid-fosforiboziltransferaza (NAMPT). Tretiranje stanica inhibitorom i priprema opisani su u poglavlju 3.2.2.3. Navedeni uvjeti korišteni su za četiri stanične linije (H1299, WI.38, HepG2 i HEK293T).

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio ispitati utjecaj polimorfizma u genu *TLR5* na promjene u metabolomu netumorskih (WI-38) i tumorskih stanica pluća (H1299), te stanica imunskog sustava (THP-1). U tu svrhu je bilo potrebno inficirati stanice virusom Adeno-5 koji sadržava divlju, odnosno mutiranu (1775A>G, N592S) verziju gena *TLR5*. Način pripreme stanica opisan je u poglavlju 3.2.2.2.2.

Također, cilj je bio utvrditi učinak promjene ekspresije *TLR7* na promjene metaboloma stanica H1299. Kako bi u H1299 povećali razinu ekspresije gena *TLR7*, u stanice je unijet plazmidna DNA SP61_TLR7 (Poglavlje 3.2.2.2.1.), te je na alikvotu stanica metodom qPCR provjerena ekspresija gena *TLR7* (Poglavlja 3.2.2.4-3.2.2.7.). Uz povećanu ekspresiju gena *TLR7*, cilj je bio i ustanoviti promjene u metabolomu stanica H1299 zbog smanjenje razine ekspresije *TLR7*. Kako bi se smanjila ekspresija *TLR7*, stanice su tretirane sa siTLR7 (Poglavlje 3.2.2.2.1.).

Nakon inkubacije, stanice su isprane pet puta hladnim amonij-acetatnim puferom (150 mM), nakon čega su odlijepljene s površine posudice mehanički pomoću sakupljača stanica (*engl. cell scraper*), te su centrifugirane. Supernatant je maknut, te su resuspendirane u 600 μ L pufera s inhibitorima proteaza (1 tableta smjese inhibitora (*cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Švicarska)) 1mM Na_2VO_3 (Sigma, SAD), 5 mM NaF (Sigma, SAD), 1 mM PMSF (Sigma, SAD) u redistiranoj H_2O). Stanice su zatim sonicirane pomoću sonikatora Bandelin Sonusplus HD 2070 (Bandelin, Njemačka) u 9 ciklusa, koji se sastoji od 15 sekundi sonikacije, te 15 sekundi inkubacije na ledu. Uzorci su zatim pohranjeni na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do daljnje obrade. Svi uzorci pripremljeni su u 4 biološke replike.

3.2.4.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina (analiza pomoću bikonične kiseline, BCA)

Kako bi se smanjila tehnička varijacija između uzoraka tijekom analize MALDI-TOF, za daljnju pripremu uzoraka potrebno je koristiti jednaku količinu uzoraka, odnosno jednaka količina ukupnih proteina. Za određivanje koncentracije proteina koristio se komercijalan komplet, *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD), prema uputama

proizvođača. Kolorimetrijska metoda BCA (*engl. bicinchoninic acid assay*) kolorimetrijska metoda temelji se na promjeni boje iz zelene u ljubičastu, odnosno redukciji iona Cu^{2+} u ione Cu^+ . Proteini u otopini reduciraju Cu^{2+} u Cu^+ , čime je količina nastalih iona Cu^+ proporcionalna količini proteina. Za određivanje količine nastalih iona Cu^+ u otopini se nalazi bikonična kiselina koja stvara ljubičasti kompleks s nastalim ionima Cu^+ što omogućava praćenje količine Cu^+ spektrofotometrijom.

Kako bi se izračunala koncentracija ukupnih proteina u našim uzorcima najprije je potrebno napraviti standardnu krivulju pomoću poznatih koncentracija BSA. U duplikatima na pločici s 96 jažica se prirede razrjeđenja BSA finalnih koncentracija 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250, 125 i 25 $\mu\text{g/mL}$. U 25 μL otopine BSA doda se 200 μL smjese reagensa A i reagensa B u omjeru 50:1. Pločica se protrese 30 s, te se inkubira 30 minuta na 37 °C nakon čega se izmjeri apsorbancija pri 570 nm. Iz dobivenih vrijednosti priredi se standardna krivulja za izračun koncentracija ukupnih proteina u uzorcima. Za dobivanje koncentracija ukupnih proteina u našim uzorcima postupak se ponovi koristeći 25 μL pojedinog uzorka, te se očita apsorbancija, pomoću koje se interpolacijom dobivene standardne krivulje dobije koncentracija ukupnih proteina.

3.2.4.3. Određivanje postotka utišavanja gena westernskom metodom otiska

U svrhu određivanja postotka utišanih gena (*NME4* i *TLR7*) u staničnim linijama, napravila se analiza proteina westernskom metodom otiska. U svakom uzorku specifičnim antitijelom pratila se količina utišanog gena, odnosno proteina, te vinkulina kao endogena kontrola kako bi se uzorci mogli uspoređivati. Razdvajanje proteina u 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu uz prisustvo natrijeva-dodecil sulfata (*engl. Sodium dodecyl sulfate, SDS*), omogućilo je razdvajanje proteina na temelju njihove mase. Jednaka količina ukupnih proteina u svakom uzorku pomiješana je s puferom za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel (0,2 M Tris-HCl (Roth, Njemačka) pH = 6,8, 0,4 M DTT (Sigma, SAD), 8 % (w/v) SDS, (Sigma, SAD) 40 % (v/v) glicerol (Gram mol, Hrvatska), 0,0001 % (w/v) bromfenol plavo (Sigma, SAD)), zagrijana 5 minuta pri 95 °C, te je se smjesa nanosena u jažice gela i pokrenuta je elektroforeza najprije 15 minuta pri 120 V, a zatim 30 minuta pri 160 V. Nakon razdvajanja proteini su s gela preneseni na PVDF-membranu, tako da se priredila „sendvič“ konstrukcija koja se sastojala od filter papira namočenih u pufer za transfer, PVDF-membrane, poliakrilamidnog gela te još jednog sloja filter papira namočenih u pufer za transfer (25 mM Tris-baza (Roth, Njemačka) pH = 8,3, 192 mM glicin (Sigma, SAD), 20 % (v/v) metanol (Kemika, Hrvatska), 0,25 % (w/v)

SDS (Sigma, SAD)). Konstrukcija je stavljena u uređaja za transfer *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, Austrija), te je pokrenut program u trajanju od 7 minuta. Nakon samog prijenosa proteina, ostatak membrane je blokiran 1 sat u puferu TBST (20 mM Tris-HCl (Roth, Njemačka) pH = 7,4, 150 mM NaCl (Sigma, SAD), 0,1 % (v/v) Tween 20 (Sigma, SAD)) koji sadrži 5 %-tno punomasno mlijeko. Nakon blokiranja membrana je inkubirana u odgovarajućem primarnom antitijelu prekoćno uz njihanje na +4 °C. Sljedeći dan membrana je isprana tri puta s puferom TBST uz njihanje 15 minuta, te je zatim inkubirana s odgovarajućim sekundarnim antitijelom 2 sata. Popis korištenih antitijela kod westernske metode otiska, kao i njihova korištena razrjeđenja prikazana su u Tablici 3. Nakon inkubacije membrana je isprana tri puta s TBST puferom uz njihanje 15 minuta. Zatim je slijedila vizualizacija proteina pomoću kompleta *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Supstrat iz kompleta je dodan na membranu, te je membrana inkubirana 3 minute u mraku kako bi se razvila kemiluminescencija. U konačnici proteini su vizualizirani pomoću uređaja *Uvitec Alliance Q9 mini* (Uvitec, UK). Nakon detekcije proteina, intenziteti vrpca su analizirani pomoću programa ImageJ ([108], verzija 1.52a), unutar istog uzorka u omjer su stavljeni intenzitet proteina koji služe kako kontrola nanošenja uzoraka (vinculin odnosno β -aktin) te proteina od interesa (NME4 i TLR7). Zatim su dobiveni omjeri intenziteta uzoraka tretiranih sa siRNA uspoređeni s omjerom intenziteta uzoraka tretiranih s nasumičnom siRNA, pri čemu je dobiven postotak inhibicije.

Tablica 3. Popis korištenih antitijela (At) kod westernske metode otiska.

Antitijelo	Svrha	Razrjeđenje	Proizvođač
abTLR7 (ab28048)	Primarno At	1 : 1 000	Abcam, UK
abNME4 (ab228005)	Primarno At	1 : 1 000	Abcam, UK
abVinculin (sc-73614)	Primarno At	1 : 1 000	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-miš (sc-516102)	Sekundarno At	1 : 10 000	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-zec (ab205718)	Sekundarno At	1 : 10 000	Abcam, UK

3.2.4.4. Ekstrakcija metabolita

Nakon što je izračunata ukupna količina proteina slijedila je ekstrakcija metabolita iz uzoraka. Za ekstrakciju je uzeta jednaka količina ukupnih proteina iz svih uzoraka, u ukupnom volumenu

od 240 μL , po potrebi dodana je redestilirana voda kako bi se postigla jednaka količina proteina u istom volumenu. Smjesi se zatim doda 600 μL 100 %-tnog metanola (Kemika, Hrvatska) i 300 μL kloroforma (Kemika, Hrvatska), te se uzorak dobro promiješa vorteksiranjem. Potom se doda 300 μL kloroforma i 300 μL vode i uzorak se opet dobro promiješa vorteksiranjem kako bi se ekstrahirali metaboliti. Uzorci se zatim centrifugiraju 10 minuta pri 10 000 x g, kako bi se razdvojile faze. Gornja polarna faza se prebaci u staklenu mikroepreveta od 1,1 mL, kao i donja nepolarna faza u zasebnu staklenu mikroeprevetu.

3.2.4.5. Snimanje masenih spektara uzoraka metodom MALDI-TOF

Prije snimanja uzoraka otapala su uklonjena uparivanjem na 37 °C u uparivaču Dri-Block DB200/3 (Thermo scientific, SAD) pod inertnom atmosferom dušika, nakon čega su uzorci otopljeni u 30 μL metanola. Uzorci su zatim pomiješani s odgovarajućom matricom u omjeru 1:1. Za snimanje u pozitivnom načinu, za analizu pozitivni ioni, snimanja kao matrica koristila se 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (DHB, Sigma, SAD, sastav:10 mg/mL otopljenog u metanolu), a za snimanje u negativnom načinu, za analizu negativnih iona, snimanja kao matrica koristio se 9-aminoakridin (9-AA, sastav: 10 mg/mL otopljenog u 40:60 acetonitril(Sigma, SAD):izopropanol(Sigma, SAD)). Zatim se 1,5 μL pripremljenog uzorka nanese na pločicu za snimanje, zajedno s DHB-om za kalibraciju snimanja. Uzorci se zatim osuše na zraku kako bi došlo do kokristalizacije matrice i uzorka, te se zatim pločica stavi u maseni spektrometar *Shimadzu iMScope TRIO* (Shimadzu, Japan). Kako tijekom ionizacije mogu nastati pozitivni i negativni ioni, snimanje se odvija u dva načina snimanja, pozitivnom i negativnom, te u dva raspona omjera m/z po načinu snimanja (200 - 700 i 700 - 1 200 Da). Najprije se kalibrira uređaj snimanjem spektara DHB-a za kalibraciju (10 mg/mL otopljen u 60:40 acetonitril:voda (0,1 % (v/v) triflouroctena kiselina, TFA)), te se dobivene postavke koriste u daljnjim snimanjima uzoraka. Kod snimanja uzoraka korišteni su sljedeći parametri: površina snimanja 400 piksela, dijametar lasera 2, intenzitet lasera 46,8 %, broj ispucaja lasera je bio 100, te frekvencija 500 Hz. Kao rezultat po uzorku dobe se četiri masena spektra, ovisno o načinu i rasponu snimanja. Svi uzorci su pripremljeni u četiri biološke replike, te su njihovi spektri snimani u dvije tehničke replike. Snimanja svih masenih spektara napravljena su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek.

3.2.4.6. Bioinformatička analiza masenih spektara

Kako bi se utvrdila promjena u metabolomu u zadanim uvjetima za bioinformatičku analizu koristio se paket FELLA ([109], verzija 3.16). FELLA se bazira na bazi podataka KEGG koja sadrži informacije svrstane u različite skupine (metaboliti, reakcije, enzime, moduli, te stanični putevi). FELLA stvara hijerarhijsku mrežu počevši od metabolita, preko međuprodukata (enzima, reakcija i modula) sve do staničnih puteva. Kako bi se povezali čvorovi, odnosno skupine iz KEGG baze, unutar hijerarhijske mreže, FELLA može koristiti dva pristupa: klasičan pristup difuzije topline (*engl. heat diffusion*) ili algoritam *PageRank*. Algoritam *PageRank* do konačnih promjena u staničnim putevima dolazi nasumičnim hodom između čvorova međuprodukata, te se čvorovi koji češće posjećeni dobe veću vrijednost *PageRank*. Pod čvorovima se podrazumijevaju sve informacije unutar jedne skupine međuprodukata. Primjerice, unutar skupine enzimi, svaki enzim predstavlja jedan čvor unutar hijerarhijske mreže. Za razliku od algoritma *PageRank*, koji nasumično prolazi kroz mrežu, pristup difuzije topline ovisi o topologiji hijerarhijske mreže. Tijekom stvaranja hijerarhijske mreže FELLA ujedno i provodi analizu obogaćenja, te kao rezultat daje popis promijenjenih staničnih puteva, kao i međuprodukata, u promatranim uvjetima.

U svrhu ove analize, najprije je pripremljena tablica koja se sastoji od intenziteta svih dobivenih omjera m/z u rasponu od 200 do 1 200 Da, dobivenih iz oba načina snimanja uzoraka, pozitivan i negativan način, za sve uzorke u promatranom uvjetu. Zatim se definiraju svi mogući adukti nastali tijekom pripreme uzoraka, kao protonacija i deprotonacija, adicija natrijevog, kalijevog, amonijevog, kloridnog, acetatnog iona, te gubitak ili adicija molekule vode. Potom FELLA pretražuje KEGG bazu podataka i našim dobivenim omjerima m/z , uz odstupanje od 20 ppm, dodjeljuje određene spojeve, odnosno metabolite iz baze. Zatim FELLA određuje diferencijalno promijenjene omjere m/z , na temelju kojih klasičnim putem difuzije daje promijenjene stanične puteve, kao i međuprodukte, uz korekciju statističke vrijednosti p izračunavanjem stope lažnog otkrivanja (*engl. False Discovery Rate, FDR*).

3.2.5. Cjelogenomske analize povezanosti biljega s nastankom karcinoma pluća

Cjelogenomske analize povezanosti (*engl. genome-wide association studies, GWAS*) analiziraju polimorfizme, od kojih se najčešće istražuju promjene jednog nukleotida (*engl. single nucleotide polymorphism, SNP*), u sekvenci DNA duž cijelog genoma kako bi

identificirali genetičke rizične čimbenike povezane s nekom osobinom ili bolešću. Metoda se sastoji od više koraka. Najprije se prikupi uzorak DNA i informacije o fenotipu promatrane skupine. Dobivene uzorke DNA je potom potrebno genotipizirati. Za proces genotipizacije može se koristiti metoda genotipizacije pomoću mikročipova ili sekvenciranje sljedeće generacije. Nakon samog procesa genotipizacije, dobiveni rezultati prolaze kroz proces provjere kvalitete, koji osim provjere kvalitete sekvenciranja podrazumijeva i pristranost (*engl. bias*) podataka ovisnim o spolu, te o mogućem srodstvu uzoraka i ostalim mogućim čimbenicima koji mogu utjecati na daljnje rezultate. Nadalje se pripisuju (*engl. impute*) negenotipizirane varijante pomoću baza podataka referentnih populacija. Te se na kraju statističkom metodom linearne regresije testira povezanost dobivenih varijanti s promatranom osobinom ili bolešću. Kod analize dobivenih rezultata važno je i pratiti neravnotežu u povezanosti (*engl. linkage disequilibrium*, LD) i frekvenciju manje zastupljenog alela (*engl. minor allele frequency*, MAF). LD je matematički opis koji nam govori u kojoj mjeri se promatrani SNP nasljeđuje ili je koreliran s okolnim SNP-ovima ili lokusom. LD iznosi (r^2) u rasponu od 0 do 1, a što je vrijednost bliža 1 to govori da je promatrani SNP bolje koreliran s okolnim SNP-ovima ili lokusom, te nam govori da se promatrana varijanta vrlo vjerojatno nasljeđuje u populaciji. MAF nam govori koliko je promatrana varijanta zastupljena u populaciji. Kao i LD, MAF se izražava u rasponu od 0 do 1. Tako npr., MAF u iznosu od 0,05 govori da je promatrana varijanta u populaciji pojavljuje frekvencijom od 5 %. MAF u iznosu od 0,05, također se često uzima kao granična vrijednost koja odjeljuje rijetke varijante ($MAF < 0,05$) od češćih varijanti ($MAF > 0,05$). Iz ovih razloga se metoda GWAS, u izradi ove disertacije, koristila za pronalaženje polimorfnih biljega povezanih s nastankom karcinoma pluća.

U tu svrhu, s baze rezultata GWAS, UK Biobank [110], skinut je set GWAS rezultata polimorfnih biljega povezanih s karcinomom pluća. U ovu analizu GWAS uključeno je 203 osoba oboljelih od karcinoma pluća, bez daljnje klasifikacije, te 360 938 osoba kontrolne skupine (osoba kojima nije dijagnosticiran karcinom pluća). Nakon što se skinuo set podataka koji se sastojao od svih identificiranih SNP-ova, najprije su se maknuli svi rijetki SNP-ovi, odnosno SNP-ovi čiji MAF je iznosio $< 0,05$. Kako je tema ove disertacije usmjerena na gene koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, i općenito dosadašnja istraživanja GWAS nisu bila usmjerena na imunosni odgovor, iz tih razloga fokus analize GWAS je bio na genima koji sudjeluju u imunosnom odgovoru. Iz baze podataka o genima koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, Innate DB (<https://www.innatedb.com/>), se skinuo popis gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, ukupno 1 511 gena. Za odabir SNP-ova oko gena koji sudjeluju u

imunom odgovoru, također je u obzir uzeta regija ± 200 kb oko pojedinog gena, korišteni su *in silico* alati LocusZoom (<http://locuszoom.org/>) i UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), pri čemu je uzet u obzir vrijednost LD-a $\geq 0,8$. Na kraju napravljena korekcija vrijednosti p za višestruka testiranja, Bonferronijeva korekcija, te je kao granična vrijednost statistički značajnih SNP-ova uzeta vrijednost $3,3 \times 10^{-5}$. Kako bi se pronađeni SNP-ovi bolje okarakterizirali, da se utvrdi njihov regulatorni učinak i potencijalni funkcionalni učinak korištene su baze podataka dostupne *on-line* baze podataka HaploReg (<https://pubs.broadinstitute.org/>) i Regulome DB (<https://regulomedb.org/regulome-search/>).

3.2.6. Statistička analiza

Za obradu podataka koristili smo metode deskriptivne statistike. Varijable su izražene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Razlika srednjih vrijednosti između skupina kod testa MTT izračunata je pomoću testa analize varijanci (ANOVA), te se za korekciju vrijednosti p zbog višestrukih testiranja koristila Tukeyeva metoda. Za korekciju vrijednosti p u analizi metaboloma koristio se pristup stope lažnog otkrivanja, FDR. Značajnost je izražena kao vrijednost p , a za sve testove vrijednost $p \leq 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Statistička analiza napravljena je pomoću programa GraphPad Prism8 (GraphPad Software, Inc, SAD, verzija 8.2.1). Za odabir statistički značajnih SNP-a nakon analize GWAS koristila se Bonferronijeva korekcija vrijednosti p . Vrijednost $p < 0,05$ označena je s *, vrijednost $p < 0,01$ označena je s **, te vrijednost $p < 0,001$ označena je s ***.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati utjecaja polimorfizama gena *TLR5* (rs2072493) na promjene ukupnog transkriptoma u staničnim linijama H1299 i WI-38

4.1.1. Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena

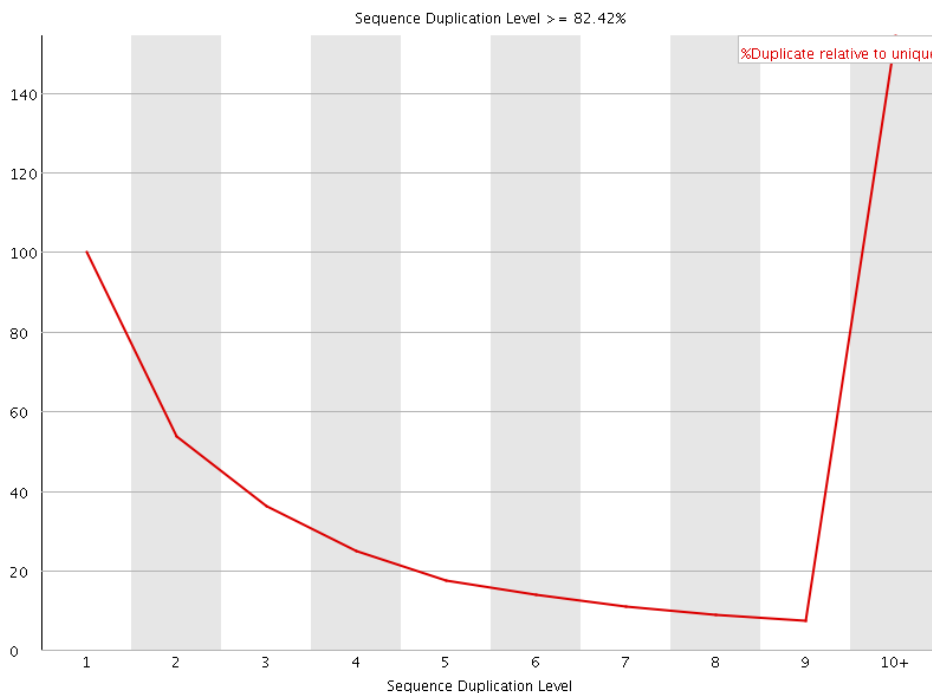
Kako bi ispitali utjecaj polimorfizama *TLR5* (rs2072493, N592S) na promjene ukupnog transkriptoma u staničnim linijama H1299 i WI-38, stanice su inficirane adeno-5 virusnim konstruktom koji sadrži divlji tip odnosno mutiranu, N592S, varijantu gena *TLR5*. Iz inficiranih stanica izolirana je ukupna RNA, te je pripremljena knjižnica koja je sekvencirana na platformi Illumina HiSeqX. Nakon sekvenciranja rezultati u obliku datoteke .fastq korišteni su za provjeru kvalitete sekvenciranja pomoću programa FastQC. Prilikom praćenja kvalitete sekvenciranja vodilo se računa o vrijednosti kvalitete Phred 20 (Q20) i 30 (Q30), koji govore o vjerojatnosti točnosti očitavanja baza. Rezultati tih analiza prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Sažetak rezultata kvaliteta očitanih sekvenci po bazama, udio parova baza GC, ukupan broj očitanih baza, te ukupan broj očitavanja za sve uzorke u analizi.

Uzorak	Ukupan broj očitanih baza / bp	Ukupan broj očitavanja	Udio parova baza GC / %	Vrijednost kvalitete Phred 20 (Q20) / %	Vrijednost kvalitete Phred 30 (Q30) / %
H1299_N592S_I	11.089.189.340	73.438.340	50,47	98,09	95,3
H1299_N592S_II	11.880.446.856	78.678.456	51,08	98,14	95,38
H1299_N592S_III	13.278.017.994	87.933.894	51,75	98,05	95,08
H1299_wt_I	10.808.824.016	71.581.616	49,79	97,56	94,68
H1299_wt_II	10.063.223.162	66.643.862	51,08	98,03	95,22
H1299_wt_III	10.621.423.654	70.340.554	50,03	98,14	95,33
WI-38_N592S_I	12.323.390.860	81.611.860	50,14	98,11	95,35
WI-38_N592S_II	11.304.632.516	74.865.116	50,01	98,21	95,48
WI-38_N592S_III	11.142.464.254	73.791.154	49,46	98,15	95,36
WI-38_wt_I	10.804.608.398	71.553.698	51,22	97,66	94,69
WI-38_wt_II	11.129.968.702	73.708.402	50,93	97,94	95,11
WI-38_wt_III	13.043.539.758	86.381.058	50,4	98,01	95,27

Kao što se vidi u Tablici 4., od 12 analiziranih uzoraka svi su zadovoljili kriterije Q30 (više od 94 % očitanih baza u sekvencama ima visoku vrijednost kvalitete), a prihvatljivu vrijednost kvalitete Q20 ima > 97 % baza u očitanim sekvencama. Ovi rezultati nam ukazuju da je sekvenciranje uspješno i točno provedeno. Također, udio parova baza GC u svim uzorcima

je oko 50 %, te ukupan broj očitavanja u uzorku, koji uključuje oba smjera očitavanja, iznosi između 66 i 88 milijuna očitavanja. U sklopu provjere kvalitete, uzorci su analizirani na provjeru dupliciranih sekvenci. Kod svih uzoraka imamo visoki udio dupliciranih sekvenci. S obzirom na to da protokol za pripremu knjižnice u posljednjem koraku uključuje obogaćivanje pripremljene knjižnice PCR-om, ovi rezultati su očekivani i prihvatljivi. Na Slici 6. prikazani su rezultati provjere dupliciranosti sekvence na primjeru jednog uzorka.

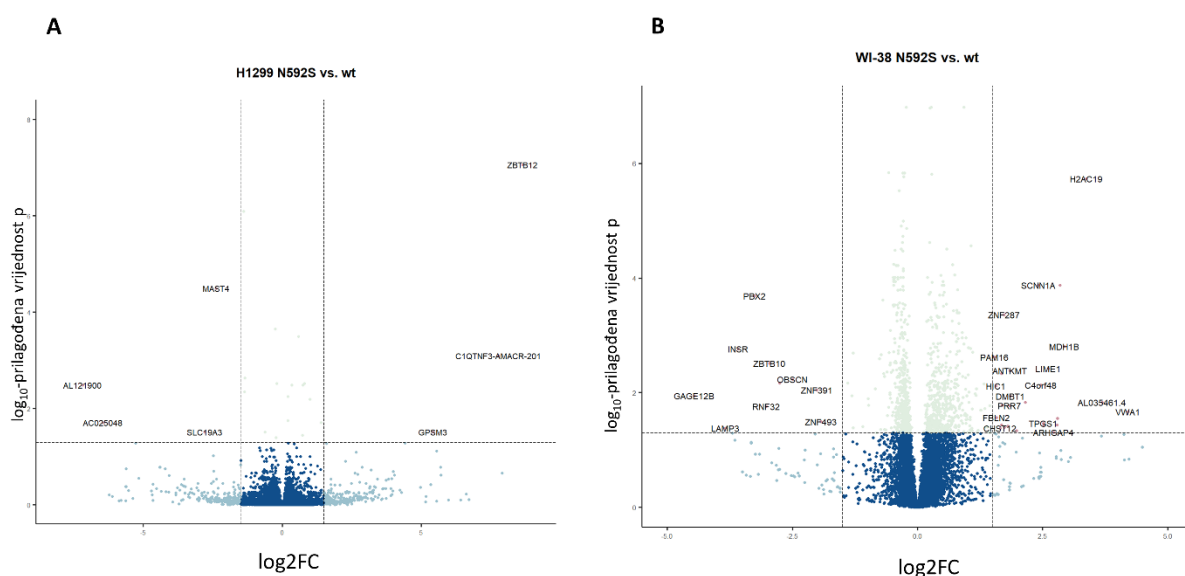


Slika 6. Rezultat provjere dupliciranih sekvenci jednog uzorka

U svrhu što točnijeg poravnavanja očitane sekvence na referentni genom, iz očitavanja su odstranjeni nukleotidni sljedovi korištenih adaptera pomoću programa fastp. Tako pripremljeni neobrađeni podaci su zatim pomoću programa STAR poravnani na referentni ljudski genom, verzija GRCh38.p13, te su zatim dobivena očitavanja kvantificirana kako bi odredili broj pojedinog transkripta u pojedinom uzorku.

Kako bi se ustanovio utjecaj prisutnosti polimorfizma na promjenu transkriptoma u staničnim linijama H1299 i WI-38, pomoću alata DESeq2 napravljena je analiza diferencijalne ekspresije gena, zasebno za pojedinu promatranu staničnu liniju. Geni su okarakterizirani kao diferencijalno eksprimirani na temelju postavljene granične vrijednosti $|\log_2FC| \geq 1,5$ i prilagođene statističke značajnosti $p < 0,05$, prema metodi Benjamin-Hochberg. Dobiveni diferencijalno eksprimirani geni prikazani su na Slici 7. u obliku Volcano grafa. Popis statistički

diferencijalno eksprimiranih gena u pojedinoj staničnoj liniji prikazan je u Tablici 5.



Slika 7. Diferencijalno eksprimirani geni zbog prisutnosti varijante N592S gena *TLR5* u staničnoj liniji H1299 (A) i WI-38 (B). Vertikalne linije predstavljaju granične vrijednosti $|\log_2FC| \geq 1,5$, dok horizontalna linija predstavlja prilagođenu statističku vrijednost p 0,05.

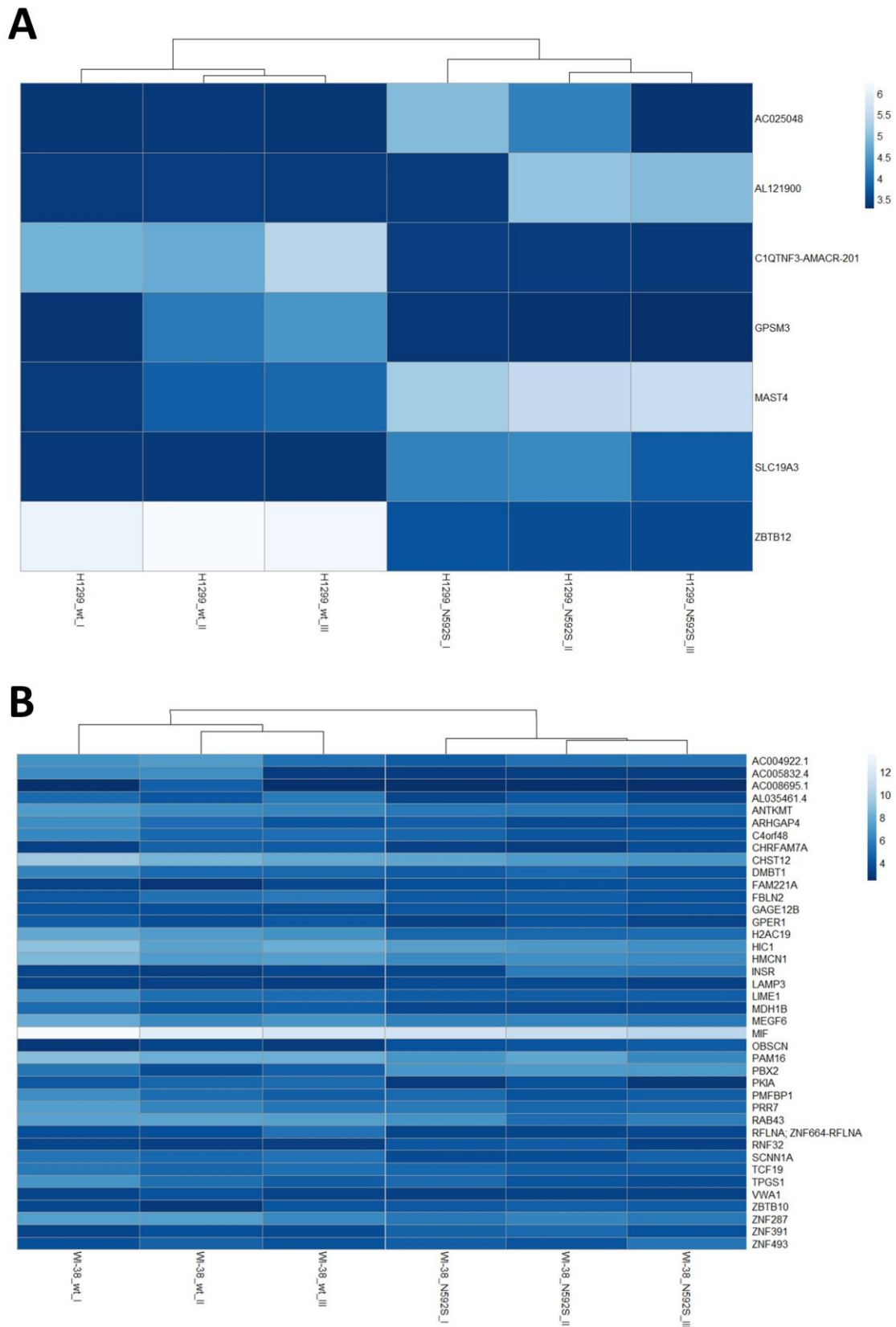
Tablica 5. Statistički diferencijalno eksprimirani geni zbog prisutnosti varijante N592S gena *TLR5* u staničnoj liniji H1299 (lijevo) i WI-38 (desno).

H1299			WI-38		
simbol gena	\log_2FC	prilagođena vrijednost p	simbol gena	\log_2FC	prilagođena vrijednost p
<i>ZBTB12</i>	8,65	8,76E-08	<i>AC008695.1</i>	20,07	0,000327
<i>C1QTNF3-AMACR-201</i>	7,79	0,000809	<i>AC005832.4</i>	9,16	0,049163
<i>GPSM3</i>	5,43	0,031135	<i>VWA1</i>	4,21	0,021676
<i>MAST4</i>	-2,37	3,23E-05	<i>AL035461.4</i>	3,69	0,014798
<i>SLC19A3</i>	-2,79	0,031135	<i>H2AC19</i>	3,38	1,85E-06
<i>AC025048</i>	-6,45	0,019739	<i>MDH1B</i>	2,93	0,001564
<i>AL121900</i>	-7,18	0,003273	<i>PKIA</i>	2,84	0,000134
			<i>CHRFAM7A</i>	2,8	0,027919
			<i>GPB1</i>	2,79	0,036375
			<i>ARHGAP4</i>	2,72	0,049163
			<i>LIME1</i>	2,62	0,003832
			<i>RFLNA; ZNF664-RFLNA</i>	2,52	0,037699
			<i>TPGS1</i>	2,51	0,034058
			<i>C4orf48</i>	2,46	0,007322
			<i>SCNN1A</i>	2,42	0,000134
			<i>AC004922.1</i>	2,15	0,014685
			<i>PMFBP1</i>	1,98	0,04622

Tablica 5. - nastavak

	<i>DMBT1</i>	1,85	0,011504
	<i>ANTKMT</i>	1,84	0,004131
	<i>PRR7</i>	1,84	0,016745
	<i>RAB43</i>	1,8	0,038722
	<i>MIF</i>	1,73	0,040099
	<i>ZNF287</i>	1,73	0,000442
	<i>TCF19</i>	1,69	0,01666
	<i>HMCN1</i>	1,68	0,004647
	<i>MEGF6</i>	1,67	0,036481
	<i>CHST12</i>	1,65	0,041875
	<i>FBLN2</i>	1,58	0,027297
	<i>HIC1</i>	1,57	0,007652
	<i>PAM16</i>	1,54	0,002418
	<i>ZNF493</i>	-1,93	0,032311
	<i>ZNF391</i>	-2,01	0,008988
	<i>OBSCN</i>	-2,49	0,005849
	<i>FAM221A</i>	-2,76	0,006792
	<i>ZBTB10</i>	-2,95	0,003077
	<i>RNF32</i>	-3,02	0,017417
	<i>PBX2</i>	-3,26	0,000203
	<i>INSR</i>	-3,58	0,001722
	<i>LAMP3</i>	-3,84	0,042104
	<i>GAGE12B</i>	-4,46	0,011348

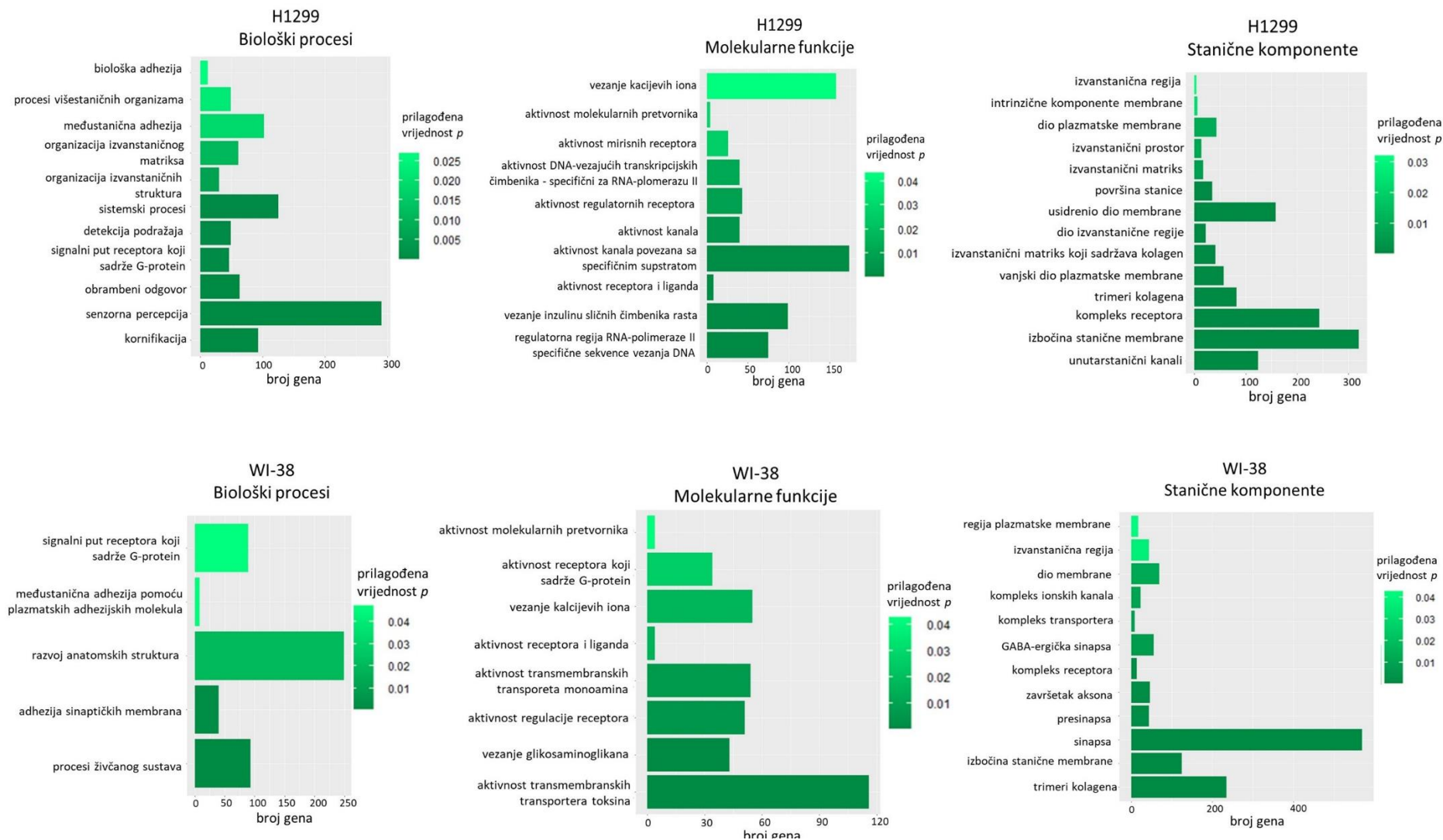
Kao što se vidi u Tablici 4. rezultati analize diferencijalne ekspresije gena pokazuju da je prisutnost varijante N592S povezana s promjenom ekspresije sedam različitih gena u staničnoj liniji H1299 - za tri gena je pokazana povećana ekspresija, a za četiri smanjena ekspresija. Prisutnost varijante N592S u staničnoj liniji WI-38 utjecala je na promjenu ekspresije 40 gena - za 30 gena pokazana je povećana ekspresija, a za deset smanjenja ekspresija. Osim analize diferencijalne ekspresije, metoda DESeq2 također omogućava i vizualizaciju uzoraka u analizi pomoću toplinske mape, koja pokazuje relativnu sličnost uzoraka u analizi na temelju profila genske ekspresije. Radi preglednijeg prikaza, na Slici 8. prikazane su toplinske mape uzimajući u obzir samo statistički značajno diferencijalno eksprimirane gene u promatranim staničnim linijama.



Slika 8. Toplinska mapa ekspresije statistički značajno promijenjenih gena u uzorcima u staničnoj liniji H1299 (A) i WI-38 (B). Iznad toplinske mape nalazi se dendrogram grupiranja pojedinačnih uzoraka.

4.1.2. Rezultati analize GO

U svrhu boljeg uvida u biološku značajnost promjene razine ekspresije gena provedena je analiza genske ontologije (GO). Analiza genske ontologije napravljena je pomoću mrežnog alata Gorilla, uzimajući u obzir gene čija \log_2FC bila veća od 1,5, odnosno manja od -1,5. Cilj analize je genima s promijenjenom razinom ekspresije dodijeliti anotacije i odrediti ulogu u biološkim procesima, molekularnim funkcijama ili staničnim komponentama. Analiza je napravljena za sve tri kategorije GO: kategoriju Biološki procesi, kategoriju Stanične komponente i kategoriju Molekularne funkcije, za obje promatrane stanične linije. Prekomjerno zastupljeni pojmovi GO sa statističkom značajnošću korigirane vrijednosti p manje od 0,05, prema metodi Benjamini-Hochberg, smatrani su značajnima, te su prikazani na Slici 9.



Slika 9. Analiza genske ontologije za diferencijalno eksprimirane gene zbog prisutnosti varijante N592S gena *TLR5* u staničnoj liniji H1299 (gore) i WI-38 (dolje).

Rezultati analize GO pokazuju da prisutnost varijante N592S utječe na određene pojmove GO u obje promatrane stanične linije. Kod stanične linije H1299, unutar kategorije Biološki procesi, varijanta N592S utječe na promjene ukupno 11 bioloških procesa, od kojih su statistički najznačajnije promijenjeni stvaranje rožnatih stanica, pretvorbu senzornog podražaja u molekularni signal i obrambeni odgovor od napada patogena ili ozlijeđe. Varijanta također utječe na molekularne funkcije, ukupno deset funkcija, od kojih su pojmovi vezanje inzulinu sličnih čimbenika rasta i vezanje RNA-polimeraze II na specifičnu regulatornu regiju molekule DNA, statistički najznačajnije promijenjeni. Unutar kategorije Stanične komponente, varijanta utječe na promijene 14 pojmova. Statistički najznačajnije promijenjene komponente su međustanični kanali, izbočine stanične membrane i kompleksi receptora koji vežu hormone, neurotransmitere, lijekove ili međustanične glasnike. Kod stanične linije WI-38, varijanta N592S, utječe na promijene ukupno pet pojmova GO povezanih s Biološkim procesima. Statistički najznačajnije promijenjeni su procesi koje provode živčani organi ili tkiva. U kategoriji Molekularne funkcije ukupno je promijenjeno osam pojmova, a statistički najviše promijenjen je aktivnost transmembranskih transportera toksina. Varijanta N592S također utječe na promijene pojmova GO unutar kategorije Stanične komponente. Ukupno dolazi do promjena 12 pojmova, od kojih su statistički najznačajnije promijenjeni izbočina stanične membrane i trimeri kolagena.

Uspoređujući rezultate dobivene za obje stanične linije možemo uočiti da unutar kategorije Biološki procesi, varijanta N592S u staničnoj liniji H1299 i WI-38, utječe na promjene signalizaciju putem receptora koji sadrže G-protein. Unutar kategorije Molekularne funkcije, varijanta N592S u obje stanične linije utječe na aktivnost molekularnih pretvornika, vezanje kalcijevih iona, te aktivnost receptora i liganda. Unutar kategorije Stanične komponente, varijanta N592S u obje stanične linije utječe na izgradnju dijelova stanične membrane, izvanstaničnu regiju, receptorske komplekse, trimere kolagena, te izbočine stanične membrane.

4.1.3. Rezultati analize GSEA

Kako bi dobili bolji uvid u kojim staničnim putevima i procesima sudjeluju geni s promijenjenom razinom ekspresije, osim analize genske ontologije, napravljena je i analiza obogaćivanja setovima gena (GSEA). U svrhu analize GSEA također su uzeti u obzir geni čija je vrijednost \log_2FC bila veća od 1,5, odnosno manja od -1,5, te je tijekom analize odabrana baza podataka KEGG kako bi se rezultati transkriptomске analize mogli bolje usporediti s

rezultatima metabolomike koji se također baziraju na bazi podataka KEGG. Rezultati analize GSEA prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Analiza obogaćivanja setovima gena na temelju diferencijalno eksprimiranih gena zbog prisutnosti varijante N592S gena *TLR5* u staničnoj liniji H1299 i WI-38.

<i>stanična linija i naziv staničnog puta iz baze podataka KEGG</i>	<i>prilagodena vrijednost p</i>	<i>vrijednost obogaćivanja</i>
<i>H1299_dugotrajna depresija</i>	0,017078	-1,5182894
<i>H1299_procesiranje i prezentacija antigena</i>	0,025194	-1,4960678
<i>H1299_reapsorpcija natrija regulirana aldosteronom</i>	0,038095	-1,448107
<i>H1299_citotoksičnost posredovana prirodnoubilačkim stanicama</i>	0,042227	-1,3609923
<i>H1299_ABC transporteri</i>	0,042553	-1,4712279
<i>WI-38_signalizacija kalcijevim ionima</i>	0,043796	-1,3438206
<i>WI-38_metabolizam tirozina</i>	0,035587	1,5060816

Rezultati analize GSEA pokazuju da prisutnost N592S varijante u staničnoj liniji H1299 negativno obogaćuje pet staničnih puteva kao što su procesiranje i prezentacija antigena, reapsorpcija natrija regulirana aldosteronom, procesi povezani s dugotrajnom depresijom, citotoksičnost posredovana prirodnoubilačkim stanicama, te procesi koji uključuju transportere ABC. Prisutnost varijante N592S u staničnoj liniji WI-38 ima za posljedicu negativno obogaćivanje signalizacije kalcijevim ionima, dok pozitivno obogaćuje metabolizam tirozina.

Zaključno možemo reći da rezultati analize ukupnog transkriptoma pokazuju da varijanta N592S gena *TLR5* utječe na promijenjenu ekspresiju sedam gena u staničnoj liniji H1299 i 40 gena u staničnoj liniji WI-38. Geni čija ekspresija je promijenjena, zbog prisutnosti varijante, sudjeluju u raznim staničnim procesima čija aktivnost je promijenjena. Primjerice dolazi do promjene u signalizaciji putem receptora koji sadrže G-protein, citotoksičnost prirodnoubilačkih stanica, te procesiranje i prezentacija antigena.

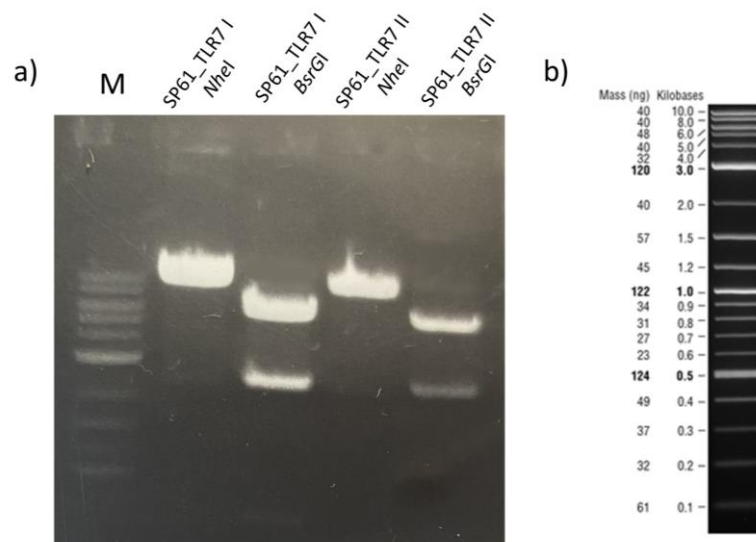
4.2. Rezultati analize utjecaja povećane ekspresije gena *TLR7* na preživljenje metastatskih stanica karcinoma pluća

Kako bi ispitali utjecaj povećane ekspresije gena *TLR7* na preživljenje metastatskih stanica karcinoma pluća H1299, najprije je bilo potrebno pripremiti plazmidni DNA konstrukt koji sadrži gen *TLR7* i koji se može eksprimirati u humanim stanicama. Najprije, bilo je potrebno

transfecirati stanice, te provjeriti uspješnost transfekcije.

4.2.1. Rezultati analize pripreme plazmidnog konstrukta

Za pripremu konstrukta korištena je reakcija LR sustava *Gateway*, u kojoj su kao polazne plazmidne DNA korištene SP61 i pDONR223_TLR7, a krajnji rezultat je plazmidna DNA SP61_TLR7. S obzirom na to da reakcijom LR, u *attB* mjestima, nastaje jedinstveno restrikcijsko mjesto za enzim *BsrGI*, to omogućava provjeru uspješnosti reakcije cijepanjem dobivenih plazmidnih DNA. Nakon završetka reakcije LR, elektrokompetentne bakterije *E. coli* DH5 α transformirane su elektroporacijom. Sljedeći dan odabrane su dvije kolonije iz kojih je izolirana plazmidna DNA i podvrgnuta cijepanju endonukleazama. Svaka od izoliranih plazmidnih DNA pocijepana je restrikcijskim endonukleazama *BsrGI* i *NheI* (Slika 10).



Slika 10. Provjera dobivenog konstrukta nakon reakcije LR elektroforezom na agaroznom gelu.

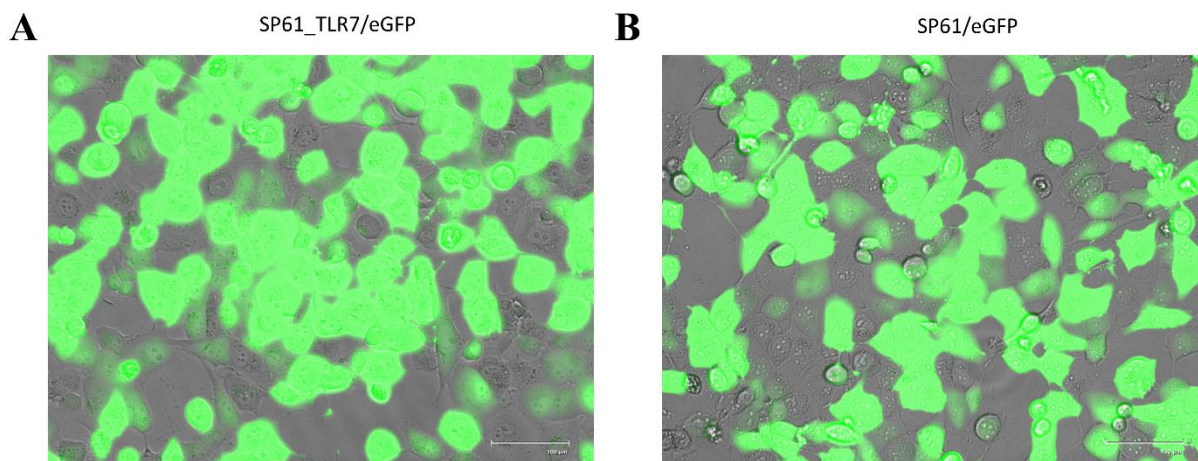
a) Elektroforeza je provedena na 1%-tnom agaroznom gelu pri 120 V i trajanju od 25 min. b) Marker DNA 1 kb plus. Preuzeto i prilagođena s <https://international.neb.com/products/n0550-quick-load-purple-1-kb-plus-dna-ladder#Product%20Information>

Rezultati restrikcijske analize s endonukleazom *NheI* pokazuju u oba uzoraka jednu vrpcu na gelu veličine oko 8 900 parova baza (pb), što odgovara lineariziranom obliku plazmidne DNA SP61_TLR7 (približna veličina je oko 8 959 pb). Plazmidna DNA SP61_TLR7 sadrži samo jedno *NheI* specifično mjesto što za posljedicu ima linearizaciju i prikaz samo jedne vrpce. Reakcijom LR nastaju dva mjesta *attB*, odnosno dva restrikcijska

mjesta koja prepoznaje *BsrGI*, tako navedena restrikcijska endonukleaza cijepa plazmidnu DNA na dva dijela, jedan je insert, odnosno u ovom slučaju gen *TLR7*, a drugi je takozvani *backbone* plazmidne DNA SP61. Gledajući nukleotidnu sekvencu gena *TLR7* ustanovljeno je da i unutar samog slijeda gena *TLR7* postoji restrikcijsko mjesto koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza *BsrGI*. Tako da *BsrGI* cijepa plazmidnu DNA SP61_TLR7 na tri mjesta i daje tri fragmenta. Jedan fragment je *backbone* plazmidne DNA SP61 veličine 5 790 pb, te dva fragmenata gena *TLR7*, jedan veličine 2 505 pb i drugi 672 pb. Rezultati prikazani na Slici 9., pokazuju 3 vrpce kod plazmidne DNA SP61_TLR7 iz kolonije br. 1, za razliku od uzorka/kolonije br. 2 (samo dvije vrpce). Stoga je za daljnje analize korištena plazmidna DNA dobivena iz prve bakterijske kolonije.

4.2.2. Rezultati analize transfekcije stanica H1299

Prije provođenja testa preživljenja stanica (MTT-test) stanice H1299 su kotransfecirane plazmidima SP61_TLR7 i eGFP. Transfekcija plazmidom eGFP provodila se u svrhu provjere uspješnosti transfekcije. Naime, uspješnom transfekcijom stanice će proizvoditi eGFP, koji se može detektirati fluorescentnim mikroskopom. Dan nakon transfekcije stanice su promatrane fluorescentnim mikroskopom, te su rezultati prikazani na Slici 11.

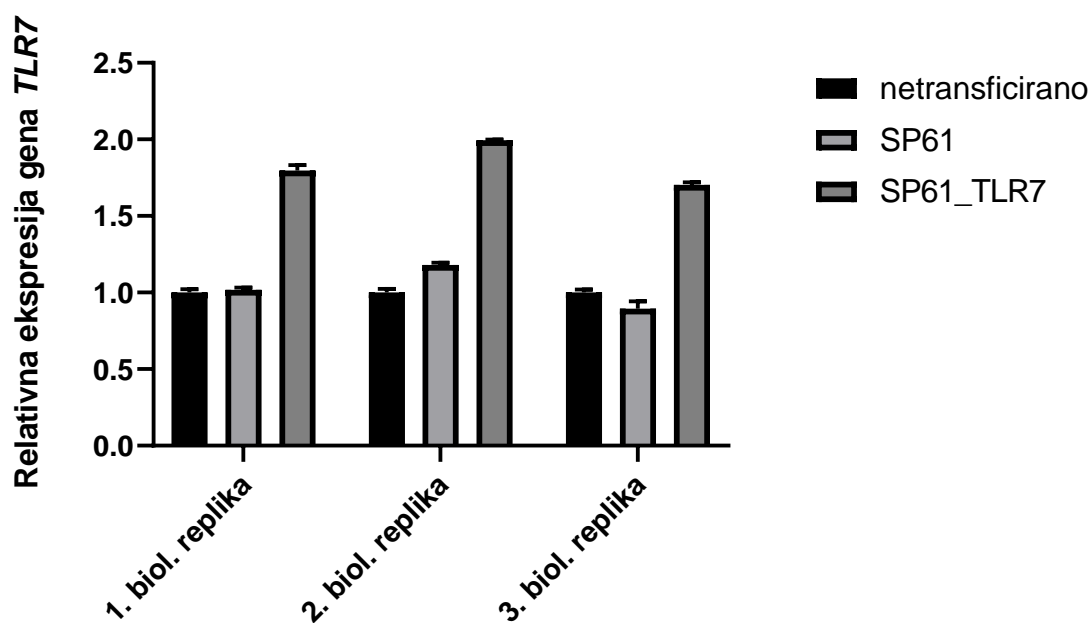


Slika 11. Provjera uspješnosti ko-transfekcije stanica plazmidima H1299 eGFP i SP61_TLR7 (A) i eGFP i SP61 (B) promatrane pomoću fluorescentnog mikroskopa.

4.2.3. Rezultati analize ekspresije gena *TLR7*

Prije analize preživljenja stanica H1299, a nakon transfekcije, provjerena je relativna

ekspresija gena *TLR7*. Iz stanica transfeciranih plazmidnom DNA SP61_TLR7, kao i iz netransfeciranih stanica, izolirana je ukupna RNA i analizirana metodom qPCR. Praćena je ekspresija gena *TLR7*, kao i ekspresija β -aktina koji je služio kao endogena kontrola. Dobiveni rezultati analizirani su $\Delta\Delta C_t$ metodom, a kao kontrolna skupina korištene su netransfecirane stanice. Relativna ekspresija gena *TLR7* prikazana je u odnosu na netransfecirane stanice. Rezultati analize qPCR pokazuju da je relativna ekspresija gena *TLR7* u stanicama koje su transfecirane plazmidnom DNA SP61_TLR7 1,8-dva puta veća u odnosu na netransfecirane stanice (Slika 12.), gdje imamo samo endogenu ekspresiju gena *TLR7*. Također u stanicama koje su transfecirane plazmidnom DNA SP61, relativna ekspresija gena *TLR7* je približno jednaka kao i u netransfeciranim uvjetima, što ukazuje da proces transfekcije ne utječe na ekspresiju gena *TLR7*.

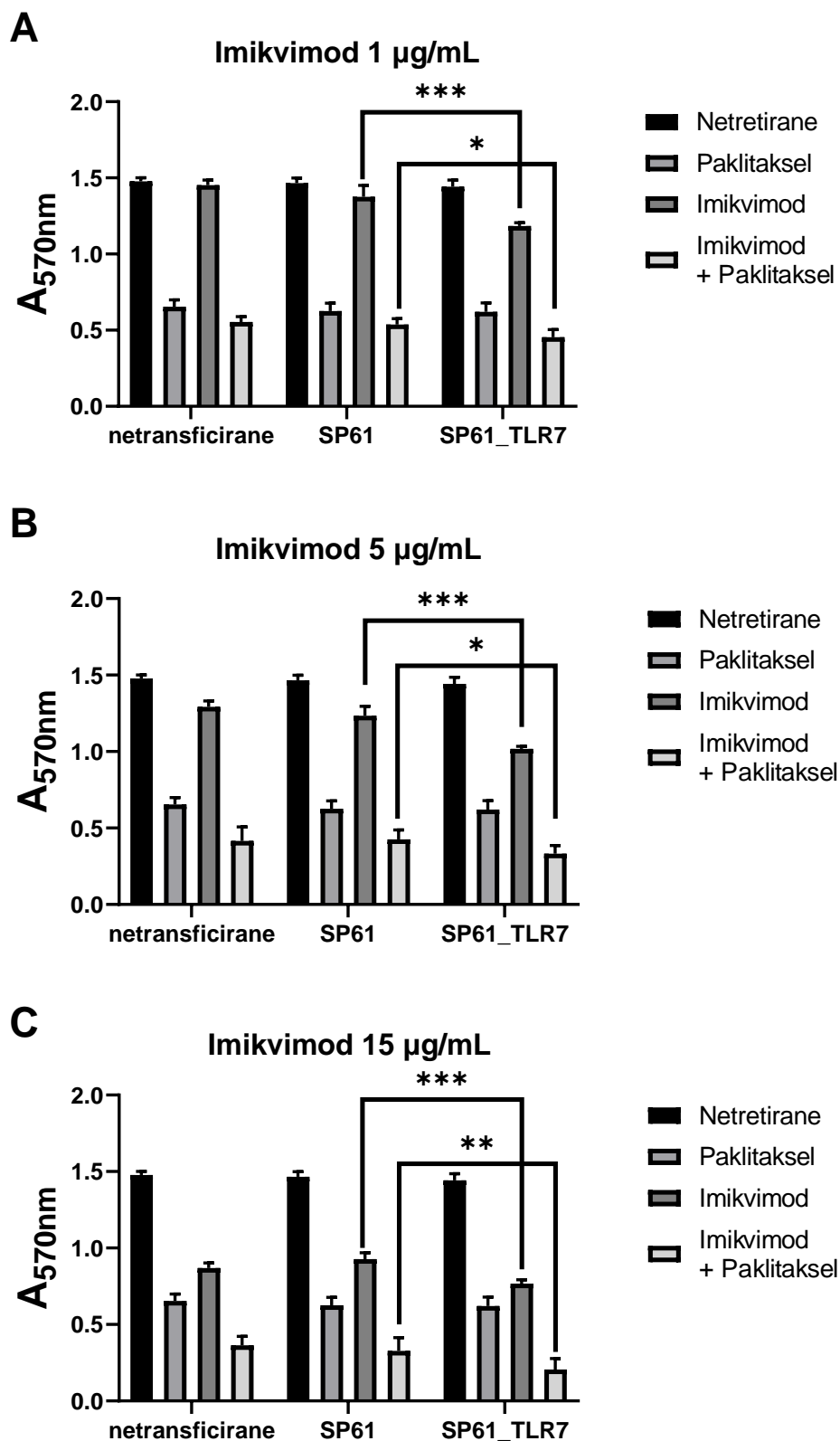


Slika 12. Relativna ekspresija gena *TLR7* u tri biološke replike stanica H1299, korištene u MTT-analizi. Relativna ekspresija izražena je prema netransfeciranim uvjetima.

Potvrda o povećanoj ekspresiji gena *TLR7*, metodom qPCR, u sve tri biološke replike transfeciranih stanica H1299, je važan rezultat. Naime, to je značilo da su transfecirane stanice dobar model za daljnju analizu preživljenja stanica MTT-metodom.

4.2.4. Rezultati analize preživljenja stanica

Za potrebe analize preživljenja stanica pod uvjetom povećane razine ekspresije gena *TLR7* korišteni su slijedeći modeli stanica H1299: netransfecirane stanice, kotransfecirane stanice transfecirane plazmidnom DNA SP61 („prazni“ konstrukt) i stanice transfecirane plazmidnom DNA SP61_TLR7. Transfekcija „praznim“ konstruktom, gdje se očekuje samo endogena ekspresija gena TLR7 služi kao provjera transfekcije na preživljenje stanica. Sva tri opisana uvjeta transfekcije stanice H1299 tretirana su paklitakselom, finalne koncentracije 2,5 nM, te trima različitim finalnim koncentracijama imikvimoda, 1, 5 i 15 µg/mL. Konačno, stanice su bile i u kotretmanu paklitakselom (2,5 nM) i imikvimodom (1, 5 i 15 µg/mL). Stanice su tretirane 72 h, te su dobiveni rezultati prikazani na Slici 13.



Slika 13. Preživljenje netransfeciranih i transfeciranih stanica H1299 stimuliranih paklitakselom ($\gamma = 2,5 \text{ nM}$), imikvimodom (A - 1, B - 5 i C - 15 $\mu\text{g/mL}$) i kotretmanom paklitaksela ($\gamma = 2,5 \text{ nM}$) i imikvimoda nakon 72 h stimulacije.

Kako bi se ustanovilo da li sam proces transfekcije utječe na preživljenje stanica H1299, uspoređene su netransfecirane stanice i stanice transfecirane plazmidnom DNA SP61. Za potrebe prijašnjih analiza određena je EC_{50} koncentracija paklitaksela, odnosno koncentracija pri kojoj 50 % stanica preživi tretman, koja je iznosila 2,5 nM. U oba uspoređivana uvjeta prethodno smo pokazali da nema razlike u ekspresiji gena *TLR7*, te usporedbom dobivenih rezultata MTT-testa možemo pratiti utjecaj transfekcije na preživljenje stanica. Primjenom analize varijanci između spomenutih skupina ustanovljeno je da nema statistički značajne promjene između preživljenja netransfeciranih stanica H1299 i transfeciranih stanica H1299 plazmidnom DNA SP61. Odnosno, sam postupak transfekcije ne utječe na preživljenje stanica H1299 (Slika 13.). Potom su uspoređene stanice H1299 transfecirane plazmidnom DNA SP61_TLR7 sa stanicama H1299 koje su transfecirane plazmidnom DNA SP61. Kod ovih uvjeta pratimo povećanu ekspresiju gena *TLR7* u odnosu na egzogenu ekspresiju gena *TLR7*. Za analizu je također primijenjena metoda analize varijanci. Rezultati pokazuju da u uvjetima povećane ekspresije gena *TLR7* stanice H1299 imaju lošije preživljenje kad su stimulirane imikvimodom, kao i kada su kotretirane imikvimodom i paklitakselom, kod sve tri primijenjene koncentracije imikvimoda. Imikvimod, neovisno o koncentraciji, smanjuje preživljenje stanica H1299 s povećanom ekspresijom gena *TLR7*, te je statistička vrijednost p manja od 0,001. Kao što je prije spomenuto, kotretman također smanjuje preživljenje stanica H1299 s povećanom ekspresijom gena *TLR7*. Najveći utjecaj je uočljiv kada su stanice tretirane paklitakselom i najvećom koncentracijom imikvimoda, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gdje je vrijednost p manja od 0,01, dok u uvjetima kotretmana manjom koncentracijom imikvimoda, 1 i 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, vrijednost p je manja od 0,05.

Zaključno možemo reći da neovisno o promatranim uvjetima ekspresije gena *TLR7* stanice H1299, povećanjem koncentracije imikvimoda, stanice imaju manje preživljenje u odnosu na netretirane uvjete.

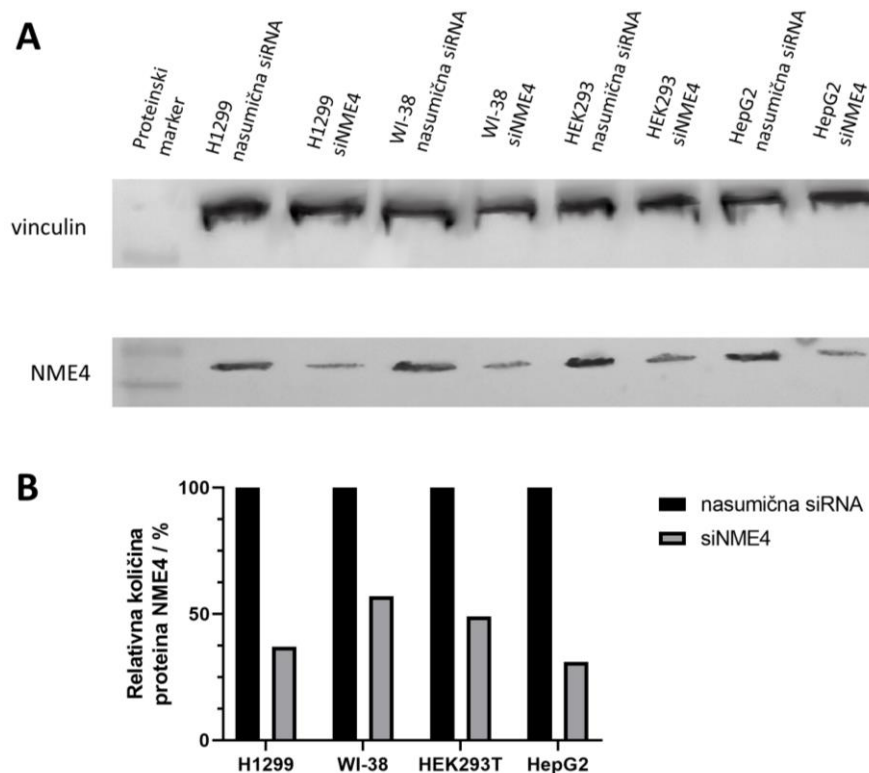
4.3. Rezultati analize metaboloma

Najčešće metode za analizu metaboloma su ciljane metode, kod kojih se prati promjena u intenzitetu jednog ili više omjera m/z koji dolaze od jednog ili nekoliko metabolita od interesa. Jedan od ciljeva ove disertacije bio je pratiti promjene cijelog metaboloma, odnosno analiza metaboloma neciljanom metodom. Iz tog razloga je najprije trebalo validirati neciljanu bioinformatičku analizu metaboloma. Kako bi se provela validacija, najprije su odabrani enzimi

koji se nalaze u bazi podataka KEGG, te utišavanjem njihove ekspresije ili korištenjem inhibitora smanjiti aktivnost u četiri stanične linije (H1299, WI-38, HEK293 i HepG2). Tako pripremljenim staničnim linijama izolirati metabolite, te snimiti masene spektre metaboloma. Odabrane su četiri različite stanične linije, dvije porijeklom iz pluća (H1299 i WI-38), HEK293 porijeklom iz bubrega, te HepG2 porijeklom iz jetre, kako bi utvrdili da dobiveni učinak nije tkivno-specifičan. Dobiveni maseni spektri analiziraju se bioinformatičkom metodom, te bi se kao očekivani rezultat trebala vidjeti, između ostaloga, promjena u aktivnosti odabranih enzima u svim uvjetima. Na taj bi se način potvrdila uspješnost i točnost bioinformatičke analize. Kao odabrani enzim čija aktivnost će se smanjiti korištenjem male interferirajuće siRNA je nikotinamid-fosforibozil-transferaza (NAMPT, EC-broj 2.4.2.12), te nukleozid-difosfat-kinaza 4 (NME4, EC-broj 2.7.4.6) čija aktivnost će se smanjiti korištenjem specifičnog inhibitora navedenog enzima.

4.3.1. Rezultati analize validacije utišavanja gena *NME4*

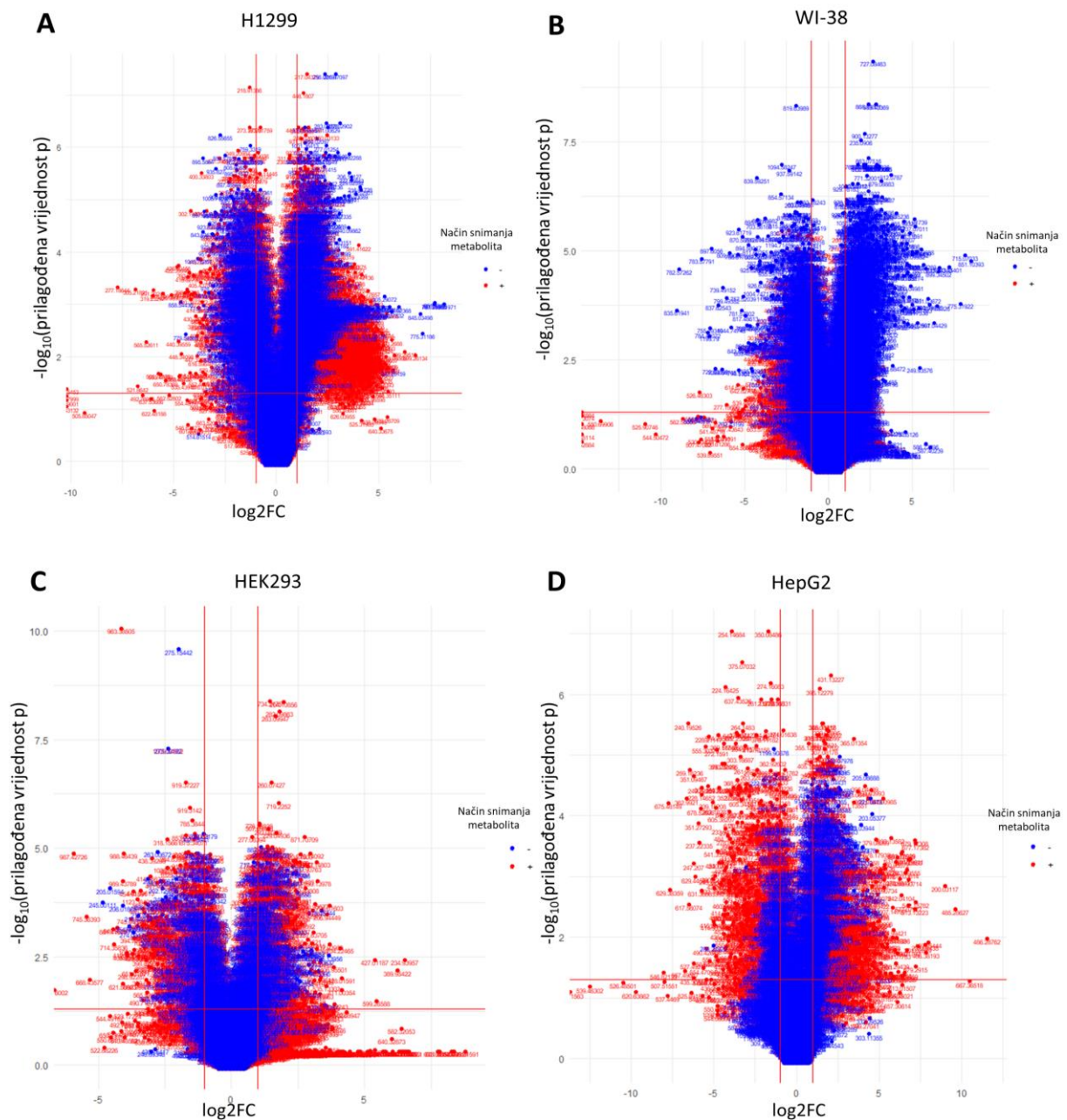
Smanjenje aktivnost enzima NME4 postignuto je transfekcijom stanica molekulama siRNA koje ciljaju mRNA gena *NME4*. Sve četiri stanične linije su najprije transfecirane sa siNME4 i nasumičnom siRNA kao kontrolni uvjet. Sljedeći dan, nakon transfekcije, tretirane stanice skinute su s podloge i izolirani su ukupni proteini, s ciljem potvrde smanjenja ekspresije proteina NME4. Ukupni proteini su zatim analizirani westernskom metodom otiska, pomoću specifičnih antitijela za NME4 i vinkulin, koji je služio kao kontrola. Dobiveni signali su zatim kvantificirani pomoću programa ImageJ, te su rezultati najprije normalizirani na signal vinkulina, a zatim su uspoređeni rezultati između uvjeta transfekcija sa siNME4 u odnosu na transfekciju nasumičnom siRNA, za svaku staničnu liniju pojedinačno. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 14.



Slika 14. Analiza utišavanja ekspresije proteina NME4 u staničnim linijama H1299, WI-38, HEK293 i HepG2. A - westernska analiza otiska ukupnih proteinskih lizata nakon transfekcije sa siNME4 i nasumičnom siRNA. B - kvantifikacija rezultata dobivenih westernskom analizom otiska.

Rezultati westernske analize otiska pokazuju uspješnost smanjenja ekspresije proteina NME4 u sve četiri promatrane stanične linije. Kvantifikacijom rezultata dobivenih westernskom metodom otiska dobivene su relativne količina proteina NME4 u uvjetima transfekcije sa siNME4 u odnosu na kontrolni uvjet (transfekcija nasumičnom siRNA). Rezultati kvantifikacije pokazuju da je relativna količina proteina NME4, nakon utišavanja sa siNME4, u staničnoj liniji H1299 iznosi 37 %, u staničnoj liniji WI-38 iznosi 57 %, u staničnoj liniji HEK293 iznosi 49 %, te u staničnoj liniji HepG2 iznosi 31 %. Dobiveni rezultati potvrđuju smanjenje ekspresije proteina NME4 u sve četiri stanične linije. Iz ukupnih proteinskih izolata ekstrahirani su metaboliti, a nakon ekstrakcije zadržane su obje faze (polarna i nepolarna). Izoliranim metabolitima su zatim snimljeni maseni spektri u dva načina snimanja, pozitivnom i negativnom, te u dva raspona omjera m/z po načinu snimanja (200 - 700 i 700 - 1 200 Da). Iz dobivenih spektara pripremljena je tablica intenziteta svih omjera m/z , koja je služila za daljnju bioinformatičku analizu. Najprije je pomoću paketa FELLA paketa u programu R dobiven popis diferencijalno promijenjenih omjera m/z u promatranim uvjetima. Dobiveni rezultati

prikazani su na Slici 15. u obliku Volcano grafa.



Slika 15. Diferencijalno promijenjeni omjeri m/z u staničnoj liniji H1299 (A), WI-38 (B), HEK293 (C) i HepG2 (D) nakon transfekcije sa siNME4. Vertikalne linije predstavljaju granične vrijednosti $|\log_2FC| \geq 1$, dok horizontalna linija predstavlja prilagođene statističku vrijednost p 0,05. Plavom bojom su označeni omjeri m/z dobiveni tijekom negativnog načina snimanja metabolita, dok su crvenom bojom označeni omjeri m/z dobiveni pozitivnim načinom snimanja metabolita.

Nakon što FELLA odredi promijenjene omjere m/z, odnosno spojeve, stvara

hijerarhijsku mrežu. U konačnici kao rezultat se dobije popis promijenjenih staničnih puteva, kao i međuprodukata (uključujući enzime), u promatranim uvjetima. U ovom slučaju promatrane su stanice transfecirane sa siNME4 u odnosu na transfecirane nasumičnom siRNA. Rezultati ove analize pokazuju da je u svim staničnim linijama došlo do smanjenja aktivnosti enzima NME4. Transfekcija stanica H1299 sa siNME4 mijenja aktivnost ukupno 286 enzima, te su rezultati dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazani je u Tablici 7., zajedno sa statističkom vrijednosti p za enzim NME4. Kod stanične linije WI-38 dolazi do promjene aktivnosti ukupno 288 enzima. Rezultati za dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazani su u Tablici 8., zajedno sa statističkom vrijednosti p za enzim NME4. Kod stanične linije HEK293 dolazi do promjene aktivnosti ukupno 221 enzima, te je dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazano su u Tablici 9., zajedno sa statističkom vrijednosti p za enzim NME4. Transfekcija stanica HepG2 sa siNME4 mijenja aktivnost ukupno 249 enzima. Dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazano je u Tablici 10., zajedno sa statističkom vrijednosti p za enzim NME4.

Tablica 7. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji H1299 kao posljedica smanjenja količine proteina NME4, uz dodatno označenim enzimom NME4.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.145	3-beta-hidroksi-delta-5-steroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.189	prostaglandin-E2-9-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.197	15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.22	UDP-glukoza-6-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.225	klordekon-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.271	GDP-L-fukoza-sintaza	1,00E-06
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata)	1,00E-06
1.1.1.40	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata) (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.41	izocitrat-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.1.1.50	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza (Si-specifična)	1,00E-06
1.1.1.51	3-(ili 17-)beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.13.99.1	inozitol-oksigenaza	1,00E-06
1.14.11.16	peptid-aspartat-beta-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.18	fitanoil-CoA-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.2	prokolagen-proline-4-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.13.32	albendazol-monooksigenaza	1,00E-06

Tablica 7. - nastavak

1.14.14.1	nespecifična monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.16	steroid-21-monooksigenaza	1,00E-06
2.7.4.6	<i>nukleozid-difosfat-kinaza</i>	0,000667

Tablica 8. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji WI-38 kao posljedica smanjenja količine proteina NME4, uz dodatno označenim enzimom NME4.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.145	3-beta-hidroksi-delta-5-steroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.179	D-ksiloza-1-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.189	prostaglandin-E2-9-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.197	15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.22	UDP-glukoza-6-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.225	klordekon-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.270	3-beta-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.271	GDP-L-fukoza-sintaza	1,00E-06
1.1.1.284	S-(hidroksimetil)-glutation-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata)	1,00E-06
1.1.1.40	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata) (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.41	Izocitrat-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.1.1.47	Glukoza-1-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.50	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza (Si-specifična)	1,00E-06
1.1.1.51	3-(ili 17-)beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.13.99.1	inozitol-oksigenaza	1,00E-06
1.14.11.16	peptide-aspartat-beta-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.18	fitanoil-CoA-dioksigenaza	1,00E-06
2.7.4.6	<i>nukleozid-difosfat-kinaza</i>	0,003327

Tablica 9. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji HEK293 kao posljedica smanjenja količine proteina NME4, uz dodatno označenim enzimom NME4.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.145	3-beta-hidroksi-delta-5-steroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.189	prostaglandin-E2-9-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.197	15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.225	klordekon-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06

Tablica 9. - nastavak

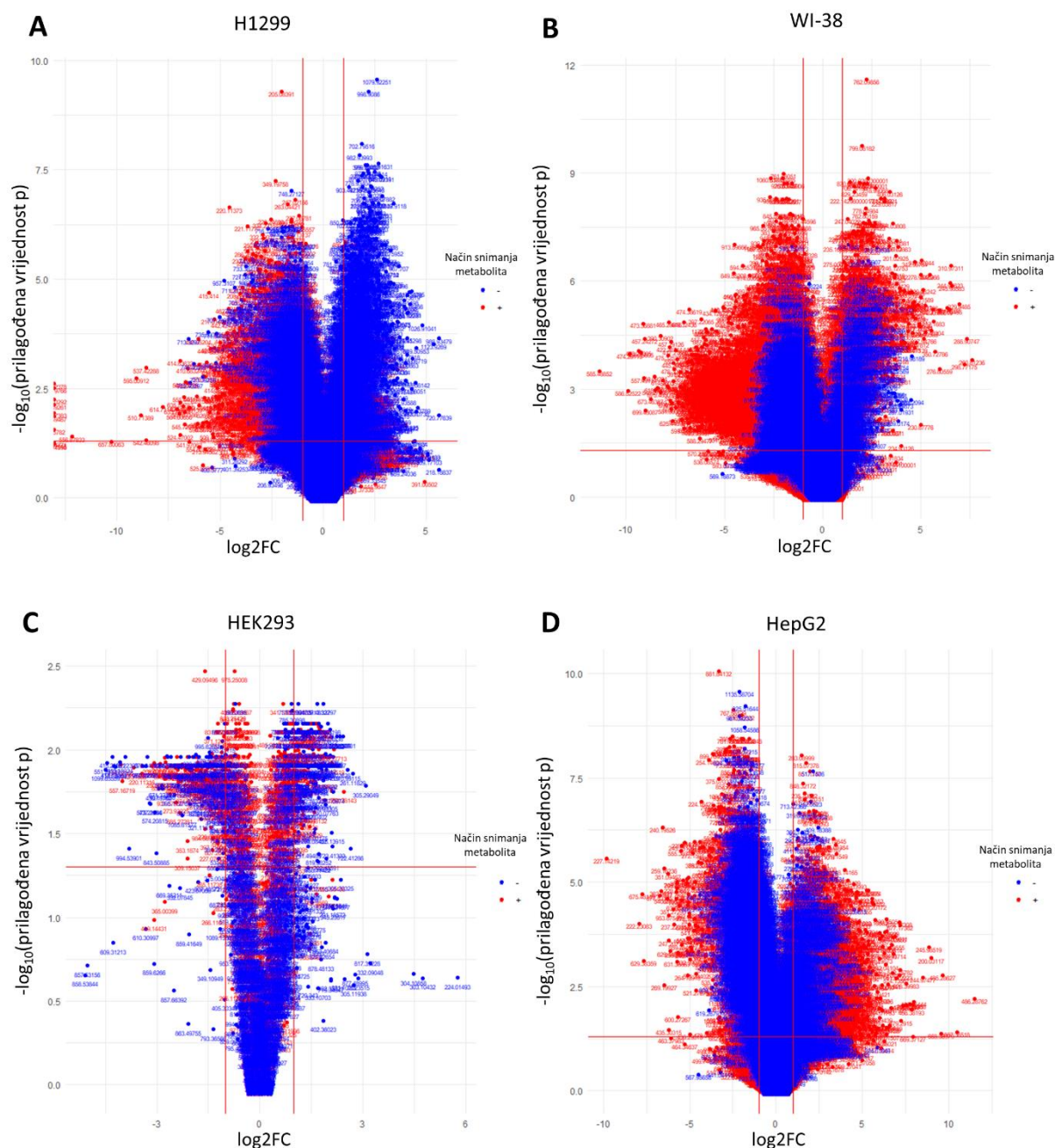
1.1.1.40	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata) (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.50	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza (Si-specifična)	1,00E-06
1.1.1.51	3-(ili 17-)beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.14.11.16	peptide-aspartat-beta-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.18	fitanoil-CoA-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.13.32	albendazol-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.16	steroid-21-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.19	steroid-17-alfa-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.32	17-alfa-hidroksiprogesteron-deacetilaza	1,00E-06
1.14.14.55	kvinin-3-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.56	1,8-cineol-2-ekso-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.57	Taurokenodeoksikolat-6-alfa-hidroksilaza	1,00E-06
1.14.14.73	albendazol-monooksigenaza (formiranje sulfoksida)	1,00E-06
1.14.14.74	albendazol-monooksigenaza (hidroksilirajuća)	1,00E-06
2.7.4.6	nukleozid-difosfat-kinaza	0,000378

Tablica 10. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti *p* u staničnoj liniji HepG2 kao posljedica smanjenja količine proteina NME4, uz dodatno označenim enzimom NME4.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost <i>p</i>
1.1.1.197	15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.22	UDP-glukoza-6-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.225	klordekon-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.270	3-beta-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata)	1,00E-06
1.1.1.40	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata) (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.41	Izocitrat-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.1.1.51	3-(ili 17-)beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.13.99.1	inozitol-oksigenaza	1,00E-06
1.14.11.16	peptide-aspartat-beta-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.18	fitanoil-CoA-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.2	prokolagen-prolink4-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.13.32	albendazol-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.1	nespecifična monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.154	sterol-14-alfa-demetilaza	1,00E-06
1.14.14.16	steroid-21-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.19	steroid-17-alfa-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.32	17-alfa-hidroksiprogesteron-deacetilaza	1,00E-06
2.7.4.6	nukleozid-difosfat-kinaza	0,003105

4.3.2. Rezultati analize validacije tretiranja stanica H1299 inhibitorom enzima NAMPT

Validacija bioinformatičke analize metaboloma je također provedena na staničnim linijama H1299, WI-38, HEK293, te HepG2 koje su tretirane FK866, inhibitorom enzima NAMPT. Literaturnom pretragom odabran je inhibitor FK866, za kojeg je pokazano da inhibira enzim NAMPT [111], stoga dodatna provjera nije rađena. Najprije su sve četiri spomenute stanične linije tretirane FK866, a kao kontrola korištene su stanice uzgojene bez tretmana inhibitorom. Iz pripremljenih stanica izolirani su ukupni proteini, te se odredila njihova koncentracija. Na temelju određene koncentracije ukupnih proteina u ekstrakciju metabolita uzeta je jednaka masa ukupnih proteina, što je služilo kao normalizacija količine uzoraka radi boljeg uspoređivanja rezultata nakon bioinformatičke analize. Nakon ekstrakcije sačuvana je i polarna i nepolarna faza svih uzoraka, koje su zatim analizirane masenim spektrometrom. Spektri masa metabolita snimljeni su u dva načina snimanja, pozitivnom i negativnom, te u dva raspona omjera m/z po načinu snimanja (200 - 700 i 700 - 1 200 Da). Iz spektara su izdvojeni intenziteti svih omjera m/z, koji su služili za daljnju bioinformatičku analizu. Najprije je pomoću paketa FELLA u programu R dobiven popis diferencijalno promijenjenih omjera m/z u promatranim uvjetima, u ovom slučaju stanice tretirane inhibitorom FK866 u odnosu na netretirane stanice. Kao granična vrijednost diferencijalno promijenjenih omjera m/z uzeta je vrijednost $|\log_2FC| \geq 1$. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 16. u obliku Volcano grafa.



Slika 16. Diferencijalno promijenjeni omjeri m/z u staničnoj liniji H1299 (A), WI-38 (B), HEK293 (C) i HepG2 (D) nakon tretmana inhibitorom enzima NAMPT. Vertikalne linije predstavljaju granične vrijednosti $|\log_2FC| \geq 1$, dok horizontalna linija predstavlja prilagođene statističku vrijednost p 0,05. Plavom bojom su označeni omjeri m/z dobiveni tijekom negativnog načina snimanja metabolita, dok su crvenom bojom označeni omjeri m/z dobiveni pozitivnim načinom snimanja metabolita.

Bioinformatička analiza je napravljena jednak način kao i kod analize validacije utišavanja gena *NME*. Kao rezultat dobiven je popis promijenjenih staničnih puteva, kao i međuprodukata (uključujući enzime), u promatranim uvjetima. Rezultati ove analize su

pokazali da u sve četiri promatrane stanične linije dolazi do smanjene aktivnosti enzima NAMPT. Analizom je utvrđeno da u stanica H1299 tretiranih inhibitorom FK866 dolazi do promjene aktivnost ukupno 289 enzima, te je dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazano je u Tablici 11., zajedno s statističkom vrijednosti p za enzim NAMPT. Kod stanične linije WI-38 dolazi do promjene aktivnosti ukupno 288 enzima, te je popis dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazano je u Tablici 12., zajedno sa statističkom vrijednosti p za enzim NAMPT. Kod stanične linije HEK293 dolazi do promjene aktivnosti ukupno 193 enzima zbog prisustva inhibitora za enzim NAMPT. Popis dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazano je u Tablici 13., zajedno sa statističkom vrijednosti p za enzim NAMPT. Tretman stanica HepG2 inhibitorom FK866 mijenja aktivnost ukupno 287 enzima. Dvadeset enzima s najvećom statistički značajnom promjenom prikazano je u Tablici 14., zajedno sa statističkom vrijednosti p za enzim NAMPT.

Tablica 11. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji H1299 kao posljedica tretmana inhibitorom enzima NAMPT, uz dodatno označenim enzimom NAMPT.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.145	3-beta-hidroksi-delta-5-steroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.146	11-beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.179	D-ksiloza-1-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.189	prostaglandin-E2-9-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.197	15-hidroksiproglandin-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.22	UDP-glukoza-6-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.225	klordekon-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.270	3-beta-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.271	GDP-L-fukoza-sintaza	1,00E-06
1.1.1.343	fosfoglukonat-dehidrogenaza (NAD ⁺ -ovisna)	1,00E-06
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.37	malat-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata)	1,00E-06
1.1.1.40	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata) (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.41	izocitrat-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.1.1.47	glukoza-1-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.50	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza (Si-specifična)	1,00E-06
1.1.1.51	3-(ili 17-)beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.13.11.27	4-hidroksifenilpiruvat-dioksigenaza	1,00E-06
2.4.2.12	nikotinamid-fosforiboziltransferaza	0,00022

Tablica 12. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji WI-38 kao posljedica tretmana inhibitorom enzima NAMPT, uz dodatno označenim enzimom NAMPT.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.145	3-beta-hidroksi-delta-5-steroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.146	11-beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.179	D-ksiloza-1-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.189	prostaglandin-E2-9-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.197	15-hidroksiproglandin-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.22	UDP-glukoza-6-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.225	klordekon-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.270	3-beta-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.271	GDP-L-fukoza-sintaza	1,00E-06
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.37	malat-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata)	1,00E-06
1.1.1.40	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata) (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.41	izocitrat-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.1.1.47	glukoza-1-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.50	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza (Si-specifična)	1,00E-06
1.1.1.51	3-(ili 17-)beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.79	glioksilat-reduktaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.81	hidroksipiruvat-reduktaza	1,00E-06
2.4.2.12	nikotinamid-fosforiboziltransferaza	0,000202

Tablica 13. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji HEK293 kao posljedica tretmana inhibitorom enzima NAMPT, uz dodatno označenim enzimom NAMPT.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.343	fosfoglukonat-dehidrogenaza (NAD ⁺ -ovisna)	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata)	1,00E-06
1.1.1.44	fosfoglukonat-dehidrogenaza (NADP ⁺ -ovisna)	1,00E-06
1.1.1.47	glukoza-1-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.14.11.16	peptid-aspartat-beta-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.18	fitanoil-CoA-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.11.2	prokolagen-prolin-4-dioksigenaza	1,00E-06
1.14.14.16	steroid-21-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.32	17-alfa-hidroksiprogesteron-deacetilaza	1,00E-06
1.14.16.1	fenilalanin-4-monooksigenaza	1,00E-06

Tablica 13. - nastavak

1.14.16.2	tirozin-3-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.17.1	dopamin-beta-monooksigenaza	1,00E-06
1.17.1.4	ksantin-dehidrogenaza	1,00E-06
1.17.3.2	ksantin-oksidaža	1,00E-06
1.2.1.24	sukcinat-semialdehid-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.2.1.5	aldehid-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.3.1.124	2,4-dienoil-CoA-reduktaza	1,00E-06
1.4.3.2	L-aminokiselina-oksidaža	1,00E-06
1.4.3.4	monoamin-oksidaža	1,00E-06
2.4.2.12	<i>nikotinamid-fosforiboziltransferaza</i>	0,001994

Tablica 14. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji HepG2 kao posljedica tretmana inhibitorom enzima NAMPT, uz dodatno označenim enzimom NAMPT.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.145	3-beta-hidroksi-delta-5-steroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.146	11-beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.179	D-ksiloza-1-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.189	prostaglandin-E2-9-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.197	15-hidroksiproglandin-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.22	UDP-glukoza-6-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.225	klordekon-reduktaza	1,00E-06
1.1.1.270	3-beta-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.271	GDP-L-fukoza- sintaza	1,00E-06
1.1.1.284	S-(hidroksimetil)glutation-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.37	malat-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata)	1,00E-06
1.1.1.40	malat-dehidrogenaza (dekarboksilacija oksaloacetata) (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.41	izocitrat-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.1.1.47	glukoza-1-dehidrogenaze [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.50	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza (Si-specifična)	1,00E-06
1.1.1.51	3-(ili 17-)beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.64	testosteron-17-beta-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.81	hidroksipiruvat-reduktaza	1,00E-06
2.4.2.12	<i>nikotinamid-fosforiboziltransferaza</i>	0,000412

Rezultati bioinformatičkih analiza svih četiri staničnih linija u promatranim uvjetima, smanjena količina proteina NME4 i inhibirana aktivnost enzima NAMPT, pokazuju da je sa statističkom značajnošću promijenjena aktivnost oba enzima u sve četiri promatrane stanične linije, što potvrđuje da se odabrana neciljana analiza metaboloma može dalje primijeniti u

analizama.

4.3.3. Rezultati analize utjecaja polimorfizama *TLR5* (rs2072493) na promjene u metabolomu staničnih linija H1299, WI-38 i THP-1

Kako bi ispitali utjecaj prisutnosti polimorfizama *TLR5* (rs2072493, N592S) na promjene metaboloma u stanicama pluća, tumorskog (H1299) i netumorskog (WI-38) porijekla, te monocitne stanice (THP-1) analizirani su metaboliti navedenih stanica inficiranih adeno-5 virusom koji kodira za divlji tip gena *TLR5*, odnosno njegovu mutiranu varijantu N592S. Stanice su inficirane adeno-5 virusom koji kodira za mutiranu varijantu gena *TLR5* (N592S) s ciljem ispitivanja učinka varijante gena na promjene metaboloma. Stanice inficirane adeno-5 virusom koji kodira za divlji tip gena *TLR5* služile su kao kontrolni uvjeti. U prijašnjim istraživanjima Laboratorija za naprednu genomiku potvrđeno je da infekcijom navedenih virusa dolazi do ekspresije pripremljenih konstrukata [19].

Iz inficiranih stanica, najprije su izolirani ukupni proteini, te zatim ekstrahirani metabolita. Metabolitima su snimljeni maseni spektri, koji su analizirani na prije opisan način. Prilikom analize uspoređivani su metaboliti ekstrahirani iz stanica inficiranih adeno-5 virusom koji sadrži mutiranu varijantu N592S gena *TLR5*, u odnosu na metabolite ekstrahirane iz stanica inficiranih sa adeno-5 virusom koji sadrži divlji tip gena *TLR5*. Analize su napravljene zasebno za svaku pojedinačno promatranu staničnu liniju.

Utjecaj varijante N592S na promjene u metabolomu stanične linije H1299 vidljiv je na Slici 17., gdje su prikazani diferencijalno promijenjeni omjeri m/z. Na temelju diferencijalno promijenjenih omjera m/z, FELLA procjenjuje promjenu u aktivnosti enzima i staničnih puteva. U staničnoj liniji H1299 dolazi do promjene aktivnosti ukupno 98 različitih enzima, a dvadeset enzima čija je aktivnost statistički najznačajnije promijenjena prikazani su u Tablici 15.

Tablica 15. - nastavak

3.1.4.1	fosfodiesteraza I	1,00E-06
3.5.4.3	guanin-deaminaza	1,00E-06
3.5.4.37	dvolančana-RNA-adenin-deaminaza	1,00E-06
3.5.4.6	AMP-deaminaza	1,00E-06
3.6.1.58	8-oxo-dGDP-fosfataza	1,00E-06
3.6.1.59	5'-(N7-metil-5'-trifosfoguanosine)-[mRNA]-difosfataza	1,00E-06

Kako bi se bolje opisao biološki utjecaj prisutnosti varijante N592S gena *TLR5* u staničnoj liniji H1299, promatrane su promjene u staničnim putevima. Prisutnost varijante N592S utječe na promjene ukupno 25 staničnih puteva, koji su prikazani u Tablici 16. Rezultati pokazuju kako dolazi do promjene u staničnim putevima vezanim za metabolizam nukleotida i aminokiselina, metabolizmu, kao ciklus limunske kiseline. Također dolazi do promjene u staničnom putu signalizacije JAK-STAT ($p = 0,002901$) koji sudjeluje u imunosnom odgovoru.

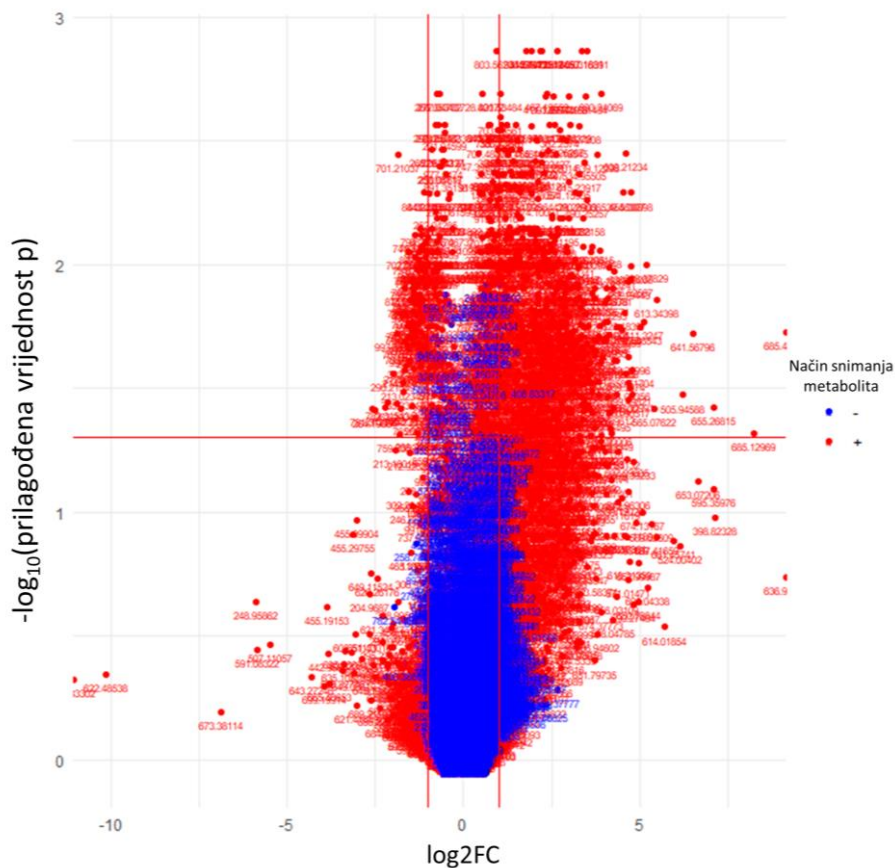
Tablica 16. Statistički značajno promijenjeni stanični putevi u staničnoj liniji H1299 kao posljedica prisustva varijante N592S gena *TLR5*.

EC-broj	Naziv staničnog puta	Prilagođena vrijednost p
hsa01232	metabolizam nukleotida	1,00E-06
hsa01210	metabolizam 2-oksokarboksilne kiseline	1,00E-06
hsa00230	metabolizam purina	1,00E-06
hsa00053	metabolizam askorbata i aldarata	1,00E-06
hsa00380	metabolizam triptofana	2,43E-06
hsa05030	ovisnost o kokainu	3,24E-06
hsa05034	ovisnost o alkoholu	4,50E-05
hsa00240	metabolizam pirimidina	4,91E-05
hsa00740	metabolizam riboflavina	6,54E-05
hsa05031	ovisnost o amfetaminu	0,000114
hsa00983	metabolizam lijekova	0,000139
hsa05219	karcinom mjehura	0,000153
hsa03018	degradacija RNA	0,000363
hsa05340	primarna imunodeficijencija	0,001147
hsa00250	metabolizam alanina, aspartata i glutamata	0,00139
hsa00790	biosinteza folata	0,001498
hsa00630	metabolizam gliksilata i dikarboksilata	0,002041
hsa00020	ciklus limunske kiseline	0,002363
hsa04728	dopaminergična sinapsa	0,00269
hsa04630	signalni put JAK-STAT	0,002901
hsa00620	metabolizam piruvata	0,00384
hsa00330	metabolizam arginina i prolina	0,004887

Tablica 16. - nastavak

hsa00400	biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana	0,005547
hsa01230	biosinteza aminokiselina	0,005951
hsa04922	signalni put glukagona	0,006975

Analiza promjene u metabolomu je također napravljena za staničnu liniju WI-38. Na Slici 18. možemo vidjeti da dolazi do promjene omjera m/z kao posljedica prisutnosti varijante N592S. Na temelju dobivenih promijenjenih omjera m/z, FELLA zatim procjenjuje promjenu u aktivnosti enzima i staničnih puteva. U staničnoj liniji WI-38 dolazi do promjene aktivnosti ukupno 122 različitih enzima, a dvadeset enzima čija je aktivnost statistički najznačajnije promijenjena prikazani su u Tablici 17.



Tablica 17. Popis dvadeset enzima sa promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji WI-38 kao posljedica prisustva varijante N592S gena *TLR5*.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.357	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza	1,00E-06
1.1.1.50	3-alfa-hidroksisteroid-3-dehidrogenaza (Si-specifična)	1,00E-06
1.1.1.64	testosterone-17-beta-dehidrogenaza (NADP+)	1,00E-06
1.14.13.32	albendazol-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.16	steroid-21-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.19	steroid-17-alfa-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.32	17-alfa-hidroksiprogesteron-deacetilaza	1,00E-06
1.14.14.55	kvnin-3-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.56	1,8-cineol-2-exo-monooksigenaza	1,00E-06
1.14.14.73	albendazol-monooksigenaza (stvaranje sulfoksida)	1,00E-06
1.14.14.74	albendazol-monooksigenaza (hidroksilirajuća)	1,00E-06
1.14.14.75	fenbendazol-monooksigenaza (4'-hidroksilirajuća)	1,00E-06
1.14.15.4	steroid-11-beta-monooksigenaza	1,00E-06
1.6.3.1	NAD(P)H-oksidaza (stvaranje H ₂ O ₂)	1,00E-06
1.1.1.197	15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenaza (NADP+)	6,65E-06
1.14.11.16	peptid-aspartat-beta-dioksigenaza	8,41E-06
1.1.1.146	11-beta-hidroksisteroid-dehidrogenaza	9,36E-06
2.4.1.17	glukuronosiltransferaza	2,12E-05
5.3.3.1	steroid-delta-izomeraza	3,08E-05
1.1.1.145	3-beta-hidroksi-delta-5-steroid-dehidrogenaza	3,08E-05

Rezultati promijene staničnih puteva u staničnoj liniji WI-38 zbog prisutnosti varijante N592S prikazani su u Tablici 18. Varijanta N592S utječe na promjenu ukupno 29 staničnih puteva. Iz rezultata možemo vidjeti da varijanta N592S mijenja nekoliko signalnih puteva koji su važni u imunskom odgovoru, dolazi do promjene u signalnom putu prolaktina ($p = 5,64 \times 10^{-6}$) koji može modulirati imunski odgovor, te regulacija kanala TRP pomoću upalnih medijatora ($p = 0,012875$). Također rezultati pokazuju da varijanta N592S utječe na stanične puteve koji su generalno povezani s nastankom karcinoma ($p = 0,007748$), ali i s nastankom karcinoma prostate i dojke.

Tablica 18. Statistički promijenjeni stanični putevi u staničnoj liniji WI-38 kao posljedica prisustva varijante N592S gena *TLR5*.

EC-broj	Naziv staničnog puta	Prilagođena vrijednost p
hsa00140	biosinteza steroidnih hormona	1,00E-06
hsa04927	sinteza i sekrecija kortizola	1,00E-06

Tablica 18. - nastavak

hsa04934	Cushingov sindrom	1,00E-06
hsa04917	signalni put prolaktina	5,64E-06
hsa04913	steroidogeneza u jajniku	8,16E-06
hsa00524	biosinteza neomicina, kanamicina i gentamicina	6,80E-05
hsa05215	karcinom prostate	0,000133
hsa04925	sinteza i sekrecija aldosterone	0,000193
hsa00130	biosinteza ubikvina i ostalih terpenoidnih-kvina	0,000342
hsa00040	međukonverzija pentoze i glukuronata	0,000393
hsa04960	reapsorpcija natrija regulirana aldosteronom	0,000642
hsa00380	metabolizam triptofana	0,000957
hsa00980	metabolizam ksenobiotika pomoću citokroma P450	0,001902
hsa05224	karcinom dojke	0,003119
hsa04976	lučenje žuči	0,004566
hsa01240	biosinteza kofaktora	0,005036
hsa01100	metabolički stanični putevi	0,005761
hsa05200	stanični putevi u karcinomu	0,007748
hsa01524	rezistencija na lijekove temeljene na platini	0,007757
hsa05226	karcinom želuca	0,008423
hsa00591	metabolizam linolne kiseline	0,008457
hsa00740	metabolizam riboflavina	0,00969
hsa01210	metabolizam 2-oksokarbosilne kiseline	0,010452
hsa01522	rezistencija na endokrinu terapiju	0,010473
hsa04918	sinteza tiroidnih hormona	0,011789
hsa00052	metabolizam galaktoze	0,012454
hsa04750	regulacija TRP kanala posredovana upalom	0,012875
hsa04672	imunosna mreža proizvodnje IgA u crijevu	0,015325
hsa04270	kontrakcija vaskularnog glatkog mišića	0,019071

Varijanta N592S također uzrokuje promjene u metabolomu stanica THP-1, što se može vidjeti na Slici 19., kao promijenjeni omjeri m/z. Za razliku od staničnih linija H1299 i WI-38, možemo vidjeti da su promjene u metabolomu nešto manje. Daljnjom analizom ustanovljeno je da dolazi do promjene aktivnosti ukupno 63 enzima zbog prisustva varijante N592S, a 20 enzima čija je aktivnost statistički najznačajnije promijenjena prikazani su u Tablici 19.

Tablica 19. - nastavak

3.5.1.9	arilformamidaza	1,00E-06
3.5.99.6	glukozamin-6-fosfat-deaminaza	1,00E-06
3.7.1.3	kinureninaza	1,00E-06
1.14.13.9	kinurenin-3-monooksigenaza	4,99E-06
1.6.2.2	citokrom-b5-reduktaza	1,10E-05
2.7.1.59	N-acetilglukozamin-kinaza	1,32E-05
2.6.1.2	alanin-transaminaza	2,48E-05
2.7.7.23	UDP-N-acetilglukozamin-difosforilaza	8,84E-05
5.4.2.3	fosfoacetilglukozamin-mutaza	0,000183
2.7.1.157	N-acetilgalaktozamin-kinaza	0,00019
2.7.7.83	UDP-N-acetilgalaktozamin-difosforilaza	0,000196
3.4.23.5	katepsin D	0,000421

Također su praćene promjene u aktivnosti staničnih puteva zbog prisutnosti varijante N592S u staničnoj liniji THP-1, te su rezultati prikazani u Tablici 20. Prisutnost varijante utječe na promjene ukupno 12 različitih staničnih puteva. Varijanta N592S utječe na promjene u metabolizmu puta pentoza fosfata ($p = 1 \times 10^{-6}$) i galaktoze ($p = 0,000179468$).

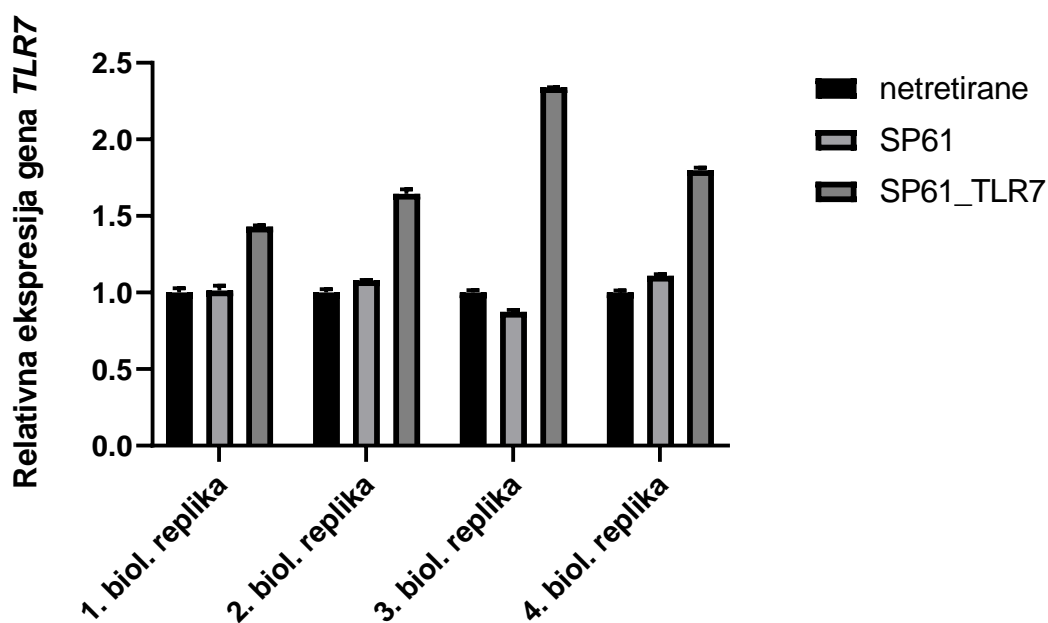
Tablica 20. Statistički promijenjeni stanični putevi u staničnoj liniji WI-38 kao posljedica prisustva varijante N592S gena *TLR5*.

EC-broj	Naziv staničnog puta	Prilagođena vrijednost p
hsa00030	put pentoza fosfat	1,00E-06
hsa00520	metabolizam amino i nukleotidnih šećera	1,00E-06
hsa01210	metabolizam 2-oksokarbosilne kiseline	1,00E-06
hsa04931	rezistencija na inzulin	1,00E-06
hsa05415	dijabetička kardiomiopatija	1,00E-06
hsa00052	metabolizam galaktoze	0,000179468
hsa01250	biosinteza nukleotidnih šećera	0,001554646
hsa05143	Afrička tripanosomijaza	0,014190097
hsa04930	dijabetes tipa II	0,014415371
hsa04614	sistem renin-angiotenzin	0,031503591
hsa04950	početak dijabetesa kod mladih osoba	0,033702244
hsa04910	signalni put inzulina	0,042112293

4.3.4. Rezultati analize utjecaja povećane i smanjene ekspresije gena *TLR7* na promjene metaboloma stanica H1299

Kako bi ustanovili utjecaj povećane, odnosno smanjene ekspresije gena *TLR7* na promjene metaboloma H1299 stanica analizirani su metabolomi stanica H1299 s promijenjenom

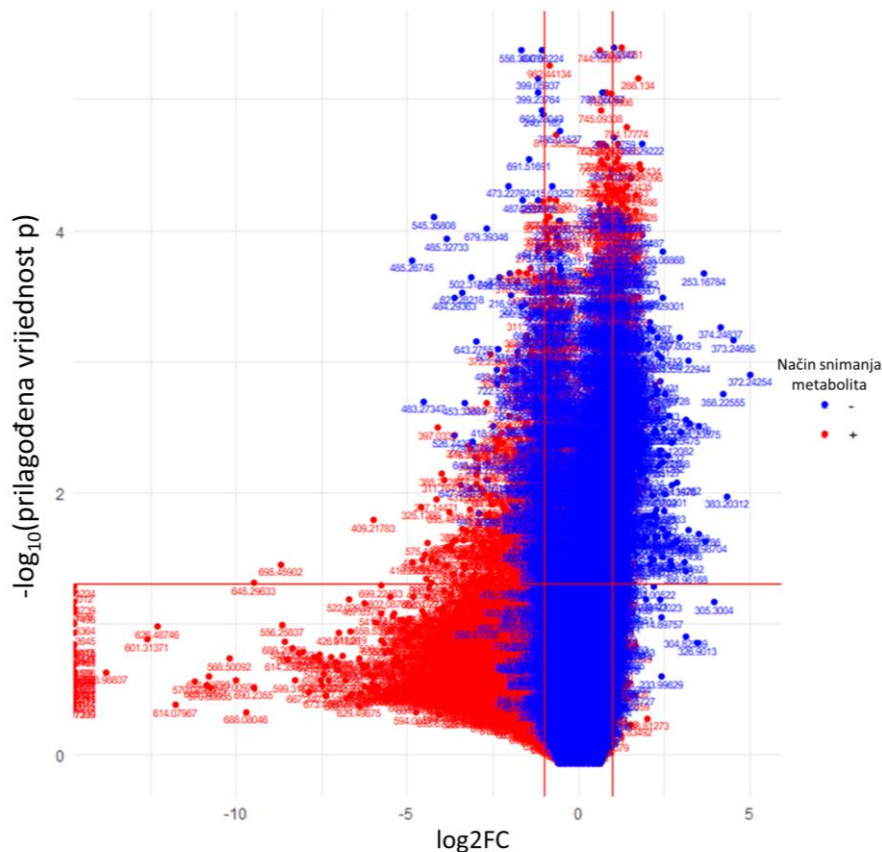
ekspresijom gena *TLR7*. Kako bi postigli povećanu ekspresiju gena *TLR7* u stanicama H1299, stanice su transfecirane plazmidnom DNA SP61_TLR7, koja sadrži gen *TLR7*. Osim transfekcije plazmidnom DNA SP61_TLR7, kao kontrolni uvjeti, odnosno uvjet za usporedbu, stanice H1299 su transfecirane plazmidnom DNA SP61. Kod stanica transfeciranih plazmidnom DNA dolazi samo do endogene ekspresije gena *TLR7*, dok kod stanica transfeciranih plazmidnom DNA SP61_TLR7 dolazi do povećane ekspresije gena u stanici. Da bi bili sigurni pratimo li doista učinak povećane ekspresije gena *TLR7*, pripremljenim stanicama je izolirana ukupno RNA, te je RT-qPCR metodom qPCR analizirana ekspresija gena *TLR7*. Rezultati unutar uzorka su najprije normalizirani na ekspresiju β -aktina, a zatim su uspoređeni s relativnom ekspresijom netretiranih (netransformiranih) stanica H1299. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 20.



Slika 20. Relativna ekspresija gena *TLR7* u 4 biološke replike stanične linije H1299. Rezultati su normalizirani najprije na ekspresiju β -aktina unutar uzorka, te su uspoređeni s relativnom ekspresijom gena *TLR7* netretiranih stanica.

Rezultati analize qPCR pokazuju da je relativna ekspresija gena *TLR7* kod stanica H1299 transfeciranih plazmidnom DNA SP61 relativno nepromijenjena u odnosu na netretirane (netransformirane) stanice. Kod stanica H1299 transfeciranih plazmidnom DNA SP61_TLR7 uočavamo, u prosjeku, 1,8 puta veću ekspresiju gena *TLR7* u odnosu na netretirane uvjete. Nakon što je pokazana povećana ekspresija gena *TLR7* iz stanica su ekstrahirani metaboliti.

Metabolitima su zatim snimljeni maseni spektri, koji su analizirani na prethodno opisan način. Kao rezultat dobiven je popis diferencijalno promijenjenih omjera m/z u promatranim uvjetima, u ovom slučaju stanice H1299 transfecirane plazmidnom DNA SP61_TLR7 u odnosu na stanice transfecirane plazmidnom DNA SP61. Dobiveni diferencijalno promijenjeni omjeri m/z prikazani su na Slici 21. u obliku Volcano grafa. Uz promjene omjera m/z , dobiven je popis enzima čija aktivnost je promijenjena zbog povećane ekspresije gena *TLR7*. Povećana ekspresija uzrokovala je promjene u aktivnosti 172 enzima, a 20 enzima čija je aktivnost statistički najznačajnije promijenjena prikazano je u Tablici 21.



Slika 21. Diferencijalno promijenjeni omjeri m/z u staničnoj liniji H1299 kao posljedica povećane ekspresije gena *TLR7*. Vertikalne linije predstavljaju granične vrijednosti $|\log_2FC| \geq 1$, dok horizontalna linija predstavlja prilagođene statističku vrijednost p 0,05. Plavom bojom su označeni omjeri m/z dobiveni tijekom negativnog načina snimanja metabolita, dok su crvenom bojom označeni omjeri m/z dobiveni pozitivnim načinom snimanja metabolita.

Tablica 21. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji H1299 kao posljedica povećane ekspresije gena *TLR7*.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.343	fosfoglukonat-dehidrogenaza (NAD ⁺ -ovisna)	1,00E-06
1.1.1.363	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.44	fosfoglukonat-dehidrogenaza (NADP ⁺ -ovisna)	1,00E-06
1.1.1.47	glukoza-1-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.49	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (NADP ⁺)	1,00E-06
1.13.99.1	inozitol-oksigenaza	1,00E-06
1.2.1.12	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (fosforilirajuća)	1,00E-06
2.2.1.1	transketolaza	1,00E-06
2.2.1.2	transaldolaza	1,00E-06
2.7.1.1	heksokinaza	1,00E-06
2.7.1.11	6-fosfofruktokinaza	1,00E-06
2.7.1.2	glukokinaza	1,00E-06
2.7.1.47	D-ribulokinaza	1,00E-06
2.7.11.19	fosforilaza-kinaza	1,00E-06
2.7.11.2	[piruvat-dehidrogenaza(prijenos acetila)]kinaza	1,00E-06
2.7.2.3	fosfoglicerat-kinaza	1,00E-06
2.7.7.9	UTP-glukoza-1-fosfat-uridililtransferaza	1,00E-06
3.1.13.4	poli(A)-specifična ribonukleaza	1,00E-06
3.1.3.11	fruktoza-bisfosfataza	1,00E-06
3.1.3.46	fruktoza-2,6-bisfosfat-2-fosfataza	1,00E-06

Također su praćene promjene u aktivnosti staničnih puteva uzrokovane povećanom ekspresijom gena *TLR7*. Povećana ekspresija gena *TLR7* u staničnoj liniji H1299 utječe na promjene ukupno 40 staničnih puteva koji su prikazani u Tablici 22. Dolazi do promjene aktivnosti nekoliko staničnih puteva povezanih uz metabolizam, kao put pentoza fosfata ($p = 1 \times 10^{-6}$), metabolizam galaktoze ($p = 1 \times 10^{-6}$) i ciklus limunske kiseline ($p = 5,11 \times 10^{-5}$). Također dolazi do promjene aktivnosti staničnih puteva koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, kao signalni put HIF-1 ($p = 2,19 \times 10^{-6}$), signalni put receptora RIG-I-like ($p = 0,000106$), te signalni put AMPK ($p = 0,004557$).

Tablica 22. Značajno promijenjeni stanični putevi u staničnoj liniji H1299 kao posljedica povećane ekspresije gena *TLR7*.

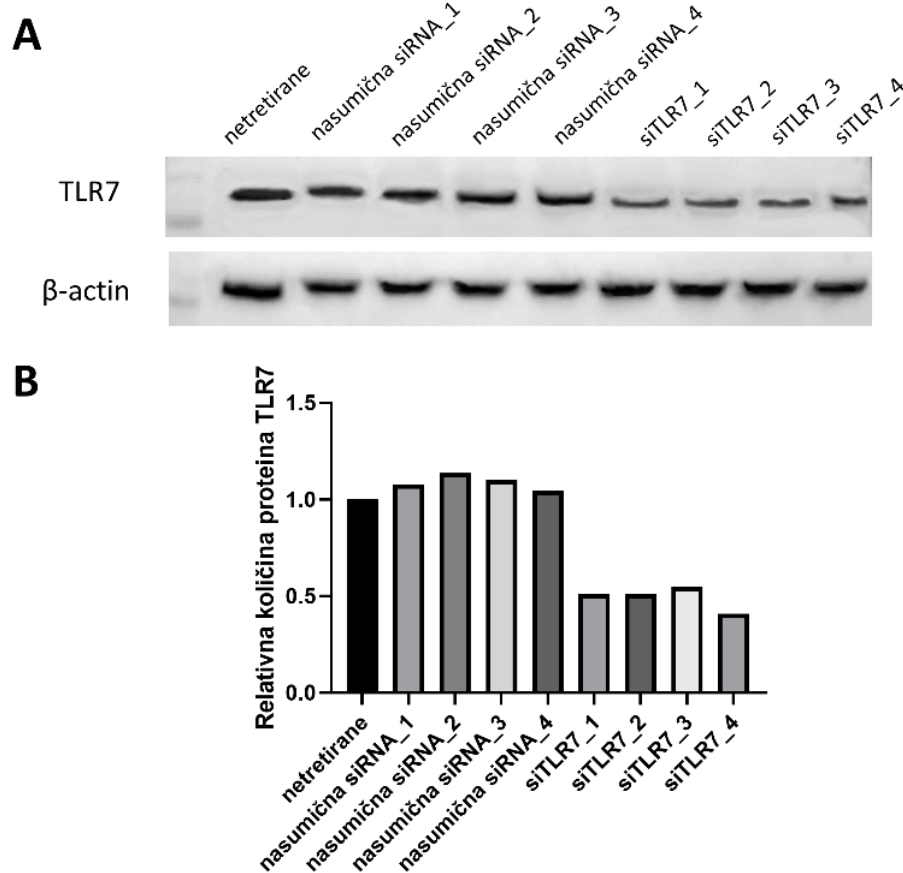
EC-broj	Naziv staničnog puta	Prilagođena vrijednost p
hsa00030	put pentoza fosfat	1,00E-06
hsa00052	metabolizam galaktoze	1,00E-06

Tablica 22. - nastavak

hsa01200	metabolizam ugljika	1,00E-06
hsa03018	degradacija RNA	1,00E-06
hsa04922	signalni put glukagona	1,00E-06
hsa04950	početak dijabetesa kod mladih osoba	1,00E-06
hsa04066	signalni put HIF-1	2,19E-06
hsa00590	metabolizam arahidonske kiseline	3,15E-06
hsa00500	metabolizam škroba i sukroze	3,21E-06
hsa04930	dijabetes tipa II	8,37E-06
hsa00230	metabolizam purina	9,90E-06
hsa01100	metabolički stanični putevi	1,64E-05
hsa00040	međukonverzija pentoze i glukuronata	3,91E-05
hsa00020	ciklus limunske kiseline	5,11E-05
hsa04726	serotonergična sinapsa	5,94E-05
hsa05230	metabolizam centralnog ugljika u karcinomu	8,78E-05
hsa04921	signalni put oksitocina	8,89E-05
hsa04622	signalni put receptora RIG-I-like	0,000106
hsa00051	metabolizam fruktoze i manoze	0,000111
hsa00250	metabolizam alanina, aspartata i glutamata	0,000152
hsa00053	metabolizam askorbata i aldarata	0,000163
hsa00232	metabolizam kofeina	0,000244
hsa04910	signalni put inzulina	0,000256
hsa00380	metabolizam triptofana	0,000258
hsa04611	aktivacija trombocita	0,00029
hsa00010	glikoliza/glukoneogeneza	0,000356
hsa01232	metabolizam nukleotida	0,001066
hsa00562	metabolizam inozitol fosfata	0,001194
hsa04080	neuroaktivna interakcija ligand-receptor	0,001428
hsa04934	Cushingov sindrom	0,001692
hsa01210	metabolizam 2-oksokarbosilne kiseline	0,001987
hsa03015	stanični put nadzora mRNA	0,002492
hsa05163	infekcija humanim citomegalovirusom	0,00318
hsa04152	signalni put AMPK	0,004557
hsa00350	metabolizam tirozina	0,006629
hsa05323	reumatoidni artritis	0,007016
hsa04917	signalni put prolaktina	0,00713
hsa01230	biosinteza aminokiselina	0,007517
hsa05143	Afrička tripanosomijaza	0,007587
hsa04927	sinteza i lučenje kortizola	0,007796

Sljedeći promatrani uvjet je bio utjecaj smanjenje ekspresije gena *TLR7* na promjene u metabolomu stanica H1299. Kako bi se smanjila ekspresija, odnosno količina proteina TLR7, stanice H1299 transfecirane su sa siTLR7 koja smanjuje nastanak količine proteina TLR7. Kao

kontrolni uvjet, stanice H1299, transfecirane su nasumičnom siRNA koja ne bi trebala utjecati na ekspresiju gena. Prije analize metaboloma, analizirani su ukupni proteinski lizati, navedenih uvjeta, westernskom metodom otiska kako bi se utvrdilo smanjenje proteina TLR7. U analizi su korištena specifična antitijela za TLR7, te β -aktin koji je služio kao kontrola. Dobiveni signali su zatim kvantificirani pomoću programa ImageJ, te su rezultati najprije normalizirani na signal β -aktina, a zatim su uspoređeni rezultati između uvjeta transfekcija sa siTLR7 u odnosu na transfekciju nasumičnom siRNA. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 22.



Slika 22. Analiza utišavanja ekspresije proteina TLR7 u četiri biološke replike stanične linije H1299. A - westernska analiza otiska ukupnih proteinskih lizata nakon transfekcije sa siTLR7 i nasumičnom siRNA. B – kvantifikacija rezultata dobivenih westernskom analizom otiska

Rezultati westernske analize otiska pokazuju da transfekcijom sa siTLR7 dolazi do smanjenja količine proteina TLR7, otprilike je 50 % manja količina proteina TLR7 u stanicama transfeciranim sa siTLR7, u odnosu na stanice transfecirane nasumičnom siRNA. Nakon što je

crvenom bojom označeni omjeri m/z dobiveni pozitivnim načinom snimanja metabolita.

Tablica 23. Popis dvadeset enzima s promijenjenom aktivnošću s najvećom prilagođenom statističkom vrijednosti p u staničnoj liniji H1299 kao posljedica smanjene količine proteina TLR7.

EC-broj	Naziv enzima	Prilagođena vrijednost p
1.1.1.343	fosfoglukonat-dehidrogenaza (NAD ⁺ -ovisna)	1,00E-06
1.1.1.363	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.38	malat-dehidrogenaza (oksaloacetat-dekarboksilirajuća)	1,00E-06
1.1.1.44	fosfoglukonat-dehidrogenaza (NADP ⁺ -ovisna)	1,00E-06
1.1.1.47	glukoza-1-dehidrogenaza [NAD(P) ⁺]	1,00E-06
1.1.1.49	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (NADP ⁺)	1,00E-06
1.1.1.81	hidroksipiruvat-reduktaza	1,00E-06
1.2.1.12	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (fosforilirajuća)	1,00E-06
1.2.1.24	sukcinat-semialdehid-dehidrogenaza (NAD ⁺)	1,00E-06
1.4.3.2	L-amino-kiselina oksidaza	1,00E-06
1.6.1.2	NAD(P) ⁺ -transhidrogenaza (Re/Si-specifična)	1,00E-06
2.2.1.1	transketolaza	1,00E-06
2.2.1.2	transaldolaza	1,00E-06
2.6.1.2	alanin-transaminaza	1,00E-06
2.6.1.45	serin-glioksilat-transaminaza	1,00E-06
2.6.1.5	tirozin-transaminaza	1,00E-06
2.6.1.51	serin-piruvat-transaminaza	1,00E-06
2.6.1.7	kinurenin-oksoglutarat-transaminaza	1,00E-06
2.7.1.1	heksokinaza	1,00E-06
2.7.1.2	glukokinaza	1,00E-06

Osim što se dobije popis enzima s promijenjenom aktivnošću, FELLA također pronade stanične puteve koji su promijenjeni u promatranim uvjetima. Tako smanjena količina proteina TLR7 mijenja aktivnost ukupno 32 stanična puta koji su prikazani u Tablici 24. Dolazi do promjene aktivnosti nekoliko staničnih puteva povezanih uz metabolizam, kao put pentozna fosfata ($p = 1 \times 10^{-6}$), metabolizam galaktoze ($p = 1 \times 10^{-6}$) i ciklus limunske kiseline ($p = 0,000345$). Također dolazi do promjene aktivnosti staničnih puteva koji sudjeluju u imunom odgovoru, kao signalni put HIF-1 ($p = 1 \times 10^{-6}$), signalni put receptora RIG-I-like ($p = 3,71 \times 10^{-5}$), te signalni put AMPK ($p = 0,001449$).

Tablica 24. Značajno promijenjeni stanični putevi u staničnoj liniji H1299 kao posljedica smanjene količine proteina TLR7.

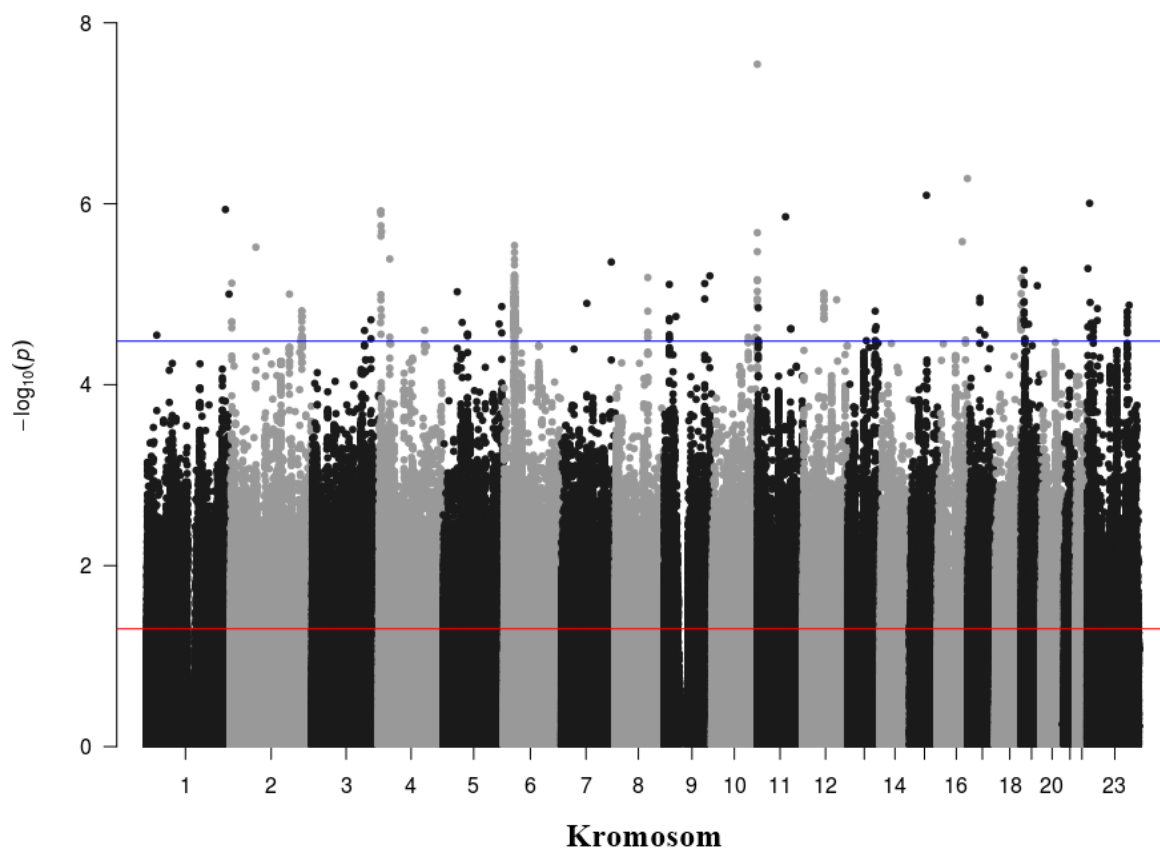
EC-broj	Naziv staničnog puta	Prilagođena vrijednost <i>p</i>
hsa00030	put pentoza fosfat	1,00E-06
hsa00052	metabolizam galaktoze	1,00E-06
hsa00232	metabolizam kofeina	1,00E-06
hsa00380	metabolizam triptofana	1,00E-06
hsa00760	metabolizam nikotinata i nikotinamida	1,00E-06
hsa01200	metabolizam ugljika	1,00E-06
hsa01210	metabolizam 2-oksokarbosilne kiseline	1,00E-06
hsa01230	biosinteza aminokiselina	1,00E-06
hsa04066	signalni put HIF-1	1,00E-06
hsa05230	metabolizam centralnog ugljika u karcinomu	1,00E-06
hsa00051	metabolizam fruktoze i manoze	1,54E-06
hsa00010	glikoliza / glukoneogeneza	1,80E-06
hsa00250	metabolizam alanina, aspartata i glutamata	2,30E-06
hsa04950	početak dijabetesa kod mladih osoba	1,23E-05
hsa01240	biosinteza kofaktora	1,32E-05
hsa00630	metabolizam gliksilata i dikarboksilata	2,72E-05
hsa04622	signalni put receptora RIG-I-like	3,71E-05
hsa00270	metabolizam cisteina i metionina	4,85E-05
hsa00620	metabolizam piruvata	6,02E-05
hsa00400	biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana	9,82E-05
hsa04922	signalni put glukagona	0,000174
hsa05030	ovisnost o kokainu	0,000222
hsa00330	metabolizam arginina i prolina	0,000272
hsa04930	dijabetes tipa II	0,000316
hsa00790	biosinteza folata	0,000331
hsa00020	ciklus limunske kiseline	0,000345
hsa00640	metabolizam propanoata	0,000346
hsa04964	poboljšavanje lučenja bikarbonata pomoću proksimalnih tubula	0,000355
hsa00350	metabolizam tirozina	0,000727
hsa03018	degradacija RNA	0,000732
hsa04152	signalni put AMPK	0,001449
hsa05031	ovisnost o amfetaminu	0,001899

Uspoređujući rezultate dobivene u uvjetima povećane ekspresije gena *TLR7* i smanjene količine proteina TLR7 vidimo da dolazi do preklapanja u rezultatima. U uvjetima povećane ekspresije gena *TLR7* dolazi do promjene ukupno 40 različitih staničnih puteva, a u uvjetima smanjene količine proteina TLR7 dolazi do promjene ukupno 32 stanična puta. Od navedenih staničnih puteva u odabranim uvjetima, dolazi do promijene u 20 stanična puta u oba uvjeta. U identificiranih 20 preklapajućih staničnih puteva nalaze se oni koji su povezani s metabolizmom

aminokiselina (npr. metabolizam triptofana, metabolizam alanina, aspartata i glutamata itd), metabolizmom (npr. put pentoza fosfata, ciklus limunske kiseline, galaktoze itd), degradacija RNA, kao i stanični putevi koji sudjeluju u imunosnom odgovoru (signalni put HIF-1, signalni put receptora RIG-I-like, signalni put AMPK). Kako su promatrani suprotni uvjeti, povećana i smanjena ekspresija TLR7, očekivano je da će suprotni učinci utjecati na promjenu istih staničnih puteva. Ujedno su ovi rezultati i potvrda validacije korištene bioinformatičke metode analize metaboloma.

4.4. Rezultati povezanosti polimorfizama u genima koji sudjeluju u imunosnom odgovoru s nastankom karcinoma pluća

Rezultati dosadašnjih istraživanja ove disertacije fokusirali su se na dva polimorfizma koji su u prijašnjim istraživanjima pokazani da su povezani s nastankom karcinoma pluća. U svrhu bolje karakterizacije genetske predispozicije u nastanku ove maligne bolesti, jedan od ciljeva ove disertacije je pronalazak moguće novih polimorfizama, u genima koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, s nastankom karcinoma pluća. Kako bi se identificirali potencijalno novih polimorfizama povezanih s nastankom karcinoma pluća korišteni su rezultati analize GWAS, pohranjeni u bazi podataka UK Biobank. Rezultati sadrže popis SNP-ova dobivenih nakon genotipizacije i statističke obrade, a statističko značajno povezanih s nastankom karcinoma pluća. U daljnjoj analizi korišteni su SNP-ovi čiji MAF je veći od 0,05, te su dobiveni rezultati prikazani na Slici 24. u obliku Manhattan grafa. Kako je fokus na genima koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, iz baze podataka skinut je popis gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, ukupno 1 511 gena, i njihov smještaj u genomu. Pomoću *in silico* alata LocusZoom i UCSC Genome Browser odabrani su SNP-ovi čija je LD vrijednosti $\geq 0,8$. Rezultati tih analiza identificirali su 13 SNP-a, u blizini gena koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, povezanih s nastankom karcinoma pluća, te su rezultati prikazani u Tablici 25. Primjenom Bonferronieve korekcije vrijednosti p za višestruka testiranja, dobivena je granica statističke značajnosti i iznosi $3,3 \times 10^{-5}$. Na kraju se regulatorni učinak i potencijalni funkcionalni učinak svih 13 SNP-ova odredio pomoću *on-line* baza podataka HaploReg i Regulome DB, te su rezultati također prikazani u Tablici 25.



Slika 24. Manhattan graf SNP-ova povezanih s nastankom karcinoma pluća i MAF vrijednošću $> 0,05$ dobivenih analizom GWAS rasprostranjeni po 23 para kromosoma. Plava linija predstavlja statistički značajnu razinu granice (vrijednost p iznosi $3,3 \times 10^{-5}$), dok crvena linija označava statističku granicu pri kojoj vrijednost p iznosi 0,05.

Tablica 25. Popis SNP-a, dobivenih nakon analize podataka GWAS, povezanih s nastankom karcinoma pluća i vrijednosti $p < 0,05$.

dbSNP ID	Lokacija (kromosom :pb)	Gen	Lokacija SNP-a u odnosu na gen	MAF	vrijednost p	Rezultati kromatinske koimunopercipitacije	Kromatinsko stanje		Rezultati analiza DNazom i FAIRE u tkivu/staničnim linijama	Genomski motivi	Rezultati analiza eQTL u plućnom tkivu	
							Jaka transkripcija (broj tkiva i staničnih linija)	Utišana/slaba (broj tkiva i staničnih linija)			gen	vrijednost p
rs1639113	6:31221503	<i>HLA-C</i>	15 kb nizvodno od 3'-kraja	0,139	$2,89 \times 10^{-6}$	ATF3, CEBPG, CEBPB, ZNF652, ATF4	-	83; potisnuti <i>PolyComb</i> elementi u 44 tkiva	jednjak	-	<i>HLA-C</i>	$3,39 \times 10^{-9}$
rs9265821	6:31311192	<i>HLA-B</i>	10 kb nizvodno od 3'-kraja	0,160	$4,13 \times 10^{-6}$	-	-	83; potisnuti <i>PolyComb</i> elementi u 44 tkiva	-	MAZ, MZF1, VDR, ZBTB7B	<i>HLA-C</i>	$6,02 \times 10^{-8}$
rs6806802	3:45929559	<i>CCR9</i>	intron	0,229	$1,2 \times 10^{-4}$	-	12, pojačivač u 2 tkiva	71; potisnuti <i>PolyComb</i> elementi u 40 tkiva	-	-	<i>FYCO1</i>	$6,16 \times 10^{-8}$
rs9766026	6:6261536	<i>F13A1</i>	intron	0,198	$1,54 \times 10^{-4}$	-	6	79; potisnuti <i>PolyComb</i> elementi u 38 tkiva	ud, koža, mišić, slezena	-	-	-
rs2386841	10:6057732	<i>IL2RA</i>	intron	0,152	$1,86 \times 10^{-4}$	-	16, pojačivač u 5 tkiva	76; potisnuti <i>PolyComb</i> elementi u 30 tkiva	-	-	-	-
rs1682802	19:3158116	<i>GNA15</i>	intron	0,359	$7,29 \times 10^{-4}$	-	42, pojačivač u 2 tkiva	57; potisnuti <i>PolyComb</i> elementi u 24 tkiva	-	-	-	-
rs3136639	19:39388483	<i>SIRT2</i>	intron	0,066	$8,38 \times 10^{-4}$	ZNF770, CEBPB, PRDM1, CEBPG, ATF4	64, aktivno PMT u 7 tkiva, pojačivač u 37 tkiva	10; potisnuti <i>PolyComb</i> elementi u 9 tkiva	-	NANOG, TRIM63	-	-

Tablica 25. - nastavak

rs28366038	3: 186647780	ST6GAL1	493 pb uzvodno od 5'- kraja	0,074	1,53x10 ⁻³	NEUROD1, EP400, ZNF766, KDM1A, ETS1, ZNF770, MGA, EZH2, VEZF1, CTCF, NR2C2, RNF2, ADNP, TRIM28, SAP130, NBN, NR2F2, NRF1, MLLT1, ZNF639, ELF1, ZNF584, RAD21, UBTF, RELA, THAP11, MXD4, ZMYM3, ZBTB40	2, aktivno PMT u 51 tkivu, pojačivač u 35 tkiva	12; potisnuti PolyComb elementi u 21 tkivu	ud, živac, krvna žila, mišić, nadbubrežna žlijezda, mliječna žlijezda, krv, debelo crijevo, koža, mozak	PAX5, ZNF524	-	-
rs1148471	1:12194612	TNFRSF8	intron	0,455	1,54x10 ⁻³	POLR2A	54, pojačivač u 23 tkiva	40; potisnuti PolyComb elementi u 9 tkiva	-	-	-	-
rs2495366	1:2488930	TNFRSF14	intron	0,494	2,53x10 ⁻³	CTCF, ZNF143, ARID4B, E2F5, SP1, KDM1A, ATF1, ZNF792, AGO1, TFE3, VEZF1, HNF4A, GABPB1, RAD21, HMG3, HNRNPL	14, aktivno PMT u 70 tkiva, pojačivač u 10 tkiva	23; potisnuti PolyComb elementi u 7 tkiva	tanko crijevo, debelo crijevo, želudac, pluća, koža, ud, živac, limfoidno tkivo, vezivno tkivo, masno tkivo, mišić, gušterača, bubreg, limfni čvor, dušnik, štitnjača, krv, tjelesna tekućina, jetra, penis, mozak, mliječna žlijezda	-	MMEL1	4,17x 10 ⁻¹⁸
rs2271609	17: 78914545	RPTOR	intron	0,457	2,74x10 ⁻³	AGO2, KLF1	103, pojačivač u 13 tkiva	10; potisnuti PolyComb elementi u 1 tkivu	ud, vaskulatura, živac, krv, koža, slezena, mozak, gušterača	-	-	-
rs144191471	2: 188428599	TFPI	9379 pb uzvodno od 5'- kraja	0,054	3,52x10 ⁻³	-	5, aktivno PMT u 10 tkiva	111; potisnuti PolyComb elementi u 1 tkivu	-	-	-	-
rs1148038	5:55197136	IL31RA	intron	0,193	1,40x10 ⁻²	-	25, pojačivač u 1 tkivu	79; potisnuti PolyComb elementi u 22 tkiva	ud, krvna žila, jednjak, posteljica, limfoidno tkivo, crijevo, želudac, štitnjača, vezivno tkivo	CBX5, HNF1A, RHOX11	-	-

* PMT - početno mjesto transkripcije (*engl. transcription start site*), MAF - frekvenciju manje zastupljenog alela (*engl. minor allele frequency, MAF*), eQTL - *engl. expression quantitative trait loci*

Od 13 gore spomenutih SNP-ova, identificirana su dva statistički značajno povezana s nastankom karcinoma pluća, rs1639113 i rs9265821. Polimorfizam rs1639113 se nalazi na šestom kromosomu, 15 kb nizvodno od 3'-kraja gena *HLA-C*, s učestalošću od 13,9 % i statističkom vrijednosti p $2,89 \times 10^{-6}$. Također, *in silico* analize su pokazale da kromatinskom koimunoprecipitacijom regija oko ovog SNP-a se veže s proteinima ATF3, CEBPG, CEBPB, ZNF652, ATF4, te da u 83 tkiva i staničnih linija SNP utječe na smanjenu/utišanu transkripciju. Regulatorna aktivnost određena pomoću analize DNazom i FAIRE (*engl. Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements*) ustanovljena u jednjaku, te eQTL (*engl. Expression Quantitative Trait Loci*) analizom ustanovljeno da navedeni SNP utječe na transkripciju gena *HLA-C* u plućnom tkivu. Drugi statistički značajan SNP povezan s nastankom karcinoma pluća je rs9265821 koji se također nalazi na šestom kromosomu, 10 kb nizvodno od 3'-kraja gena *HLA-B*. Učestalost ovog SNP-a u istraživanoj populaciji iznosi 16 %, dok statistička vrijednost p iznosi $4,13 \times 10^{-6}$. Nalazi se u kodirajućem slijedu genomskih elemenata *MAZ*, *MZF1*, *VDR*, *ZBTB7B*, tu u 83 tkiva i staničnih linija SNP utječe na smanjenu/utišanu transkripciju, dok analiza eQTL pokazuje da navedeni SNP utječe na transkripciju gena *HLA-C* u plućnom tkivu.

Ostalih 11 SNP-ova s vrijednosti p manjom od 0,05 su: rs6806802 smješten na trećem kromosomu u intronskoj regiji gena *CCR9*, rs9766026 smješten na šestom kromosomu u intronskoj regiji gena *F13A1*, rs2386841 smješten na desetom kromosomu u intronskoj regiji gena *IL2RA*, rs1682802 smješten na devetnaestom kromosomu u intronskoj regiji gena *GNAI5*, rs3136639 smješten na devetnaestom kromosomu u intronskoj regiji gena *SIRT2*, rs28366038 smješten na trećem kromosomu 493 pb uzvodno od 5'-kraja *ST6GALI*, rs1148471 smješten na prvom kromosomu u intronskoj regiji gena *TNFRSF8*, rs2495366 smješten na prvom kromosomu u intronskoj regiji gena *TNFRSF14*, rs2271609 smješten na sedamnaestom kromosomu u intronskoj regiji gena *RPTOR*, rs144191471 smješten na drugom kromosomu 9 379 pb uzvodno od 5'-kraja gena *TFPI*, te rs1148038 smješten na petom kromosomu u intronskoj regiji gena *IL31RA*.

5. RASPRAVA

Karcinom pluća je jedan od najčešće dijagnosticiranih malignih oboljenja na svijetu. Iako je tema istraživanja mnogih znanstvenika, mehanizam nastanka ove maligne bolesti nije još uvijek u potpunosti razjašnjen. Dišni putevi, uključujući i pluća, izloženi su raznim patogenima i česticama iz okoliša koje potencijalno mogu narušiti njihov integritet i dovesti do razvitka malignih bolesti [30]. U obrani organizma od patogena važnu ulogu ima imunski sustav, čija uloga je spriječiti štetno djelovanje patogena i čestica te ih eliminirati iz organizma. Jedan od načina obrane organizma od patogena jest pomoću receptora za prepoznavanje molekularnih uzoraka povezanih s patogenima, uključujući TLR-e. Osim aktivacije imunskog odgovora, aktivacija TLR-a također aktivira i stanične puteve koji sudjeluju u nastanku kroničnih bolesti, poput autoimunih bolesti i karcinoma [112]. Velik broj istraživanja pokazala su da TLR-i imaju važnu ulogu u razvoju i liječenju karcinoma, te da mogu imati protumorsku kao i antitumorsku ulogu. Tako na primjer, aktivacijom receptora TLR4 na stanicama karcinoma prostate i pluća, ligandom lipopolisaharidom (LPS) dolazi do povećane ekspresije čimbenika rasta krvožilnog endotela (*engl. vascular endothelial growth factor, VEGF*), koji pogoduje rastu karcinoma [113]. Rezultati istraživanja Huang i sur. [114] pokazali su antitumorski učinak imikvimoda. Tretiranje staničnih linija karcinoma (BCC/KMC-1 – humana stanična linija karcinoma bazalnih stanica, AGS – humana stanična linija karcinoma želuca, HeLa – stanična linija karcinoma vrata maternice, SCC12 – humana stanična linija karcinoma skvamoznih stanica, B16F10 – mišja stanična linija melanoma i 4T1 – mišja stanična linija karcinoma dojke) imikvimodom dovodi do proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva koji potiču stres u stanicama, te u konačnici dovode stanicu u staničnu smrt [114]. Osim navedenog, aktivacija različitih TLRa ima i adjuvantno svojstvo. Tako su FDA i EMA (*engl. European Medicines Agency*) odobrili su Cervariks, cjepivo za prevenciju premalignih anogenitalnih lezija te karcinoma cerviksa i anusa uzročno povezanih s određenim onkogenim tipovima humanog papilomavirusa (HPV). Cervariks u svojem sastavu sadrži monofosforil lipidu (*engl. monophosphoryl lipid, MPL*), agonist receptora TLR4. Aktivacijom TLR4 pomoću MPL-a dolazi do aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- κ B koji prouzrokuje stvaranje proupalnih citokina, kao što su TNF- α i IL-6. Proupalni citokini pospješuju stečeni imunski odgovor tako da stimuliraju sazrijevanje antigen prezentirajućih stanica i inhibiraju regulatorne limfocite T [115]. Antitumorska uloga TLR3 pokazana je kod hepatocelularnog karcinoma, gdje aktivacijom pomoću liganda poli(I:C) dolazi do aktivacije receptora TLR3 koji inducira apoptozu stanica karcinoma [116].

Istraživanja koja su prethodila ovoj doktorskoj disertaciji, u Laboratoriju za naprednu genomiku na Institutu Ruđer Bošković, pokazala su povezanost polimorfizama u genu *TLR5* (rs2072493) [19] i u genu *TLR7* (rs5935436) s nastankom karcinoma pluća. Prema dosadašnjim istraživanjima, pokazana je uloga TLR5 u tumorigenezi karcinoma pluća. Istraživanja su pokazala je da povećana ekspresija *TLR5* u stanicama karcinoma pluća dovodi do inhibicije proliferacije, migracije i invazije tumorskih stanica, što ukazuje na antitumorsko djelovanje TLR5 u karcinomu pluća [13]. Kod pacijenata dijagnosticirana s NSCLC-om pokazano je kako je povećana ekspresija TLR5 povezana s boljim preživljenjem. Također, stimulacija staničnih linija karcinoma pluća, SPC-A1, A549, H1975 i H1299, flagelinom dovodi do povećane aktivacije signalnog puta TLR5 koja u konačnici utječe na inhibiciju proliferacije, migracije i invazije [117]. U istraživanjima *in vivo*, na ksenografnom modelu stanica A549 kod miša, pokazano je kako stimulacija stanica A549 CBLB502, sintetskim ligandom za TLR5, dovodi do inhibicije rasta stanica A549 [118]. Također postoje istraživanja koja su pokazala pro- i antitumorsku ulogu TLR7 u karcinomu pluća. TLR7 može razriješiti upalu i inhibirati angiogenezu, te je povećana ekspresija gena *TLR7* povezana je s boljim preživljenjem osoba s NSCLC-om [99]. Pokazano je kako je TLR7 također eksprimiran na staničnim linijama karcinoma pluća, te njegova aktivacija utječe na povećanje ekspresije antiapoptotskog proteina BCL-2, koji u konačnici utječe na preživljenje stanica karcinoma, te da aktivacija TLR7 ligandom loksoribinom dovodi do otpornosti na citostatik [15,16]. S obzirom na to da su TLR5 i TLR7 povezani s tumorigenezom karcinoma pluća, te da su navedeni polimorfizmi povezani s nastankom karcinoma pluća, fokus ove disertacije je okarakterizirati ulogu navedenih polimorfizama u tumorigenezi karcinoma pluća. Cilj ove disertacije je utvrditi promjene u ekspresiji gena i metabolita do kojih dolazi zbog prisustva navedenih polimorfizama. Također na temelju tih promjena ustanoviti do kojih promjena u staničnim procesima dolazi, koji su povezani s nastankom i razvojem karcinoma pluća. Ujedno cilj ove disertacije je bio analizom rezultata GWAS istraživanja pronaći potencijalno nove polimorfizme u genima koji sudjeluju u imunom odgovoru koji su povezani s nastankom karcinoma pluća.

U svrhu ispitivanja utjecaja polimorfne varijante rs2072493/N592S gena *TLR5* na promjene u transkriptomu, analizirana je ukupna RNA izolirana iz navedenih staničnih linija WI-38 i H1299 koje su inficirane adeno-5 virusom koji sadrži ili divlji tip ili mutiranu varijantu gena *TLR5*. Rezultati ove analize pokazuju da prekomjerna ekspresija varijante N592S u testiranim stanicama, u odnosu na stanice koje prekomjerno ekspimiraju divlji tip gena, dovodi do niza promjena. Identificirane su promjene u razini ekspresije gena, kao i promjene aktivnosti različitih staničnih puteva u testiranim staničnim linijama. Rezultati analize diferencijalne

ekspresije gena pokazali su da je prisutnost varijante N592S povezana s promjenom ekspresije 7 različitih gena u staničnoj liniji H1299, dok u staničnoj liniji WI-38 dolazi do promjene ekspresije 40 gena. U obje testirane stanične linije varijanta N592S utječe na promjenu aktivnosti u signalnom putu receptora spregnutim s proteinima G (*engl. G-protein-coupled receptors*, GPCRs), aktivnost molekularnih pretvarača, vezanje kalcijevih iona, te aktivnost receptora vezanjem liganda. Poznato je da TLR-i mogu modulirati signalni put GPCR u imunskim stanicama. Rezultati istraživanja Loniewski i sur. [119] pokazuju da aktivacijom TLR-a u makrofazima dolazi do promjene u ekspresiji gena (*ARR2*, *ARR3*, *GRK2*, *GRK5* i *GRK6*) koji sudjeluju u signalnom putu GPCR, te time i mijenjaju aktivnost signalnog puta [119]. Shi i sur. [120] Su pokazali slične rezultate u dendritičnim stanicama. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da TLR-i utječu na ekspresiju gena regulatora signalnog puta G proteina (*engl. regulator of G protein signaling*, *RGS*). Zbog aktivacije signalnog puta preko TLR-a u dendritičnim stanicama dolazi do povećane ekspresije gena *RGS1* i *RGS16*, dok se ekspresija gena *RGS14* i *RGS18* smanji, te u konačnici dolazi do promjene aktivnosti signalnog puta GPCR [120]. Receptori GPCR kao i njihov signalni put utječe na različite stanične procese kao što su proliferacija, rezistencija na apoptozu, inicijacija angiogeneze, aktivacija i invazija procesa metastaziranja i izbjegavanje supresora rasta, pa upravo promjene u ovom signalnom putu mogu utjecati na rast i razvoj karcinoma [121]. Gen čija razina ekspresije je promijenjena u staničnoj liniji H1299, zbog prisustva polimorfizma N592S, a sudjeluje u GPCR signalnom putu je *GPSM3*. *GPSM3* je protein iz porodice modulatora signalnog puta proteina G (*engl. G protein-signaling modulators*, *GPSM*), čija uloga je regulacija GPCR putem interakcije s podjedinicama proteina G. U istraživanju karcinoma dojke, pokazano je kako kod osoba oboljelih od ove vrste karcinoma, dolazi do povećane razine ekspresije *GPSM3*. Nadalje, pokazano je kako povećanjem razine ekspresije *GPSM3* dolazi do povećanja broja imunskih stanica, kao što su CD8+ limfociti T, limfociti B, makrofazi i mijeloidne dendritične stanice, u tumorskom mikrookolišu [122]. Također je pokazano da pacijenti oboljeli od glioma niskog stupnja i s povećanom razinom ekspresije *GPSM3* imaju manje vrijeme preživljenja u odnosu na pacijente sa nižom ekspresijom *GPSM3*. Povećana razina ekspresije *GPSM3* kod navedenih pacijenata povezana je s većom prisutnosti makrofaga M2, neutrofila i regulatornih limfocita T u tumorskom mikrookolišu, te sa smanjenom količinom monocita [123]. Nadalje, u staničnoj liniji WI-38 geni čija razina ekspresije je promijenjena zbog prisutnosti polimorfizma N592S, a povezani su sa signalnim putem GPCR, su *ARHGAP4* i *RAB43*. *RAB43* pripada Rab porodici malih GTPaza čija glavna uloga regulacija unutarstaničnog prijenosa kroz membranu od formiranja prijenosnih vezikula do njihove fuzije s membranom. Istraživanja pokazuju njihovu

ulogu u tumorigenezi. Pokazano je da pacijenti oboljeli od glioma imaju povećanu razinu RAB43, te je ona u pozitivnoj korelaciji s napredovanjem ove vrste karcinoma, te da pacijenti s povećanom razinom ekspresije RAB43 imaju lošije preživljenje u odnosu na pacijente s manjom razinom ekspresije. Smanjenjem ekspresije *RAB43* u staničnim linijama glioma, U-87 MG i U-251, dovodi do smanjenja migracije i invazije karcinomskih stanica, te do smanjenja razine ekspresije biljega epitelno- mezenhimalnog prijelaza, N-kadherina i vimentina, epitelno- mezenhimalnog prijelaza [124]. RAB43 također sudjeluje u tumorigenezi karcinoma želuca, gdje je pokazano da smanjena razina ekspresije gena *RAB43* u staničnim linijama karcinoma želuca, MGC803 i HGC27, dovodi do inhibicije proliferacije stanica. Isti učinak je utvrđen i u istraživanju *in vivo* gdje je volumen karcinoma kod miševa s utišanim genom *RAB43* bio manji u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenjem ekspresije gena *RAB43* dolazi do smanjene ekspresije proteina AKT, kao i njegovog fosforiliranog oblika, te PI3K, što ukazuje da RAB43 ima ulogu u regulaciji staničnog puta PI3K/AKT. Također je pokazano da pacijenti s karcinomom želuca i povećanom razinom ekspresije RAB43 imaju lošije preživljenje u odnosu na pacijente s manjom ekspresijom RAB43 [125]. ARHGAP4 pripada skupini proteina koji aktiviraju GTPaze Rho te je pokazano da sudjeluje u tumorigenezi. Pokazano je da povećana razina ekspresije *ARHGAP4* smanjuje migraciju i invaziju staničnih linija karcinoma gušterače, BxPC-3 i SW1990, te također da povećana ekspresija navedenog gena inhibira proliferaciju stanica. Utvrđeno je da upravo ARHGAP4 utječe na aktivaciju signalnog puta β -katenina koji regulira procese proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze. Povećana ekspresija *ARHGAP4* smanjuje lokalizaciju β -katenina u jezgri, te smanjuje ekspresiju i aktivnost nizvodnih proteina MMP2 i MMP-9, čime inhibira aktivaciju signalnog puta β -katenina. Također je pokazano da kod osoba oboljelih od karcinoma gušterače dolazi do povećane razine ekspresije proteina ARHGAP4 u tkivu karcinoma u odnosu na pripadajućem netumorskom tkivu, te da pacijenti s manjom razinom ekspresije ARHGAP4 u tkivu karcinoma gušterače imaju lošije preživljenje u odnosu na pacijente s povećanom razinom ekspresije ARHGAP4 [126]. ARHGAP4 je također povezan s tumorigenezom karcinoma debelog crijeva. Pokazano je da u tkivu karcinoma debelog crijeva dolazi do povećane razine ekspresije proteina ARHGAP4 u odnosu na pripadajuće netumorsko tkivo. Nadalje je utvrđeno da pacijenti s povećanom razinom ekspresije ARHGAP4 imaju lošije preživljenje u odnosu na pacijente s manjom razinom ekspresije ARHGAP4. Smanjena razina ekspresije *ARHGAP4* korelira sa smanjenom količinom limfocita B, makrofaga, neutrofila i dendritičnih stanica u tumorskom mikrookolišu karcinoma debelog crijeva, dok povećana razina ekspresije korelira s povećanom količinom limfocita T CD8+ i CD4+ [127]. Zaključno možemo reći da prisutnost polimorfizma

rs2072493/N592S u genu *TLR5* dovodi do promijene aktivnosti signalnog puta GPCR promjenom razine gena *GPSM3*, *RAB43* i *ARHGAP4*.

Kako je već ranije spomenuto, jedan od ciljeva ove disertacije bio je ispitati ulogu gena *TLR7* u nastanku i razvoju karcinoma pluća. Naime, prijašnji rezultati grupe koju vodi mentorica ove disertacije pokazali su da je polimorfni biljeg (rs5935436) u promotorskoj regiji gena *TLR7* statistički značajno povezan s nastankom karcinoma pluća. Isto tako, *in vitro* studije su pokazale da prisustvo ovog polimorfizma povećava aktivnost samog promotora i dovodi do povećanja ekspresije gena. Stoga je jedan od ciljeva ove disertacije bio vidjeti da li povećana ekspresija gena *TLR7* utječe na preživljenje metastatskih stanica karcinoma pluća. U tu svrhu napravljen je MTT-test na stanicama H1299 s endogenom ekspresijom gena *TLR7*, te s povećanom ekspresijom, koje su također bile stimulirane s imikvimodom, sintetskim ligandom za *TLR7*, citostatikom paklitakselom, te kotretirane imikvimodom i paklitakselom. Rezultati ove analize pokazali su da povećana ekspresija gena *TLR7* ne utječe na preživljenje stanica H1299, u nestimuliranim uvjetima i uvjetima tretmana paklitakselom. Također rezultati ovog istraživanja pokazuju kako su stanice H1299 koje imaju povećanu razinu gena *TLR7* osjetljivije na imikvimod, kao i na kotretman imikvimodom i paklitakselom. Chatterjee i suradnici [16] su pokazali da pacijenti dijagnosticirani s NSCLC-om i povećanom ekspresijom proteina *TLR7* imaju lošije preživljenje. Pacijenti koji su bili uključeni u navedeno istraživanje bili su stadija I-III, dakle nisu bili uključeni pacijenti s metastazama [16]. Bauer i suradnici [100] su također pratili preživljenje pacijenta dijagnosticiranih s NSCLC-om, gdje su koristili podatke iz različitih baza podataka, te su uključivali pacijente sva četiri stadija. Njihovi rezultati pokazuju suprotno od rezultata istraživanja Chatterjee i suradnika [16], dakle pacijenti s povećanom razinom ekspresije gena *TLR7* imaju bolje preživljenje [100]. Nadalje, pokazano je kako stanične linije primarnog karcinoma pluća, A549 i SK-MES, koje su prije stimulacije citostatikom (doksorubicin, Navelbine, cikloheksimid, cisplatina i karboplatina) bile stimulirane loksoribinom, također sintetskim ligandom *TLR7*, pokazuju otpornost na učinak citostatika nakon 10 dana stimulacije [15]. Istraživanja su pokazala kako imikvimod može imati antitumorski učinak inducirajući staničnu smrt autofagijom u staničnim linijama karcinoma dojke [128], debelog crijeva [129], te melanoma [130]. Nadalje, pokazano je kako imikvimod smanjuje vijabilnost stanica karcinoma maternice, te da povećava aktivnost kaspaza 3 i 4. Uz navedeno također je uočeno kako stimulacija imikvimodom dovodi do smanjenja količine proteina BCL-2 i BCL-xL, što ukazuje da imikvimod može inducirati apoptozu. U *in vitro* istraživanjima je pokazano da imikvimod može inhibirati rast i razvoj karcinoma maternice bez značajnog toksičnog učinka [131]. Zaključno možemo reći da povećana ekspresija gena *TLR7*

i njegova aktivacija imikvimodom smanjuje vijabilnost stanica H1299, te da su takve stanice, kada su stimulirane imikvimodom i paklitakselom, osjetljivije na djelovanje citostatika, u našem slučaju paklitaksela.

Jedan od ciljeva ove disertacije bio je ispitati kako polimorfizmi rs2072493 i rs5935436 utječu na metabolom testiranih staničnih linija. Kako ne postoji ustaljena metoda obrade podataka dobivenih masenom spektrometrijom i njihove neciljane analize metaboloma, najprije je bilo potrebno validirati odabranu bioinformatičku metodu obrade i analize podataka. U tu svrhu utišani je gen *NME4*, te inhibiran enzim NAMPT, koji se nalaze u KEGG bazi podataka u skupini enzima, u četiri testirane stanične linije. Kao rezultat validacije se očekivao popis enzima s promijenjenom aktivnosti među kojima se nalaze i prije spomenuti odabrani enzimi. Tretiranim stanicama su izolirani metaboliti, te su snimljeni maseni spektri MALDI-TOF metodom. Dobiveni maseni spektri su zatim analizirani uz pomoć paketa FELLA koji koristi bazu podataka KEGG, te kao rezultat je dobiven popis enzima s promijenjenom aktivnošću. Rezultati ove analize pokazuju utišavanje gena *NME4* u sve 4 stanične linije dovodi do promjene u aktivnosti raznih enzima, među kojima je i *NME4*. Nadalje, rezultati analize pokazuju da inhibicijom enzima NAMPT dolazi do promjene u aktivnosti mnogih enzima, u sve 4 promatrane stanične linije, među kojima se nalazi i NAMPT. Analizom metaboloma staničnih linija, kod kojih smo izazvali ciljanu promjenu, kao rezultat neciljane analize smo upravo dobili promjenu u aktivnosti ciljanih enzima, što nam potvrđuje da je odabrana bioinformatička metoda pogodna za neciljanu analizu. Također, analiza je napravljena na 4 različite stanične linije, podrijetlom iz 3 različita tkiva, što nam govori da uvedene promjene nisu tkivno specifične. U recentno objavljenom radu Hoegen i suradnici opisuju analizu neciljane analize metaboloma koja se bazira na analizi obogaćivanja setova metabolita kako bi se dobili promijenjeni stanični putevi u svrhu pronalaženja potencijalnih biomarkera. Bioinformatička analiza koju opisuju je vrlo slična korištenoj u izradi ove disertacije. Opisana metoda bazira se na programu MSEA (*engl. Metabolite Set Enrichment Analysis*), te uz KEGG bazu podataka također koristi i HMDB (*engl. Human Metabolome Database*) bazu podataka [132]. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je korištena bioinformatička metoda pogodna za neciljanu analizu podataka dobivenih masenom spektrometrijom.

Nakon validacije bioinformatičke analize podataka dobivenih masenom spektrometrijom, navedena metoda je korištena za analizu utjecaja polimorfizama na promjene u metabolomu. Najprije su praćene promjene u metabolomu stanične linije H1299 tijekom povećane, odnosno smanjenje ekspresije gena *TLR7*. Za postizanje povećane ekspresije gena *TLR7*, stanice su transfecirane plazmidnom DNA koja sadrži gen, a za smanjenje ekspresije

stanice su transfecirane siRNA koja specifično smanjuje ekspresiju gena *TLR7*. Pripremljenim stanicama izolirani su metaboliti, te snimljeni su maseni spektri koji su analizirani na prije opisan način. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da zbog povećane ekspresije gena *TLR7* u staničnoj liniji H1299 dolazi do promjene u aktivnosti 172 enzima i ukupno 40 staničnih puteva. Kod uvjeta smanjenje ekspresije gena *TLR7* dolazi do promjene u aktivnosti 145 enzima i 32 stanična puta. Uspoređujući rezultate oba promatrana uvjeta uočavamo da dolazi do preklapanja u aktivnosti 20 staničnih puteva. Preklapajući stanični putevi povezani su s metabolizmom aminokiselina (npr. metabolizam triptofana, metabolizam alanina, aspartata i glutamata itd), metabolizmom (npr. put pentoza fosfata, ciklus limunske kiseline, galaktoze itd), degradacija RNA, kao i stanični putevi koji sudjeluju u imunosnom odgovoru (signalni put HIF-1, signalni put receptora RIG-I-like, signalni put AMPK). Istraživanja su također pokazala da TLR7 može imati razne promjene u metabolizmu stanica. Primjerice, stimulacija raznih staničnih linija karcinoma (BCC, A549, AGS, HeLa, SCC12, A375, MeWo, C32 i B16F10) imikvimodom dovodi do povećanog unosa glukoze u stanice, te lučenja laktata, što upućuje na povećanje procesa aerobne glikolize. Pokazano je da do navedenog učinka dolazi zbog povećane ekspresije HIF-1 α na razini transkripta i proteina. Gen *HIF-1 α* kodira alfa podjedinicu proteina HIF-1 (*engl. Hypoxia-inducible factor 1*), te njegovom aktivacijom dolazi do translokacije u jezgru gdje utječe na regulaciju gena koji sudjeluju u transport glukoze, kao i enzima koji sudjeluju u procesu glikolize. Navedeno istraživanje je također pokazalo da povećana ekspresija gena *TLR7* u staničnoj liniji karcinoma bazalnih stanica, uz stimulaciju imikvimodom dovodi do još veće aktivacije procesa aerobne glikolize [133]. Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije također pokazuju da zbog promjene u ekspresiji gena TLR7 dolazi do promjene u aktivnosti signalnog puta AMPK u staničnoj liniji H1299. Poznata je dvojaka uloga staničnog puta AMPK u tumorigenezi. Primjerice, sirtuin 3, kao uzvodni medijator signalnog puta AMPK, može povećati razinu ekspresije AMPK, čija je povećana razina povezana s procesom metastaziranja stanica raka maternice [134]. U staničnim linijama karcinoma pluća, A549 i H1299, je pokazano da stimulacija kvverticinom odvođa navedene stanične linije u staničnu smrt putem staničnog puta AMPK [135]. Nadalje, pokazano je da u plazmacitoidnim detritičnim stanicama (pDC) TLR7 može aktivirati signalni put AMPK. U pDC AMPK fosforilira Raptor, komponentu signalnog puta Akt/mTOR, pri čemu dolazi do aktivacije navedenog signalnog puta. Inficirajući stanice pDC virusom gripe A (*engl. Influenza A Virus*), koji stimulira receptor TLR7, te su stanice zatim tretirane inhibitorom receptora TLR7, RS661, utvrđeno je da ne dolazi do defosforilacije proteina Raptor nakon stimulacije inhibitorom, što ukazuje da TLR7 ima ulogu u aktivaciji signalnog puta AMPK [136]. S

obzirom da signalni put AMPK ima važnu ulogu u tumorigenezi karcinoma pluća, istražuju se razni lijekovi koji utječu na aktivaciju signalnog puta AMPK. Uz prethodno navedeni kverticin, You i suradnici [137] istraživali su utjecaja baikalina, flavonoid koji smanjuje ekspresiju gena *TLR7*, na stanične linije karcinoma pluća, A549 i H1299. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da baikalin inhibira vijabilnost, migraciju i invaziju staničnih linija A549 i H299, upravo aktivacijom staničnog puta AMPK. Dobiveni učinak su potvrdili tako da su utišali AMPK pomoći odgovarajuće siRNA, te su stanice stimulirali baikalinom, što je dovelo do proliferacije i migracije stanica karcinoma [137]. Utvrdili smo kako povećana odnosno smanjena ekspresija gena *TLR7* dovodi do statistički značajne promjene u staničnom procesu glikolize kao i signalnom putu HIF-1 u staničnom modelu metastatskog karcinoma pluća nemalih stanica. Zanimljivo je da kod priprema stanica sa smanjenom ekspresijom gena *TLR7*, stanice nisu bile tretirane imikvimodom, te da smanjena ekspresija gena *TLR7* bez dodatne aktivacije receptora također dovodi do promijene u staničnom procesu glikolize kao i signalnom putu HIF-1, što upućuje da bi samo promjena u razini ekspresije gena *TLR7* mogla izazvati zapažene promjene. S obzirom da *TLR7* utječe na aktivaciju signalnog puta AMPK, upravo bi se regulacija ekspresije *TLR7* mogla koristiti u aktivaciji navedenog staničnog puta, te bi razina ekspresija *TLR7* mogla biti prediktivni biljeg u odgovoru lijekova koji ciljaju stanični put AMPK.

Za razliku od *TLR7*, utjecaj receptora *TLR5* na promjene u metabolomu nije toliko istražen, stoga je jedan od ciljeva ove disertacije bio je ispitati utjecaj polimorfizma rs2072493/N592S u genu *TLR5* na promjene u metabolomu. U tu svrhu inficirane se tri stanične linije (WI-38, H1299 i THP-1) adenovirusom-5 koji sadrži divlji tip odnosno spomenutu varijantu gena *TLR5*. Pripremljenim stanicama izolirani su metaboliti kojima je snimljen maseni spektar, te zbog prisustva navedenog polimorfizma dolazi do promjene u metabolomu staničnih linija H1299 i WI-38. Dobiveni rezultati pokazuju da polimorfizam rs2072493 utječe na promjene u aktivnosti enzima i staničnih puteva u sve tri promatrane stanične linije. U staničnim linijama H1299 i WI-38 ustanovljena je statistički značajna promjena u aktivnosti metabolizma triptofana. Iako nije uočena statistički značajna promjena u metabolizmu triptofana kod stanične linije THP-1, rezultati aktivnosti enzima pokazuju da je aktivnost enzima (triptofan-2,3-dioksigenaza, kinurenin-3-monooksigenaza i kinureninaza), koji sudjeluju u metabolizmu triptofana, promijenjena. Clarke i suradnici [138] promatrali su utjecaj liganada *TLR*-a na metabolizam triptofana. U navedenom istraživanju stimulirali su krvne stanice pacijenata dijagnosticiranih sa sindromom iritabilnog crijeva, kao i kontrolnu skupinu, ligandima koji stimuliraju *TLR1-9*. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da stimulacija

TLR-a utječe na koncentracije triptofana i kinurenina, međuproducta u metabolizmu triptofana. Stimulirajući krvne stanice flagelinom, ligandom koji prepoznaje TLR5, uočeno je povećanje u omjeru kinurenina i triptofana, kod pacijenata dijagnosticiranih sa sindromom iritabilnog crijeva, u odnosu na nestimulirane krvne stanice, što govori da aktivacija receptora TLR5 može izazvati promjene u metabolizmu triptofana [138]. Iako istraživanja do sada nisu povezala utjecaj TLR5 na promjene u metabolizmu triptofana u karcinomu pluća, pokazano je da triptofan i njegovi metaboliti sudjeluju u tumorigenezi karcinoma pluća. Analiza metaboloma seruma pacijenata oboljelih od karcinoma pluća pokazala je da dolazi do promjene u količini triptofana u odnosu na serum zdravih osoba [139]. Nadalje, pokazano je da stanice karcinoma pluća koje potječu od pacijenata s rezistencijom na odgovor na citostatik (cisplatinu) unose više triptofana, u odnosu na stanice karcinoma pluća pacijenata kod kojih je došlo do odgovora na cisplatinu. Triptofan također može sudjelovati u biosintezi kofaktora NAD^+ *de novo*. Pokazano je da iako dolazi do povećanog unosa triptofana u stanice karcinoma pluća rezistentne na cisplatinu, količina NAD^+ kao i međuproducta sinteze NAD^+ je smanjena, dok je povećana količina kinurenina, metabolita koji sudjeluje u metabolizmu triptofana. Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako promjene u aktivnosti staničnog puta metabolizma triptofana mogu utjecati na rezistenciju karcinoma pluća na odgovor na cisplatinu [140]. Zaključno možemo reći da polimorfizam rs2072493/N592S u genu *TLR5* utječe na promjene u aktivnosti staničnog puta metabolizma triptofana, kao i enzima koji sudjeluju u navedenom staničnom putu.

Uz promatranje utjecaja polimorfizama u genima *TLR5* i *TLR7* na promjene u transkriptomu i metabolomu, jedan od ciljeva ove disertacije bio je pronaći potencijalno nove polimorfizme povezane s nastankom karcinoma pluća. U tu svrhu u izradi ove disertacije analizirani su rezultati istraživanja GWAS u kojem su bili uključeni oboljeli od NSCLC-a, te kontrolna skupina bez dijagnoze NSCLC-a. Kod analize rezultata u fokus smo stavili gene koji sudjeluju u imunosnom odgovoru. Rezultati analize pokazuju dva SNP-a, rs1639113 koji se nalazi u genu *HLA-C* i rs9265821 koji se nalazi u genu *HLA-B*, da su povezani s nastankom karcinoma pluća. Nadalje, pretraživanjem baza podataka utvrđeno je da rezultati analiza koji povezuju određeni lokus s razinom ekspresije mRNA (*engl. expression quantitative trait loci, eQTL*) ukazuju da oba SNP-a utječu na razinu ekspresije gena *HLA-C* u tkivu pluća. HLA (*engl. Human Leukocyte Antigen*) su skupina proteina koji predočavaju antigene na staničnoj membrani limfocitima T te sudjeluju u imunosnom odgovoru. HLA-B i HLA-C zajedno s HLA-A pripadaju skupini I (HLA-I) proteina HLA, te je pokazano da stanice NSCLC-a imaju povećanu razinu ekspresije proteina HLA-I u odnosu na okolne stromalne stanice. Također je pokazano da karcinomi s manjom razinom ekspresije proteina HLA-B i HLA-C imaju smanjenu

količinu tumor infiltrirajućih leukocita CD4+, CD8+ i FOXP3+, kao i prirodnoubilačkih stanica CD56+. Pokazano je također da je smanjena ekspresija HLA-B i HLA-C povezana s lošijim preživljenjem pacijenata s NSCLC-om [141]. Istraživanje Abed i suradnika [142] pokazalo je povezanost lokusa na kromosomu 6 koji sadrži gene koji kodiraju za HLA-I s lošijim preživljenjem osoba dijagnosticiranih s napredovalim NSCLC-om te tretiranih imunoterapijom [142]. Navedena istraživanja pokazuju ulogu HLA u tumorigenezi NSCLC-a, te dobiveni rezultati analize GWAS doprinose spoznaji o genetičkoj povezanosti gena HLA s nastankom karcinoma pluća. Uz navedene statistički značajne SNP-ove povezane s nastankom karcinoma pluća, analiza rezultata GWAS pokazuje SNP-ove, sa statističkom vrijednosti $p < 0,05$, u genima koji utječu na aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF- κ B. Identificiran je SNP rs1682802 u genu *GNAI5*, koji kodira jednu podjedinicu heteromerne podjedinice $G\alpha$ proteina G. *GNAI5* sudjeluje u staničnom putu GPCR, te tijekom upale dolazi do aktivacije podjedinice $G\alpha$, koja zatim aktivira protein kinazu C (PKC), u limfocitima i makrofazima, a PKC u konačnici regulira aktivnost NF- κ B [143,144]. Također, identificirana su dva SNP-a u genima *TNFRSF8* (rs1148471) i *TNFRSF14* (rs2495366) koji pripadaju skupini receptora čimbenika nekroze tumora. Aktivacijom receptora čimbenika nekroze tumora, dolazi do novačenja adaptornih proteina TRAF koji u konačnici aktiviraju NF- κ B [145]. Identificiran je SNP rs1148038 u genu *IL31RA*, koji kodira za alfa podjedinicu receptora IL31 (IL31R). Stimulacija IL31R može dovest do aktivacije jednog od tri signalna puta, MAPK, PI3K/AKT i Jak/STAT, koji u konačnici također aktiviraju transkripcijski čimbenik NF- κ B [145]. Istraživanja su pokazala da transkripcijski čimbenik NF- κ B ima važnu ulogu u tumorigenezi karcinoma pluća. Aktivacijom NF- κ B dolazi do njegove translokacije u jezgru gdje prepoznaje svoje vezne sljedove u dostupnim promotorskim regijama ciljanih gena, te započinje proces transkripcije. Kod karcinoma pluća signalni put NF- κ B regulira transkripciju gena koji sudjeluju u procesima stanične proliferacije, preživljenja, angiogeneze, metastaziranja, kao i rezistenciju na razne terapije, uključujući i citostatike [145]. Zaključno, rezultati analize podataka GWAS, ukazuju na statistički značajnu povezanost polimorfizma, rs1639113 i rs9265821, sa nastankom karcinoma pluća. Također, rezultati ukazuju na polimorfizme sa statističkom vrijednosti $p < 0,05$, u genima koji utječu na aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF- κ B, a povezani su s nastankom karcinoma pluća.

Do sada postoji vrlo malo studija vezanih uz promatrane polimorfizme u genima *TLR5* i *TLR7*, a vezano uz karcinom pluća ih gotovo ni nema. Stoga ovo istraživanje doprinosi boljoj karakterizaciji proučavanih polimorfizama u razvoju karcinoma pluća. Također postoji mali broj istraživanja koja proučavaju utjecaj imunskih gena na promjene u metabolizmu, posebice

nema mnogo istraživanja utjecaja gena *TLR5* na promjene u metabolomu karcinoma pluća, te su rezultati dobiveni istraživanjem metaboloma od iznimne važnosti. Analizom rezultata GWAS pronađeni su potencijalno novi biljezi, vezani uz gene koji sudjeluju u imunosnom odgovoru, u nastanku karcinoma pluća, koje bi svakako trebalo dodatno ispitati. Nadalje, buduća nova istraživanja, posebice na kliničkim materijalima, bi trebala dodatno proširiti saznanja o utjecaju promatranih polimorfizama na nastanak i razvoj karcinoma pluća.

6. ZAKLJUČAK

- Rezultati analize transkriptoma, u kontekstu diferencijalne ekspresije gena, u staničnim linijama koje prekomjerno ekspimiraju mutiranu varijantu gena *TLR5* (N592S), pokazuju da dolazi promjenom ekspresije razine gena koji utječu na promjene aktivnosti u signalnom putu receptora spregnutim s proteinima G (*engl. G-protein-coupled receptors*, GPCRs), aktivnost molekularnih pretvarača, vezanje kalcijevih iona, te aktivnost receptora vezanjem liganda.
- Rezultati analize utjecaja polimorfizama *TLR5* (rs2072493) na promjene metaboloma u staničnim linijama koje prekomjerno ekspimiraju mutiranu varijantu gena *TLR5* (N592S), pokazuju da polimorfizam utječe na promjene u aktivnosti staničnog puta metabolizma triptofana, kao i enzima koji sudjeluju u navedenom staničnom putu.
- Rezultati analize utjecaja povećane ekspresije gena *TLR7* na preživljenje metastatskih stanica karcinoma pluća ukazuju da su navedene stanice osjetljivije su na tretman imikvimodom, kao i na kotretman imikvimodom i paklitakselom
- Rezultati analize utjecaja promijenjene ekspresije gena *TLR7* u staničnoj liniji pokazuju da navedena promjena u ekspresiji gena utječe na aktivnost enzima, ujedno i raznim staničnim putevima poput staničnog puta glikolize, signalnog puta HIF-1, i signalnog puta AMPK.
- Rezultati bioinformatičke analize metaboloma stanica tretiranih siRNA koja cilja *NME4* i inhibitorom enzima NAMPT, pokazuju da dolazi do promjene u aktivnosti raznih enzima, među kojima se nalaze i navedeni enzimi, čime je u konačnici validirana odabrana neciljana bioinformatička analiza metaboloma.
- Rezultati povezanosti polimorfizama u genima koji sudjeluju u imunom odgovoru s nastankom karcinoma pluća pokazuju da su polimorfizmi, rs1639113 i rs9265821, povezani s nastankom karcinoma pluća.

7. LITERATURA

- [1] Osmani, L.; Askin, F.; Gabrielson, E.; Li, Q.K. Current WHO Guidelines and the Critical Role of Immunohistochemical Markers in the Subclassification of Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC): Moving from Targeted Therapy to Immunotherapy. *Semin. Cancer Biol*, 52, 103–109.
- [2] Bossé, Y.; Amos, C.I. A Decade of GWAS Results in Lung Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2018, 27, 363–379.
- [3] Greten, F.R.; Grivennikov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 2019, 51, 27–41.
- [4] Gonzalez, H.; Hagerling, C.; Werb, Z. Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression. *Genes & Development*, 2018, 32, 1267–1284.
- [5] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, S.P. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*; 6th ed.; Elsevier Health Sciences, 2019.
- [6] Taniguchi, K.; Karin, M. NF- κ B, Inflammation, Immunity and Cancer: Coming of Age. *Nature Reviews Immunology*, 2018, 18, 309–324.
- [7] Lind, N.A.; Rael, V.E.; Pestal, K.; Liu, B.; Barton, G.M. Regulation of the Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors. *Nature Reviews Immunology*, 2022, 22, 224–235.
- [8] Vidya, M.K.; Kumar, V.G.; Sejian, V.; Bagath, M.; Krishnan, G.; Bhatta, R. Toll-like Receptors: Significance, Ligands, Signaling Pathways, and Functions in Mammals. *International Reviews of Immunology*, 2018, 37, 20–36.
- [9] Jefferies, C.A. Regulating IRFs in IFN Driven Disease. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10.
- [10] Hoden, B.; DeRubeis, D.; Martinez-Moczygemba, M.; Ramos, K.S.; Zhang, D. Understanding the Role of Toll-like Receptors in Lung Cancer Immunity and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13.
- [11] Fitzgerald, K.A.; Kagan, J.C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 2020, 180, 1044–1066.
- [12] Schön, M.P.; Schön, M. TLR7 and TLR8 as Targets in Cancer Therapy. *Oncogene*, 2008, 27, 190–199.
- [13] Zhou, H.; Chen, J.H.; Hu, J.; Luo, Y.Z.; Li, F.; Xiao, L.; Zhong, M.Z. High Expression of Toll-like Receptor 5 Correlates with Better Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Anti-Tumor Effect of TLR5 Signaling in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2014, 140, 633–643.
- [14] Zhou, S.-X.; Li, F.-S.; Qiao, Y.-L.; Zhang, X.-Q.; Wang, Z.-D. Toll-like Receptor 5 Agonist Inhibition of Growth of A549 Lung Cancer Cells in Vivo in a Myd88 Dependent Manner. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2012, 13, 2807–2812.

- [15] Cherfils-Vicini, J.; Platonova, S.; Gillard, M.; Laurans, L.; Validire, P.; Caliandro, R.; Magdeleinat, P.; Mami-Chouaib, F.; Dieu-Nosjean, M.-C.C.; Fridman, W.-H.H.; Damotte, D.; Sautès-Fridman, C.; Cremer, I. Triggering of TLR7 and TLR8 Expressed by Human Lung Cancer Cells Induces Cell Survival and Chemoresistance. *Journal of Clinical Investigation*, **2010**, *120*, 1285–1297.
- [16] Chatterjee, S.; Crozet, L.; Damotte, D.; Iribarren, K.; Schramm, C.; Alifano, M.; Lupo, A.; Cherfils-Vicini, J.; Goc, J.; Katsahian, S.; Younes, M.; Dieu-Nosjean, M.C.; Fridman, W.H.; Sautès-Fridman, C.; Cremer, I. TLR7 Promotes Tumor Progression, Chemotherapy Resistance, and Poor Clinical Outcomes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, **2014**, *74*, 5008–5018.
- [17] Dajon, M.; Iribarren, K.; Petitprez, F.; Marmier, S.; Lupo, A.; Gillard, M.; Ouakrim, H.; Victor, N.; Vincenzo, D.B.; Joubert, P.E.; Kepp, O.; Kroemer, G.; Alifano, M.; Damotte, D.; Cremer, I. Toll like Receptor 7 Expressed by Malignant Cells Promotes Tumor Progression and Metastasis through the Recruitment of Myeloid Derived Suppressor Cells. *Oncotarget*, **2019**, *8*, e1505174.
- [18] Klimosch, S.N.; Försti, A.; Eckert, J.; Knežević, J.; Bevier, M.; Von Schönfels, W. Von; Heits, N.; Walter, J.; Hinz, S.; Lascorz, J.; Hampe, J.; Hartl, D.; Frick, J.S.; Hemminki, K.; Schafmayer, C.; Weber, A.N.R. Functional TLR5 Genetic Variants Affect Human Colorectal Cancer Survival. *Cancer Research*, **2013**, *73*, 7232–7242.
- [19] Baranašić, J.; Šutić, M.; Catalano, C.; Drpa, G.; Huhn, S.; Majhen, D.; Nestić, D.; Kurtović, M.; Rumora, L.; Bosnar, M.; Vukić Dugac, A.; Sokolović, I.; Popovic-Grle, S.; Oršolić, N.; Škrinjarić-Cincar, S.; Jakopović, M.; Samaržija, M.; Weber, A.N.R.; Försti, A.; Knežević, J. TLR5 Variants Are Associated with the Risk for COPD and NSCLC Development, Better Overall Survival of the NSCLC Patients and Increased Chemosensitivity in the H1299 Cell Line. *Biomedicines*, **2022**, *10*, 2240.
- [20] Shan, L.; Hou, P.; Kang, X.; Shang, Y. Effects of Single-Nucleotide Polymorphisms in the TLR7 and TLR9 Genes of Asthmatic Children. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **2018**, *48*, 601–607.
- [21] Shen, N.; Fu, Q.; Deng, Y.; Qian, X.; Zhao, J.; Kaufman, K.M.; Wu, Y.L.; Yu, C.Y.; Tang, Y.; Chen, J.Y.; Yang, W.; Wong, M.; Kawasaki, A.; Tsuchiya, N.; Sumida, T.; Kawaguchi, Y.; Howe, H.S.; Mok, M.Y.; Bang, S.Y.; Liu, F.L.; Chang, D.M.; Takasaki, Y.; Hashimoto, H.; Harley, J.B.; Guthridge, J.M.; Grossman, J.M.; Cantor, R.M.; Song, Y.W.; Bae, S.C.; Chen, S.; Hahn, B.H.; Lau, Y.L.; Tsao, B.P. Sex-Specific Association of X-Linked Toll-like Receptor 7 (TLR7) with Male Systemic Lupus Erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2010**, *107*, 15838–15843.
- [22] Callejón-Leblic, B.; Pereira-Vega, A.; Vázquez-Gandullo, E.; Sánchez-Ramos, J.L.; Gómez-Ariza, J.L.; García-Barrera, T. Study of the Metabolomic Relationship between Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Based on Direct Infusion Mass Spectrometry. *Biochimie*, **2019**, *157*, 111–122.

- [23] Ruiying, C.; Zeyun, L.; Yongliang, Y.; Zijia, Z.; Ji, Z.; Xin, T.; Xiaojian, Z. A Comprehensive Analysis of Metabolomics and Transcriptomics in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*, **2020**, *15*, 1–16.
- [24] Sun, Q.; Zhao, W.; Wang, L.; Guo, F.; Song, D.; Zhang, Q.; Zhang, D.; Fan, Y.; Wang, J. Integration of Metabolomic and Transcriptomic Profiles to Identify Biomarkers in Serum of Lung Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2019**, *120*, 11981–11989.
- [25] Hrvatski zavod za javno zdravstvo, R. za rak R.H. Incidencija Raka u Hrvatskoj 2020. *Bilten*, **2022**.
- [26] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2021**, *71*, 209–249.
- [27] WHO. *WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic Tumours*; **2021**.
- [28] Osmani, L.; Askin, F.; Gabrielson, E.; Li, Q.K. Current WHO Guidelines and the Critical Role of Immunohistochemical Markers in the Subclassification of Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC): Moving from Targeted Therapy to Immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, **2018**, *52*, 103–109.
- [29] Detterbeck, F.C.; Boffa, D.J.; Kim, A.W.; Tanoue, L.T. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*, **2017**, *151*, 193–203.
- [30] Kadara, H.; Scheet, P.; Wistuba, I.I.; Spira, A.E. Early Events in the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *Cancer Prevention Research*, **2016**, *9*, 518–527.
- [31] Chalela, R.; Curull, V.; Enríquez, C.; Pijuan, L.; Bellosillo, B.; Gea, J. Lung Adenocarcinoma: From Molecular Basis to Genome-Guided Therapy and Immunotherapy. *Journal of Thoracic Disease*, **2017**, *9*, 2142–2158.
- [32] Duma, N.; Santana-Davila, R.; Molina, J.R. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, **2019**, *94*, 1623–1640.
- [33] Šutić, M.; Vukić, A.; Baranašić, J.; Försti, A.; Džubur, F.; Samaržija, M.; Jakopović, M.; Brčić, L.; Knežević, J. Diagnostic, Predictive, and Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Management. *Journal of Personalized Medicine*, **2021**, *11*, 1102.
- [34] Gibbons Johnson, R.M.; Dong, H. Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells. *Frontiers in Immunology*, **2017**, *8*.
- [35] Chamoto, K.; Hatae, R.; Honjo, T. Current Issues and Perspectives in PD-1 Blockade Cancer Immunotherapy. *International Journal of Clinical Oncology*, **2020**, *25*, 790–800.
- [36] Martínez-Jiménez, F.; Muiños, F.; Sentís, I.; Deu-Pons, J.; Reyes-Salazar, I.; Arnedo-Pac, C.; Mularoni, L.; Pich, O.; Bonet, J.; Kranas, H.; Gonzalez-Perez, A.; Lopez-

- Bigas, N. A Compendium of Mutational Cancer Driver Genes. *Nature Reviews Cancer*, **2020**, *20*, 555–572.
- [37] Robert, F.; Pelletier, J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Frontiers in Genetics*, **2018**, *9*.
- [38] Gorodetska, I.; Kozeretska, I.; Dubrovskaya, A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *Journal of Cancer*, **2019**, *10*, 2109–2127.
- [39] Sharma, B.; Preet Kaur, R.; Raut, S.; Munshi, A. BRCA1 Mutation Spectrum, Functions, and Therapeutic Strategies: The Story so Far. *Current Problems in Cancer*, **2018**, *42*, 189–207.
- [40] Chhabra, Y.; Wong, H.Y.; Nikolajsen, L.F.; Steinocher, H.; Papadopoulos, A.; Tunny, K.A.; Meunier, F.A.; Smith, A.G.; Kragelund, B.B.; Brooks, A.J.; Waters, M.J. A Growth Hormone Receptor SNP Promotes Lung Cancer by Impairment of SOCS2-Mediated Degradation. *Oncogene*, **2018**, *37*, 489–501.
- [41] Passaro, A.; Jänne, P.A.; Mok, T.; Peters, S. Overcoming Therapy Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Nature Cancer*, **2021**, *2*, 377–391.
- [42] Bosse, Y.; Amos, C.I.; Bossé, Y.; Amos, C.I. A Decade of GWAS Results in Lung Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **2018**, *27*, 363–379.
- [43] Wang, Q.; Gu, J.; Wang, L.; Chang, D.W.; Ye, Y.; Huang, M.; Roth, J.A.; Wu, X. Genetic Associations of T Cell Cancer Immune Response-Related Genes with T Cell Phenotypes and Clinical Outcomes of Early-Stage Lung Cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **2020**, *8*, e000336.
- [44] Yu, L.; Li, K.; Zhang, X. Next-Generation Metabolomics in Lung Cancer Diagnosis, Treatment and Precision Medicine: Mini Review. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 115774–115786.
- [45] Wishart, D.; Mandal, R.; Stanislaus, A.; Ramirez-Gaona, M. Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites*, **2016**, *6*, 10.
- [46] Ward, P.S.; Patel, J.; Wise, D.R.; Abdel-Wahab, O.; Bennett, B.D.; Collier, H.A.; Cross, J.R.; Fantin, V.R.; Hedvat, C. V.; Perl, A.E.; Rabinowitz, J.D.; Carroll, M.; Su, S.M.; Sharp, K.A.; Levine, R.L.; Thompson, C.B. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, **2010**, *17*, 225–234.
- [47] Lim, S.L.; Jia, Z.; Lu, Y.; Zhang, H.; Ng, C.T.; Bay, B.H.; Shen, H.M.; Ong, C.N. Metabolic Signatures of Four Major Histological Types of Lung Cancer Cells. *Metabolomics*, **2018**, *14*, 118.
- [48] Moreno, P.; Jiménez-Jiménez, C.; Garrido-Rodríguez, M.; Calderón-Santiago, M.; Molina, S.; Lara-Chica, M.; Priego-Capote, F.; Salvatierra, Á.; Muñoz, E.; Calzado, M.A. Metabolomic Profiling of Human Lung Tumor Tissues – Nucleotide Metabolism as a Candidate for Therapeutic Interventions and Biomarkers. *Molecular Oncology*, **2018**, *12*, 1778–1796.

- [49] Zheng, Y.; He, Z.; Kong, Y.; Huang, X.; Zhu, W.; Liu, Z.; Gong, L. Combined Metabolomics with Transcriptomics Reveals Important Serum Biomarkers Correlated with Lung Cancer Proliferation through a Calcium Signaling Pathway. *Journal of Proteome Research*, **2021**, *20*, 3444–3454.
- [50] Chang, R.B.; Beatty, G.L. The Interplay between Innate and Adaptive Immunity in Cancer Shapes the Productivity of Cancer Immunosurveillance. *Journal of Leukocyte Biology*, **2020**, *108*, 363–376.
- [51] Netea, M.G.; Balkwill, F.; Chonchol, M.; Cominelli, F.; Donath, M.Y.; Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Golenbock, D.; Gresnigt, M.S.; Heneka, M.T.; Hoffman, H.M.; Hotchkiss, R.; Joosten, L.A.B.; Kastner, D.L.; Korte, M.; Latz, E.; Libby, P.; Mandrup-Poulsen, T.; Mantovani, A.; Mills, K.H.G.; Nowak, K.L.; O’Neill, L.A.; Pickkers, P.; van der Poll, T.; Ridker, P.M.; Schalkwijk, J.; Schwartz, D.A.; Siegmund, B.; Steer, C.J.; Tilg, H.; van der Meer, J.W.M.; van de Veerdonk, F.L.; Dinarello, C.A. A Guiding Map for Inflammation. *Nature Immunology*, **2017**, *18*, 826–831.
- [52] Farber, D.L.; Netea, M.G.; Radbruch, A.; Rajewsky, K.; Zinkernagel, R.M. Immunological Memory: Lessons from the Past and a Look to the Future. *Nature Reviews Immunology*, **2016**, *16*, 124–128.
- [53] Gun, S.Y.; Lee, S.W.L.; Sieow, J.L.; Wong, S.C. Targeting Immune Cells for Cancer Therapy. *Redox Biology*, **2019**, *25*, 101174.
- [54] Gonzalez, H.; Hagerling, C.; Werb, Z. Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression. *Genes & Development*, **2018**, *32*, 1267–1284.
- [55] Sun, L.; Wang, X.; Saredy, J.; Yuan, Z.; Yang, X.; Wang, H. Innate-Adaptive Immunity Interplay and Redox Regulation in Immune Response. *Redox Biology*, **2020**, *37*, 101759.
- [56] Sun, L.; Wang, X.; Saredy, J.; Yuan, Z.; Yang, X.; Wang, H. Innate-Adaptive Immunity Interplay and Redox Regulation in Immune Response. *Redox Biology*, **2020**, *37*, 101759.
- [57] Berraondo, P.; Sanmamed, M.F.; Ochoa, M.C.; Etxeberria, I.; Aznar, M.A.; Pérez-Gracia, J.L.; Rodríguez-Ruiz, M.E.; Ponz-Sarvisé, M.; Castañón, E.; Melero, I. Cytokines in Clinical Cancer Immunotherapy. *British Journal of Cancer*, **2019**, *120*, 6–15.
- [58] Waldmann, T.A. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2018**, *10*, a028472.
- [59] Sarode, P.; Schaefer, M.B.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Savai, R. Macrophage and Tumor Cell Cross-Talk Is Fundamental for Lung Tumor Progression: We Need to Talk. *Frontiers in Oncology*, **2020**, *10*.
- [60] Lin, J.-X.; Leonard, W.J. Fine-Tuning Cytokine Signals. *Annual Review of Immunology*, **2019**, *37*, 295–324.

- [61] Hibino, S.; Kawazoe, T.; Kasahara, H.; Itoh, S.; Ishimoto, T.; Sakata-Yanagimoto, M.; Taniguchi, K. Inflammation-Induced Tumorigenesis and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, *22*, 5421.
- [62] Nakamura, K.; Smyth, M.J. Targeting Cancer-related Inflammation in the Era of Immunotherapy. *Immunology & Cell Biology*, **2017**, *95*, 325–332.
- [63] Xue, J.; Suarez, J.S.; Minaai, M.; Li, S.; Gaudino, G.; Pass, H.I.; Carbone, M.; Yang, H. HMGB1 as a Therapeutic Target in Disease. *Journal of Cellular Physiology*, **2021**, *236*, 3406–3419.
- [64] Wang, S.; Zhang, Y. HMGB1 in Inflammation and Cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, **2020**, *13*, 116.
- [65] Wu, L.; Yang, L. The Function and Mechanism of HMGB1 in Lung Cancer and Its Potential Therapeutic Implications (Review). *Oncology Letters*, **2018**.
- [66] Patel, S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): The Derivatives and Triggers of Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*, **2018**, *18*, 63.
- [67] Li, D.; Wu, M. Pattern Recognition Receptors in Health and Diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **2021**, *6*, 291.
- [68] Smole, U.; Kratzer, B.; Pickl, W.F. Soluble Pattern Recognition Molecules: Guardians and Regulators of Homeostasis at Airway Mucosal Surfaces. *European Journal of Immunology*, **2020**, *50*, 624–642.
- [69] Patidar, A.; Selvaraj, S.; Sarode, A.; Chauhan, P.; Chattopadhyay, D.; Saha, B. DAMP-TLR-Cytokine Axis Dictates the Fate of Tumor. *Cytokine*, **2018**, *104*, 114–123.
- [70] Huang, L.; Xu, H.; Peng, G. TLR-Mediated Metabolic Reprogramming in the Tumor Microenvironment: Potential Novel Strategies for Cancer Immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, **2018**, *15*, 428–437.
- [71] Brennan, J.J.; Gilmore, T.D. Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling. *Molecular Biology and Evolution*, **2018**, *35*, 1576–1587.
- [72] Balka, K.R.; De Nardo, D. Understanding Early TLR Signaling through the Myddosome. *Journal of Leukocyte Biology*, **2019**, *105*, 339–351.
- [73] Tanji, H.; Ohto, U.; Shibata, T.; Miyake, K.; Shimizu, T. Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic Ligands. *Science*, **2013**, *339*, 1426–1429.
- [74] Pires, B.; Silva, R.; Ferreira, G.; Abdelhay, E. NF-KappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes*, **2018**, *9*, 24.
- [75] Atsaves, V.; Leventaki, V.; Rassidakis, G.Z.; Claret, F.X. AP-1 Transcription Factors as Regulators of Immune Responses in Cancer. *Cancers*, **2019**, *11*, 1037.
- [76] Gazon, H.; Barbeau, B.; Mesnard, J.-M.; Peloponese, J.-M. Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Frontiers in Microbiology*, **2018**, *8*.

- [77] Urban-Wojciuk, Z.; Khan, M.M.; Oyler, B.L.; Fåhraeus, R.; Marek-Trzonkowska, N.; Nita-Lazar, A.; Hupp, T.R.; Goodlett, D.R. The Role of TLRs in Anti-Cancer Immunity and Tumor Rejection. *Frontiers in Immunology*, **2019**, *10*.
- [78] Schön, M.P.; Schön, M. TLR7 and TLR8 as Targets in Cancer Therapy. *Oncogene*, **2008**, *27*, 190–199.
- [79] Hajam, I.A.; Dar, P.A.; Shahnawaz, I.; Jaume, J.C.; Lee, J.H. Bacterial Flagellin—A Potent Immunomodulatory Agent. *Experimental & Molecular Medicine*, **2017**, *49*, e373–e373.
- [80] Invernizzi, R.; Lloyd, C.M.; Molyneaux, P.L. Respiratory Microbiome and Epithelial Interactions Shape Immunity in the Lungs. *Immunology*, **2020**, *160*, 171–182.
- [81] Burgueño, J.F.; Abreu, M.T. Epithelial Toll-like Receptors and Their Role in Gut Homeostasis and Disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **2020**, *17*, 263–278.
- [82] Beilmann-Lehtonen, I.; Hagström, J.; Mustonen, H.; Koskensalo, S.; Haglund, C.; Böckelman, C. High Tissue TLR5 Expression Predicts Better Outcomes in Colorectal Cancer Patients. *Oncology*, **2021**, *99*, 589–600.
- [83] Liang, H.; Zhang, L.; Liu, Z.; Hoden, B.; DeRubeis, D.; Zhang, Y.; Wang, F.; Zhang, D. Upregulation of TLR5 Indicates a Favorable Prognosis in Prostate Cancer. *The Prostate*, **2023**, *83*, 1035–1045.
- [84] Eremina, N. V.; Kazey, V.I.; Mishugin, S. V.; Leonenkov, R. V.; Pushkar, D.Y.; Mett, V.L.; Gudkov, A. V. First-in-Human Study of Anticancer Immunotherapy Drug Candidate Mobilan: Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Prostate Cancer Patients. *Oncotarget*, **2020**, *11*, 1273–1288.
- [85] Shuang, C.; Weiguang, Y.; Zhenkun, F.; Yike, H.; Jiankun, Y.; Jing, X.; Xinghan, L.; Yue, L.; Dalin, L. Toll-like Receptor 5 Gene Polymorphism Is Associated with Breast Cancer Susceptibility. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 88622–88629.
- [86] Nischalke, H.D.; Fischer, J.; Klüners, A.; Matz-Soja, M.; Krämer, B.; Langhans, B.; Goeser, F.; Soyka, M.; Stickel, F.; Spengler, U.; Nattermann, J.; Strassburg, C.P.; Berg, T.; Lutz, P. A Genetic Variant in Toll-like Receptor 5 Is Linked to Chemokine Levels and Hepatocellular Carcinoma in Steatohepatitis. *Liver International*, **2021**, *41*, 2139–2148.
- [87] De Re, V.; Repetto, O.; De Zorzi, M.; Casarotto, M.; Tedeschi, M.; Giuffrida, P.; Lenti, M.V.; Magris, R.; Miolo, G.; Mazzon, C.; Zanette, G.; Alessandrini, L.; Canzonieri, V.; Caggiari, L.; Zanussi, S.; Steffan, A.; Di Sabatino, A.; Cannizzaro, R. Polymorphism in Toll-Like Receptors and Helicobacter Pylori Motility in Autoimmune Atrophic Gastritis and Gastric Cancer. *Cancers*, **2019**, *11*, 648.
- [88] Xu, T.; Fu, D.; Ren, Y.; Dai, Y.; Lin, J.; Tang, L.; Ji, J. Genetic Variations of TLR5 Gene Interacted with Helicobacter Pylori Infection among Carcinogenesis of Gastric Cancer. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 31016–31022.

- [89] Vijay, K. Toll-like Receptors in Immunity and Inflammatory Diseases: Past, Present, and Future. *International Immunopharmacology*, **2018**, *59*, 391–412.
- [90] Braunstein, M.J.; Kucharczyk, J.; Adams, S. Targeting Toll-Like Receptors for Cancer Therapy. *Targeted Oncology*, **2018**, *13*, 583–598.
- [91] Dajon, M.; Iribarren, K.; Cremer, I. Dual Roles of TLR7 in the Lung Cancer Microenvironment. *OncoImmunology*, **2015**, *4*, e991615.
- [92] Petes, C.; Odoardi, N.; Gee, K. The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Frontiers in Immunology*, **2017**, *8*.
- [93] Moradi-Marjaneh, R.; Hassanian, S.M.; Fiuji, H.; Soleimanpour, S.; Ferns, G.A.; Avan, A.; Khazaei, M. Toll like Receptor Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, **2018**, *233*, 5613–5622.
- [94] Okazaki, S.; Stintzing, S.; Sunakawa, Y.; Cao, S.; Zhang, W.; Yang, D.; Ning, Y.; Matsusaka, S.; Berger, M.D.; Miyamoto, Y.; Suenaga, M.; Schirripa, M.; West, J.D.; Gopez, R.; Akihito, T.; Ichikawa, W.; Heinemann, V.; DePaolo, R.W.; Lenz, H.-J. Predictive Value of TLR7 Polymorphism for Cetuximab-Based Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Cancer*, **2017**, *141*, 1222–1230.
- [95] Yuan, Q.; Zhou, Q.; Ren, J.; Wang, G.; Yin, C.; Shang, D.; Xia, S. WGCNA Identification of TLR7 as a Novel Diagnostic Biomarker, Progression and Prognostic Indicator, and Immunotherapeutic Target for Stomach Adenocarcinoma. *Cancer Medicine*, **2021**, *10*, 4004–4016.
- [96] Zhang, M.; Yan, Z.; Wang, J.; Yao, X. Toll-like Receptors 7 and 8 Expression Correlates with the Expression of Immune Biomarkers and Positively Predicts the Clinical Outcome of Patients with Melanoma. *OncoTargets and Therapy*, **2017**, *Volume 10*, 4339–4346.
- [97] Stark, M.; Nicolai, M.; Tatura, M.; Keber, C.U.; Kaufmann, A.; Chung, H.; Slater, E.P.; Heeschen, C.; Lawlor, R.T.; Scarpa, A.; Bartsch, D.K.; Gress, T.M.; Bauer, S.; Buchholz, M. Dissecting the Role of Toll-like Receptor 7 in Pancreatic Cancer. *Cancer Medicine*, **2023**, *12*, 8542–8556.
- [98] Chang, S.-H.; Lin, P.-Y.; Wu, T.-K.; Hsu, C.-S.; Huang, S.-W.; Li, Z.-Y.; Liu, K.-T.; Kao, J.-K.; Chen, Y.-J.; Wong, T.-W.; Wu, C.-Y.; Shieh, J.-J. Imiquimod-Induced ROS Production Causes Lysosomal Membrane Permeabilization and Activates Caspase-8-Mediated Apoptosis in Skin Cancer Cells. *Journal of Dermatological Science*, **2022**, *107*, 142–150.
- [99] Liotti, F.; Marotta, M.; Sorriento, D.; Pone, E.; Morra, F.; Melillo, R.M.; Prevete, N. Toll-Like Receptor 7 Mediates Inflammation Resolution and Inhibition of Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*, **2021**, *13*, 740.
- [100] Bauer, A.K.; Upham, B.L.; Rondini, E.A.; Tennis, M.A.; Velmuragan, K.; Wiese, D. Toll-like Receptor Expression in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma: Potential Prognostic Indicators of Disease. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 91860–91875.

- [101] Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **2001**, *25*, 402–408.
- [102] Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinformatics*, **2018**, *34*, i884–i890.
- [103] Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics*, **2013**, *29*, 15–21.
- [104] Patro, R.; Duggal, G.; Love, M.I.; Irizarry, R.A.; Kingsford, C. Salmon Provides Fast and Bias-Aware Quantification of Transcript Expression. *Nature Methods*, **2017**, *14*, 417–419.
- [105] Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biology*, **2014**, *15*, 550.
- [106] Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; Mesirov, J.P. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2005**, *102*, 15545–15550.
- [107] Thaiparambil, J.; Dong, J.; Grimm, S.L.; Perera, D.; Ambati, C.S.R.; Putluri, V.; Robertson, M.J.; Patel, T.D.; Mistretta, B.; Gunaratne, P.H.; Kim, M.P.; Yustein, J.T.; Putluri, N.; Coarfa, C.; El-Zein, R. Integrative Metabolomics and Transcriptomics Analysis Reveals Novel Therapeutic Vulnerabilities in Lung Cancer. *Cancer Medicine*, **2023**, *12*, 584–596.
- [108] Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nature Methods*, **2012**, *9*, 671–675.
- [109] Picart-Armada, S.; Fernández-Albert, F.; Vinaixa, M.; Yanes, O.; Perera-Lluna, A. FELLA: An R Package to Enrich Metabolomics Data. *BMC Bioinformatics*, **2018**, *19*, 538.
- [110] Sudlow, C.; Gallacher, J.; Allen, N.; Beral, V.; Burton, P.; Danesh, J.; Downey, P.; Elliott, P.; Green, J.; Landray, M.; Liu, B.; Matthews, P.; Ong, G.; Pell, J.; Silman, A.; Young, A.; Sprosen, T.; Peakman, T.; Collins, R. UK Biobank: An Open Access Resource for Identifying the Causes of a Wide Range of Complex Diseases of Middle and Old Age. *PLoS Medicine*, **2015**, *12*, 1–10.
- [111] Tolstikov, V.; Nikolayev, A.; Dong, S.; Zhao, G.; Kuo, M.-S. Metabolomics Analysis of Metabolic Effects of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibition on Human Cancer Cells. *PLoS ONE*, **2014**, *9*, e114019.
- [112] Patra, M.C.; Shah, M.; Choi, S. Toll-like Receptor-Induced Cytokines as Immunotherapeutic Targets in Cancers and Autoimmune Diseases. *Seminars in Cancer Biology*, **2020**, *64*, 61–82.

- [113] Kashani, B.; Zandi, Z.; Pourbagheri-Sigaroodi, A.; Bashash, D.; Ghaffari, S.H. The Role of Toll-like Receptor 4 (TLR4) in Cancer Progression: A Possible Therapeutic Target? *Journal of Cellular Physiology*, **2021**, *236*, 4121–4137.
- [114] Huang, S.-W.; Wang, S.-T.; Chang, S.-H.; Chuang, K.-C.; Wang, H.-Y.; Kao, J.-K.; Liang, S.-M.; Wu, C.-Y.; Kao, S.-H.; Chen, Y.-J.; Shieh, J.-J. Imiquimod Exerts Antitumor Effects by Inducing Immunogenic Cell Death and Is Enhanced by the Glycolytic Inhibitor 2-Deoxyglucose. *Journal of Investigative Dermatology*, **2020**, *140*, 1771-1783.e6.
- [115] Luchner, M.; Reinke, S.; Milicic, A. TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases. *Pharmaceutics*, **2021**, *13*, 142.
- [116] Cen, X.; Liu, S.; Cheng, K. The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity. *Frontiers in Pharmacology*, **2018**, *9*.
- [117] Zhou, H.; Chen, J.; Hu, J.; Luo, Y.; Li, F.; Xiao, L.; Zhong, M. High Expression of Toll-like Receptor 5 Correlates with Better Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Anti-Tumor Effect of TLR5 Signaling in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **2014**, *140*, 633–643.
- [118] Zhou, S.-X.; Li, F.-S.; Qiao, Y.-L.; Zhang, X.-Q.; Wang, Z.-D. Toll-like Receptor 5 Agonist Inhibition of Growth of A549 Lung Cancer Cells in Vivo in a Myd88 Dependent Manner. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **2012**, *13*, 2807–2812.
- [119] Loniewski, K.; Shi, Y.; Pestka, J.; Parameswaran, N. Toll-like Receptors Differentially Regulate GPCR Kinases and Arrestins in Primary Macrophages. *Molecular Immunology*, **2008**, *45*, 2312–2322.
- [120] Shi, G.-X.; Harrison, K.; Han, S.-B.; Moratz, C.; Kehrl, J.H. Toll-Like Receptor Signaling Alters the Expression of Regulator of G Protein Signaling Proteins in Dendritic Cells: Implications for G Protein-Coupled Receptor Signaling. *The Journal of Immunology*, **2004**, *172*, 5175–5184.
- [121] Chaudhary, P.K.; Kim, S. An Insight into GPCR and G-Proteins as Cancer Drivers. *Cells*, **2021**, *10*, 3288.
- [122] Dang, H.-H.; Ta, H.D.K.; Nguyen, T.T.T.; Anuraga, G.; Wang, C.-Y.; Lee, K.-H.; Le, N.Q.K. Identifying GPSM Family Members as Potential Biomarkers in Breast Cancer: A Comprehensive Bioinformatics Analysis. *Biomedicines*, **2021**, *9*, 1144.
- [123] Wang, M.; Jia, J.; Cui, Y.; Peng, Y.; Jiang, Y. Molecular and Clinical Characterization of a Novel Prognostic and Immunologic Biomarker GPSM3 in Low-Grade Gliomas. *Brain Sciences*, **2021**, *11*, 1529.
- [124] Han, M.-Z.; Huang, B.; Chen, A.-J.; Zhang, X.; Xu, R.; Wang, J.; Li, X.-G. High Expression of RAB43 Predicts Poor Prognosis and Is Associated with Epithelial-Mesenchymal Transition in Gliomas. *Oncology Reports*, **2017**, *37*, 903–912.
- [125] Huang, Z.; Liang, H.; Chen, L. RAB43 Promotes Gastric Cancer Cell Proliferation and Metastasis via Regulating the PI3K/AKT Signaling Pathway. *OncoTargets and Therapy*, **2020**, *Volume 13*, 2193–2202.

- [126] Shen, Y.; Xu, L.; Ning, Z.; Liu, L.; Lin, J.; Chen, H.; Meng, Z. ARHGAP4 Regulates the Cell Migration and Invasion of Pancreatic Cancer by the HDAC2/ β -Catenin Signaling Pathway. *Carcinogenesis*, **2019**, *40*, 1405–1414.
- [127] Fu, M.; Pan, S.; Cai, X.; Hu, Y.; Zhang, W.; Pan, Q. Analysis of ARHGAP4 Expression With Colorectal Cancer Clinical Characteristics and Prognosis. *Frontiers in Oncology*, **2022**, *12*.
- [128] Kang, S.-J.; Tak, J.-H.; Cho, J.-H.; Lee, H.-J.; Jung, Y.-J. Stimulation of the Endosomal TLR Pathway Enhances Autophagy-Induced Cell Death in Radiotherapy of Breast Cancer. *Genes & Genomics*, **2010**, *32*, 599–606.
- [129] Yi, J.Y.; Jung, Y.-J.; Choi, S.S.; Hwang, J.; Chung, E. Autophagy-Mediated Anti-Tumoral Activity of Imiquimod in Caco-2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2009**, *386*, 455–458.
- [130] Cho, J.H.; Lee, H.-J.; Ko, H.-J.; Yoon, B.-I.; Choe, J.; Kim, K.-C.; Hahn, T.-W.; Han, J.A.; Choi, S.S.; Jung, Y.M.; Lee, K.-H.; Lee, Y.-S.; Jung, Y.-J. The TLR7 Agonist Imiquimod Induces Anti-Cancer Effects via Autophagic Cell Death and Enhances Anti-Tumoral and Systemic Immunity during Radiotherapy for Melanoma. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 24932–24948.
- [131] Almomen, A.; Jarboe, E.A.; Dodson, M.K.; Peterson, C.M.; Owen, S.C.; Janát-Amsbury, M.M. Imiquimod Induces Apoptosis in Human Endometrial Cancer Cells In Vitro and Prevents Tumor Progression In Vivo. *Pharmaceutical Research*, **2016**, *33*, 2209–2217.
- [132] Hoegen, B.; Hampstead, J.E.; Engelke, U.F.H.; Kulkarni, P.; Wevers, R.A.; Brunner, H.G.; Coene, K.L.M.; Gilissen, C. Application of Metabolite Set Enrichment Analysis on Untargeted Metabolomics Data Prioritises Relevant Pathways and Detects Novel Biomarkers for Inherited Metabolic Disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **2022**, *45*, 682–695.
- [133] Huang, S.-W.; Kao, J.-K.; Wu, C.-Y.; Wang, S.-T.; Lee, H.-C.; Liang, S.-M.; Chen, Y.-J.; Shieh, J.-J. Targeting Aerobic Glycolysis and HIF-1 α Expression Enhance Imiquimod-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Oncotarget*, **2014**, *5*, 1363–1381.
- [134] Xiao, J.-B.; Ma, J.-Q.; Yakefu, K.; Tursun, M. Effect of the SIRT3-AMPK/PPAR Pathway on Invasion and Migration of Cervical Cancer Cells. *Int J Clin Exp Pathol*, **2020**, *13*, 2495–2501.
- [135] Guo, H.; Ding, H.; Tang, X.; Liang, M.; Li, S.; Zhang, J.; Cao, J. Quercetin Induces Pro-apoptotic Autophagy via SIRT1/AMPK Signaling Pathway in Human Lung Cancer Cell Lines A549 and H1299 in Vitro. *Thoracic Cancer*, **2021**, *12*, 1415–1422.
- [136] Hurley, H.J.; Dewald, H.; Rothkopf, Z.S.; Singh, S.; Jenkins, F.; Deb, P.; De, S.; Barnes, B.J.; Fitzgerald-Bocarsly, P. Frontline Science: AMPK Regulates Metabolic Reprogramming Necessary for Interferon Production in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **2021**, *109*, 299–308.
- [137] You, J.; Cheng, J.; Yu, B.; Duan, C.; Peng, J. Baicalin, a Chinese Herbal Medicine, Inhibits the Proliferation and Migration of Human Non-Small Cell Lung Carcinoma

- (NSCLC) Cells, A549 and H1299, by Activating the SIRT1/AMPK Signaling Pathway. *Medical Science Monitor*, **2018**, *24*, 2126–2133.
- [138] Clarke, G.; McKernan, D.P.; Gaszner, G.; Quigley, E.M.; Cryan, J.F.; Dinan, T.G. A Distinct Profile of Tryptophan Metabolism along the Kynurenine Pathway Downstream of Toll-Like Receptor Activation in Irritable Bowel Syndrome. *Frontiers in Pharmacology*, **2012**, *3*.
- [139] Zhang, X.; Zhu, X.; Wang, C.; Zhang, H.; Cai, Z. Non-Targeted and Targeted Metabolomics Approaches to Diagnosing Lung Cancer and Predicting Patient Prognosis. *Oncotarget*, **2016**, *7*, 63437–63448.
- [140] Nguyen, D.J.M.; Theodoropoulos, G.; Li, Y.-Y.; Wu, C.; Sha, W.; Feun, L.G.; Lampidis, T.J.; Savaraj, N.; Wangpaichitr, M. Targeting the Kynurenine Pathway for the Treatment of Cisplatin-Resistant Lung Cancer. *Molecular Cancer Research*, **2020**, *18*, 105–117.
- [141] Datar, I.J.; Hauc, S.C.; Desai, S.; Gianino, N.; Henick, B.; Liu, Y.; Syrigos, K.; Rimm, D.L.; Kavathas, P.; Ferrone, S.; Schalper, K.A. Spatial Analysis and Clinical Significance of HLA Class-I and Class-II Subunit Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, **2021**, *27*, 2837–2847.
- [142] Abed, A.; Calapre, L.; Lo, J.; Correia, S.; Bowyer, S.; Chopra, A.; Watson, M.; Khattak, M.A.; Millward, M.; Gray, E.S. Prognostic Value of HLA-I Homozygosity in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Single Agent Immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **2020**, *8*, e001620.
- [143] Zachariou, V.; Duman, R.S.; Nestler, E.J. G Proteins. *Basic Neurochemistry*, **2012**, 411–422.
- [144] Fraser, C.C. G Protein-Coupled Receptor Connectivity to NF-KB in Inflammation and Cancer. *International Reviews of Immunology*, **2008**, *27*, 320–350.
- [145] Brenner, D.; Blaser, H.; Mak, T.W. Regulation of Tumour Necrosis Factor Signalling: Live or Let Die. *Nature Reviews Immunology*, **2015**, *15*, 362–374.

8. ŽIVOTOPIS

Jurica Baranašić rođen je 18. studenog 1988. u Čakovcu gdje je ujedno i završio osnovnu i srednju školu (jezična gimnazija). U veljači 2017. diplomirao je na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu s temom „Ekspresija gena za biljnu seril-tRNA-sintetazu u uvjetima stresa,, , pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec. Nakon diplome radio je kao asistent na Zavodu za biokemiju PMF-a. 2019. zaposlio kao asistent na Zavodu za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković, te je upisao doktorski studij biologije na PMF-u.

Za vrijeme trajanja dokorskog studija radio je kao suradnik na projektu „Genetički i epigenetički biomarkeri urođene imunosti u KOPBu i karcinomu pluća“ pod vodstvom naslovne doc. dr. sc. Jelene Knežević. Istovremeno je održavao Praktikum biokemije na preddiplomskom studiju kemije, te vodio studente na laboratorijskoj stručnoj praksi i pomagao studentima u izradi diplomskih radova.

Koautor je 8 znanstvenih radova objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB). Dobitnik je nagrade za najbolji znanstveni rad na 10. kongresu Hrvatskog torokalnog društva 2020., te je iste godine dobio HDBMB stipendiju za sudjelovanje na 45-tom FEBS-ovom kongresu u Ljubljani pod nazivom “Molecules of Life: Towards New Horizons”.