

Ispitivanje fenotipa stanica humanog melanoma nakon tretmana vemurafenibom

Bobić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:639282>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ivana Bobić

**ISPITIVANJE FENOTIPA STANICA
HUMANOG MELANOMA
NAKON TRETMANA VEMURAFENIBOM**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu, na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Maje Herak Bosnar i neposrednim voditeljstvom Martine Radić, mag. chem. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Zahvale

Hvala svim djelatnicima Zavoda za molekularnu medicinu, posebno Laboratorija za proteinsku dinamiku, za svu pomoć pri snalaženju u laboratoriju i ugodnu radnu atmosferu.

Posebno zahvaljujem dr. sc. Maji Herak Bosnar što mi je omogućila izradu diplomskog rada pod njenim mentorstvom. Veliko hvala njoj i Martini Radić, mag. chem. na strpljenju i vremenu koje su izdvojile za mene, na svom prenešenom znanju i vještinama te pomoći u provedbi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala i dr. sc. Maji Jazvinščak Jembrek i dr. sc. Nikolini Hanžić za svu pomoć, savjete i konstruktivne kritike tijekom rada u laboratoriju i prilikom obrade podataka.

Hvala i svim dragim ljudima na koje uvijek mogu računati, na njihovoj potpori i ljubavi; prijateljima i kolegama koji su uljepšali i upotpunili i studentski dio mog života te, najvažnije, mojim roditeljima i bratu koji su mi sam studij, i još mnogo toga, uopće omogućili.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Humani melanom.....	3
2.2. Signalni put MAPK.....	4
2.3. BRAF	4
2.4. Vemurafenib – inhibitor enzima BRAF	5
2.5. Otpornost na tretman vemurafenibom	6
2.6. Epitelno-mezenhimalna tranzicija.....	7
2.7. Obitelj gena/proteina NME/Nm23.....	9
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Kemikalije	11
3.1.2. Otopine i puferi.....	12
3.1.3. Hranjive podloge i mediji	13
3.1.4. Stanične linije.....	13
3.1.5. Inhibitori proteaza i komercijalni kompleti	13
3.1.6. Standardi, biljezi i boje	13
3.1.7. Primarna i sekundarna antitijela.....	14
3.1.8. Posuđe i ostali materijali	14
3.1.9. Uređaji	15
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Tretman stanica vemurafenibom.....	16
3.2.2. Odmrzavanje i uzgoj stanica.....	16
3.2.3. Brojanje stanica.....	18
3.2.4. Test MTT.....	18
3.2.5. Izolacija proteina iz stanica.....	20
3.2.7. Elektroforeza proteina na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata.....	21
3.2.8. Analiza Western blot	23
3.2.9. Imunocitokemijska analiza stanica	25

§ 4. REZULTATI.....	26
4.1. Promjena morfologije stanica humanog melanoma	26
4.2. Vijabilnost stanica humanog melanoma	27
<i>4.2.1. Vijabilnost stanica linije A375M.....</i>	<i>27</i>
<i>4.2.2. Vijabilnost stanica linije WM793B</i>	<i>30</i>
4.3. Ekspresija proteina u stanicama humanog melanoma	32
<i>4.3.1. Ekspresija biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije.....</i>	<i>32</i>
<i>4.3.2. Ekspresija proteina NME1 i NME2</i>	<i>33</i>
4.4. Lokalizacija proteina u stanicama humanog melanoma	34
§ 5. RASPRAVA	37
§ 6. ZAKLJUČAK	42
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	43
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	45
§ 9. ŽIVOTOPIS	XIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ISPITIVANJE FENOTIPA STANICA HUMANOG MELANOMA NAKON TRETMANA VEMURAFENIBOM

Ivana Bobić

Maligni melanom je najagresivniji i najzloćudniji oblik raka kože. U većini melanoma utvrđeno je prisustvo mutacije gena *BRAF* pa liječenje uključuje i terapiju kemoterapeuticima, vrlo često vemurafenibom, inhibitorom enzima BRAF. Međutim, stanice melanoma obično razvijaju otpornost i dugotrajnim tretmanom vemurafenibom *in vitro* stanice s tipično epitelnom morfologijom poprimaju izduženi, vretenasti oblik. Takva promjena fenotipa upućuje na indukciju procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije kojim stanice poprimaju još zloćudnija svojstva. Cilj ovog rada bio je okarakterizirati stanične linije humanog melanoma A375M i WM793B nakon višemjesečnog tretmana vemurafenibom utvrđivanjem vijabilnosti stanica, ekspresije i lokalizacije ključnih biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije te ekspresije supresora metastaziranja, NME1 i NME2. U tu svrhu korišteni su test MTT te metode *Western blot* i fluorescentna imunocitokemija.

(47 stranica, 17 slika, 4 tablice, 41 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: BRAF, epitelno-mezenhimalna tranzicija, melanom, otpornost, vemurafenib

Mentor: dr. sc. Maja Herak Bosnar, zn. savjetnica

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
 3. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 14. veljače 2019.

Ivana Bobić

Diplomski rad



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF HUMAN MELANOMA CELL PHENOTYPE AFTER VEMURAFENIB TREATMENT

Ivana Bobić

Human melanoma is the most aggressive and most malignant of all skin cancers. Most cases of melanoma harbour *BRAF* gene mutation; therefore, treatment includes chemotherapeutics, commonly vemurafenib, a BRAF enzyme inhibitor. However, melanoma cells usually develop resistance and, after long-term vemurafenib treatment, cultured cells with an epithelial-like morphology acquire a more elongated, spindle-like shape. This change indicates the induction of a process called epithelial-mesenchymal transition which prompts even more malignant behaviour. The aim of this study was to characterize human melanoma cell lines A375M and WM793B after several months of vemurafenib treatment, by determining cell viability, expression and localization of key epithelial-mesenchymal transition markers and expression of metastasis suppressors, NME1 and NME2. For that purpose, MTT assay, Western blot and fluorescent immunocytochemistry methods were used.

(47 pages, 17 figures, 4 tables, 41 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: BRAF, epithelial-mesenchymal transition, melanoma, resistance, vemurafenib

Mentor: Dr. Maja Herak Bosnar, Senior Scientist

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 2. Dr. Sanda Rončević, Associate Professor
 3. Dr. Željka Soldin, Associate Professor
- Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: 14 February 2019

Ivana Bobić

Diplomski rad

§ 1. UVOD

Melanom je zloćudni tumor kože koji nastaje malignom preobrazbom melanocita.¹ Izrazito je agresivan i velikog potencijala metastaziranja. Nastaje zbog akumuliranih mutacija kritičnih gena uključenih u vitalne signalne puteve stanice, a najvažniju ulogu u patogenezi melanoma ima signalni put proteinske kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK). Tim staničnim putem povezuju se izvanstanični signali s jezgrom čime se regulira ekspresija ciljanih gena te omogućava normalna stanična proliferacija, diferencijacija i preživljenje. Najvažnije komponente ovog signalnog puta su geni/proteini obitelji serinskih/treoninskih kinaza RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*). Mutacije u ovim genima dovode do konstitutivne aktivacije signalnog puta MAPK. Kompleksnom interakcijom velikog broja faktora, onkogenā i tumor-supresorskih proteina promovira se inhibicija apoptoze tumorskih stanica i tumorigeneza te se povećava metastatski potencijal tumora.²

Liječenje melanoma u kojem je prisutna mutacija BRAF^{V600E} (B-tip RAF kinaze, engl. *B-rapidly accelerated fibrosarcoma*) u kojoj je valin na 600.-tom mjestu aminokiselinskog slijeda zamijenjen glutaminskom kiselinom, tretira se različitim kemoterapeuticima, često vemurafenibom, specifičnim inhibitorom ove serinske/treoninske kinaze. Iako je prvotni odgovor na terapiju obećavajuć, uslijed smanjenja ili čak potpunog povlačenja tumora, neminovno se razvija otpornost na lijek.^{3,4}

Indukcija otpornosti stanica melanoma na liječenje vemurafenibom, uz razvitak sposobnosti invazije i metastaziranja, povezana je s procesom epitelno-mezenhimalne tranzicije (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT).⁵ EMT je proces u kojem stanice gube svoje epitelne karakteristike i stječu mezenhimalne osobine te drastično mijenjaju svoj oblik. Karakterizira ga gubitak stanične polarnosti, promjena regulacije različitih gena/proteina, odnosno smanjena ekspresija epitelnih biljega poput E-kadherina i keratinā, a povećana ekspresija mezenhimalnih biljega poput N-kadherina i vimentina. U normalnom se tkivu proces EMT zbiva tijekom embriogeneze i zacijeljivanja rana, a u stanicama tumora dovodi do povećane migracije stanica i metastaziranja te razvitka otpornosti na liječenje.⁶

Melanom karakterizira veliki metastatski potencijal, odnosno agresivnost i sklonost širenju u okolna tkiva. Metastaziranje je kompleksan proces koji zahtijeva koordinaciju aktivacije gena koji promoviraju metastaziranje i inhibicije gena koji ga sprječavaju. Prvi otkriveni supresor

metastaziranja bio je NME1/Nm23 (nukleozid-difosfatska kinaza 1, engl. *non-metastatic clone 23*). Opaženo je da je njegova ekspresija povezana sa statusom bolesti, odnosno da je u uznapređovalom stadiju bolesti i metastaziranju tumora ekspresija NME1 smanjena.⁷ Otkriveno je još 9 homologa koji zajedno čine obitelj gena/proteina NME/Nm23. Pored NME1 najviše je istraživani NME2/Nm23 (nukleozid-difosfatska kinaza 2, engl. *non-metastatic clone 23*) koji zajedno s NME1 sastavlja enzim nukleozid-difosfatsku kinazu (engl. *nucleoside diphosphate kinase*, NDPK) te koji, također, može djelovati kao supresor metastaziranja.⁸

Cilj ovog rada bio je okarakterizirati stanice metastatskog i primarnog humanog melanoma, A375M i WM793B, nakon njihovog višemjesečnog *in vitro* tretmana vemurafenibom. Testom MTT ispitana je vijabilnost stanica, potvrđen je razvoj otpornosti stanica na lijek te su utvrđene i uspoređene koncentracije vemurafeniba potrebne da se vijabilnost stanica smanji za 50 % (engl. *half-maximal inhibitory concentration*, IC₅₀). Metodom *Western blot* ispitana je ekspresija proteina koji su okarakterizirani kao značajni biljezi epitelno-mezenhimalne tranzicije radi utvrđivanja korelacije između tog procesa i dokazane stečene otpornosti stanica humanog melanoma na vemurafenib. Metodom *Western blot* ispitana je i ekspresija proteina NME1 i NME2 da bi se utvrdila korelacija razina ekspresije ovih gena s otpornošću na vemurafenib i procesom EMT. Promjena fenotipa tijekom procesa EMT, osim promjene ekspresije proteina, očituje se i u translokaciji i relokalizaciji nekih od biljega tog procesa, pa je njihova lokalizacija proučena metodom fluorescentne imunocitokemije.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Humani melanom

Melanom je najzloćudniji tumor u ljudi, podrijetlom iz melanocita, izrazito agresivnog ponašanja i velikog metastatskog potencijala. Melanom nastaje kao rezultat kompleksnih interakcija genetskih i okolišnih faktora. Osobe svijetle puti s pjegama, crvene ili svijetle kose, plavih očiju ili sklone opeklinama pri izlaganju suncu spadaju u najrizičniju skupinu za nastanak melanoma. Od okolišnih faktora najznačajnije je ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*, UV) zračenje, odnosno prekomjerno izlaganje UV zrakama.¹

Premda čini samo 4 % tumora kože, melanom je odgovoran za 80 % smrtnih ishoda od svih tumora kože, a samo 10 – 30 % bolesnika s metastazama preživi 5 godina.⁹ Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske, učestalost melanoma se od 1998. do 2008. povećala za 149 % kod muškaraca i 130 % kod žena, dok je, općenito, broj umrlih od ove bolesti porastao za 50 %. Najnoviji statistički podaci za 2015. godinu pokazuju kako na melanom otpada tek 3 % svih malignih tumora. Po učestalosti pojavljivanja nalazi se na 9. mjestu na ukupnom poretku malignih tumora kod muškaraca, dok je kod žena prvi put ušao među 10 najzastupljenijih tumora. U 2015. godini zabilježeno je ukupno 649 novooboljelih što je porast za više od 10 % u odnosu na prethodnu godinu – 362 muškaraca i 287 žena, s učestalošću od 17,8 odnosno 13,2 novooboljenih na 100 000 stanovnika. Međutim, unatoč niskoj pojavnosti, melanom se brzo razvija u metastatsku bolest čime postaje jedan od najagresivnijih i na liječenje najotpornijih oblika raka kože.¹⁰

Melanom nastaje iz melanocita koji su smješteni u bazalnim slojevima epidermisa kože i folikulama dlaka, mrežnici oka i ovojnicama mozga. Melanociti sintetiziraju pigment melanin koji je, zbog svoje molekularne strukture, sposoban apsorbirati UV zračenje te stoga služi kao zaštita od istog. UV zračenje aktivira signalni put MAPK koji aktivira transkripcijski faktor mikroftalmije (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*, MITF). On inducira transkripciju gena za tirozinazu koja katalizira reakciju oksidacije aminokiseline tirozin u melanin. Melanin se pakira u vezikule, melanosome, koje se prenose u okolne keratinocyte gdje se akumuliraju oko stanične jezgre i na taj način štite DNA od mutacija izazvanih zračenjem.²

Terapijski protokol liječenja melanoma ovisi o histološkom tipu melanoma, stadiju bolesti i općem zdravstvenom stanju pacijenta. Za rane stadije melanoma najvažniji pristup liječenju

je kirurško odstranjivanje tumora, dok se kod pacijenata s inoperabilnim ili metastatskim melanomom pristupa imunoterapiji (nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab) ili ciljanoj molekularnoj terapiji. Otkrićem ključnih mutacija i aktiviranih signalnih puteva koji potiču nastanak melanoma omogućuje se razvoj ciljanih terapija, tj. razvoj inhibitora komponenti signalnih puteva koji se u terapiji koriste samostalno ili u kombinaciji s imunoterapijom.³

2.2. Signalni put MAPK

Najčešće primijećene mutacije kod melanoma dio su signalnog puta proteinske kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK).¹² Signalni put MAPK aktivira se vezanjem izvanstaničnog signala na membranski receptor, najčešće receptorsku tirozinsku kinazu (engl. *receptor tyrosine kinase*, RTK). Vezanjem liganada (faktorā rasta, citokinā i hormonā) potiču se konformacijske promjene koje dovode do interakcija između receptora i njihove dimerizacije. Signal se potom u kaskadi prenosi preko enzima RAS (engl. *rat sarcoma virus homologue*) koji se aktivira vezanjem gvanozin-trifosfata (engl. *guanosine triphosphate*, GTP) te koji, potom, veže i aktivira kinaze RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) u obliku homo- ili heterodimera. Signal se dalje prenosi na MEK (kinaza proteinske kinaze aktivirane mitogenom i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom, engl. *mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase kinase*) koji fosforilira i aktivira ERK (kinaza regulirana izvanstaničnim signalom, engl. *extracellular signal-regulated kinase*) koji regulira ekspresiju genā u jezgri fosforilacijom transkripcijskih faktora i drugih proteinskih kinaza. Signalni put MAPK dodatno je aktiviran u melanomu najčešće zbog mutacija u genu *BRAF* (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) (> 50 % melanoma) i *NRAS* (engl. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) (10 – 20 %), i rijede u *MEK* (~ 8 %).²

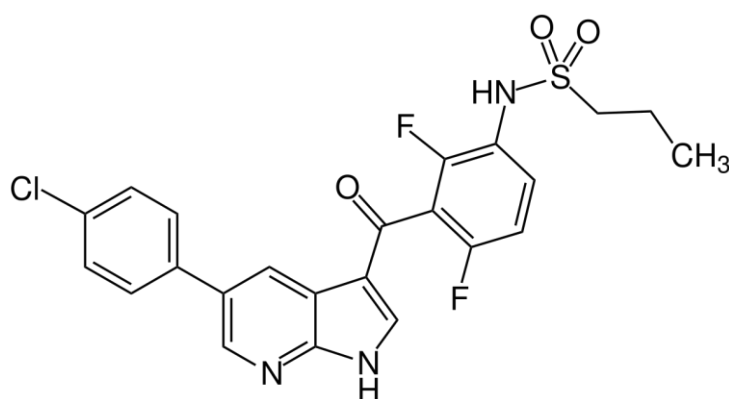
2.3. BRAF

Obitelj RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) je obitelj unutarstaničnih serinskih/treoninskih kinaza koje su ključne komponentne signalnog puta MAPK, a čine ju tri enzima – ARAF, BRAF i CRAF. Gen *BRAF* (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), koji kodira za istoimeni enzim, mutacijom postaje onkogen, tj. gen čiji je produkt sposoban transformirati normalne stanice u tumorske. Povećana sinteza mutiranog enzima dovodi do proliferacije nedovoljno diferenciranih stanica.

BRAF (engl. *B-rapidly accelerated fibrosarcoma*) sudjeluje u signalnom putu MAPK i važan je u kontroli stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Više od 40 različitih mutacija *BRAF* identificirano je kod raznih tumora poput melanoma, kolorektalnog tumora, tumora dojke i pluća. Mutacije *BRAF* javljaju se u 50 – 60 % melanoma, a do njih najčešće dolazi u kinaznoj domeni gena/proteina. Oko 70 – 95 % svih mutacija ovog gena su točkaste mutacije, a najčešća je mutacija BRAF^{V600E}, tj. transverzija nukleotida timina u adenin na mjestu 1799 gena *BRAF* koja rezultira zamjenom valina za glutaminsku kiselinu na mjestu 600 u aminokiselinskom slijedu proteina. Druge česte zamjene su zamjena valina za lizin (V600K), arginin (V600R) odnosno asparaginsku kiselinu (V600D). Takve mutacije nazivaju se aktivirajućim mutacijama jer dovode do stalnog prijenosa signala u nizvodnoj kaskadi signalnog puta MAPK čime se potiče stanična proliferacija i bez prisustva inače potrebnih liganada membranskih receptora.^{11,14}

2.4. Vemurafenib – inhibitor enzima BRAF

Razvijanjem ciljanih inhibitora omogućava se liječenje genetski okarakteriziranih tumora. Jedan od ciljanih lijekova za melanom je vemurafenib (PLX4032, RG7204), lijek kojeg je američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Association*, FDA) odobrila u kolovozu 2011. godine. Vemurafenib je inhibitor enzima BRAF koji se koristi u liječenju pacijenata oboljelih od inoperabilnog ili metastatskog melanoma u kojem je utvrđena prisutnost mutacije BRAF^{V600E}. Vemurafenib, čija je molekularna struktura prikazana na Slici 1., svojim 7-azaindolnim prstenom veže i inhibira aktivacijsku domenu enzima BRAF^{V600E}.^{3,4}



Slika 1. Molekularna struktura vemurafeniba (PLX4032, RG7204).

Inhibiranjem BRAF-a smanjuje se signal kroz signalni put MAPK čime se reducira transkripcija gena uključenih u različite signalne odgovore, te inducira apoptoza tumorskih stanica.³ Vemurafenib pokazuje veliku specifičnost i za druge mutante BRAF-a, tj. BRAF^{V600K} i BRAF^{V600D},⁴ a paradoksalno, uzrokuje nastanak tumora u mišjem modelu melanoma u kojem je prisutan samo divlji tip gena *BRAF* – vezanjem vemurafeniba na dimere RAF-a dolazi do transaktivacije jednog od monomera i povećanja njegove katalitičke aktivnosti, odnosno pojačanja signala u nizvodnoj kaskadi signalnog puta MAPK.¹⁵

2.5. Otpornost na tretman vemurafenibom

Unatoč pozitivnom odgovoru pacijenata na liječenje vemurafenibom u početnom razdoblju, brzo se uočava otpornost tumora koja uzrokuje daljnje napredovanje bolesti, odnosno sklonost metastaziranju.¹⁶ Kompleksna mreža staničnih puteva i faktora koji određuju sudbinu stanice omogućava različite mehanizme prilagodbe stanica na terapiju, odnosno više je faktora koji omogućavaju razvitak otpornosti na terapiju.

Primarna ili intrinzična otpornost prisutna je u otprilike 5 – 10 % pacijenata, a uzrokovana je, međuostalim, mutacijama enzima RAC1 (engl. *RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*) koji regulira staničnu proliferaciju i migraciju, gubitkom funkcije tumor-supresora PTEN (homolog fosfataze i tenzina, engl. *phosphatase and tensin homolog*) i neurofibromina koji inhibira aktivnost enzima RAS, povećanom ekspresijom enzima CDK4 (ciklin-ovisna kinaza 4, engl. *cyclin-dependent kinase 4*) i ciklina D1, važnih regulatora staničnog ciklusa, te povećanom ekspresijom različitih receptora i pripadajućih liganada – faktora rasta, citokina i hormona.^{4,17}

Sekundarna ili stečena otpornost javlja se u medijanu vremena od šestog do osmog mjeseca nakon početka tretmana, a uglavnom uključuje promjene u signalnom putu MAPK, odnosno uključuje njegovu ponovnu aktivaciju uslijed poremećene aktivacije gena koji kodiraju za njegove transkripcijske faktore. Unutar stanice javljaju se i aktivirajuće mutacije u RAS (NRAS, engl. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog* ili KRAS, engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) i MEK. Drugi značajni mehanizmi pojave otpornosti su amplifikacija gena *BRAF* i alternativno prekrajanje pripadne mRNA, a povećava se i razina enzima RAS, CRAF, MEK i ERK. Stečena rezistencija se također očituje u povećanom eksprimiranju membranskih receptora (RTK) poput EGFR (receptor epidermalnog faktora rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*), PDGFR- β (receptor β trombocitnog faktora rasta,

engl. *platelet-derived growth factor receptor* β) i IGF1-R (receptor faktora rasta nalik inzulinu 1, engl. *insulin-like growth factor 1 receptor*).⁴

Ipak, potvrđeno je da je proces stjecanja otpornosti stanica na vemurafenib moguće izbjeći diskontinuiranim tretmanom. Stanice nakon kontinuiranog izlaganja i tretiranja vemurafenibom postaju i otporne na vemurafenib i ovisne o vemurafenibu za daljnju proliferaciju. Po prestanku tretiranja stanica dolazi do deficita fitnesa (smanjenja sposobnosti preživljenja) stanica otpornih na vemurafenib u populaciji zbog pojačano aktiviranog signalnog puta MAPK i one se kao nepoželjne uklanjaju iz populacije, a preostaju stanice osjetljive na lijek. Tada, ponovnim tretiranjem vemurafenibom, lijek nastavlja inhibirati proliferaciju tumorskih stanica.¹²

2.6. Epitelno-mezenhimalna tranzicija

Epitelno-mezenhimalna tranzicija je složeni molekularni proces u kojem dolazi do tranzicije epitelnih stanica u mezenhimalne. Stanice tipično epitelne morfologije, koje su organizirane i izrazito diferencirane, mijenjaju oblik i postaju izdužene, gube polarnost te postaju slabije diferencirane. Mijenjaju im se i polaritet i orijentacija, a međustanične adhezijske veze se gube te stanice dobivaju na pokretljivosti. EMT je prisutna i u fiziološkim i u patofiziološkim procesima. Fiziološki procesi koji su u najvećoj mjeri posljedica EMT-a su embriogeneza (gastrulacija i organogeneza; formiranje mezoderma, neuralnog sedla i srčanih zalistaka) i popravak tkiva poput zacjeljivanja rana, dok su patofiziološki procesi uzrokovani EMT-om fibrogeneza i tumorigeneza. EMT sudjeluje i u razvoju metastatskog potencijala jer stanice s povećanom pokretljivošću stječu sposobnost invazije i migracije, a stanice koje su prošle kroz EMT pokazuju manju osjetljivost na apoptozu.^{5,6}

Članovi obitelji transformirajućih faktora rasta β (engl. *transforming growth factor* β , TGF- β), najbolje su istražene molekule koje mogu uzrokovati EMT, a najvažniji signalni putevi ovog procesa su MAPK, PI3K/AKT/mTOR i Wnt (engl. *wingless-type mammary tumor virus integration site family*).¹⁸ Tijekom samog procesa dolazi do promjene ekspresije više stotina različitih gena i proteina. Transkripcijski represori Twist, Snail, Slug i ZEB (engl. *zinc finger E-box-binding homeobox*) odgovorni su za gubitak epitelnih obilježja stanice, poput ekspresije E-kadherina i određenih citokeratina, a dovode do povećane ekspresije N-kadherina, vimentina, α -SMA (engl. *α -smooth muscle actin*), fibronektina i dr. Upravo smanjenjem ekspresije citokeratina i povećanjem ekspresije vimentina u procesu EMT dolazi do reorganizacije aktinskog citoskeleta, a sinteza proteinâ izvanstaničnog matriksa i metaloproteaza u matriksu

(engl. *matrix metalloproteinases*, MMP) dodatno doprinosi povećanju pokretljivosti i invazivnosti tumorskih stanica.^{18,19}

Najznačajniji događaj u procesu EMT je smanjena ekspresija E-kadherina čime dolazi do gubitka adherentnih veza između stanica i adhezije za bazalnu laminu.^{5,6} E-kadherin je transmembranski glikoprotein koji posreduje u staničnoj adheziji uz pomoć svoje izvanstanične domene kojom čvrsto povezuje dvije epitelne stanice, dok je unutarstaničnom domenom vezan za citoskelet preko veznih proteina u kateninskom kompleksu. Otpuštanjem membranskog E-kadherina narušava se međustanična adhezija i adhezija stanica za bazalnu membranu epidermisa kože čime stanice postaju pokretljivije. Uz gubitak ekspresije E-kadherina istovremeno dolazi do povećane ekspresije N-kadherina. Prolaskom kroz EMT stanice sintetiziraju N-kadherin što im olakšava invaziju u dermalnu stromu zbog većeg afiniteta mezenhimalnih stanica za N-kadherin na površini stanica poput fibroblasta i drugih stromalnih stanica. Takve međustanične veze su mnogo slabije, odnosno stanicama je povećana pokretljivost, pa N-kadherin promiče migraciju, invazivnost i metastaziranje.^{19,20}

Drugi važan molekularni događaj uključen u EMT je translokacija β -katenina u jezgru.⁶ β -katenin je središnja molekula signalnog puta Wnt. Kad je signalni put Wnt inaktivan, β -katenin stvara degradacijske komplekse s proteinima u citoplazmi – aksinom, proteinom APC (engl. *adenomatous polyposis coli*), kinazom 3 β glikogenske sintaze (engl. *glycogen syntase kinase 3 β* , GSK3 β) i kazeinskom kinazom 1 (engl. *casein kinase 1*, CK1), te se konstantno ubikvitinizira i razgrađuje. Aktivacijom puta, degradacijski kompleks disocira, a β -katenin se stabilizira i nakuplja u jezgri. β -katenin je i transkripcijski kofaktor – interagira s članovima obitelji proteina koji se vežu za DNA, tj. transkripcijskim faktorima TCF/LEF (engl. *T-cell factor / lymphoid enhancer binding factor*) i tako promovira preoblikovanje kromatina te inicijaciju i elongaciju transkripcije ciljanih gena.^{20,21} Stabilizacija i nakupljanje β -katenina u jezgri može povećati ekspresiju transkripcijskih represora Twist, Slug i Snail koji se mogu vezati na promotorsku regiju gena koji kodira za E-kadherin i potisnuti njegovu ekspresiju, čime se oslabljuju međustanični spojevi i nadalje potiče proces EMT.^{5,6}

Vimentin je član obitelji intermedijarnih filamenata koji se eksprimira u fibroblastima, endotelnim stanicama, stanicama hematopoetske linije i stanicama glija te je jedan od važnijih citoskeletnih biljega mezenhimalnih stanica.¹⁹ Uz aktinske mikrofilamente i mikrotubule, vimentin čini komponente citoskeleta koje su zadužene za kontrakciju i migraciju stanice. Povećanom ekspresijom vimentina i stabilizacijom fosforilacijom uz pomoć proteinske kinaze

AKT, enzima signalnog puta PI3K/AKT/mTOR, potiče se pokretljivost i širenje stanica u okolna tkiva.²² Osim kao dijagnostički biljeg bolesti, vimentin može poslužiti i kao prognostički biljeg metastaziranja tumora.²³

Fibronektin je esencijalna komponenta izvanstaničnog matriksa, a njegova prekomjerna ekspresija obilježje je procesa EMT.^{6,19} Fibronektin povezuje kolagenska vlakna s integrinima na površini stanica, a inducira modifikacije citoskeleta omogućavajući migraciju stanica koja je važna u procesima embriogeneze i angiogeneze te fibroze i cijeljenja rana. U normalnim humanim tkivima gotovo se ne može detektirati te bi zato mogao biti dobra meta novih lijekova za tumore s izraženim metastatskim potencijalom.²⁴ Ekspresija fibronektina regulirana je signalnim putem MAPK – konstitutivno aktivirani put MAPK, uzrokovan mutacijom BRAF^{V600E}, dovodi do prekomjerne ekspresije fibronektina.²⁵

2.7. Obitelj gena/proteina NME/Nm23

Obitelj gena *NME* u ljudi čine 10 članova, poznatih i kao *nm23* (engl. *non-metastatic clone 23*), koji se povezuju sa supresijom metastaziranja tumora i invazije lokalnog tkiva. Proteinski produkti ovih gena su nukleozid-difosfatske kinaze NME/NDPK (engl. *nucleoside diphosphate kinase*) koje kataliziraju reakciju prijenosa terminalne fosfatne skupine s (deoksi)nukleozid-trifosfata (engl. *(deoxy)nucleoside triphosphate*, (d)NTP) (najčešće adenozin-trifosfata) na (deoksi)nukleozid-difosfat (engl. *(deoxy)nucleoside diphosphate*, (d)NDP). Na temelju filogenetskih analiza, struktura eksonā i intronā te prisutnosti/odsutnosti specifičnih domena, članovi obitelji NME/Nm23 čovjeka podijeljeni su u dvije skupine. Prva skupina obuhvaća gene/proteine NME1 – NME4 koji imaju enzimatsku aktivnost, dok druga skupina NME5 – NME10 obuhvaća gene/proteine uglavnom bez enzimatske aktivnosti.⁸

Najbolje istraženi geni ove obitelji su *NME1* i *NME2*. Gen *NME1* otkriven je 1988. godine kao prvi supresor metastaziranja,⁷ a kodira za podjedinicu A enzima NDPK.⁸ *NME2* otkriven je nekoliko godina kasnije,²⁶ kao homolog *NME1* s kojim se podudara u 88 % aminokiselinskog slijeda, a koji kodira za podjedinicu B enzima NDPK.⁸ Oba proteina sadrže aktivnu domenu koja katalizira reakciju prijenosa fosfatne skupine s dNTP na dNDP. U stanici se slažu u obliku homo- ili heteroheksamera i tvore aktivan enzim, nukleozid-difosfatsku kinazu koja regulira količinu nukleotida u stanici. Proteini pokazuju i histidin-kinaznu i 3'–5' egzonukleaznu aktivnost te tako sudjeluju i u procesima razvoja, diferencijacije, proliferacije, endocitoze, apoptoze, popravka DNA i regulacije transkripcije u stanici.²⁷

Steege i sur. otkrili su da je razina mRNA gena *NME1* povećana 10 puta u klonovima stanične linije melanoma s malim metastatskim potencijalom u usporedbi s klonovima s velikim metastatskim potencijalom.⁷ Leone i sur. dokazali su njegovu ulogu metastatskog supresora; prolaznom transfekcijom *NME1* u stanicama melanoma došlo je do smanjenja incidencije stvaranja primarnog tumora i do značajnog smanjenja metastatskog potencijala tumora.²⁸ Nadalje, Xerri i sur. pokazali su da su pacijenti s dužim vremenom preživljenja imali povećanu ekspresiju *NME1* u metastatskom tkivu te da se metastaze s povećanom ekspresijom mRNA gena *NME1* javljaju kasnije tijekom bolesti.²⁹ Smatra se da je ekspresija *NME1* povezana s indukcijom procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije – *knockout* gena *NME1* dovodi do aktivacije EMT-a, odnosno njegovom stabilnom ili povećanom ekspresijom povećava se razina E-kadherina te dolazi do smanjenja invazije tumora.³⁰ Utišavanje gena *NME1* također rezultira narušenim međustaničnim adhezijama te dolazi do translokacije β -katenina u jezgru i aktivacije faktora TCF/LEF, a stanicama se povećava pokretljivost te dolazi do širenja kroz izvanstanični matriks povećanom sintezom enzima MMP što upućuje na djelomičan prolazak stanica kroz proces EMT.³¹

NME2 je također povezan s tumorigenezom, a smatra se da sudjeluje u regulaciji transkripcije, staničnoj proliferaciji, apoptozi, diferencijaciji i telomeraznoj aktivnosti. Kao i *NME1*, posjeduje aktivnost supresora metastaziranja, a povezuje se s razvojem i širenjem raka jetre, maternice, dojke i pluća te sarkoma i leukemije.³²

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Akrilamid (Sigma-Aldrich, SAD)

Amonijev persulfat ($[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$) (engl. *ammonium persulfate*, APS) (Sigma-Aldrich, SAD)

Bisakrilamid (Sigma-Aldrich, SAD)

Bromfenolno plavilo (Sigma-Aldrich, SAD)

Deionizirana voda pripravljena korištenjem uređaja *Milli Q* (qH_2O)

Destilirana voda (deH_2O)

Dimetil-sulfoksid ($[\text{CH}_3]_2\text{SO}$) (DMSO) (Kemika, Hrvatska)

Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Kemika, Hrvatska)

Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) (Kemika, Hrvatska)

Formaldehid (CH_2O) (Kemika, Hrvatska)

Glicin (Kemika, Hrvatska)

Kalijev klorid (KCl) (Kemika, Hrvatska)

Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Kemika, Hrvatska)

L-glutamin (Sigma-Aldrich, SAD)

Metanol (CH_3OH) (Kemika, Hrvatska)

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid) (Chemicon, SAD)

Naftol-modriilo (Kemika, Hrvatska)

Natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) (Sigma-Aldrich, SAD)

Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Kemika, Hrvatska)

Natrijev klorid (NaCl) (Kemika, Hrvatska)

Natrijev piruvat ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$) (Gibco, SAD)

Obrano mlijeko u prahu (Dukat, Hrvatska)

Octena kiselina (CH_3COOH) (Kemika, Hrvatska)

Serum fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Gibco, SAD)

Streptomycin (Gibco, SAD)

TEMED (*N, N, N', N'*-tetrametiletilendiamin) (Sigma-Aldrich, SAD)

Tripsin (Sigma-Aldrich, SAD)

Tris-baza (tris[hidroksimetil]aminometan) (Sigma-Aldrich, SAD)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD)

Tween-20 (Sigma-Aldrich, SAD)

Vemurafenib (PLX4032, RG7204) (#S1267) (Selleck Chemicals, SAD)

3.1.2. Otopine i puferi

- Otopina tripsina za odljepljivanje stanica: 0,25 % (w/v) tripsin; 1 mmol dm⁻³ EDTA
- Fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*, PBS): pH = 7,4; γ (NaCl) = 8 g dm⁻³; γ (KCl) = 0,2 g dm⁻³; γ (Na₂HPO₄) = 1,44 g dm⁻³; γ (KH₂PO₄) = 0,24 g dm⁻³; deH₂O
- Fosfatni pufer za izolaciju proteina (engl. *Dulbecco's phosphate buffered saline*, DPBS) (Sigma-Aldrich, UK)
- Matična otopina akrilamid/bisakrilamid (engl. *acrylamide/bisacrylamide stock*, AAS): 29,2 % (w/v) akrilamid, 0,8 % (w/v) bisakrilamid
- Pufer za pripravu gela za razdvajanje: pH = 8,8; 1,5 mol dm⁻³ Tris; deH₂O
- Pufer za pripravu gela za sabijanje: pH = 6,8; 1 mol dm⁻³ Tris; deH₂O
- 10× pufer za elektroforezu: 0,025 mol dm⁻³ Tris; 0,192 mol dm⁻³ glicin; 0,1 % (w/v) SDS; deH₂O
- 4× pufer za nanošenje uzoraka na gel (engl. *Laemmli buffer*, LB): pH = 6,8; 0,2 mol dm⁻³ Tris-HCl; 0,4 mol dm⁻³ DTT (ditiotritol); 8 % (w/v) SDS; 40 % (w/v) glicerol; 0,001 % (w/v) bromfenolno plavilo
- 10× pufer za prijenos proteina (engl. *transfer buffer*, TB): 184 mmol dm⁻³ Tris, 140 mmol dm⁻³ glicin, deH₂O
- Pufer za prijenos proteina: 10 % (v/v) 10× TB, 20 % (v/v) metanol, 70 % (v/v) deH₂O
- Otopina za bojanje membrane: γ (naftol-modrilo) = 1 g dm⁻³, 10 % (v/v) metanol, 2 % (v/v) octena kiselina, deH₂O
- Otopina za odbojavanje membrane: 40 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) octena kiselina, deH₂O
- 10× pufer TBST (engl. *Tris buffered saline+Tween-20*): 150 mmol dm⁻³ NaCl; 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl; 0,1 % (v/v) Tween-20; deH₂O
- Pufer za blokiranje membrane: 5 % (w/v) obrano mlijeko u prahu otopljeno u puferu 1× TBST

3.1.3. Hranjive podloge i mediji

- Kompletirana tekuća hranjiva podloga: RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) (Lonza, Belgija), 10 % (v/v) FBS, 2 mmol dm⁻³ L-glutamin, 1 mmol dm⁻³ natrijev piruvat, 100 U cm⁻³ penicilin, 100 µg cm⁻³ streptomycin
- Krioprotektivna hranjiva podloga za zamrzavanje stanica: 45 % (v/v) RPMI 1640, 45 % (v/v) FBS, 10 % (v/v) DMSO
- Medij za uklapanje stanica za mikroskopiranje: reagens protiv izbljeđivanja i 0,015 mol dm⁻³ natrijev azid (Dako, SAD)

3.1.4. Stanične linije

- Stanična linija A375M, stanice metastatskog humanog melanoma (ATCC® CRL_1619™)
- Stanična linija WM793B, stanice primarnog humanog melanoma (ATCC® CRL_2806™)

3.1.5. Inhibitori proteaza i komercijalni kompleti

- Inhibitori proteaza *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, Švicarska)
- Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*: BCA reagens A (natrijev karbonat, natrijev bikarbonat, bikinkonična kiselina, natrijev tartarat; 0,1 mol dm⁻³ NaOH), BCA reagens B (4 % (w/v) bakrov sulfat) (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Komercijalni komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom *Western Lightning® Plus-ECL* (PerkinElmer, Nizozemska)

3.1.6. Standardi, biljezi i boje

- Standardi za određivanje koncentracije proteina: otopine proteina albumina iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg cm⁻³
- Biljezi za određivanje molekularne mase proteina, raspona 10 – 250 kDa, *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BioRad, SAD)

- Otopina tripanskog modrila za brojanje stanica: 0,03 % (w/v) tripansko modrilo, 1 mmol dm⁻³ PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid, engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*), 1 mg cm⁻³ BSA, sterilna qH₂O
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*), $c = 300 \text{ nmol dm}^{-3}$ (Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.7. Primarna i sekundarna antitijela

- Primarno monoklonsko antitijelo iz miša anti- β -aktin (#60008-1-Ig), $\gamma = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ (Proteintech, SAD)
- Primarno monoklonsko antitijelo iz miša anti- β -katenin (#C7207) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Primarno monoklonsko antitijelo iz miša anti-E-kadherin (G-10) (#sc-8426), $\gamma = 200 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ (Santa Cruz Biotechnology, SAD)
- Primarno monoklonsko antitijelo iz miša anti-fibronektin (EP5) (#sc-8422), $\gamma = 200 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ (Santa Cruz Biotechnology, SAD)
- Primarno monoklonsko antitijelo iz miša anti-N-kadherin (#610920), $\gamma = 250 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ (BD Biosciences, SAD)
- Primarno monoklonalno antitijelo iz miša anti-vimentin (RV202) (#sc-32322), $\gamma = 200 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ (Santa Cruz Biotechnology, SAD)
- Primarno poliklonsko antitijelo iz kunića anti-NME1/NME2, afinitetno pročišćeno, proizvedeno u suradnji I. Lascu, M. Herak Bosnar i S. Volarević
- Sekundarno poliklonsko anti-mišje antitijelo iz kunića konjugirano s fluoroforom FITC (fluorescein izotiocijanat, engl. *fluorescein isothiocyanate*) (#ab6724), $\gamma = 2 \text{ mg cm}^{-3}$ (Abcam, Austrija)
- Sekundarno anti-mišje antitijelo iz ovce konjugirano s peroksidazom iz hrena (#NA931) (Amersham™ ECL™, GE Healthcare, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Sekundarno anti-zečje antitijelo iz kože konjugirano s peroksidazom iz hrena (#7074) (Cell Signaling Technology, Njemačka)

3.1.8. Posude i ostali materijali

- Krio-tubice volumena 2 mL *Cryo.S™* (Greiner Bio-One, Njemačka)
- Petrijeve zdjelice promjera 60 mm i 100 mm (Falcon®, Corning Incorporated, SAD)

- Plastične epruvete volumena 15 mL (Falcon®, Corning Incorporated, SAD)
- Mikrotitarske pločice s 96 bunarića (Falcon®, Corning Incorporated, SAD)
- Predmetno stakalce s osam bunarića, s odvojivim silikonskim pregradama (Ibidi GmbH, Njemačka)
- Pločica za brojanje stanica *Neubauer*, površine 0,0025 mm³ (Blaubrand, Brand, Njemačka)
- Nitrocelulozna membrana za prijenos proteina *Protran BA 85*, veličine pora 0,2 µm (Whatman™, GE Healthcare, Ujedinjeno Kraljevstvo)

3.1.9. Uređaji

Centrifuga *Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital* (MSE, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Centrifuga, tip *5414 R* (Eppendorf, Njemačka)

Inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija)

Invertni mikroskop *Wilovert S* (Hund Wetzlar, Njemačka)

Kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija)

Kružna miješalica *Gyro-rocker SSL3* (Stuart®, Cole-Parmer Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)

Laserski pretražni konfokalni mikroskop *Leica SP8 X FLIM* (Leica, Njemačka)

Magnetska miješalica *MSH Basic* (Ika, Njemačka)

Spektrofotometar za mikrotitarske pločice *ELISA* (Multiscan MS Labsystems, Finska)

Sustav za elektroforezu *Mini-Protean II* (BioRad, SAD)

Sustav za prijenos proteina *Mini Trans-Blot* (BioRad, SAD)

Termoblok *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Njemačka)

Tresilica za mikrotitarske pločice, tip *715* (Asal, Italija)

Ultrazvučna sonda *Labsonic® M*, promjera 1 mm (Montreal Biotech, Kanada)

Uređaj za napajanje *Power Pac Basic Power Supply* (BioRad, SAD)

Uređaj za vizualizaciju i oslikavanje *Alliance 4.7* (UVItec, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Vaga, tip *PM 4000* (Mettler Toledo, SAD)

Vodena kupelj za mikrotitarske pločice, tip *1083* (GFL, Njemačka)

Zibalica *PMR-30 Rocker-Shaker* (Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo)

3.2. Metode

3.2.1. *Tretman stanica vemurafenibom*

U radu se koriste dvije stanične linije dobivene ljubaznošću dr. sc. Danielea Bergamaschija (Blizard Institute, London, Ujedinjeno Kraljevstvo); A375M, stanice metastatskog humanog melanoma, i WM793B, stanice primarnog humanog melanoma, osjetljive na vemurafenib, koje služe kao kontrolne stanice, a čije su karakteristike opisane u Tablici 1.

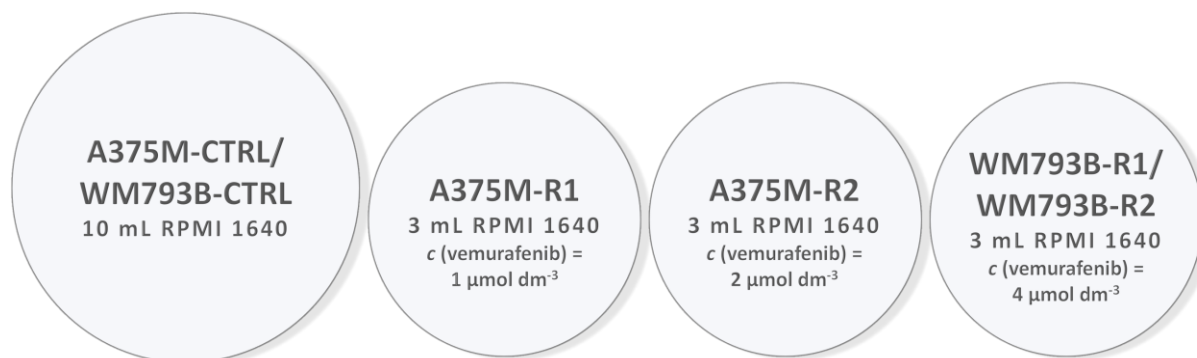
Tablica 1. Karakteristike staničnih linija humanog melanoma A375M i WM793B.

	A375M	WM793B
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	koža	koža
Format proizvoda	smrznuto	smrznuto
Morfologija	epitelna	epitelna
Obilježja kulture	adherentna	adherentna
Bolest	metastatski melanom	primarni melanom
Spol	ženski	muški
Dob	54 godine	37 godina

Također, koriste se generirane stanične linije otporne na vemurafenib. Dvije sublinije A375M otporne na vemurafenib razvijene su uzgajanjem osjetljive stanične linije A375M (u daljnjem tekstu: A375M-CTRL) u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom konačne koncentracije $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tijekom tri mjeseca odnosno $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tijekom osam mjeseci (u daljnjem tekstu: A375M-R1 odnosno A375M-R2). Također, tijekom tri odnosno osam mjeseci, razvijene su dvije sublinije WM793B otporne na vemurafenib uzgajanjem osjetljive stanične linije WM793B (u daljnjem tekstu: WM793B-CTRL) u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom konačne koncentracije $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (u daljnjem tekstu: WM793B-R1 odnosno WM793B-R2).

3.2.2. *Odmrzavanje i uzgoj stanica*

Stanične linije A375M i WM793B rastu u sterilnim plastičnim posudama, Petrijevim zdjelicama, u inkubatoru za uzgoj stanica pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i u atmosferi s 5 % CO_2 , zasićenoj vlagom. Sav rad sa stanicama ograničen je u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima radi sprječavanja zagađenja, uz korištenje sterilnog laboratorijskog pribora te sterilnih otopina i pufera. Stanice se uzgajaju u određenom volumenu kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640, uz dodatak vemurafeniba različitih konačnih koncentracija (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz uvjeta uzgajanja staničnih linija humanog melanoma A375M i WM793B, osjetljivih i otpornih na vemurafenib.

Tijekom uzgoja stanica, prije svake zamjene hranjive podloge svježom, presađivanja stanica i priprema stanica za eksperiment potrebno je RPMI 1640, tripsin i PBS zagrijati u vodenoj kupelji na 37 °C. Krio-tubice sa smrznutim stanicama, pohranjene na –80 °C, potrebno je ugrijati tek toliko da se zaleđena smjesa odvoji od stijenki, a sadržaj se potom prenese u staklenu epruvetu s 5 mL tekuće hranjive podloge RPMI 1640, uz dodatak vemurafeniba različitih konačnih koncentracija. Koristi se *stock* otopina koncentracije 10 mmol dm⁻³ pripremljena otapanjem praha vemurafeniba u DMSO. Sadržaj u epruvetama se centrifugira pet minuta na 1200×g, pri 4 °C (*Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital*, MSE), a supernatant se baci kako bi se uklonio DMSO koji je na sobnoj temperaturi štetan za stanice. Talog stanica se resuspendira u tekućoj hranjivoj podlozi RPMI 1640, uz dodatak vemurafeniba različitih konačnih koncentracija, i prebaci u odgovarajuću Petrijevu zdjelicu.

Stanice rastu u jednom sloju, a hranjiva podloga zamjenjuje se svježom svakih dva do tri dana, uz ispiranje stanica u PBS-u. Stanice se rasađuju pri 90 % konfluentnosti, što se kontrolira invertnim mikroskopom (*Wilovert S*, Hund Wetzlar). Najprije se odsiše hranjiva podloga i stanice isperu PBS-om, a potom se doda 0,5 – 1 mL tripsina i inkubira stanice na 37 °C, do tri minute, radi odvajanja stanica od podloge. Nakon inkubacije, tripsin se inaktivira dodavanjem tekuće hranjive podloge, uz dodatak vemurafeniba različitih konačnih koncentracija. Sadržaj se dobro resuspendira i presađuje u nove Petrijeve zdjelice.

Za dugotrajno čuvanje, postupkom krioprezervacije, stanice je potrebno isprati i odlijepiti od podloge, prebaciti u staklenu epruvetu i centrifugirati pri 4 °C na 1200×g tijekom pet minuta. Stanični talozi se resuspendiraju u krioprotektivnoj hranjivoj podlozi za zamrzavanje stanica i prebace u krio-tubice te spreme, najprije na –20 °C, potom na –80 °C, a na kraju, za dugotrajnu pohranu, na –196 °C.

3.2.3. Brojanje stanica

Kako bi rezultati eksperimenata bili kvalitetni i reproducibilni, definiran je točan broj stanica za svaki eksperiment pa je zato prije izvođenja pokusa potrebno utvrditi broj stanica u staničnoj suspenziji.

Dvadeset mikrolitara stanične suspenzije pomiješa se s 80 μL otopine tripanskog modrila i dobro resuspendira. Otopina tripanskog modrila oboji mrtve stanice jer se nakuplja u stanicama s oštećenom membranom, dok kod živih stanica s intaktnom membranom stanične pumpe izbacuju boju izvan stanice i one ostaju neobojene. Resuspendirane stanice u tripanskom modrilu nanose se na pločicu za brojanje stanica (*Neubauer*, *Blaubrand*) ispod pokrovnog stakalca i na invertnom mikroskopu (*Wilovert S*, *Hund Wetzlar*) izbroje se stanice u ukupno 64 polja. Broj stanica u jednom mililitru izračunava se prema formuli:

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

(broj izbrojanih kvadranata od 16 kvadratića = 4; faktor razrjeđenja = 5)

3.2.4. Test MTT

Test MTT kolorimetrijska je metoda za kvantitativnu procjenu stanične vijabilnosti nakon tretmana stanica kemijskim agensima određivanjem postotka preživljenja stanica. MTT je u vodi topljiva žuta tetrazolijeva sol (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid) koju mitohondrijski enzim sukcinat-dehidrogenaza živih stanica reducira u ljubičaste kristale formazana. Kristali formazana nisu topljivi u mediju u kojem nastaju, već u DMSO koji se naknadno dodaje. Spektrofotometrijski se mjere apsorbancije otopina, pri 570 nm, koje su razmjerne broju živih, metabolički aktivnih stanica.

Na pločice s 96 bunarića nasade se stanice linija A375M i WM793B, i osjetljive i otporne na vemurafenib, gustoće $2,5 \times 10^4$ stanica mL^{-1} , uz iznimku A375M-CTRL koje se nasaduju u gustoći od 2×10^4 stanica mL^{-1} , u ukupnom volumenu od 100 μL . Tijekom 24 sata u inkubatoru, stanice se prilijepe za površinu pločica, a potom se iz bunarića ukloni medij i u svaki doda po 200 μL tekuće hranjive podloge, s vemurafenibom u određenim koncentracijama (Slika 3). Svaka koncentracija ispitana je u kvadriplikatu. Stanice se ostave u tretmanu tijekom 72 sata te se tada iz bunarića ukloni medij i doda po 40 μL otopine $1 \times$ MTT ($c = 0,5 \mu\text{g mm}^{-3}$). Nakon trosatne inkubacije pločica pri 37 °C u bunariće se doda po 170 μL DMSO i pločice se potom stave na tresilicu za mikrotitarske pločice (Tresilica tip 715, Asal) na pet minuta pri 600 rpm.

Osim na stanice, otopinu MTT-a i DMSO-a potrebno je dodati u osam dodatnih bunarića kako bi se izmjerila apsorbancija slijepe probe. Netretirane stanice koje su rasle samo u hranjivoj podlozi tijekom tretmana predstavljaju negativnu kontrolu. Apsorbancije otopina mjere se pri 570 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (*ELISA*, Multiscan MS Labsystems).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OSJETLJIVE STANICE	A												
	B	Prazni bunarići	Netretirane stanice	$0,001 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,005 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,01 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,05 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$1 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$5 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$10 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$50 \mu\text{mol dm}^{-3}$
	C												
	D												
OTPORNE STANICE	E												
	F	Prazni bunarići	Netretirane stanice	$0,001 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,01 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$1 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$2 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$5 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$10 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$20 \mu\text{mol dm}^{-3}$	$50 \mu\text{mol dm}^{-3}$
	G												
	H												

Slika 3. Shematski prikaz rasporeda stanica linija A375M i WM793B na mikrotitarskoj pločici s 96 bunarića za test MTT. Označene su koncentracije tretmana vemurafeniba analiziranih u kvadriplikatu.

Kako bi se odredila letalna doza u kojoj 50 % stanica umire (engl. *half-maximal inhibitory concentration*, IC_{50}), prvo je potrebno izračunati postotak preživljenja stanica na temelju srednjih vrijednosti kvadriplikata očitanih apsorbancija tretiranih i kontrolnih stanica, prema formuli:

$$\text{preživljenje (\%)} = \frac{\text{apsorbancija stanica tretiranih vemurafenibom}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica}} \times 100$$

Dobiveni podaci obrađuju se u programu *GraphPad Prism 8.0*.

3.2.5. Izolacija proteina iz stanica

Od svake stanične linije uzgajane u istim koncentracijama vemurafeniba, odabrane su po dvije koje su narasle do oko 90 % konfluentnosti u Petrijevim zdjelicama. Medij se iz Petrijevih zdjelica jednostavno ukloni, a same zdjelice potrebno je odmah smjestiti na led. Stanicama se tada doda po 5 mL PBS-a i mehanički se ih sastruže pomoću sterilne strugalice, a sadržaj prebaci u Falcon® epruvetu volumena 15 mL. Postupak je potrebno ponoviti kako bi se što više stanica prenijelo u epruvetu. Sadržaj u epruvetama centrifugira se pet minuta na 1500×g pri 4 °C (*Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital*, MSE) kako bi se stanice oslobodile medija. Supernatant se odbaci, a talog stanica pohranjuje na –80 °C ili resuspendira za izolaciju proteina.

Kako bi se izolirali ukupni proteini iz taloga stanica, stanice je prvo potrebno resuspendirati u DPBS-u u koji su prethodno dodani inhibitori proteaza. Nakon resuspendiranja, sadržaj se prebaci u epruvete volumena 1,5 mL, a zatim se stanice soniciraju kako bi se pomoću ultrazvučnih valova oslobodio stanični sadržaj uslijed narušavanja integriteta staničnih membrana. Ultrazvučnu sondu promjera 1 mm (*Labsonic® M*, Montreal Biotech) potrebno je isprati etanolom radi sterilizacije, a potom i s deH₂O. Stanična suspenzija sonicira se tri puta po 10 sekundi pri amplitudi od 60 Hz, uz razmak od 10 sekundi između svakog soniciranja. Pritom epruvetu držimo na ledu kako bi se dodatno smanjila mogućnost razgradnje proteina uslijed oslobađanja topline tijekom soniciranja. Uzorci staničnih lizata kratko se vorteksiraju i drže na ledu.

3.2.6. Određivanje ukupne koncentracije staničnih proteina i priprema uzoraka za elektroforezu

Za određivanje ukupne koncentracije proteina koristi se komercijalni komplet koji koristi metodu koja se bazira na redukciji Cu²⁺ u Cu⁺ u bazičnim uvjetima s veoma osjetljivom i selektivnom detekcijom nastalih Cu⁺ iona pomoću reagensa bikinkonične kiseline (engl. *bicinchoninic acid*, BCA). U prvom koraku reakcije dolazi do kelacije bakra i proteina uz nastanak svijetloplavog kompleksa, a u drugom koraku BCA reagira s nastalim reduciranim ionima bakra. Pritom se stvara ljubičasto obojenje kao rezultat formiranja kelata između iona bakra i dvije molekule BCA. Apsorbancije otopina mjere se pri 570 nm, a proporcionalne su koncentracijama proteina u uzorku.

Na mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića nanosi se po 20 μL otopina standardā albumina iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 $\mu\text{g cm}^{-3}$, zatim 20 μL qH₂O kao slijepe probe i duplikati razrijeđenih otopina uzoraka staničnih lizata (2 μL uzorka s 18 μL qH₂O). U svaki se bunarić, potom, doda 200 μL reagensa za određivanje koncentracije koji se priredi prema uputama proizvođača (miješanjem otopina A i B u omjeru 50:1). Pločicu je potrebno kratko protresti na tresilici (Tresilica tip 715, Asal), a zatim je pokrivenu inkubirati u vodenoj kupelji (Vodena kupelj tip 1083, GFL) 30 minuta, pri 37 °C. Nakon inkubacije pločica se ohladi i očitava se apsorbancija pri 570 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (ELISA, Multiscan MS Labsystems). Iz očitanih apsorbancija otopina standardā izradi se baždarni pravac, a iz pripadne jednadžbe pravca izračuna se koncentracija ukupnih proteina u lizatu svake stanične linije.

Na gel se nanosi po 20 μg ukupnih proteina. Prije nanošenja na gel, uzorcima je potrebno dodati pufer za nanošenje uzoraka na gel (engl. *Laemmli buffer*, LB), konačnog udjela 25 % (v/v), koji u sebi sadrži boju kako bi se omogućilo vizualno praćenje fronte uzoraka, tj. napretka elektroforeze. Pripremljena smjesa se grije pet minuta pri 95 °C na termobloku (*Thermomixer Comfort*, Eppendorf) radi pospješivanja denaturacije, a potom se smjesa kratko vorteksira i centrifugira (Centrifuga tip 5414 R, Eppendorf).

3.2.7. Elektroforeza proteina na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata

SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) je brza i osjetljiva metoda pročišćavanja i odjeljivanja proteina pomoću električnog polja. Izvodi se pri denaturirajućim uvjetima i proteini se odjeljuju uglavnom na osnovi mase.

Natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS), prisutan u puferu LB za nanošenje uzoraka na gel te u gelu za sabijanje i razdvajanje, anionski je deterdžent koji se veže na hidrofobne dijelove proteina te dovodi do odmatanja proteina i razdvajanja oligomernih proteina na pojedinačne polipeptidne lance. Anioni SDS-a poništavaju endogene naboje proteina tako što se ravnomjerno vežu na glavne lance proteina i daju im jednak površinski negativan naboj. Zato svi nastali kompleksi SDS-a i denaturiranih proteina u uzorku imaju jednak omjer mase i naboja i kreću se kroz gel u električnom polju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, s time da se najbrže kreću oni s relativno manjom molekulskom masom.

Za provedbu SDS-PAGE koristi se sustav diskontinuirane elektroforeze čiji se poliakrilamidni gel sastoji od dva dijela – gornjeg gela za sabijanje uzoraka i donjeg gela za razdvajanje proteina. Da bi se razdvojili proteini biljezi procesa EMT potrebno je pripremiti dva donja gela, 7 %-tni za razdvajanje proteina velikih molekulskih masa (fibronektin i β -katenin) i 10 %-tni za razdvajanje proteina manjih molekulskih masa (N-kadherin i vimentin). Za razdvajanje proteina NME1 i NME2 potrebno je pripremiti jedan 15 %-tni gel. Gornji, 5 %-tni gel za sabijanje je isti kod svih elektroforeza, a od gela za razdvajanje razlikuje se po sastavu i vrijednosti pH. Gel za sabijanje je rjeđi i nižeg pH, a služi za poravnavanje uzoraka, tj. omogućava istovremeni ulazak svih uzoraka u gel za razdvajanje, koji je gušći i višeg pH. Volumeni potrebnih otopina za izradu pojedinih gelova ukupne veličine gela 10×7 cm prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav smjesa za gelove za sabijanje i razdvajanje.

	Gel za sabijanje, 5 %-tni	Gel za razdvajanje, 7 %-tni	Gel za razdvajanje, 10 %-tni	Gel za razdvajanje, 15 %-tni
Sastojak	Volumen / mL	Volumen / mL	Volumen / mL	Volumen / mL
deH ₂ O	2,7	4,95	4,3	2,3
AAS	0,67	2,35	3,0	5,0
1,5 mol dm ⁻³ Tris (pH=8,8)	-	2,5	2,5	2,5
1,5 mol dm ⁻³ Tris (pH=6,8)	0,5	-	-	-
10 % (w/v) SDS	0,4	0,1	0,1	0,1
10 % (w/v) APS*	0,4	0,1	0,1	0,1
TEMED*	0,004	0,007	0,005	0,004

*dodaju se neposredno prije izlivanja

Za izradu gelova koriste se stakalca za elektroforezu na gelu s razmaknicom od 1,5 mm i pokrovna stakalca koja se postave na nosače. U njih se prvo ulijeva smjesa za gel za razdvajanje koja se nadsvodi destiliranom vodom radi sprječavanja kontakta s kisikom koji bi inače inhibirao polimerizaciju i radi izbjegavanja formiranja meniskusa na gornjem rubu gela. Nakon njegove polimerizacije, voda se ukloni i potom se među stakalca izlije smjesa za gel za sabijanje i postavlja češljic za formiranje 10 jažica u gelu.

Nakon polimerizacije gornjeg gela za sabijanje, češljic se ukloni, a stakalca se smještaju u kadicu za vertikalnu elektroforezu (*Mini-Protean II*, BioRad) koja je napola ispunjena $1\times$ puferom za elektroforezu. U svaku jažicu nanosi se po 20 μg ukupnih staničnih proteina, te se u posebnu jažicu nanose biljezi za određivanje molekularne mase proteina u volumenu od 3 μL . Po završetku nanošenja uzoraka u jažice, kadica se u potpunosti napuni $1\times$ puferom za elektroforezu i spoji na uređaj za napajanje (*Power Pac Basic Power Supply*, BioRad). Elektroforeza se provodi pri sobnoj temperaturi 30 minuta i konstantnom naponu od 90 V radi sabijanja uzoraka, a potom se proteini razdvajaju 90 minuta pri konstantnom naponu od 110 V.

3.2.8. Analiza Western blot

Western blot je imunokemijska metoda kojom se proteini, prethodno razdvojeni elektroforezom na gelu, prenose na nitroceluloznu membranu s ciljem njihove kvalitativne i relativne kvantitativne detekcije. Po završetku prijenosa proteina iz gela na nitroceluloznu membranu pomoću električne struje, membrana se blokira radi sprječavanja nespecifičnog vezanja antitijela, a potom tretira primarnim antitijelom te sekundarnim antitijelom s vezanim enzimom. Na koncu se dodaje supstrat tog vezanog enzima čime se omogućava vizualizacija položaja određenih proteina na membrani. Obojeni precipitat nastaje samo na mjestu na kojem se nalazi protein od interesa te stoga *Western blot* omogućuje detekciju proteina od interesa i određivanje njegove približne molekulske mase.

U ovom radu koristi se tzv. tehnika mokrog prijenosa – proteini iz gela ulaze u pufer za prijenos te se vežu na površinu membrane gdje su lako dostupni za interakcije sa specifičnim monoklonskim ili poliklonskim antitijelom.

Nakon završene elektroforeze, gel za sabijanje se ukloni i u puferu za prijenos proteina slaže se kazeta za prijenos proteina na membranu. Na donji dio kazete, koji je bliži katodi, postavi se spužvica, na nju dva filter papira, potom gel za razdvajanje koji sadrži odvojene proteine, nitrocelulozna membrana, dva filter papira i spužvica. Pazeći da se nakon svakog dodanog sloja kazete ne stvore mjehurići zraka, kazetu zatvorimo i smjestimo u kadicu (*Mini Trans-Blot*, BioRad) u kojoj se nalazi pufer za prijenos proteina. U kadicu je potrebno staviti i led kako bi se kadica hladila, budući da električna struja generira toplinsku energiju koja može degradirati proteine. Kadica za prijenos proteina spoji se na izvor napajanja (*Power Pac Basic Power Supply*, BioRad). Prijenos teče pri konstantnom naponu od 13 V preko noći, pri sobnoj temperaturi.

Nakon prijenosa, nitrocelulozna membrana pažljivo se izvadi iz kazete i ispere destiliranom vodom, uz zibanje (*Gyro-rocker SSL3*, Stuart®, Cole-Parmer Ltd.), kako bi se uklonio metanol iz pufera za prijenos proteina. Uspješnost elektroforeze i prijenosa proteina provjerava se inkubiranjem membrane u otopini naftol-modrila koji nespecifično boji sve proteine na membrani. Nakon bojanja, membrana se odboja otopinom za odbojavanje membrane pri čemu proteini i dalje ostaju obojeni i vidljivi kao plave vrpce na svijetloj membrani.

Membrana se u kadici ispire tri puta po 10 minuta puferom 1× TBST, uz zibanje (*Gyro-rocker SSL3*, Stuart®, Cole-Parmer Ltd.), kako bi se uklonili ostaci metanola i octene kiseline iz otopine za odbojavanje, a potom se blokira u puferu za blokiranje (5 %-tno obrano mlijeko u prahu u puferu 1× TBST) tijekom 30 minuta, uz zibanje. Primarna i sekundarna antitijela razrijeđuju se u 5 %-tnom obranom mlijeku na željenu koncentraciju (Tablica 3). Primarna antitijela dodaju se u kadice s membranama te se one inkubiraju pri 4 °C tijekom noći na zibalici (*PMR-30 Rocker-Shaker*, Grant Instruments), osim primarnog antitijela za imunodetekciju proteina NME1 i NME2 u kojem se membrana inkubira dva sata pri sobnoj temperaturi. Membrane je nakon inkubacije potrebno isprati od suviška primarnog antitijela, tri puta po 10 minuta u 1× TBST-u uz zibanje, a zatim se membrane inkubiraju u sekundarnom antitijelu s vezanom peroksidazom iz hrena 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon vezanja sekundarnog antitijela ponovno slijedi ispiranje tri puta po 10 minuta puferom 1× TBST. Kao supstrat za vizualizaciju koristi se komplet *Western Lightning® Plus-ECL*. Membrana se inkubira u supstratu jednu minutu pri sobnoj temperaturi, u mraku, a signal se detektira u uređaju za vizualizaciju i oslikavanje (*Alliance 4.7*, UVitec).

Tablica 3. Razrjeđenja primarnih i sekundarnih antitijela za analizu *Western blot*.

Primarno antitijelo	Razrjeđenje prim. antitijela	Sekundarno antitijelo	Razrjeđenje sekund. antitijela
Anti-β-aktin	1:2000	Anti-mišje iz ovce	1:3000
Anti-β-katenin	1:1000		
Anti-fibronektin	1:200		
Anti-N-kadherin	1:500		
Anti-vimentin	1:200		
Anti-NME1/NME2	1:3000	Anti-zečje iz koze	1:3000

3.2.9. Imunocitokemijska analiza stanica

Imunocitokemija je metoda kojom se procjenjuje prisutnost i određuje lokalizacija specifičnog proteina ili antigena u stanicama koristeći specifična antitijela koja na njih vežu, omogućujući vizualizaciju i pregled pod mikroskopom.

Imunocitokemijska analiza provodi se na stanicama primarnog metastatskog melanoma, osjetljivim na vemurafenib (WM793B-CTRL) i otpornim na vemurafenib generiranim tijekom osmomjesečnog tretmana vemurafenibom (WM793B-R2). Na predmetnom stakalcu s osam bunarića, s odvojivim silikonskim pregradama, nasaduje se $4,7 \times 10^4$ stanica linije WM793B po mililitru, tj. $1,88 \times 10^4$ stanica u volumenu od 400 μL po bunariću. Dvadeset i četiri sata nakon nasadivanja, medij se iz svakog bunarića ukloni, prilijepljene se stanice ispiru tri puta PBS-om, a potom se u svaki bunarić doda po 200 μL 3,6 %-tnog (v/v) formaldehida kako bi se stanice fiksirale. Formaldehid se drži 10 minuta na sobnoj temperaturi, potom ukloni, te se stanice ispiru tri puta PBS-om. Zatim se doda 200 μL 0,1 %-tnog (v/v) Triton X-100 za permeabilizaciju membrana. Nakon inkubacije u Triton X-100 na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta, stanice se ispiru tri puta PBS-om. Na stanice se nakon ispiranja nanosi po 200 μL primarnog antitijela odgovarajućih razrjeđenja, priređenih u otopini PBS-a s 10 % (v/v) FBS-a (Tablica 4) i inkubira preko noći pri 4 °C. Idući se dan primarno antitijelo ispire tri puta PBS-om, a onda se u svaki bunarić doda 200 μL sekundarnog antitijela konjugiranog s fluoroforom FITC (fluorescein izotiocijanat, engl. *fluorescein isothiocyanate*), priređenog u određenom razrjeđenju u otopini PBS-a s 10 % (v/v) FBS-a (Tablica 4). Nakon inkubacije stanica u sekundarnom antijelu u mraku tijekom 45 minuta, pri sobnoj temperaturi, sekundarno se antitijelo ispire tri puta PBS-om i potom doda medij za uklapanje i fluorescentna boja DAPI koja se veže za DNA i tako obilježava jezgru stanica. Na predmetno stakalce postavi se pokrovno stakalce koje se učvrsti nanošenjem laka za nokte po rubovima. Unutarstanična lokalizacija proteina promatra se konfokalnim mikroskopom (*Leica SP8 X FLIM*, Leica).

Tablica 4. Razrjeđenja primarnih i sekundarnih antitijela za imunocitokemijsku analizu stanica.

Primarno antitijelo	Razrjeđenje prim. antitijela	Sekundarno antitijelo	Razrjeđenje sekund. antitijela
Anti-E-kadherin	1:50	FITC	1:50
Anti-N-kadherin	1:250		
Anti- β -katenin	1:500		

§ 4. REZULTATI

U svrhu karakterizacije stanica humanog melanoma nakon tretmana vemurafenibom ispitivane su stanice metastatskog i primarnog humanog melanoma, A375M i WM793B, osjetljive na vemurafenib (A375M-CTRL i WM793B-CTRL) i njihove sublinije otporne na vemurafenib generirane tijekom tromjesečnog (A375M-R1 i WM793B-R1) odnosno osmomjesečnog (A375M-R2 i WM793B-R2) tretmana vemurafenibom. Pregledom stanica pomoću mikroskopa utvrđena je njihova morfologija, a fenotip je okarakteriziran testom vijabilnosti stanica MTT, analizom *Western blot* i metodom fluorescentne imunocitokemije.

4.1. Promjena morfologije stanica humanog melanoma

U svrhu određivanja morfoloških promjena, stanice linija A375M i WM793B, osjetljive na vemurafenib i njihove sublinije otporne na vemurafenib, promatrane su pomoću svjetlosnog mikroskopa pri povećanju od 100 \times .

Stanice linija A375M i WM793B, osjetljive na vemurafenib i njihove sublinije otporne na vemurafenib, pokazuju različitu morfologiju. Na Slici 4. prikazane su stanice linije A375M te je primijećeno kako njihova morfologija ne ovisi o statusu otpornosti na vemurafenib, odnosno i osjetljive i otporne stanice pokazuju karakteristike epitelnih stanica. Za razliku od njih, stanice linije WM793B pokazuju morfološke promjene – stanice osjetljive na vemurafenib pokazuju epitelnu morfologiju, a stanice otporne na vemurafenib pokazuju izduženi, vretenasti oblik, karakterističan za mezenhimalne stanice (Slika 5).



Slika 4. Mikroskopski pregled stanica linije A375M, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. a) A375M-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; b) A375M-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom; c) A375M-R2: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.



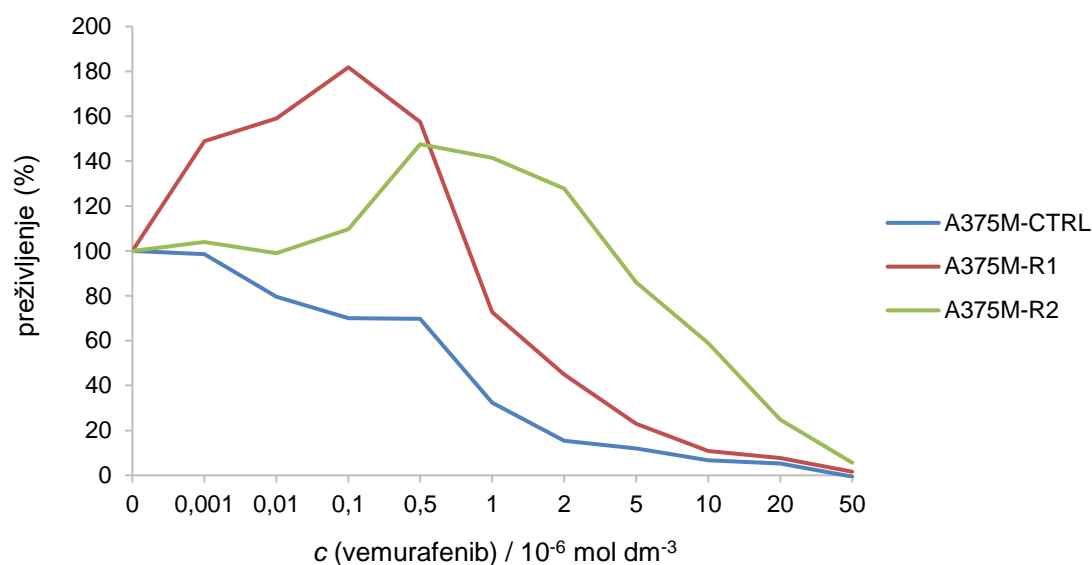
Slika 5. Mikroskopski pregled stanica linije WM793B, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. a) WM793B-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; b) WM793B-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom; c) WM793B-R2: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.

4.2. Vijabilnost stanica humanog melanoma

Stanice metastatskog i primarnog humanog melanoma, A375M i WM793B, osjetljive na vemurafenib (A375M-CTRL i WM793B-CTRL) i njihove sublinije otporne na vemurafenib generirane tijekom tromjesečnog (A375M-R1 i WM793B-R1) odnosno osmomjesečnog (A375M-R2 i WM793B-R2) tretmana vemurafenibom, tretirane su nizom koncentracija vemurafeniba nakon čega je praćena njihova vijabilnost testom MTT radi utvrđivanja otpornosti na lijek i izračuna koncentracije vemurafeniba pri kojoj 50 % stanica umire (engl. *half-maximal inhibitory concentration*, IC_{50}). Preživljenje tretiranih stanica normalizirano je prema postotku preživljenja netretiranih stanica.

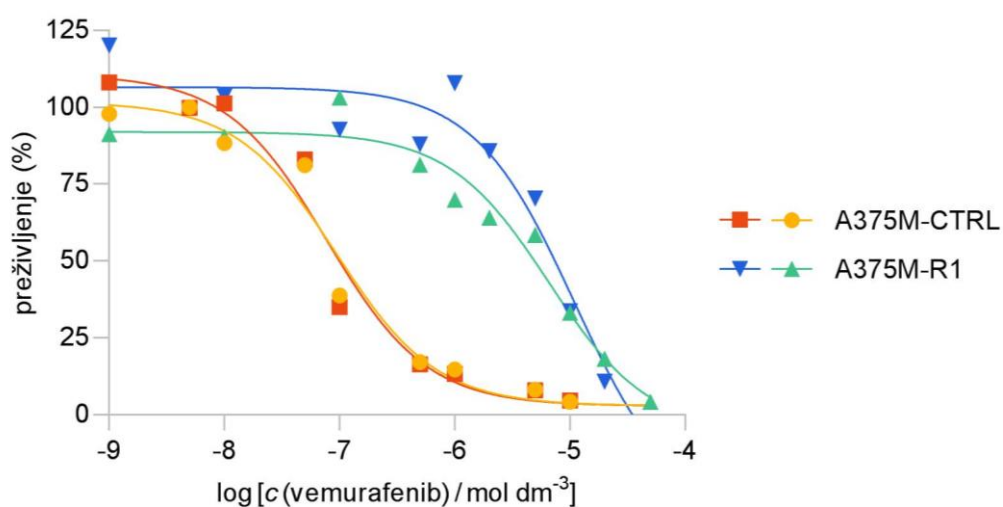
4.2.1. Vijabilnost stanica linije A375M

Stanice osjetljive na vemurafenib A375M-CTRL pokazuju negativnu korelaciju između postotka preživljenja stanica i koncentracije vemurafeniba kojim su stanice tretirane; s porastom koncentracije vemurafeniba kojim su stanice tretirane postotak preživljenja stanica pada. Međutim, kod stanica koje su tijekom tri odnosno osam mjeseci uzgajane u tretmanu 1 odnosno 2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ vemurafeniba (A375M-R1 odnosno A375M-R2), relativna vijabilnost je veća od vijabilnosti osjetljivih stanica, a graf ovisnosti postotka preživljenja o koncentraciji vemurafeniba poprima oblik zvona – postotak preživljenja raste i postiže maksimum, a potom pada (Slika 6).

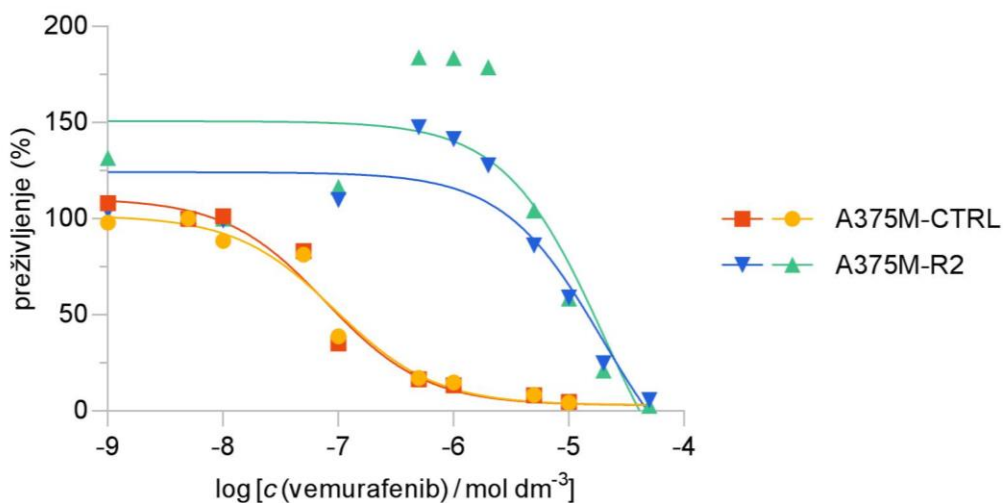


Slika 6. Utjecaj rastućih koncentracija vemurafeniba na vijabilnost stanica linije A375M, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. A375M-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib, A375M-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom, A375M-R2: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.

Dokazana je otpornost generiranih staničnih sublinija nakon višemjesečnog tretmana vemurafenibom. Iz krivulja inhibicije preživljenja stanica u tretmanu različitim koncentracijama vemurafeniba, određene su vrijednosti koncentracije vemurafeniba koje inhibiraju rast 50 % stanica, IC_{50} . Za stanice osjetljive na vemurafenib (A375M-CTRL) IC_{50} iznosi $83,3 \text{ nmol dm}^{-3}$, dok se za stanice koje su uzgajane tri mjeseca u $1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ vemurafeniba (A375M-R1) IC_{50} povećava $\sim 50\times$ i iznosi $4,3 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ (Slika 7). IC_{50} za stanice koje su duže držane u tretmanu $2 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ vemurafeniba (osam mjeseci) (A375M-R2) povećava se $\sim 160\times$ u odnosu na osjetljive stanice i iznosi $13,4 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ (Slika 8).



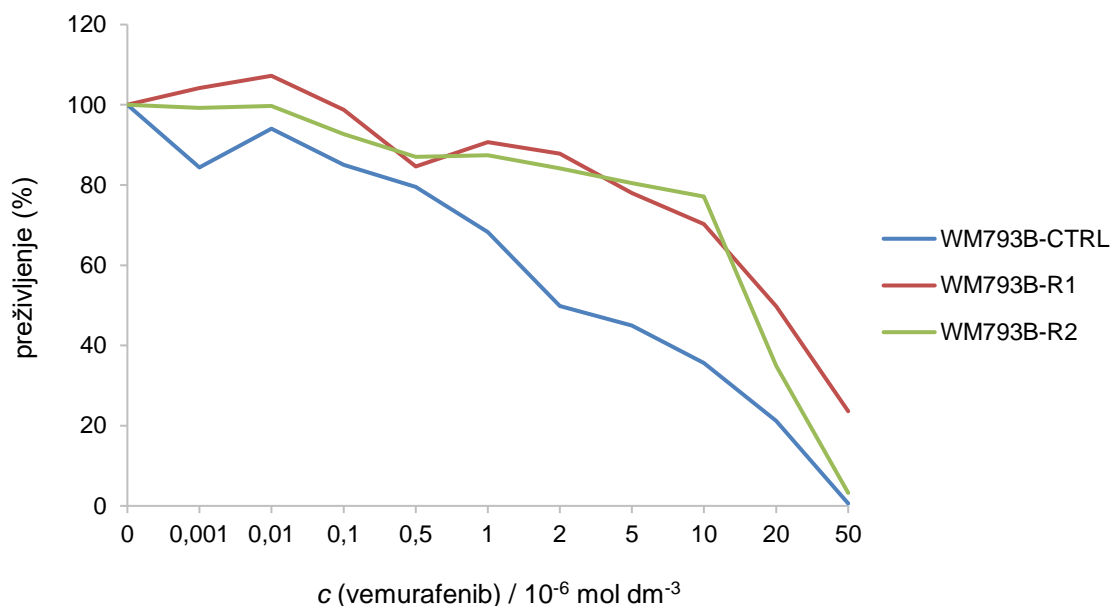
Slika 7. Usporedba inhibicije rasta stanica linije A375M, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. A375M-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; A375M-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom.



Slika 8. Usporedba inhibicije rasta stanica linije A375M, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. A375M-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; A375M-R2: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.

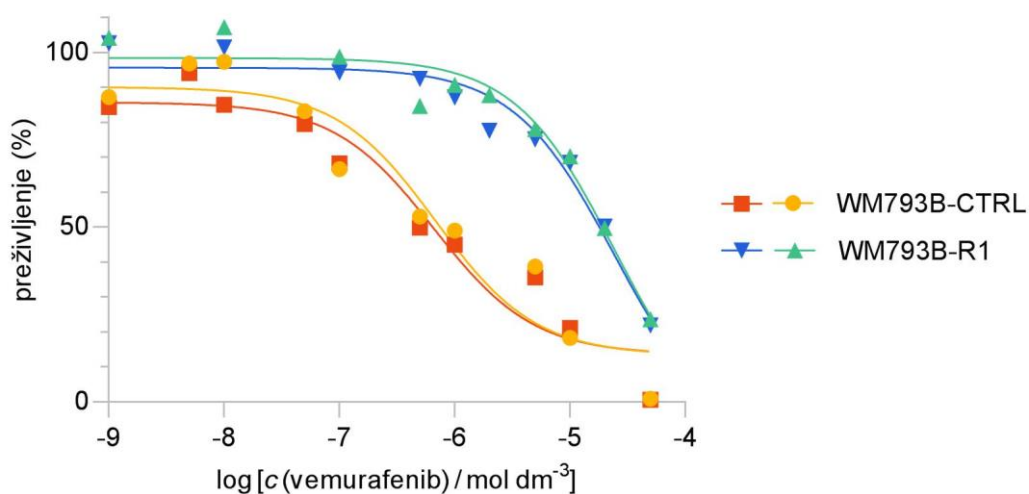
4.2.2. Vijabilnost stanica linije WM793B

Postotak preživljenja stanica linije WM793B, osjetljivih i otpornih na vemurafenib, uglavnom pokazuje stalan pad s povećanjem koncentracije vemurafeniba u tretmanu. Vijabilnost stanica WM793B-R1 i WM793B-R2, zbog njihove otpornosti na vemurafenib, veća je od vijabilnosti osjetljivih stanica pri istim koncentracijama vemurafeniba (Slika 9).

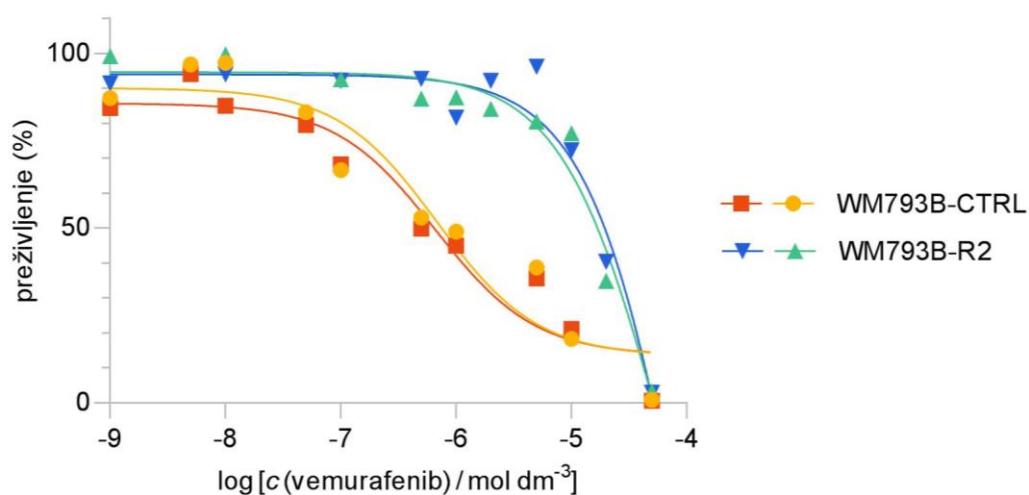


Slika 9. Utjecaj rastućih koncentracija vemurafeniba na vijabilnost stanica linije WM793B, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. WM793B-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib, WM793B-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom, WM793B-R2: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.

Dokazana je otpornost generiranih staničnih sublinija nakon višemjesečnog tretmana vemurafenibom. Iz krivulja inhibicije preživljenja stanica u tretmanu različitim koncentracijama vemurafeniba određene su vrijednosti IC_{50} . Za stanice osjetljive na vemurafenib (WM793B-CTRL) IC_{50} iznosi $683,6 \text{ nmol dm}^{-3}$, dok se za stanice koje su uzgajane tri mjeseca u $4 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ vemurafeniba (WM793B-R1) IC_{50} povećava približno $30\times$ i iznosi $20,3 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ (Slika 10). IC_{50} za stanice koje su duže držane u tretmanu $4 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ vemurafeniba (osam mjeseci) (WM793B-R2) veći je približno $20\times$ od vrijednosti IC_{50} za stanice osjetljive na vemurafenib i iznosi $12,9 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ (Slika 11), no ipak je manji od IC_{50} za stanice WM793B-R1.



Slika 10. Usporedba inhibicije rasta stanica linije WM793B, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. WM793B-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; WM793B-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom.



Slika 11. Usporedba inhibicije rasta stanica linije WM793B, osjetljivih i otpornih na vemurafenib. WM793B-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; WM793B-R1: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.

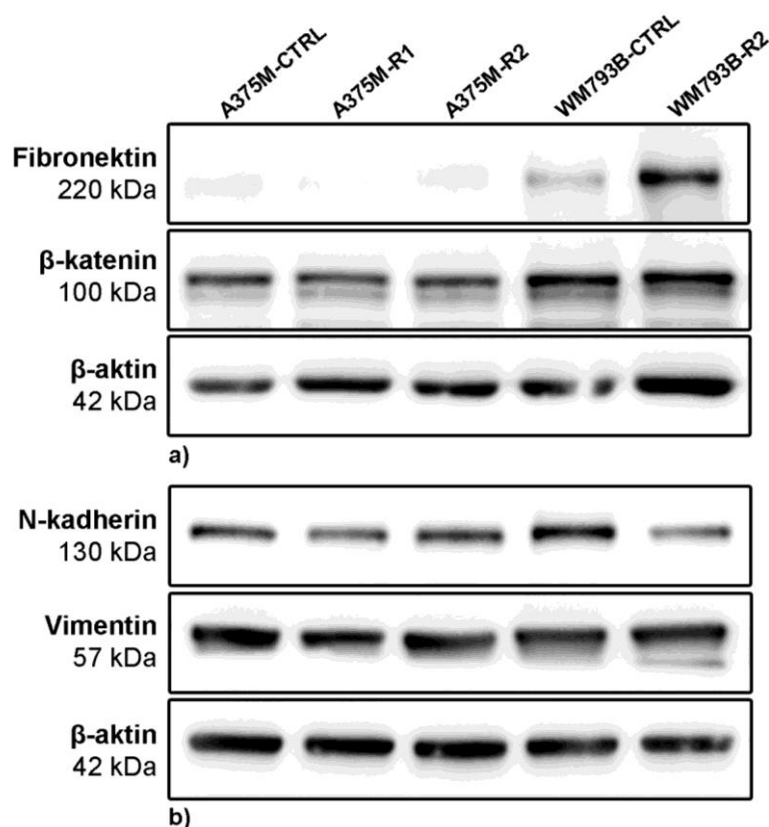
4.3. Ekspresija proteina u stanicama humanog melanoma

Za određivanje ekspresije mezenhimalnih biljega u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije i proteina obitelji NME korištene su metode SDS-PAGE i *Western blot*. Nakon mjerenja njihove koncentracije, proteini iz lizata stanica metastatskog i primarnog humanog melanoma, A375M i WM793B, osjetljivih na vemurafenib (A375M-CTRL i WM793B-CTRL) i njihovih sublinija otpornih na vemurafenib generiranih tijekom tromjesečnog (A375M-R1 i WM793B-R1) odnosno osmomjesečnog (A375M-R2 i WM793B-R2) tretmana vemurafenibom, razdvojeni su pomoću SDS-elektroforeze. Nakon elektrotransfera membrane s proteinima, membrana je inkubirana specifičnim primarnim i sekundarnim antitijelima.

4.3.1. Ekspresija biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije

Koristeći specifična primarna antitijela i specifično sekundarno antitijelo određena je relativna ekspresija biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije u staničnim linijama metastatskog i primarnog humanog melanoma, A375M i WM793B, osjetljivim na vemurafenib i njihovim sublinijama otpornim na vemurafenib. Korištena su primarna antitijela anti-fibronektin (u razrjeđenju 1:200), anti-N-kadherin (u razrjeđenju 1:500), anti- β -katenin (u razrjeđenju 1:1000) i anti-vimentin (u razrjeđenju 1:200) te sekundarno anti-mišje antitijelo u razrjeđenju 1:3000. Detektirane su vrpce na 220, 130, 100 i 57 kDa koje masama odgovaraju proteinima fibronektinu, N-kadherinu, β -kateninu i vimentinu. Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin, detektiran pomoću primarnog antitijela anti- β -aktin (u razrjeđenju 1:2000) na 42 kDa.

Rezultati analize *Western blot* prikazani na Slici 12. pokazuju kako se u staničnoj liniji A375M fibronektin eksprimira vrlo slabo, odnosno ispod razine detekcije, a razina N-kadherina, β -katenina i vimentina ne mijenja se sa statusom otpornosti stanica na vemurafenib. Ekspresija fibronektina se u stanicama linije WM793B otpornim na vemurafenib značajno povećava, dok se ekspresija N-kadherina smanjuje. Ekspresija β -katenina i vimentina ne mijenja se u odnosu na stanice osjetljive na vemurafenib.

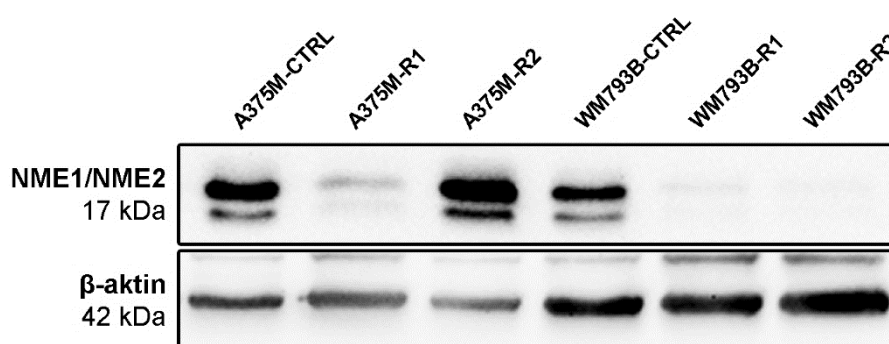


Slika 12. Analiza Western blot mezenhimalnih biljega u stanicama linija A375M i WM793B, osjetljivim i otpornim na vemurafenib. Proteini razdvojeni na a) 7 %-tnom gelu, b) 10 %-tnom gelu. A375M-CTRL i WM793B-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; A375M-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom; A375M-R2 i WM793B-R2: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.

4.3.2. Ekspresija proteina NME1 i NME2

Koristeći specifično primarno antitijelo anti-NME1/NME2, koje prepoznaje oba proteina, i specifično sekundarno antitijelo određena je relativna ekspresija supresorā metastaziranja, NME1 i NME2, u staničnim linijama metastatskog i primarnog humanog melanoma, A375M i WM793B, osjetljivim na vemurafenib i njihovim sublinijama otpornim na vemurafenib. Korišteno je primarno antitijelo anti-NME1/NME2 u razrjeđenju 1:3000 i sekundarno anti-zečje antitijelo u razrjeđenju 1:3000. Detektirane su dvije vrpce između 15 i 20 kDa, od kojih gornja predstavlja NME1, a donja NME2. Kao kontrola nanošenja uzoraka na gel korišten je β-aktin, detektiran pomoću primarnog antitijela anti-β-aktin (u razrjeđenju 1:2000) na 42 kDa.

Rezultati analize *Western blot* prikazani na Slici 13. pokazuju da su proteini NME1 i NME2 eksprimirani u stanicama osjetljivim na vemurafenib, pri čemu je ekspresija proteina NME1 jača od ekspresije proteina NME2. Ekspresija proteina NME1 i NME2 vrlo je slaba kod stanica linije A375M koje su bile izložene vemurafenibu tijekom tri mjeseca (A375M-R1), dok stanice linije A375M koje su bile izložene vemurafenibu tijekom osam mjeseci (A375M-R2) pokazuju izrazitu ekspresiju, relativno veću od ekspresije u osjetljivim stanicama. Stanice linije WM793B osjetljive na vemurafenib eksprimiraju proteine NME1 i NME2, dok u stanicama nakon višemjesečnog tretmana vemurafenibom ovi proteini nisu detektirani.

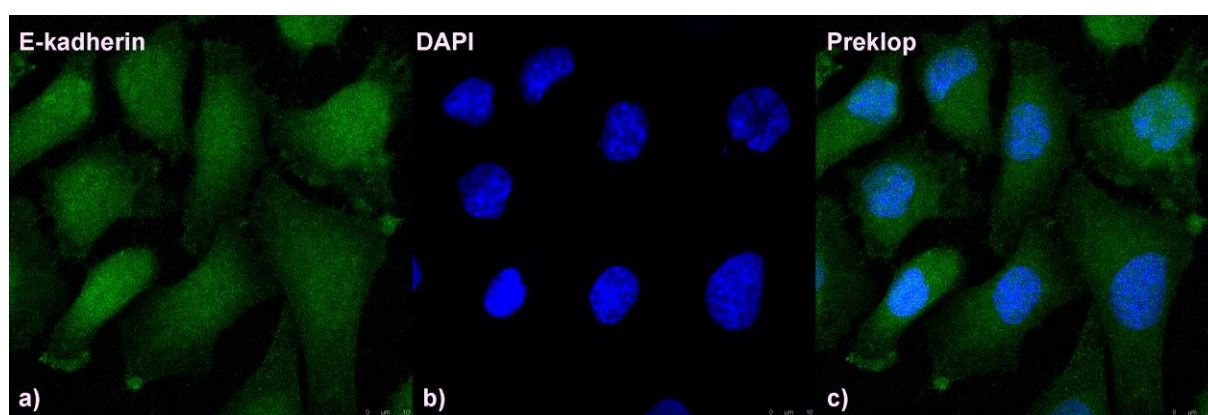


Slika 13. Analiza *Western blot* proteina NME1 i NME2 u stanicama linija A375M i WM793B, osjetljivim i otpornim na vemurafenib. A375M-CTRL i WM793B-CTRL: stanice osjetljive na vemurafenib; A375M-R1 i WM793B-R1: stanice nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom; A375M-R2 i WM793B-R2: stanice nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom.

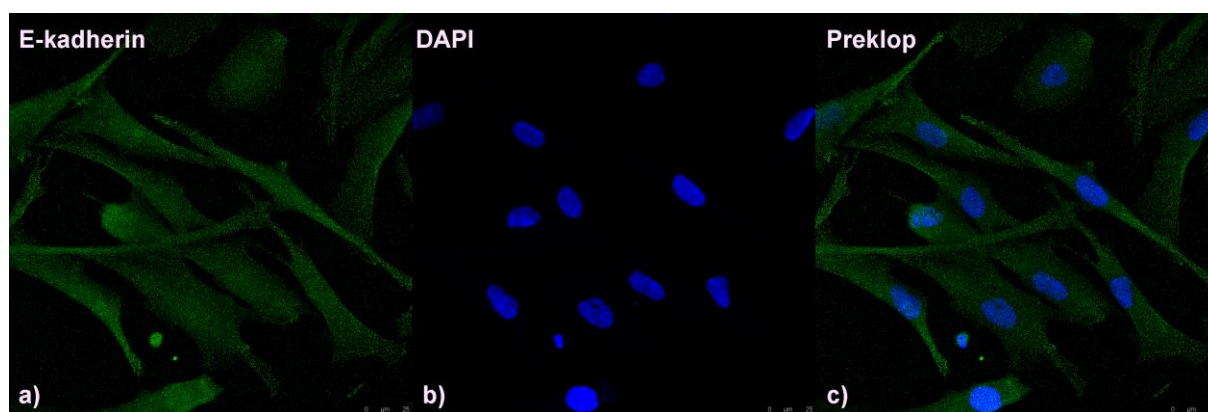
4.4. Lokalizacija proteina u stanicama humanog melanoma

Stanice linije WM793B, osjetljive na vemurafenib (WM793B-CTRL) i otporne na vemurafenib generirane tijekom osmomjesečnog tretmana vemurafenibom (WM793B-R2), nasadene su na predmetno stakalce s osam bunarića, s odvojivim silikonskim pregradama, te podvrgnute imunocitokemijskoj analizi radi utvrđivanja lokalizacije proteina u stanicama. Stanice su nakon fiksacije i permeabilizacije inkubirane u specifičnim primarnim antitijelima; anti-E-kadherin u razrjeđenju 1:50, anti-N-kadherin 1:250 i anti-β-katenin 1:500; a potom u specifičnom sekundarnom antitijelu konjugiranom s fluoroforom FITC (fluorescein izotiocijanat, engl. *fluorescein isothiocyanate*), u razrjeđenju 1:50. Stanicama je dodan i medij za uklapanje i fluorescentna boja DAPI koja obilježava jezgru. Pregledom stanica konfokalnim mikroskopom utvrđena je lokalizacija proteina u stanicama.

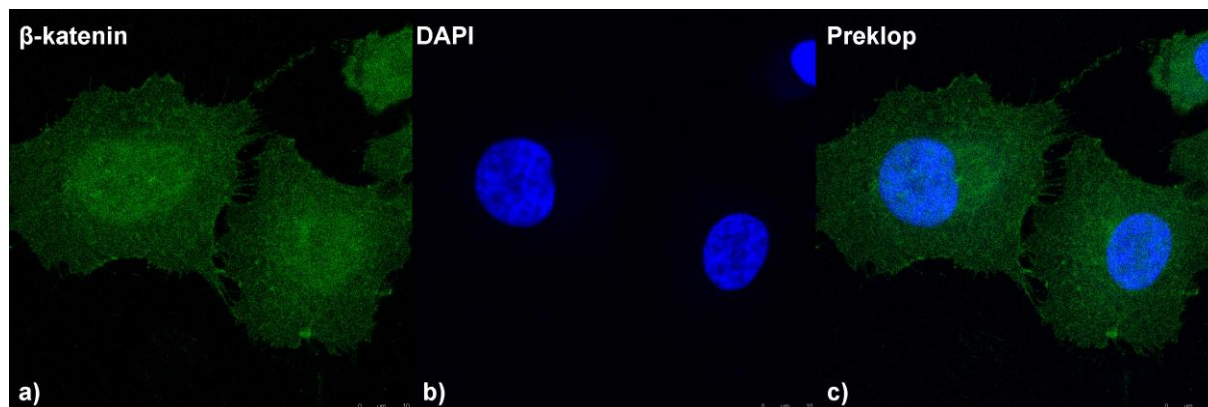
Stanice osjetljive (WM793B-CTRL) i otporne na vemurafenib (WM793B-R2) eksprimiraju E-kadherin, N-kadherin i β -katenin. E-kadherin je u osjetljivim stanicama (Slika 14) eksprimiran u većoj mjeri nego u stanicama otpornim na vemurafenib (Slika 15) te izgleda kao da je jednoliko raspoređen po stanici, a dobro se vide rubovi stanica; to obojenje je relativno blago. Imunoreaktivnost N-kadherina vrlo je slaba (slika nije priložena). U stanicama osjetljivim (Slika 16) i otpornim (Slika 17) na vemurafenib β -katenin je lokaliziran po cijeloj stanici, iako jače na membranama stanica osjetljivih na vemurafenib, a jače su obojane i jezgre u stanicama osjetljivim na vemurafenib.



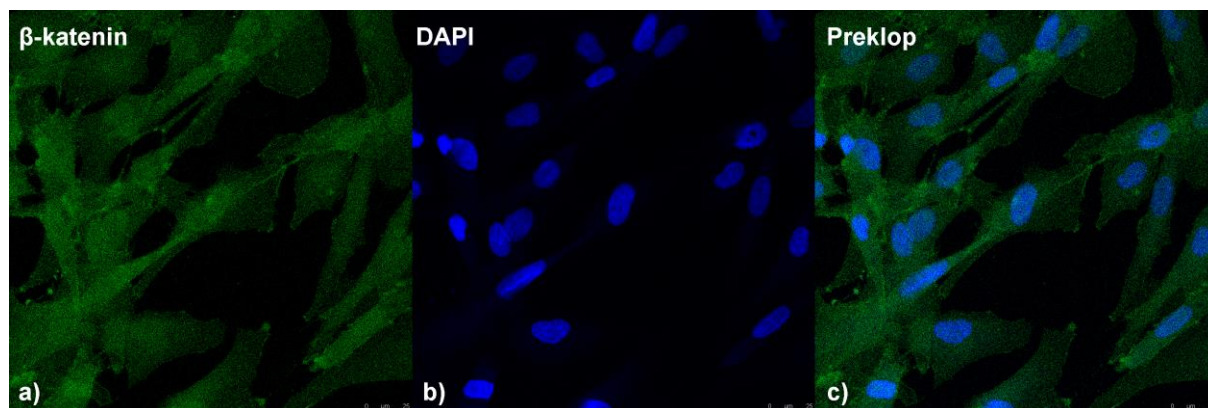
Slika 14. Lokalizacija E-kadherina u stanicama WM793B-CTRL, osjetljivim na vemurafenib. a) lokalizacija E-kadherina u stanicama, b) jezgre stanica obilježene bojom DAPI, c) preklop slika a) i b).



Slika 15. Lokalizacija E-kadherina u stanicama WM793B-R2, otpornim na vemurafenib. a) lokalizacija E-kadherina u stanicama, b) jezgre stanica obilježene bojom DAPI, c) preklop slika a) i b).



Slika 16. Lokalizacija β -katenina u stanicama WM793B-CTRL, osjetljivim na vemurafenib. a) lokalizacija β -katenina u stanicama, b) jezgre stanica obilježene bojom DAPI, c) preklop slika a) i b).



Slika 17. Lokalizacija β -katenina u stanicama WM793B-R2, otpornim na vemurafenib. a) lokalizacija β -katenina u stanicama, b) jezgre stanica obilježene bojom DAPI, c) preklop slika a) i b).

§ 5. RASPRAVA

Humani melanom je bolest sa sve većom incidencijom, a posebno zabrinjava njegova agresivnost i sklonost metastaziranju te rani razvitak otpornosti na liječenje. Rezultat je kompleksnih interakcija genetskih i okolišnih čimbenika, a detektiranjem mutacija i razumijevanjem promjena u koordiniranoj mreži signalnih puteva, kojima dolazi do razvoja tumora, javlja se koncept ciljane terapije genetski okarakteriziranih melanoma koji djeluju na proteine uključene u različite stanične puteve koji kontroliraju proliferaciju stanica, migraciju i preživljenje ili apoptozu. Vemurafenib je čest kemoterapeutik koji se koristi u liječenju melanoma s mutacijom BRAF^{V600E}, no glavni uzrok neuspješnosti liječenja je otpornost stanica na lijek, bilo da se radi o urođenoj, primarnoj ili stečenoj, sekundarnoj otpornosti. Već nakon šest do osam mjeseci liječenja dolazi do razvitka otpornosti, odnosno do progresije bolesti koju prati povećanje invazivnosti.^{3,4}

Testom MTT, kojim se određuje vijabilnost stanica, utvrđeno je da su stanice metastatskog melanoma A375M nakon tri odnosno osam mjeseci tretmana vemurafenibom stekle otpornost na lijek koja se očituje u činjenici da je za inhibiciju rasta 50 % stanica potrebna veća koncentracija vemurafeniba. Zanimljivo je kako grafovi ovisnosti preživljenja tih stanica o koncentraciji vemurafeniba u tretmanu poprimaju oblik zvona; s povećanjem koncentracije vemurafeniba u tretmanu postotak preživljenja stanica raste, postiže maksimum pa tek zatim pada. Slične rezultate pokazali su Das Thakur i sur. proučavajući model melanoma s mutacijom BRAF^{V600E} u miševima. Kontinuirano su tretirali miševe s melanomom osjetljivim na vemurafenib sve dok nisu razvili otpornost te su primijetili da stanice derivirane iz takvih tumora nije moguće uzgojiti u kulturi bez prisustva vemurafeniba, a uklanjanje vemurafeniba iz medija u kulturi otpornih staničnih linija rezultiralo je promjenom stanične morfologije i smanjenom proliferacijom stanica. Time se sugerira kako stanice melanoma otporne na vemurafenib razvijaju svojevrsnu ovisnost o lijeku, odnosno da za svoj rast zahtijevaju prisutnost lijeka. Kontinuirani tretman vemurafenibom, dakle, podržava rast otpornih stanica, a diskontinuiranim tretmanom iz populacije se uklanjaju takve otporne stanice zbog njihovog smanjenog fitnessa (smanjene sposobnosti preživljenja). U populaciji tada preostaju osjetljive stanice te se ponovnim tretmanom vemurafenibom nastavlja pozitivan odgovor stanica na lijek tj. njihova apoptoza.¹² Kod stanica primarnog humanog melanoma WM793B također je

utvrđena otpornost na vemurafenib, ali stanice tretirane vemurafenibom tijekom osam mjeseci imaju relativno manju otpornost nego stanice koje su tretirane vemurafenibom tijekom tri mjeseca. Dakle, stanice linije WM793B nakon dugog tretmana razvijaju otpornost, ali se njihova osjetljivost na vemurafenib nakon osam mjeseci ponovno povećava što uzrokuje smanjenje letalne doze lijeka. Točne mehanizme i razloge ove povraćene osjetljivosti nije moguće utvrditi, ali može se pretpostaviti da stanice postaju ovisne o signalnom putu onkogeno BRAF, a povećana signalizacija unutar signalnog puta MAPK u stanicama otpornim na vemurafenib može biti jednako kobna za stanice kao i smanjena signalizacija u inicijalnom odgovoru osjetljivih stanica na tretman, kao što to navode Das Thakur i sur.¹²

Morfologija stanica tumora mijenja se u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije koja je odgovorna za tumorigenezu i metastaziranje, ali i razvitak otpornosti na liječenje.^{5,6} Stanice linije A375M bez obzira na status otpornosti na vemurafenib nisu promijenile svoju morfologiju; stanice tipično epitelnog oblika nisu postale vretenaste, što bi se očekivalo ako poprimaju zloćudniji fenotip. Prolaskom kroz epitelno-mezenhimalnu tranziciju, stanice manje ekspimiraju epitelne, a više ekspimiraju mezenhimalne biljege koji im omogućuju pokretljivost, tipičnu za invazivne, zloćudne stanice.¹⁹ U ovom su radu metodom *Western blot* proučavani biljezi protein međustanične adhezije N-kadherin, protein izvanstaničnog matriksa fibronektin te citoskeletni proteini β -katenin i vimentin. Utvrđeno je kako stanice linije A375M ekspimiraju mezenhimalne biljege N-kadherin, vimentin i β -katenin, ali relativne promjene u ekspresiji između osjetljivih i otpornih stanica nisu uočene te se prema ovim rezultatima i rezultatima utvrđivanja morfologije stanica može zaključiti kako stanice linije A375M ne prolaze kroz proces EMT, odnosno kako stečena otpornost na vemurafenib u stanicama linije A375M nije povezana s ovim staničnim programom. Međutim, kako su stanice A375M stanice metastatskog humanog melanoma, moguće je da su stanice postigle svoj maksimalni metastatski potencijal te da razvitak otpornosti ne utječe na status metastatske moći odnosno promjenu morfologije i ekspresije mezenhimalnih biljega procesa EMT koji inače korelira s razvitkom otpornosti na lijek. Također, do danas nije poznato moraju li sve stanice tumora proći kroz proces EMT kako bi postale metastatske. Naime, postoje različite vrste pokretljivosti stanica; neke od njih (kolektivna migracija) trebaju E-kadherin jer se kreću u nakupinama, pri čemu ih E-kadherin drži na okupu, dok cijelu skupinu vodi samo nekoliko pokretljivih stanica.³³

Stanice linije WM793B mijenjaju morfološke osobine i s razvitkom otpornosti mijenja se njihov oblik – relativno okrugle stanice postaju izduženije, vretenastog oblika.

Stanice WM793B nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom pokazuju povećanu ekspresiju fibronektina, dok se neočekivano ekspresija N-kadherina smanjuje, a ekspresija β -katenina i vimentina se ne mijenja. U procesu EMT najvažniji događaji su smanjenje ekspresije E-kadherina koju prati povećanje ekspresije N-kadherina i translokacija β -katenina u jezgru stanice,^{6,19} no u ovom radu zabilježene su relativno manje ekspresije i E- i N-kadherina u stanicama nakon stjecanja otpornosti na vemurafenib. Imunocitokemijskom analizom utvrđena je smanjena ekspresija E-kadherina te smanjena nuklearna lokalizacija β -katenina u stanicama otpornim na vemurafenib. Korišteno antitijelo anti-N-kadherin nije pogodno za imunocitokemijsku analizu zbog vrlo slabog signala koji se može pripisati pozadinskom bojanju. Pretraživanjem literature teško je utvrditi univerzalni obrazac ekspresije biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije. Mnoga istraživanja pokazala su heterogenost rezultata, odnosno različite promjene ekspresije biljega i epitelnih i mezenhimalnih stanica u različitim staničnim linijama melanoma te u uzorcima tkiva primarnih i metastatskih melanoma, a smatra se da su takvi nalazi rezultat više intermedijarnih stanja između ovih dvaju krajnjih oblika fenotipa te utjecaja tumorskog mikrookoliša, tretiranja lijekovima i razvijene otpornosti na lijek.⁵ Rezultati istraživanja Kim i sur. pokazuju kako stanice melanoma ne prolaze kroz tipičan proces epitelno-mezenhimalne tranzicije te su u tkivima i staničnim linijama melanoma zabilježene i smanjene i povećane ekspresije i epitelnih (E-kadherin) i mezenhimalnih (N-kadherin) biljega.³⁴ Yan i sur. pokazali su da je u samo 4,8 % primarnih i 9,5 % metastatskih melanoma zabilježena smanjena ekspresija E-kadherina s istovremenom povećanom ekspresijom N-kadherina, a povećana ekspresija N-kadherina zabilježena je u 35,7 % primarnih melanoma i 40,5 % metastatskih melanoma. Također su zabilježili da je smanjena membranska i pozitivna nuklearna ekspresija E-kadherina češća u metastatskom tkivu nego u primarnom melanomu, tj. u progresivnijem stadiju bolesti,³⁵ no u ovom radu imunocitokemijskom analizom utvrđena je i membranska i citoplazmatska obojenost, s time da se citoplazmatska obojenost pripisuje pozadinskom bojanju. Naime, membranske proteine vrlo je teško detektirati pomoću konfokalne mikroskopije koja nam daje sliku jednog presjeka stanice. Da bi bojanje membrana bilo vidljivije, stanice bi trebalo vrlo gusto nasaditi; tako bi se obojao i lakše uočio E-kadherin na mjestima kontakata stanica. U ovom radu, stanice su se tijekom provedbe eksperimenta velikim brojem ispiranja dosta razrijedile te su, raspršene po podlozi, tek mjestimično u međusobnom kontaktu. Za vidljivije bojenje membrana signal je potrebno pojačati, čime se pojačava i pozadinski signal, koji je i inače prisutan u stanicama. Mikesch i sur.

inducirali su proces EMT u 12 staničnih linija melanoma i utvrdili kako se ekspresija E-kadherina smanjuje u tri stanične linije, dok je povećana ekspresija N-kadherina i fibronektina zabilježena u 8 odnosno 11 staničnih linija. Zabilježena je i povećana ekspresija vimentina u pet staničnih linija, nepromijenjena ekspresija u četiri stanične linije odnosno smanjena ekspresija u tri stanične linije.³⁶ Povećana ekspresija fibronektina i nepromijenjena ekspresija vimentina dokazane u ovom radu u skladu su s njihovim podacima heterogenosti nalaza ekspresije fibronektina i vimentina u različitim staničnim linijama melanoma. Međutim, nadeksprimirani fibronektin korelira s pretpostavljenom pojačanom aktivacijom signalnog puta MAPK u stanicama WM793B nakon osmomjesečnog tretmana vemurafenibom, na temelju testa MTT, kao u radu Gaggiolija i sur.²⁵

Iako analiza *Western blot* nije dokazala relativnu promjenu ekspresije β -katenina u stanici, imunocitokemijskom analizom utvrđeno je kako stanice linije WM793B, otporne na vemurafenib, imaju manje izraženu nuklearnu lokalizaciju ovog proteina. Žigmund i sur. pokazali su da se ekspresija β -katenina ne mijenja između uzoraka tumora i normalnog, zdravog tkiva, ali tumori koji su bili u uznapredovanom stadiju pokazivali su smanjenu ekspresiju β -katenina. Također su potvrdili bitne razlike u lokalizaciji β -katenina. Normalno, zdravo tkivo pokazalo je homogenu, membransku imunoreaktivnost β -katenina, dok je u melanomu β -katenin lokaliziran u citoplazmi (32 % uzoraka), na staničnoj membrani (29 %), u citoplazmi i membrani (24 %) ili citoplazmi i jezgri (5 %) ili uopće nije uočen (9,8 %).³⁷ Arozarena i sur. analizirali su panel biopsija melanomā te potvrdili da uslijed ekspiriranja nuklearnog β -katenina dolazi do smanjenja tumora. Utvrdili su kako smanjena ekspresija β -katenina smanjuje proliferaciju stanica, ali povećava njihovu invazivnost, dok stanice s povećanom ekspresijom nuklearnog β -katenina pokazuju slabu invazivnu aktivnost i stoga zaključili da je β -katenin supresor invazije melanoma.³⁸ Da povećana ekspresija nuklearnog β -katenina utječe na porast preživljenja utvrdili su Chien i sur. proučavajući mišji model melanoma u kojem je aktivacija signalnog puta Wnt dovela do smanjene proliferacije *in vitro* i smanjenja veličine tumora i metastaza *in vivo*.³⁹ Stoga bi smanjena lokalizacija β -katenina u jezgrama stanica otpornim na vemurafenib, utvrđena u ovom radu, potvrdila da stanice tijekom višemjesečnog tretmana vemurafenibom poprimaju zloćudnija svojstva i povećavaju metastatski potencijal, unatoč djelomičnom prolasku stanica kroz proces EMT tijekom kojeg, suprotno, karakterističan proces translokacije i nakupljanja β -katenina u jezgri upućuje na povećanje metastatskog potencijala i stečenu sposobnost invazije i migracije.

Proteini NME1 i NME2 supresori su metastaziranja i njihova povećana ekspresija povezuje se s pozitivnijom prognozom napredovanja bolesti.^{7,28,29,32} Kod stanica WM793B, otpornih na vemurafenib, utvrđena je jedva zamjetna ekspresija ovih proteina. Stoga se može tvrditi da smanjena ekspresija NME1/NME2 u stanicama primarnog humanog melanoma WM793B nakon tretmana vemurafenibom korelira sa stjecanjem otpornosti i djelomičnim prolaskom stanica kroz EMT te da stanice stječu zloćudnija svojstva. Boissan i sur. utvrdili su istu korelaciju; utišavanje gena *NME1* u stanicama tumora dovodi do narušenih međustaničnih veza i stanicama se povećava pokretljivost te dolazi do translokacije β -katenina u jezgru.³¹ U stanicama A375M nakon tromjesečnog tretmana vemurafenibom, ekspresija NME proteinā je značajno smanjena, dok je ekspresija povraćena u stanicama koje su duže vrijeme (osam mjeseci) tretirane vemurafenibom. Leone i sur.²⁸ te Xerri i sur.²⁹ pokazali su kako povećana ekspresija NME1 korelira s pozitivnijom prognozom bolesti, no Easty i sur. su, uspoređujući uzorke primarnih i metastatskih melanoma, utvrdili kako imunoreaktivnost NME1 i NME2 u primarnim tumorima nije povezana s prognozom bolesti i njezinim napredovanjem. Iako su u primarnim melanomima utvrdili manju ekspresiju NME1 u usporedbi s normalnim stanicama, tj. melanocitima benignih novotvorina; dapače, više od polovice uzoraka primarnog melanoma nije pokazivala ekspresiju NME1; nije potvrđena povezanost količine NME1 i incidencije metastaza – u uzorcima metastatskih melanoma utvrdili su zapravo više razine NME1 od onih u primarnim melanomima. Prema njihovim podacima pretpostavlja se mogućnost represije ekspresije NME1 u primarnom melanomu, dok je prekomjerna ekspresija gena jedan od mehanizama progresije bolesti i metastaziranja.⁴⁰ Flørenes i sur. su također pokazali slične rezultate – tkiva metastaza melanomā pokazivala su izrazito veće razine mRNA gena *NME1* nego zdravo tkivo.⁴¹ Potvrđeno je i kako različiti stanični uvjeti *in vitro*, poput hipoksije, mogu dovesti do smanjene ekspresije NME1 te da NME1 nije uvijek moguće povezati s procesima invazije, metastaziranja ili EMT.³⁰ Zaključno, pretpostavlja se da je uključenost proteina NME1/NME2 u progresiji melanoma vrlo kompleksna i da se njihova smanjena ekspresija ne može univerzalno koristiti kao prediktor metastaziranja. Prema rezultatima analize *Western blot* stanica metastatskog humanog melanoma A375M u ovom radu, također se pretpostavlja mogućnost da u stanicama dolazi do represije ekspresije NME1/NME2 stjecanjem otpornosti na vemurafenib, no da daljnjim tretmanom vemurafenibom dolazi do povećane ekspresije genā i stoga povraćene ekspresije NME1/NME2, odnosno da ekspresija NME1/NME2 nije uvjetovana statusom otpornosti na lijek, vjerojatno jer stanice nisu ni prošle kroz proces EMT.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Stanice metastatskog i primarnog humanog melanoma, A375M i WM793B, nakon dugotrajnog tretmana vemurafenibom stječu otpornost na lijek.
- Stanice linije A375M otporne na vemurafenib pokazuju ovisnost o vemurafenibu.
- Razvitak otpornosti na vemurafenib u stanicama metastatskog humanog melanoma A375M, zbog ograničenog seta ispitanih biljega, nije moguće povezati s procesom epitelno-mezenhimalne tranzicije.
- Ekspresija proteina NME1 i NME2 vjerojatno ne ovisi o razvitku otpornosti stanica metastatskog humanog melanoma A375M na vemurafenib.
- Razvitak otpornosti na vemurafenib u stanicama primarnog humanog melanoma WM793B posredovan je djelomičnim prolaskom kroz proces epitelno-mezenhimalne tranzicije.
- Razvitak otpornosti na vemurafenib u stanicama primarnog humanog melanoma WM793B dovodi do smanjenja ekspresije supresora metastaziranja, NME1 i NME2.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

α-SMA	engl. <i>α-smooth muscle actin</i>
AAS	matična otopina akrilamid/bisakrilamid (engl. <i>acrylamide/bisacrylamide stock</i>)
AKT	proteinska kinaza B
APC	engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	amonijev persulfat (engl. <i>ammonium persulfate</i>)
ATCC	američka kolekcija kultura sojeva (engl. <i>American Type Culture Collection</i>)
BCA	bikinkonična kiselina (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
BRAF	B-tip RAF kinaze (engl. <i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CDK4	ciklin-ovisna kinaza 4 (engl. <i>cyclin-dependent kinase 4</i>)
CK1	kazeinska kinaza 1 (engl. <i>casein kinase 1</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (engl. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
deH₂O	destilirana voda
DMSO	dimetil-sulfoksid
DPBS	fosfatni pufer za izolaciju proteina (engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FBS	serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	američka Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Association</i>)
FITC	fluorescein izotiocijanat (engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GSK3β	kinaza 3 β glikogenske sintaze (engl. <i>glycogen syntase kinase 3 β</i>)
GTP	gvanozin-trifosfat (engl. <i>guanosine triphosphate</i>)
IC₅₀	koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica (engl. <i>half-maximal inhibitory concentration</i>)
IGF1-R	receptor faktora rasta nalik inzulinu 1 (engl. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
KRAS	engl. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LB	pufer za nanošenje uzoraka na gel (engl. <i>Laemmli buffer</i>)
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenom (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)

MEK	kinaza proteinske kinaze aktivirane mitogenom i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (engl. <i>mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase</i>)
MITF	transkripcijski faktor mikroftalmije (engl. <i>microphthalmia-associated transcription factor</i>)
MMP	metaloproteaze u matriksu (engl. <i>matrix metalloproteinases</i>)
mTOR	ciljna molekula rapamicina u sisavaca (engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
(d)NDP	(deoksi)nukleozid-difosfat (engl. <i>(deoxy)nucleoside diphosphate</i>)
NDPK	nukleozid-difosfatska kinaza (engl. <i>nucleoside diphosphate kinase</i>)
NME1/Nm23	nukleozid-difosfatska kinaza 1 (engl. <i>non-metastatic clone 23</i>)
NME2/Nm23	nukleozid-difosfatska kinaza 2 (engl. <i>non-metastatic clone 23</i>)
NRAS	engl. <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
(d)NTP	(deoksi)nukleozid-trifosfat (engl. <i>(deoxy)nucleoside triphosphate</i>)
PAGE	elektroforeza u gelu poliakrilamida (engl. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i>)
PDGFR-β	receptor β trombocitnog faktora rasta (engl. <i>platelet-derived growth factor receptor β</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid (engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PTEN	homolog fosfataze i tenzina (engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
qH₂O	deionizirana voda pripravljena korištenjem uređaja <i>Milli Q</i>
RAC1	engl. <i>RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAF	engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	engl. <i>rat sarcoma virus homologue</i>
rpm	okretaji u minuti (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RPMI 1640	vrsta tekuće hranjive podloge (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RTK	receptorske tirozinske kinaze (engl. <i>receptor tyrosine kinases</i>)
SDS	natrijev dodecil-sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
TB	pufer za prijenos proteina (engl. <i>transfer buffer</i>)
TBST	engl. <i>Tris buffered saline+Tween-20</i>
TCF/LEF	engl. <i>T-cell factor / lymphoid enhancer binding factor</i>
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletildiamin
TGF-β	transformirajući faktor rasta β (engl. <i>transforming growth faktor β</i>)
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UV	ultraljubičasto (zračenje) (engl. <i>ultraviolet</i>)
Wnt	engl. <i>wingless-type mammary tumor virus integration site family</i>
ZEB	engl. <i>zinc finger E-box-binding homeobox</i>

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. B. Bandarchi, L. Ma, R. Navab, A. Seth, G. Rasty, *Dermatol. Res. Pract.* **2010** (2010) 1–8.
2. J. Paluncic, Z. Kovacevic, P. J. Jansson, D. Kalinowski, A. M. Merlot, M. L.-H. Huang, H. C. Lok, S. Sahni, D. J. R. Lane, Des R. Richardson, *Biochim. Biophys. Acta* **1863** (2016) 770–784.
3. A. Kim, M.S. Cohen, *Expert Opin. Drug Discovery* **11(9)** (2016) 907–916.
4. A. Swaika, J. A. Crozier, R. W. Joseph, *Drug Des., Dev. Ther.* **8** (2014) 775–787.
5. F. Z. Li, A. S. Dhillon, R. L. Anderson, G. McArthur, P. T. Ferrao, *Front Oncol.* **5** (2015) 1–7.
6. J. Yang i R. A. Weinberg, *Dev. Cell* **14** (2008) 818–829.
7. P. S. Steeg, G. Bevilacqua, L. Kopper, U. P. Thorgeirsson, J. E. Talmadge, L. A. Liotta, M. E. Sobel, *J. Natl. Cancer Inst.* **80(3)** (1988) 200–204.
8. M. Boissan, S. Dabernat, E. Pauchant, U. Schattner, I. Lascu, M.-L. Lacombe, *Mol. Cell Biochem.* **329** (2009) 51–62.
9. <https://www.vasezdravlje.com/bolesti-i-stanja/melanom-predrasude-i-zablude> (datum pristupa: 15. listopada 2018.)
10. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske, *Incidencija raka u Hrvatskoj 2015.*, Bilten br. 40, Zagreb, 2018, https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf (datum pristupa: 16. listopada 2018.)
11. P. A. Ascierto, J. M. Kirkwood, J.-J. Grob, E. Simeone, A. M. Grimaldi, M. Maio, G. Palmieri, A. Testori, F. M. Marincola, N. Mozzillo, *J. Transl. Med.* **10** (2012) 85–93.
12. M. Das Thakur, F. Salangsang, A. S. Landman, W. R. Sellers, N. K. Pryer, M. P. Levesque, R. Dummer, M. McMahon, D. D. Stuart, *Nature* **494** (2013) 251–256.
13. H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, *Nature* **417** (2002) 949–954.
14. M. J. Garnett, R. Marais, *Cancer Cell* **6** (2004) 313–319.
15. P. I. Poulikakos, C. Zhang, G. Bollag, K. M. Shokat, N. Rosen, *Nature* **464** (2010) 427–430.

16. B. Sanchez-Laorden, A. Viros, M. R. Girotti, M. Pedersen, G. Saturno, A. Zambon, D. Niculescu-Duvaz, S. Turajlic, A. Hayes, M. Gore, J. Larkin, P. Lorigan, M. Cook, C. Springer, R. Marais, *Sci. Signaling* **7** (2014) 30–41.
17. J. L. Manzano, L. Layos, C. Bugés, M. de Los Llanos Gil, L. Vila, E. Martínez-Balibrea, A. Martínez-Cardús, *Ann. Transl. Med.* **4(12)** (2016) 237–245.
18. R. L. Pearlman, M. K. Montes de Oca, H. C. Pal, F. Afaq, *Cancer Lett.* **391** (2017) 125–140.
19. M. Zeisberg, E. G. Neilson, *J. Clin. Invest.* **119(6)** (2009) 1429–1437.
20. N. Bonitsis, A. Batistatou, S. Karantima, K. Charalabopoulos, *Exp. Oncol.* **28** (2006) 187–193.
21. R. Fodde, T. Brabletz, *Curr. Opin. Cell Biol.* **19** (2007) 150–158.
22. A. Satelli, S. Li, *Cell. Mol. Life Sci.* **68(18)** (2011) 3033–3046.
23. M. Li, B. Zhang, B. Sun, X. Wang, X. Ban, T. Sun, Z. Liu, X. Zhao, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29** (2010) 109–117.
24. I. Petrini, S. Barachini, V. Carnicelli, S. Galimberti, L. Modeo, R. Boni, M. Sollini, P. A. Erba, *Oncotarget* **8** (2017) 4914–4921.
25. C. Gaggioli, G. Robert, C. Bertolotto, O. Bailet, P. Abbe, A. Spadafora, P. Bahadoran, J.-P. Ortonne, V. Baron, R. Balloti, S. Tartare-Deckert, *J. Invest. Dermatol.* **127** (2007) 400–410.
26. J. A. Stahl, A. Leone, A. M. Rosengard, L. Porter, C. R. King, P. S. Steeg, *Cancer Res.* **51** (1991) 445–449.
27. H. Četković, D. Perina, M. Harcet, A. Mikoč, M. Herak Bosnar, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **388(2)** (2015) 133–142.
28. A. Leone, U. Flatow, C. R. King, M. A. Sandeen, I. M. K. Margulies, L. A. Liotta, P. S. Steeg, *Cell* **65** (1991) 25–35.
29. L. Xerri, J.-J. Grob, Z. Battyani, J. Gouvernet, J. Hassoun, J.-J. Bonerandi, *Br. J. Cancer* **70** (1994) 1224–1228.
30. R. U. Rasool, D. Nayak, S. Chakraborty, V. L. Jamwal, V. Mahajan, A. Katoch, M. M. Faheem, Z. Igra, H. Amin, S. G. Gandhi, A. Goswami, *Eur. J. Cell Biol.* **96(2)** (2017) 164–171.

31. M. Boissan, O. De Wever, F. Lizarraga, D. Wendum, R. Poincloux, N. Chignard, C. Desbios-Mouthon, S. Dufour, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, M. Bracke, P. Chavrier, C. Gespach, M. L. Lacombe, *Cancer Res.* **70(19)** (2010) 7710–7722.
32. Y. Li, Y. Tong, Y. H. Wong, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **388(2)** (2015) 243–256.
33. K. Campbell, J. Casanova, *Development* **143** (2016) 4291–4300.
34. J. E. Kim, E. Leung, B. C. Baguley, G. J. Finlay, *Front. Genet.* **4** (2013) 1–8.
35. S. Yan, B. M. Holderness, Z. Li, G. D. Seidel, J. Gui, J. L. Fisher, M. S. Ernstoff, *Anticancer Res.* **36(12)** (2016) 6449–6456.
36. L. M. Mikesh, M. Kumar, G. Erdag, K. T. Hogan, K. R. Molhoek, M. W. Mayo, C. L. Slingluff Jr., *Melanoma Res.* **20(6)** 2010 485–495.
37. M. Žigmond, N. Pećina-Šlaus, V. Kušec, T. Nikuševa-Martić, M. Čačić, M. Šlaus, F. Bulić-Jakuš, *Acta Clin. Croat.* **45** (2006) 133–139.
38. I. Arozarena, H. Bischof, D. Gilby, B. Belloni, R. Dummer, C. Wellbrock, *Oncogene* **30** (2011) 4531–4543.
39. A. J. Chien, E. C. Moore, A. S. Lonsdorf, R. M. Kulikauskas, B. G. Rothberg, A. J. Berger, M. B. Major, S. T. Hwang, D. L. Rimm, R. T. Moon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (2009) 1193–1198.
40. D. J. Easty, K. Maung, I. Lascu, M. Véron, M. E. Fallowfield, I. R. Hart, D. C. Bennett, *Br. J. Cancer* **74(1)** (1996) 109–114.
41. V. A. Flørenes, S. Aamdal, O. Myklebost, G. M. Maelandsmo, Ø. S. Bruland, Ø. Fodstad, *Cancer Res.* **52** (1992) 6088–6091.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivana Bobić

Datum rođenja: 9. travnja 1993.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

1999.–2007. Osnovna škola [VII. Osnovna škola Varaždin, Kučan Gornji]

2007.–2011. Srednja škola [I. Gimnazija Varaždin, Varaždin]

2011.–2016. Preddiplomski studij [Preddiplomski studij kemije, istraživački smjer, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb]

Nagrade i priznanja

2013. Posebna Rektorova nagrada za organizaciju i izvedbu
6. Otvorenog dana Kemijskog odsjeka PMF-a

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012.–2013. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a