

Konstrukcija vektora za ekspresiju proteina SHH u staničnoj liniji melanoma čovjeka CHL-1

Čonkaš, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:537217>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Josipa Čonkaš

**KONSTRUKCIJA VEKTORA ZA EKSPRESIJU PROTEINA SHH
U STANIČNOJ LINIJI MELANOMA ČOVJEKA CHL-1**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Maje Sabol i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Sofie Ane Blažević sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

Zahvale

Neizrecivo hvala mentorici dr. sc. Maji Sabol na neiscrpojnoj vjeri, strpljenju i povjerenju, nesebičnoj pomoći i dijeljenju svoga znanja te istinskoj motivaciji i razumijevanju. Vi ste mi pokazali što znači voljeti i živjeti znanost, biti mentor i učitelj, ali prvenstveno biti veliki čovjek!

Veliko hvala voditelju laboratorija, dr. sc. Petru Ozretiću, na ukazanom povjerenju i prilici za izradu diplomskog rada te velikodušnoj pomoći.

Najiskrenije hvala i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za nasljedni rak - Nikolini, Matei, Vesni i Diani na beskrajnoj pomoći, radosti i podršci. Vi ste bile moja snaga i poticaj na ovom putu!

Zahvaljujem se suvoditeljici doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević na pomoći, suradnji i savjetima.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama s fakulteta i izvan njega na bezgraničnoj podršci i ljubavi, suzama i smijehu. Vi ste moje studentske dane pretvorili u najljepšu uspomenu!

Hvala mojim roditeljima, sestri i šogoru, baki, ujaku i cijeloj obitelji na istinskoj vjeri, potpori, strpljenju i razumijevanju. Bez Vas bi ova priča ostala neispričana!

Hvala ti Deni, jer Ti znaš koliko je bilo teško - čuo si svaku moju suzu. Ti znaš koliko sam vremena uložila u ovo - čekao si me. Ti znaš koliko mi ovo znači - i zato mi daješ bezuvjetnu ljubav i snagu da budem još bolja i sve svoje snove pretvorim u stvarnost!

„Dreams are made possible if you try.“

~ Terry Fox

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

KONSTRUKCIJA VEKTORA ZA EKSPRESIJU PROTEINA SHH U STANIČNOJ LINIJI MELANOMA ČOVJEKA CHL-1

Josipa Čonkaš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U današnje vrijeme, melanom se smatra jednim od najsmrtonosnijih tipova tumora sa sve većom učestalosti u populaciji. Uslijed izuzetno složene patogeneze bolesti, koja je povezana sa promjenama u jednom ili više signalnih puteva, istraživanja se usmjeravaju prema razvoju kombiniranih inhibitora kao potencijalne terapije. U ovom istraživanju dizajniran je vektor za prolaznu i stabilnu ekspresiju proteina SHH u staničnoj liniji melanoma čovjeka CHL-1. Aktivni oblik proteina SHH djeluje kao ligand koji se veže za transmembranski receptor Patched i pokreće signalni put Hedgehog-Gli. Ključna uloga signalnog puta HH-GLI je regulacija embriogeneze, dok se poremećena funkcija istog povezuje s inicijacijom, progresijom, invazijom i preživljenjem tumora. Kloniranjem dizajniranog sintetskog genskog fragmenta gBlock *SHH* u ekspresijski vektor pcDNA3 uspješno je ekspimiran aktivni oblik proteina SHH-N. Westernskom metodom otiska dokazano je da prolazna transfekcija stanične linije melanoma CHL-1 vektorom pcDNA3.1 - SHH dovodi do povećanja ekspresije gena *SHH* i autokrine aktivacije signalnog puta HH-GLI ovisne o ligandu, što potvrđuje povećana proteinska ekspresija SHH-N, PTCH1, transkripcijskog faktora GLI1 i GLI3R te smanjenje razine ekspresije proteina GLI3FL, 48 sati nakon transfekcije. Isto tako, ekspresija proteina SHH stimulirala je aktivaciju signalnih puteva PI3K i MAPK, no nije pokazala učinak na regulaciju staničnog ciklusa. Važnost dokazane interakcije je izuzetno velika i predstavlja temelj razvoja modela za istraživanje terapija u liječenju melanoma.

(65 stranica, 34 slike, 10 tablica, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: signalni put HH-GLI, Sonic Hedgehog, kloniranje, melanom, transfekcija, PI3K/AKT, MAPK

Voditelj rada: Doc. dr. sc. Maja Sabol
Suvoditelj rada: Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji: 1. Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević
2. Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
3. Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 11. siječnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

CONSTRUCTION OF VECTORS FOR SHH PROTEIN EXPRESSION IN CHL-1 HUMAN MELANOMA CELL LINE

Josipa Čonkaš

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Malignant melanoma is one of the most aggressive cancers nowadays with increasing incidence in the population. The focus of research today is on the development of combined inhibitors as potential therapy due to the extremely complex pathogenesis of the disease associated with mutations in one or a few signaling pathways. In this study, we designed vectors for transient and stable SHH protein expression in the CHL-1 human melanoma cell line. The active form of the SHH protein acts as a ligand that binds to the Patched transmembrane receptor and triggers the Hedgehog-Gli signaling pathway. The main role of the HH-GLI signaling pathway is the regulation of embryogenesis while its altered function is associated with initiation, progression, invasion and survival of tumor cells. The active form of the SHH-N protein was successfully expressed by cloning the recombinant gene fragment gBlock *SHH* into the pcDNA3 expression vector. Transient transfection of the CHL-1 melanoma cell line with the pcDNA3.1 - SHH vector increased the *SHH* gene expression and led to autocrine ligand-dependent activation of the HH-GLI signaling pathway. Increased protein expression of SHH-N, PTCH1, transcription factors GLI1 and GLI3R, as well as decreased expression of protein GLI3FL, was identified by Western blot analysis 48 hours after transfection. SHH protein expression also stimulated activation of the PI3K and MAPK signaling pathways, but it showed no effect on cell cycle regulation. There is a very high importance in this interaction and it represents the basis for the development of the research model in melanoma treatment.

(65 pages, 34 figures, 10 tables, 70 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: HH-GLI signaling pathway, Sonic Hedgehog, cloning, melanoma, transfection, PI3K/AKT, MAPK

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Maja Sabol

Cosupervisor: Asst. Prof. Dr. Sofija Ana Blažević

Reviewers: 1. Asst. Prof. Dr. Sofija Ana Blažević
2. Assoc. Prof. Dr. Jasna Lajtner
3. Asst. Prof. Dr. Tomislav Ivanković

Thesis accepted: 11th January 2021

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Protein Sonic Hedgehog (SHH).....	1
1.1.1. Povijesni pregled	1
1.1.2. Procesiranje i izlučivanje proteina SHH.....	1
1.2. Signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI).....	4
1.2.1. Kanonska aktivacija signalnog puta	4
1.2.2. Nekanonska aktivacija signalnog puta	4
1.3. Uloga SHH u embrionalnom razvoju i odraslom organizmu	5
1.4. Uloga SHH u tumorigenezi.....	7
1.5. Interakcija SHH i drugih signalnih puteva u nastanku melanoma.....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. MATERIJALI	15
3.2. METODE	15
3.2.1. Dizajn sintetskog genskog fragmenta (gBlock) <i>SHH</i>	15
3.2.2. Kloniranje gBlock <i>SHH</i> u plazmidne vektore	16
3.2.2.1. Kloniranje gBlock <i>SHH</i> u plazmidni vektor pCR-XL-2-TOPO.....	16
3.2.2.2. Ekstrakcija gBlock <i>SHH</i> iz vektora pCR-XL-2-TOPO - SHH.....	18
3.2.2.3. Kloniranje gBlock <i>SHH</i> u plazmidne vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR...	19
3.2.3. Analiza bakterijskih kolonija lančanom reakcijom polimeraze	23
3.2.4. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija	27
3.2.5. Sekvenciranje izolirane plazmidne DNA.....	29
3.2.6. Rad sa staničnim kulturama.....	30
3.2.6.1. Odmrzavanje stanica	30
3.2.6.2. Održavanje i presađivanje stanica u kulturi.....	31
3.2.6.3. Transfekcija stanica	31
3.2.6.4. Izolacija proteina iz stanica	32
3.2.6.5. Mjerenje koncentracije proteina	33
3.2.7. Westernska metoda otiska	34
3.2.8. Protočna citometrija	38
3.2.8.1. Analiza staničnog ciklusa	38
3.2.8.2. Analiza aktivacije signalnih puteva PI3K/MAPK.....	40
3.2.9. Statistička obrada podataka	42
4. REZULTATI.....	43

4.1. Dizajn sintetskog genskog fragmenta (gBlock) <i>SHH</i>	43
4.2. Analiza sekvence gBlock <i>SHH</i> u plazmidnim vektorima	43
4.3. Analiza proteinske ekspresije.....	47
4.4. Analiza staničnog ciklusa	49
4.5. Analiza aktivacije signalnih puteva PI3K/MAPK.....	52
5. RASPRAVA	56
6. ZAKLJUČAK.....	59
7. LITERATURA	60
8. ŽIVOTOPIS.....	65

POPIS KRATICA

Akt/PKB	proteinska kinaza B (eng. <i>protein kinase B</i>)
APS	amonij-persulfat
BCA	eng. <i>bicinchoninic acid</i>
BCC	karcinom bazalnih stanica (eng. <i>basal cell carcinoma</i>)
BCL2	gen BCL2 (eng. <i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>)
BRAF	gen BRAF
BRAF	kinaza BRAF (eng. <i>isoform B of RAF kinase</i>)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (eng. <i>bovine serum albumin</i>)
CCND1	gen CCND1
CDK4	ciklin-ovisna kinaza 4 (eng. <i>cyclin-dependent kinase 4</i>) gen za tumorski supresor ciklin-ovisni inhibitor kinaze 2A (eng. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>)
CDKN2A	
CDS	kodirajuća regija gena (eng. <i>coding DNA sequence</i>)
CHL-1	stanična linija melanoma čovjeka CHL-1
CSC	tumorske matične stanice (eng. <i>cancer stem cells</i>)
DHH	gen Desert Hedgehog
DHH	protein Desert Hedgehog
DISP	protein Dispatched
DMEM	Dulbeccov modificirani Eagle medij (eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	dimetil-sulfoksid
dNTP	deoksinukleotid-trifosfati
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EGF	epidermalni faktor rasta (eng. <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ERK	kinaza regulirana ekstracelularnim signalom (eng. <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>)

FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i>)
gBlock SHH	sintetski fragment gena SHH
GIST	gastrointestinalni stromalni tumori
GLI	protein Gli
GLI1	gen Gli1
GLI2	gen Gli2
GLI2	protein Gli2
GLI3	protein Gli3
GLI3FL	nepocijepani protein Gli3, aktivator (eng. <i>GLI3 full length</i>)
GLI3R	pocijepani oblik proteina Gli3, represor (eng. <i>GLI3 repressor</i>)
GPI	glikozil fosfatidilinozitol (eng. <i>glycosyl phosphatidylinositol</i>)
GSK3β	kinaza glikogen sintaze 3β (eng. <i>glycogen synthase kinase 3β</i>)
GTPaza	gvanozin trifosfataza (eng. <i>guanosine triphosphatase</i>)
HH	gen Hedgehog
HH-C	C-terminalni fragment proteina HH
HH-GLI	signalni put Hedgehog-Gli
HH-N	N-terminalni fragment proteina HH
IGF	inzulinu sličan faktor rasta 1 (eng. <i>insulin-like growth factor 1</i>)
IHH	gen Indian Hedgehog
IHH	protein Indian Hedgehog
K-RAS	protein K-RAS
LB	pufer za nanošenje (eng. <i>loading buffer</i>)
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenom (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MDM2	protein MDM2 (eng. <i>mouse double minute 2 homolog</i>)
MITF	gen za transkripcijski faktor povezan s mikroftalmijom (eng. <i>microphthalmia-associated transcription factor</i>)
NANOG	gen Nanog (eng. <i>Nanog homeobox</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOTUM	protein NOTUM
NRAS	gen NRAS
NRAS	protein NRAS (eng. <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>)

OD	optička gustoća (eng. <i>optical density</i>)
p14	protein p14
p16	protein p16
p53	protein p53
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PI	propidij jodid (eng. <i>propidium iodide</i>)
PI3K	fosfoinozimid 3-kinaza (eng. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
PKA	proteinska kinaza A (eng. <i>protein kinase A</i>)
PTCH	protein Patched
<i>PTCH1</i>	gen Patched1
PTCH1	protein Patched1
<i>PTEN</i>	gen za tumorski supresor homologa fosfataze i tenzina (eng. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
rSAP	rekombinantna alkalna fosfataza iz škampa (eng. <i>recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
rSHH	rekombinantni protein SHH
SCC	karcinom skvamoznih stanica (eng. <i>squamous cell carcinoma</i>)
SCUBE2	protein SCUBE2 (eng. <i>signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2</i>)
SDS	natrijev dodecil sulfat
<i>SHH</i>	gen Sonic Hedgehog
SHH	protein Sonic Hedgehog
SHH-N	N-terminalni fragment proteina SHH (signalna domena)
SKI	acil-transferaza SKI (eng. <i>skinny hedgehog</i>)
SMO	protein Smoothened
SUFU	protein Suppressor of Fused
TEMED	tetrametiletilendiamin
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
β-ACT	beta-aktin (eng. <i>β-actin</i>)

1. UVOD

1.1. Protein Sonic Hedgehog (SHH)

1.1.1. Povijesni pregled

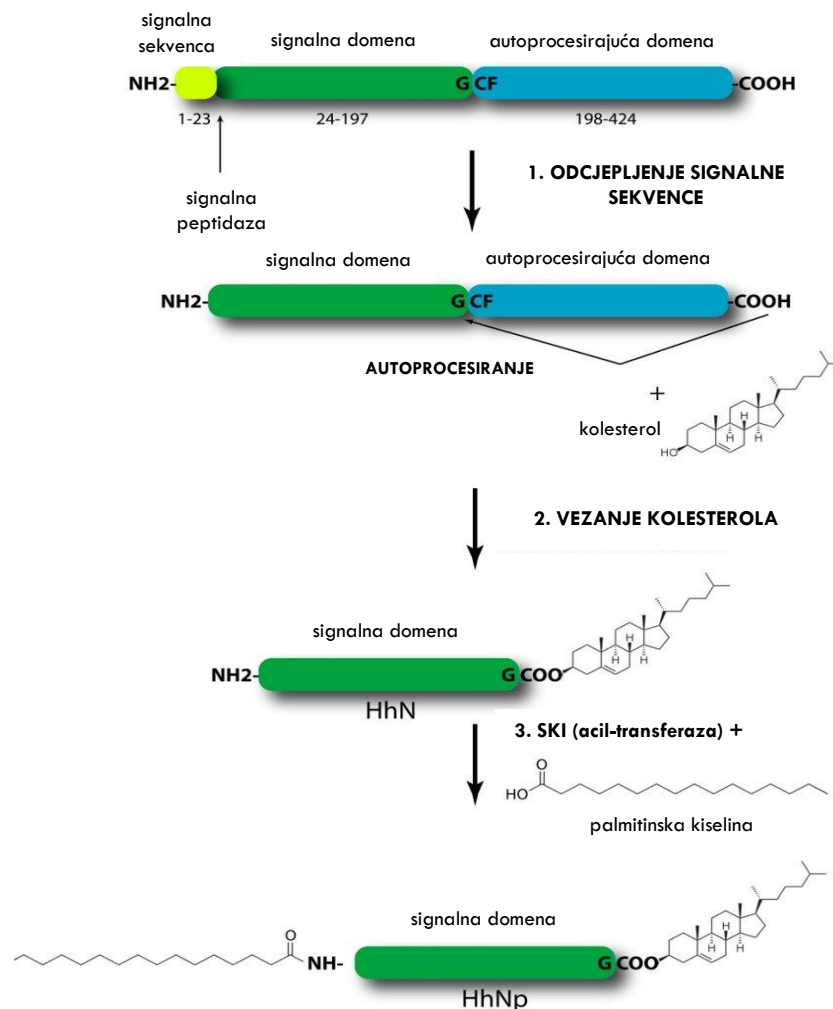
Obitelj gena *Hedgehog* (*HH*) otkrili su, ranih osamdesetih godina dvadesetog stoljeća, Christiane Nüsslein-Volhard i Eric Wieschaus. Cilj njihovog istraživanja bio je detektirati mutacije koje su direktno povezane s deformacijama prilikom segmentacije kutikule kod ličinki vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*). Jedan od prvotno 15 identificiranih lokusa povezanih s razvojnim deformacijama bio je upravo *HH*. Naime, svaka od mutacija u pojedinom lokusu dovodi do razvoja specifičnog fenotipa. Tako je gen, uslijed čije mutacije dolazi do gubitka pravilnih ventralnih segmenata i isti postaju nepravilno raspoređeni, nalik ježevim bodljama, nazvan *Hedgehog* (hrv. jež) (Nüsslein-Volhard i Wieschaus 1980). Tek 12 godina po otkriću uslijedila je njegova molekularna identifikacija kojom je pokazano da je riječ o sekretornom proteinu te da isti direktno regulira razvoj susjednih stanica (Ingham i McMahon 2001).

U narednim godinama, otkrivena su tri homologna gena *HH* kod sisavaca: *Sonic Hedgehog* (*SHH*), *Desert Hedgehog* (*DHH*) i *Indian Hedgehog* (*IHH*) te je dokazana njihova evolucijski očuvana uloga u rastu i razvoju organizma. Gen *DHH* najsrodniji je onom u vinske mušice i ima važnu ulogu u razvoju spolnih stanica i sazrijevanju testisa te formiranju ovojnice perifernih živaca, dok *IHH* regulira razvoj hrskavice i kostiju. S druge strane, *SHH* je najbolje istražena izoforma proteina *HH*, koja ima važnu ulogu u rastu, proliferaciji i preživljenju stanica u gotovo svim tkivima (Ingham i McMahon 2001).

1.1.2. Procesiranje i izlučivanje proteina SHH

Aktivna forma proteina *HH* nastaje nakon nekoliko posttranslacijskih modifikacija i cijepanja neaktivnog oblika proteina. Prvi korak po translaciji u procesiranju *HH* je odcjepljenje N-terminalne signalne sekvence od polipeptidnog prekursora, koji se potom podvrgava autokatalitičkom cijepanju. Autokatalitičkim cijepanjem prekursora, prosječne molekularne mase 45 kDa, između glicina i cisteina nastaje N-terminalni fragment (*HH-N*) molekularne mase 19 kDa i C-terminalni fragment proteina (*HH-C*), molekularne mase 25 kDa. Nakon cijepanja peptidne veze nastaje tioesterski intermedijer, uslijed zamjene peptidne veze

tioesterom. Novonastali tioesterski intermedijer potom je podvrgnut nukleofilnom napadu kolesterola, uslijed čega dolazi do kovalentnog vezanja istog na C-kraj HH-N i otpuštanja HH-C fragmenta (Porter i sur. 1996). Druga modifikacija je također lipidnog tipa, a obuhvaća vezanje palmitata na visoko konzervirani N-terminalni cistein HH-N (Pepinsky i sur. 1998). Enzim koji katalizira navedenu modifikaciju je acil-transferaza SKI (eng. *skinny hedgehog*) te kao produkt iste nastaje zrela signalna molekula HH-N, koja se u obliku monomera veže za vanjsku površinu stanične membrane (Slika 1.) (Chamoun i sur. 2016).

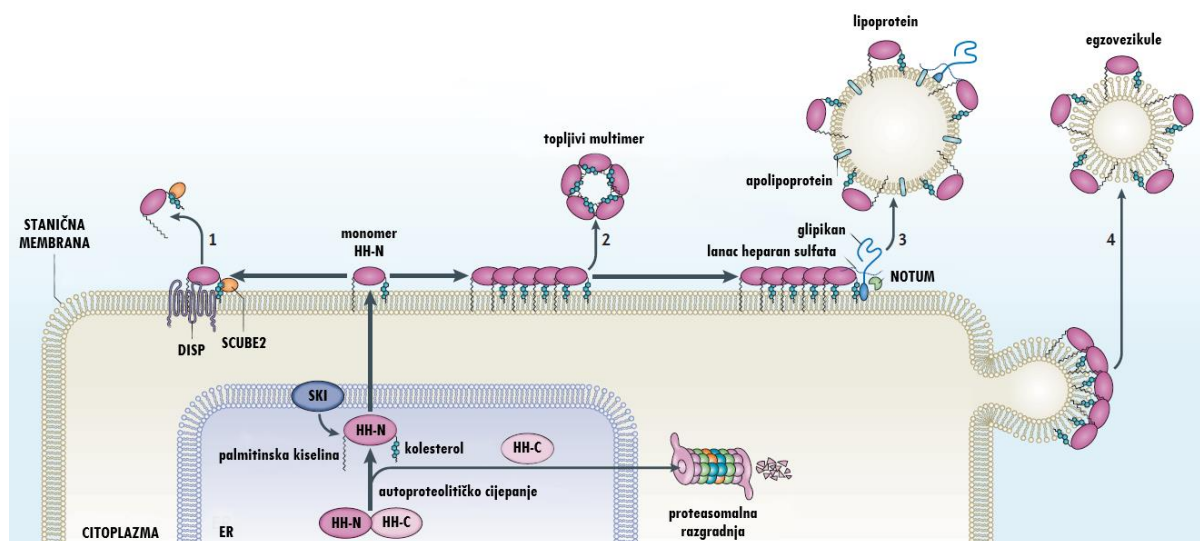


Slika 1. Proces sazrijevanja i procesiranja proteina HH (Preuzeto i prilagođeno prema Varjosalo i Taipale 2008).

Nakon sinteze polipeptidnog prekursora dolazi do uklanjanja signalne sekvence pomoću enzima signalne peptidaze u endoplazmatskom retikulumu (1.). Posredstvom C-terminalnog fragmenta dolazi do intramolekularnog proteolitičkog cijepanja i kovalentnog vezanja kolesterola na C-kraj HH-N (2.). Druga lipidna modifikacija obuhvaća vezanje palmitata posredstvom acil-transferaze SKI (3.). Tako modificirani HH-N predstavlja aktivnu signalnu molekulu.

Procesiranje proteina HH od izuzetne je važnosti iz razloga što je sam C-terminalni fragment odgovoran za intramolekularnu obradu prekursora (autoprocisirajuća domena), dok N-terminalni fragment posjeduje signalnu aktivnost (signalna domena). Dvostruka lipidna modifikacija ključni je dio sinteze i procesiranja proteina HH te stoga ima važnu ulogu u kontroliranom otpuštanju proteina s membrane, na način da potiče povezivanje HH-N s membranskim mikrodomenama visoko obogaćenima sterolima te lokalizaciji njegovog djelovanja u tkivima (Briscoe i Théron 2013).

Oslobađanje proteina HH-N iz stanice posredovano je transmembranskim proteinom Dispatched (DISP) i sekretornim proteinom SCUBE2 (eng. *signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2*), koji se izravno vežu za kolesterolski dio HH-N. Isto tako, postoje i drugi načini oslobađanja proteina HH-N s membrane, kao što je izlučivanje u obliku velikih topljivih multimera, koji nastaju udruživanjem većeg broja monomera HH-N, zatim interakcija grupe monomera s glipikanima¹ u svrhu interakcije s apolipoproteinima i pakiranja u lipoproteinske čestice ili izlučivanje na površini egzovezikula (Slika 2.) (Briscoe i Théron 2013).



Slika 2. Sinteza i oslobađanje proteina HH iz stanice (Preuzeto i prilagođeno prema Briscoe i Théron 2013).

Aktivni oblik HH-N vezan je u obliku monomera za lipidni dvosloj stanične membrane s koje se oslobađa na jedan od četiri načina. Vezanjem proteina DISP i SCUBE2 za kolesterolski dio HH-N dolazi do oslobađanja monomera HH-N (1.). Više monomera može tvoriti velike topljive multimere koji se oslobađaju s membrane (2.). HH-N oligomeri mogu komunicirati s glipikanima, što im omogućuje regrutiranje apolipoproteina i formiranje lipoproteinskih čestica, koje se oslobađaju od membrane posredstvom proteina NOTUM (3.). Konačno, alternativni put predstavlja izlučivanje HH-N na površini egzovezikula (4.).

¹ Proteoglikani heparan sulfata usidreni za vanjsku površinu stanične membrane pomoću glikozil fosfatidilinozitola (GPI, eng. *glycosyl phosphatidylinositol*).

Nakon obrade i sekrecije aktivnog oblika proteina HH-N iz stanica, isti putem izvanstaničnog prostora odlazi do ciljnih stanica, gdje se kao ligand veže za transmembranski receptor Patched (PTCH) i pokreće signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI) (Porter i sur. 1996). Nezreli proteini HH, odnosno oni koji nisu prošli dvostruku lipidnu modifikaciju uslijed neke pogreške u procesiranju, ne mogu tvoriti multimerne te samim time ne dolazi do njihovog izlučivanja i prijenosa signala između stanica (Briscoe i Théron 2013).

1.2. Signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI)

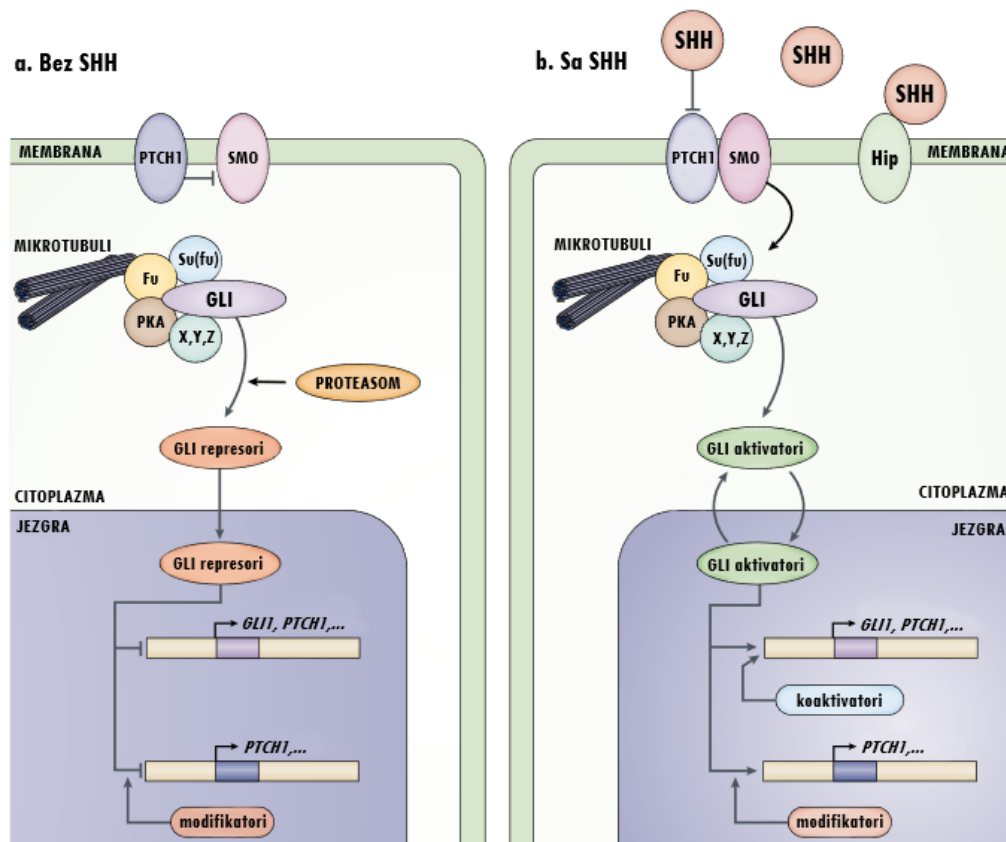
1.2.1. Kanonska aktivacija signalnog puta

Signalni put Hedgehog-Gli ima dva načina aktivacije, kanonski i nekanonski. Vezanjem liganda HH na primarni transmembranski receptor Patched dolazi do klasične ligand-ovisne kanonske aktivacije signalnog puta. Kod sisavaca razlikujemo dva homologa proteina PTCH, Patched1 (PTCH1) i Patched2 (PTCH2), koji vežu sva tri HH liganda s podjednakim afinitetom (Sari i sur. 2018). U odsustvu liganda HH, receptor PTCH inhibira koreceptor Smoothed (SMO) i na taj način negativno regulira signalni put, odnosno onemogućava prijenos signala (Ingham i McMahon 2001). Aktivacijom receptora prestaje inhibicija SMO od strane PTCH te je omogućen prijenos signala i aktivacija nizvodnih komponenti signalnog puta, transkripcijskih faktora GLI (Slika 3.) (Sabol i sur. 2018). Ulaskom u jezgru, aktivatorski oblici transkripcijskih faktora GLI potiču transkripciju različitih skupina ciljnih gena, među kojima su i *PTCH1* te *GLI1* (Marigo i sur. 1996).

1.2.2. Nekanonska aktivacija signalnog puta

Zbog složenosti signalnog puta HH-GLI, osim kanonske aktivacije ovisne o ligandu HH, paralelno se razvilo i nekoliko alternativnih mehanizama nekanonske aktivacije, koji izazivaju različite stanične odgovore (Niyaz i sur. 2019). Nekanonski put aktivacije obuhvaća sve tipove signalizacije koji odstupaju od klasičnog kanonskog puta, poput signalizacije koja uključuje komponente signalnog puta HH-GLI neovisno o transkripcijskim promjenama posredovanima transkripcijskim faktorima GLI, zatim interakcije HH-GLI s drugim signalnim putevima i netipične međusobne interakcije glavnih komponenti signalnog puta HH-GLI (Jenkins 2009). Poznato je da do aktivacije SMO ili GLI može doći putem drugih signalnih

puteva poput gvanozin trifosfataze (GTPase, eng. *guanosine triphosphatase*), fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K, eng. *phosphoinositide 3-kinase*) i sl. (Jeng i sur. 2020).



Slika 3. Prikaz inaktivnog (lijevo) i aktivnog (desno) signalnog puta HH-GLI kod sisavaca (Preuzeto i prilagođeno prema Ruiz i Altaba i sur. 2002).

U odsustvu liganda HH dolazi do inhibicije koreceptora SMO od strane receptora PTCH, čime se blokira prijenos signala. Proteini GLI vezani su za represor SUFU (eng. *suppressor of fused*) i fosforilirani protenskom kinazom A (PKA) te kinazom glikogen sintaze 3 β (GSK3 β , eng. *glycogen synthase kinase 3 β*), što sprječava njihovu translokaciju u jezgru i dovodi do njihovog cijepanja u proteasomu. Cijepanjem proteina GLI nastaje represorski oblik koji blokira transkripciju ciljnih gena u jezgri. S druge strane, nakon vezanja liganda HH za receptor PTCH1 dolazi do kanonskog prijenosa signala, odnosno prestaje inhibicija koreceptora SMO i dolazi do odvajanja proteina GLI od represora SUFU. Takvi nepocijepani proteini odlaze u jezgru, gdje potiču transkripciju ciljnih gena.

1.3. Uloga SHH u embrionalnom razvoju i odraslom organizmu

Tijekom embriogeneze dolazi do aktivacije brojnih signalnih puteva s ciljem regulacije i kontrole pravilnog razvoja. Jedan od njih je i signalni put HH-GLI, poznat po mitogenim i morfogenim učincima tijekom razvoja (Petrova i Joyner 2014). Pokretač signalnog puta HH-GLI, ligand SHH, uključen je u cijeli spektar razvojnih procesa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i sazrijevanje stanica i tkiva, djelujući na regulatore staničnog ciklusa. Tijekom

embrionalnog razvoja javlja se tkivno specifična ekspresija istog u notokordu, ploči dna neuralne cijevi, zoni polarizirajuće aktivnosti pupoljaka udova i crijevima (Odent i sur. 1999). Kod razvoja neuralne cijevi kralježnjaka nastaje padajući koncentracijski gradijent SHH od notokorda i ploče dna prema dorzalnoj strani neuralne cijevi koji usmjerava stvaranje i pozicioniranje više tipova neurona. Uslijed povišene koncentracije SHH nastaju prekursori neurona iz kojih se potom razvijaju neuroblasti, a nakon diferencijacije i jedan od specijaliziranih tipova neurona, odnosno osjetilni i interneuroni u dorzalnog te motorički neuroni u ventralnom dijelu neuralne cijevi. Isto tako, pri razvoju udova nastaje gradijent SHH koji usmjerava stvaranje istih, počevši od zone polarizirajuće aktivnosti prema anteriornom kraju udova (Jia i Jiang 2006). Nadalje, dokazano je da tijekom razvoja maloga mozga dolazi do izlučivanja SHH iz Purkinjeovih stanica, koji potiče aktivaciju nekoliko tipova matičnih stanica i proliferaciju prekursora zrnatih stanica (Dahmane i sur. 2001). Osim u neurogenezi, SHH ima važnu ulogu u razvoju kože i folikula dlake (Fuchs i sur. 2001) te gastrointestinalnog trakta (Van Den Brink 2007). Tijekom rane organogeneze javlja se ekspresija SHH i IHH u endodermu crijeva kralježnjaka, dok su njihovi ciljni geni (*PTCH1* i *GLII*) eksprimirani isključivo u mezenhimu, stoga dolazi do prijenosa signala iz epitela u mezenhim i aktivacije signalnog puta HH-GLI, koji ima ključnu ulogu u pravilnoj morfogenezi gastrointestinalnog trakta i enteričkog živčanog sustava (Ramalho-Santos i sur. 2000). S obzirom na izuzetno važnu ulogu liganda SHH u embriogenezi, bilo kakvi poremećaji ili mutacije istog mogu rezultirati određenom vrstom razvojnih malformacija. Dokazano je da mutacije gena *SHH* dovode do holoprosencefalije, kongenitalne malformacije koja uključuje abnormalno formiranje i razdvajanje prednjeg mozga embrija (lat. *prosencephalon*) na dvije hemisfere (Roessler i sur. 1997). Riječ je o genetski heterogenoj malformaciji kompleksne etiologije koja osim genetskih uključuje i okolišne čimbenike te se samim time razlikuje i klinička slika oboljelih (Odent i sur. 1999).

Iako je u odraslom organizmu signalni put HH-GLI u potpunosti inaktivan ili vrlo slabo aktivan, djelomična aktivnost ovog signalnog puta jedan je od ključnih čimbenika u održavanju homeostaze i regeneraciji tkiva. Ekspresija SHH kod odraslih ljudi primarno se javlja u sličnim populacijama somatskih matičnih stanica kao i tijekom embriogeneze, poput stanica mozga, kože, prostate i mjehura (Petrova i Joyner 2014). Kao što je već nekoliko puta navedeno, pošto SHH ima ključnu ulogu u razvoju živčanog sustava, nepobitna je i njegova važnost tijekom neurogeneze mozga odraslih sisavaca. Dokazano je da kod odraslih štakora dolazi do proliferacije i poticanja samoobnavljanja neuralnih matičnih i progenitorskih stanica, kao

odgovor na prekomjernu ekspresiju SHH, što doprinosi neurogenezi mozga, primarno hipokampusa, pošto isti ima eksprimirane receptore PTCH i SMO (Lai i sur. 2003). Isto tako, SHH djeluje kao važan regulator migracije stanica u mozgu odraslih sisavaca (Balordi i Fishell 2007). Osim u mozgu, ekspresija SHH javlja se i u koži odraslih, odnosno epidermalnim matičnim stanicama tijekom anagene faze rasta dlake, koja je definirana intenzivnom mitotičkom aktivnošću u području matriksa vlasi i procesom orožnjavanja iste (Brownell i sur. 2011). Dokazano je da egzogeno uneseni SHH kod miševa potiče rast dlake upravo na način da inducira mirujuće folikule iz telogene faze u anagenu fazu rasta (Sato i sur. 1999). S druge strane, prekomjerna ekspresija egzogenog SHH-N ili delecija PTCH1 u zrelih osteoblastima miševa dovodi do povećane proizvodnje osteoblasta, ali i osteoklastogenog potencijala koji dovodi do resorpcije i smanjenja volumena kosti (Kiuru i sur. 2009). Što se tiče uloge SHH u regeneraciji tkiva nakon ozljeda, Liu i sur. (2013) pokazali su da povećana ekspresija SHH, kod odraslih miševa s ozljedama dišnih puteva, dovodi do taloženja kolagena i fibroze pluća. Također, važna je njegova uloga i u regeneraciji mišića nakon ozljede, jer usmjerava mišićne matične stanice prema mjestu ozljede i inducira angiogenezu (Koleva i sur. 2005), kao i u gastrointestinalnom sustavu, gdje inhibira proliferaciju i potiče diferencijaciju epitela želuca (Van den Brink i sur. 2001). Navedeni primjeri predstavljaju samo dio velikog broja regulatornih mehanizama odraslog organizma u koje je uključen SHH sa svrhom očuvanja homeostaze, dok neki od glavnih mehanizama tek trebaju biti opisani.

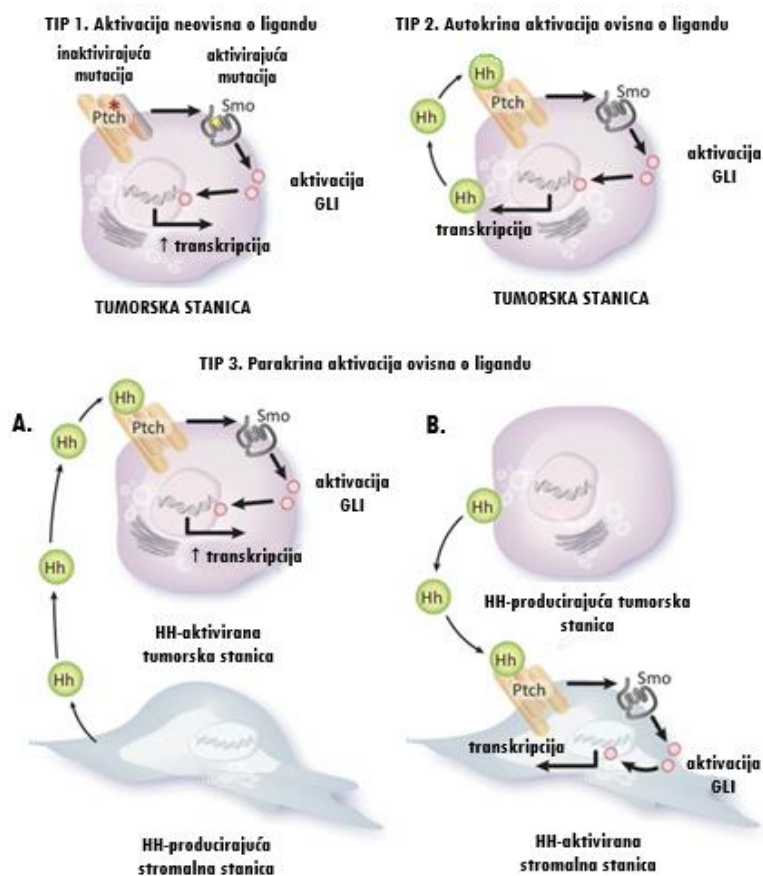
1.4. Uloga SHH u tumorogenezi

Iako SHH, kao ligand signalnog puta HH-GLI, ima najvažniju ulogu u embriogenezi, diferencijaciji i proliferaciji stanica te regeneraciji tkiva kod odraslih organizama, poremećena funkcija ili mutacije istog mogu doprinijeti inicijaciji, progresiji, invaziji i preživljenju tumora. Tumori najčešće nastaju uslijed neprekidne proliferacije stanica uzrokovane mutacijama u genima čija je uloga kontrola regulatornih procesa u stanici. U tu skupinu ubrajamo protoonkogene i gene za tumorske supresore. Protoonkogeni su geni normalno prisutni u zdravim stanicama s ulogom kontrole staničnog ciklusa, diferencijacije i inhibicije stanične smrti. Uslijed mutacija oni postaju onkogeni, što rezultira pojačanom proliferacijom tumorskih stanica i uspješnim izbjegavanjem stanične smrti. S druge strane, geni za tumorske supresore inhibiraju rast tumorskog tkiva, na način da sprječavaju diobu stanica i potiču staničnu smrt te su stoga u tumorima najčešće inaktivirani, čime se gubi i njihova funkcija (Cooper i Hausman

2004). Pošto pojedini članovi signalnog puta HH-GLI spadaju u skupinu tumorskih supresora (PTCH i GLI) i protoonkogeni (SHH i SMO), jasno je da njihova inaktivacija, odnosno prekomjerna aktivacija može dovesti do poremećene funkcije signalnog puta, a samim time i procesa koje kontroliraju.

U tumorigenezi razlikujemo četiri modela, odnosno tipa aktivacije signalnog puta HH-GLI. *Tip I* predstavlja tumore posredovane mutacijama u određenim članovima signalnog puta, a najčešće je riječ o inaktivaciji *PTCH1* i *SUFU*, aktivaciji *SMO* ili pak amplifikaciji i translokaciji gena *GLI1* i *GLI2*, što dovodi do konstitutivne aktivacije signalnog puta HH-GLI i razvoja nekoliko tipova tumora. Pošto na taj način dolazi do aktivacije signalnog puta čak i u odsustvu liganda, taj model se još naziva i ligand-neovisan (Niyaz i sur. 2019). S druge strane, aktivacija *tipa II* je ligand-ovisna autokrini aktivacija kod koje povećana ekspresija liganda HH djeluje na tumorske stanice koje proizvode isti, što rezultira proliferacijom i preživljenjem tumora. Autokrini aktivacija, odnosno prekomjerna ekspresija liganda HH neovisna o genetičkim aberacijama, javlja se kod tumorigeneze dojke, jajnika, kože, pluća, debelog crijeva i sl. Stvaranjem i ponovnim vezanjem liganda HH stvara se pozitivna povratna sprega aktivacije signalnog puta (Cochrane i sur. 2015). Nadalje, *tip III* predstavlja ligand-ovisnu parakrinu aktivaciju koja može biti dvosmjerna. Ligand HH može biti prekomjerno ekspresiran od strane tumorskih stanica i kao takav djelovati na susjedne stromalne stanice, koje lučenjem određenih čimbenika rasta, poput vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, eng. *vascular endothelial growth factor*) i inzulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF, eng. *insulin-like growth factor 1*), aktivacijom drugih signalnih puteva i poticanjem angiogeneze stvaraju povoljan mikrookoliš za rast tumora (Yauch i sur. 2008). Dokazano je da se parakrini aktivacija signalnog puta HH-GLI javlja kod tumora prostate, gušterače, jajnika i debelog crijeva (Cochrane i sur. 2015). Isto tako, postoji i reverzna parakrini aktivacija koju definira lučenje liganda HH od strane stromalnih i endotelnih stanica iz tumorskog mikrookoliša, što potiče rast tumora (Pandolfi i Stecca 2015). Reverzna parakrini aktivacija karakteristična je primarno za različite tipove mijeloma i limfoma (Dierks i sur. 2007) (Slika 4.). Konačno, *tip IV* ili alternativni put, definiran je autokrinom ili parakrinom aberantnom aktivacijom signalnog puta HH-GLI u tumorskim matičnim stanicama (CSC, eng. *cancer stem cells*). Na taj način potiče se njihovo samoobnavljanje, ali i diferencijacija te proliferacija, što rezultira stvaranjem heterogene populacije stanica unutar tumora (Medema 2013). Gubitkom tumor supresorske aktivnosti p53 dolazi do aktivacije signalnog puta HH-GLI i pojačane regulacije transkripcijskog faktora *NANOG* (eng. *Nanog homeobox*), čija uloga je samoobnavljanje

embrionalnih matičnih stanica i reprogramiranje diferenciranih somatskih stanica u pluripotentne (Po i sur. 2010).



Slika 4. Tipovi aktivacije signalnog puta HH-GLI u tumorskim stanicama (Preuzeto i prilagođeno prema Hui i sur. 2013).

Tip I predstavlja aktivaciju neovisnu o ligandu posredovanu inaktivirajućim mutacijama *PTCH1* i *SUFU*, aktivirajućom mutacijom *SMO* ili amplifikacijama gena *GLI1* i *GLI2*, što dovodi do konstitutivne aktivacije signalnog puta HH-GLI. Kod tipa II ili autokrine aktivacije ovisne o ligandu dolazi do povećane ekspresije liganda HH od strane tumorskih stanica koja istovremeno i veže isti, stvarajući pozitivnu povratnu spregu u aktivaciji puta HH-GLI. Tip III ili parakrina aktivacija ovisna o ligandu može biti dvosmjerna. Tumorske stanice mogu lučiti ligand HH, koji se veže za receptore na stromalnim stanicama. Aktivirane stromalne stanice zauzvrat proizvode faktore rasta koji potiču angiogenezu i progresiju tumorskih stanica (3B.). S druge strane, kod reverzne parakrine aktivacije ovisne o ligandu dolazi do lučenja liganda HH od strane stromalnih stanica te se isti veže za tumorske stanice (3A.).

1.5. Interakcija SHH i drugih signalnih puteva u nastanku melanoma

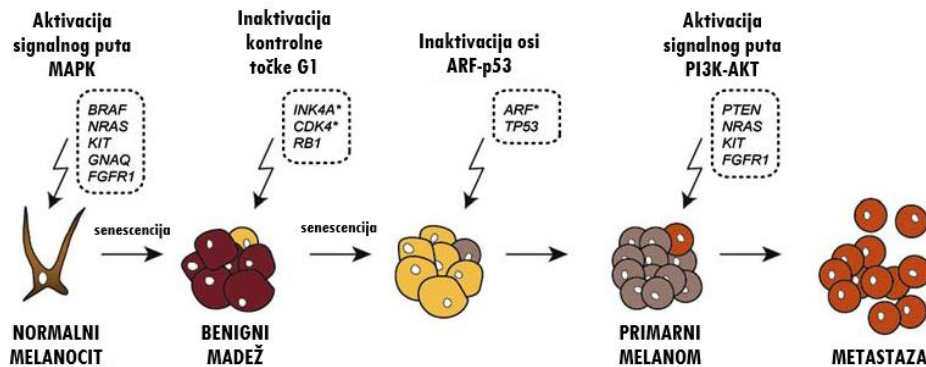
U današnje vrijeme, melanom se smatra jednim od najagresivnijih tumora sa sve većom učestalosti u populaciji (Stecca i sur. 2007). Riječ je o izuzetno smrtonosnom tipu tumora kože

koji nastaje uslijed nekontroliranog rasta i diobe pigmentnih stanica melanocita ili njihovih multipotentnih prekursora porijeklom iz neuralnog grebena. Sama patogeneza melanoma je izuzetno raznolika, zbog heterogenosti same bolesti, koja u podlozi ima složene mehanizme nastanka. Najčešće je riječ o specifičnim genetskim promjenama unutar jednog ili više funkcionalno povezanih signalnih puteva (Palmieri i sur. 2015). Osim melanoma, postoje i nemelanomski tumori kože, a to su karcinom bazalnih stanica (BCC, eng. *basal cell carcinoma*) i karcinom skvamoznih stanica (SCC, eng. *squamous cell carcinoma*), koji su puno češći u populaciji, ali i manje smrtonosni (Böni i sur. 2002).

Nemelanomski tumori, posebno bazocelularni karcinomi, često nastaju uslijed mutacija u genima *PTCH1* ili *SMO* (Otsuka i sur. 2015). S druge strane, kod melanoma razlikujemo cijeli niz molekularnih podvrsta bolesti, ovisno o genima koji su mutirani, no najčešće su prisutne mutacije gena *BRAF* ili *NRAS* (Slika 5.). Mutacije u genu za kinazu BRAF (eng. *isoform B of RAF kinase*) čine istu konstitutivno aktivnom i dovode do pretjerane aktivacije signalnog puta mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK, eng. *mitogen-activated protein kinase*) u čak 50% melanoma te posljedičnog rasta i preživljavanja tumorskih stanica (Kunz i Vera 2019). Najčešća mutacija, koja se javlja u 74–90% slučajeva melanoma s mutacijom BRAF, je zamjena valina glutaminskom kiselinom na kodonu 600 (V600E) (Platz i sur. 2008), dok je u 16–29% slučajeva dokazana zamjena u lizin na istom kodonu (V600K) (Menzies i sur. 2012). Mutacija V600E dokazana je i u 82% histološki različitih madeža, što implicira na zaključak da je sama aktivacija signalnog puta MAPK ključan korak pri nastanku benignih madeža, no ista nije dostatna za progresiju u invazivnu vrstu tumora, već takvi madeži ostaju indolentni. Također, u istoj studiji dokazana je mutacija u genu za protein NRAS (eng. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), koji se nalazi uzvodno u signalnom putu MAPK, kod 14% madeža i čak 64% metastaza melanoma (Pollock i sur. 2003). S druge strane, sekvenciranjem cijelog genoma identificirane su mutacije proteina NRAS u 26% uzoraka melanoma (Hodis i sur. 2012). Najučestalije mutacije istog su u kodonu 61, i to supstitucija glutamina u arginin (Q61R), odnosno lizin (Q61K) (Ball i sur. 1994). Zanimljivo je da, iako se mutacije proteina BRAF i NRAS međusobno isključuju u gotovo svim slučajevima melanoma, čak oko dvije trećine bolesnika ima melanom u kojem aktivirani signalni put MAPK nosi jedan od ta dva mutirana gena (Thomas 2006).

Sljedeći signalni put koji je uključen u nastanak melanoma je put fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) i proteinske kinaze B (Akt ili PKB, eng. *protein kinase B*), odnosno PI3K/Akt. Do aktivacije istog u melanomu dolazi na više načina, no najčešća su dva događaja. Isto kao i

BRAF, u 15-20% slučajeva signalni put PI3K može biti aktiviran mutacijama u uzvodnom signalnom putu proteina NRAS ili gubitkom ekspresije, odnosno delecijom gena za tumorski supresor homologa fosfataze i tenzina (*PTEN*, eng. *phosphatase and tensin homolog*), što je dokazano u 20-30% slučajeva (Hocker i Tsao 2007). Gubitak funkcije istog rezultira povećanom fosforilacijom kinaze Akt i posljedično smanjenom apoptozom, odnosno povećanim preživljenjem melanoma, pošto *PTEN* djeluje kao negativni regulator signalnog puta PI3K (Kunz i Vera 2019). Isto tako, mutacija gena *PTEN* pronađena je u 44% melanoma s mutacijom BRAF i samo 4% NRAS mutiranih melanoma, što je dodatni dokaz da se mutacije BRAF i NRAS međusobno isključuju (Hodis i sur. 2012). S druge strane, Curtin i sur. (2006) dokazali su da je učestalost mutacija u genima koji kodiraju za PI3K i Akt te amplifikacija gena Akt rijetka u uzorcima tkiva, kao i staničnim linijama melanoma.



Slika 5. Hipotetski model razvoja melanoma (Preuzeto i prilagođeno prema Meyle i Guldberg 2009).

Svaki od koraka u nastanku primarnog melanoma i njegove metastaze iz normalnog melanocita temelji se na promjenama u nizu gena. Aktivacija signalnog puta MAPK nužna je za razvoj benignih madeža, no ista nije dostatna za progresiju istih u invazivnu vrstu tumora, već takvi madeži ostaju indolentni. Nakupljanjem dodatnih mutacija koje uključuju gubitak kontrolne točke na prijelazu staničnog ciklusa iz G1 u S fazu, aktivaciju signalnog puta PI3K/Akt i dr. dolazi do razvoja tumora.

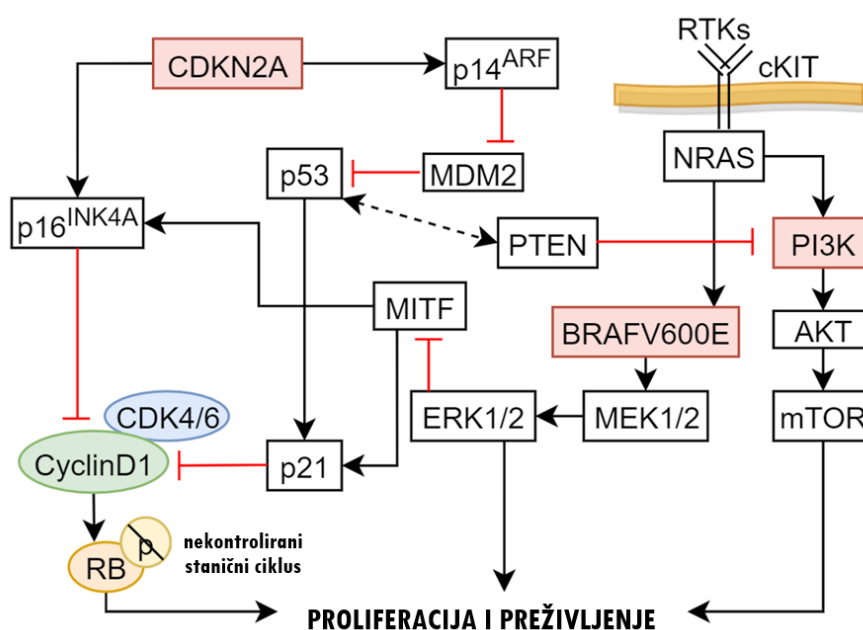
Osim gore navedenih, izuzetno važnu ulogu u tumorigenezi melanoma ima i gen za tumorske supresore ciklin-ovisni inhibitor kinaze 2A (*CDKN2A*, eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), koji kodira proteine p16 i p14. Protein p16 negativno regulira kompleks ciklin-ovisne kinaze 4 (CDK4, eng. *cyclin-dependent kinase 4*) i ciklina D1 (kodiran genom *CCND1*), koji kao kontrolna točka sprječava prelazak staničnog ciklusa iz G1 u S fazu (Palmieri i sur. 2015). S druge strane, p14 inhibira MDM2 (eng. *mouse double minute 2 homolog*) i na taj način pozitivno regulira p53, sprječavajući njegovu degradaciju. Stoga inaktivacija *CDKN2A* i p53

dovodi do nekontrolirane proliferacije melanocita (Liu i sur. 2014). Mutacije, odnosno delecije gena *CDKN2A* su čak do deset puta češće kod ljudi s nasljednim tipom melanoma u usporedbi s pojedincima kod kojih se melanom javio sporadično (Meyle i Guldborg 2009). Isto tako, u kontroli proliferacije i diferencijacije melanocita važnu ulogu ima i transkripcijski faktor povezan s mikroftalmijom² (*MITF*, eng. *microphthalmia-associated transcription factor*). Dokazano je da MITF aktivira antiapoptotski gen *BCL2* (eng. *B-cell leukemia/lymphoma 2*), što rezultira preživljenjem melanocita i melanoma (McGill i sur. 2002). Povećana ekspresija istog u metastatskom melanomu korelira sa smanjenom stopom preživljenja pacijenata (Garraway i sur. 2005). Prikaz mrežne interakcije svih gore navedenih signalnih puteva i molekula u melanomu nalazi se na Slici 6.

Iako SHH ima važnu ulogu u razvoju kože i dlačnih folikula te se mutacije istog, kao dijela signalnog puta HH-GLI, dovode u vezu s nemelanomskim tumorima, tek prije petnaestak godina je otkrivena njegova poveznica s nastankom melanoma. Stecca i sur. (2007) dokazali su aktivnost signalnog puta HH-GLI u staničnim linijama i genetski induciranim mišjim modelima melanoma. U navedenom istraživanju pokazano je da do pojačane transkripcijske aktivnosti faktora *GLI* može doći uslijed hiperaktivacije signalnih puteva MAPK i Akt. Također, ekspresija transkripcijskih faktora *GLI* dokazana je i u staničnim linijama, kao i uzorcima tkiva primarnih melanoma čovjeka. Ozretić i sur. (2019) dokazali su statistički značajno povećanje ekspresije proteina *GLI1* i *GLI2* u metastatskim uzorcima melanoma čovjeka u usporedbi sa zdravim tkivom kože. Zanimljivo je da tkivni uzorci melanoma koji nose mutaciju *BRAF*^{V600E} imaju značajno povećanu ekspresiju *GLI1*, u odnosu na melanome s divljim tipom gena *BRAF*, dok inhibicija *BRAF*^{V600E} korelira sa značajnim smanjenjem proteinske ekspresije *GLI1*, što dokazuje postojanje uske interakciju između ta dva signalna puta (Jalili i sur. 2013). Slična interakcija dokazana je i kod analize staničnih linija i tkivnih uzoraka tumora jednjaka. Naime, kod istih dolazi do aktivacije signalnog puta HH-GLI i povećane ekspresije gena *SHH* i *GLI1*, koja je povezana s aktivacijom proteinske kinaze B (Akt) te posljedično lošijom prognozom takvih bolesnika. U istoj studiji dokazana je pojačana fosforilacija kinaze Akt nakon tretiranja dvije stanične linije karcinoma jednjaka rekombinantnim SHH-N (Wei i Xu 2011). Isto je pokazano i kod gastrointestinalnih stromalnih tumora (GIST), gdje po stimulaciji stanica rekombinantnim SHH-N i epidermalnim faktorom rasta (EGF, eng. *epidermal growth factor*) dolazi do povećane ekspresije signalnih puteva PI3K, MAPK i SHH te značajnog povećanja stope proliferacije tumorskih stanica, što se

² Kongenitalna malformacija koju karakterizira smanjena očna jabučica.

sprječava upotrebom inhibitora tih signalnih puteva (Qi i sur. 2018). S druge strane, u staničnim linijama tumora dojke, rekombinantni SHH osim pojačanja ekspresije GLI1 i proliferacije tumorskih stanica, doveo je i do pojačanja ekspresije SMO te iskorištenosti glukoze i proizvodnje laktata, odnosno ubrzanog glikolitičkog procesa. Uz to, nakon tretmana pomoću rSHH došlo je značajnog povećanja fosforilacije proteinske kinaze B (Akt) i kinaze regulirane ekstracelularnim signalom (ERK, eng. *extracellular-signal-regulated kinase*), što je direktni dokaz da rSHH aktivira signalne puteve PI3K i MAPK (Ge i sur. 2015).



Slika 6. Prikaz značajnih signalnih puteva u melanomu povezanih s preživljenjem, diferencijacijom i proliferacijom tumorskih stanica te njihova mrežna interakcija. Crne strelice predstavljaju aktivacijske, a crvene linije inhibicijske signale (Preuzeto i prilagođeno prema Maner i sur. 2020).

S obzirom na činjenicu da je dokazana interakcija SHH sa signalnim putevima PI3K i MAPK u drugim tipovima tumorima, postavlja se pitanje postoji li ona i u melanomu. Pošto još uvijek ne postoje dokazi za istu, odlučili smo istražiti kako tretman rekombinantnim SHH utječe na proteinsku ekspresiju njegovog primarnog receptora PTCH1 i transkripcijskih faktora GLI te na stanični ciklus i aktivaciju signalnih puteva PI3K i MAPK u staničnoj liniji melanoma čovjeka CHL-1. Ukoliko se dokaže postojanje interakcije između navedenih signalnih puteva, to otvara mogućnost daljnjih istraživanja vezanih uz primjenu kombiniranih inhibitora kao ciljane terapije u liječenju melanoma.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Aktivni oblik proteina SHH djeluje kao ligand koji se veže za transmembranski receptor Patched i pokreće signalni put Hedgehog-Gli. Ključna uloga signalnog puta HH-GLI je u regulaciji normalnog razvoja tijekom embriogeneze, dok se poremećena funkcija istog povezuje s razvojnim deformacijama i tumorigenezom. Do poremećene funkcije određenog dijela signalnog puta dolazi uslijed mutacija ili prekomjerne ekspresije liganda Hedgehog (HH), koja potiče preživljenje i proliferaciju tumorskih stanica. Autokrini aktivacija signalnog puta HH-GLI može se postići prolaznom transfekcijom stanica, koristeći vektor s ugrađenim genom koji kodira ligand HH ili stabilnom transfekcijom primjenom sustava CRISPR/Cas9. Modificirane zdrave ili tumorske stanice mogu služiti kao model za proučavanje signalnog puta, rasta i razvoja stanica, odgovora na pojedinu vrstu terapije i sl.

Na temelju dosad provedenih istraživanja, glavni ciljevi ovog rada bili su:

1. Dizajn sintetskog genskog fragmenta (gBlock) *SHH*.
2. Kloniranje gBlock *SHH* u plazmidne vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR te validacija vektora sekvenciranjem.
3. Prolazna transfekcija stanične linije CHL-1 plazmidnim vektorom pcDNA3 s ugrađenim genskim fragmentom *SHH*.
4. Dokaz pojačane ekspresije gena *SHH* provjerom njegove proteinske ekspresije.
5. Potvrda autokrine aktivacije signalnog puta HH-GLI ovisne o ligandu SHH provjerom proteinske ekspresije njegovog primarnog receptora *PTCH1* i ciljnih gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*.
6. Provjera utjecaja prolazne transfekcije stanica genskim fragmentom *SHH* i aktivacije signalnog puta HH-GLI na stanični ciklus i aktivaciju signalnih puteva PI3K/MAPK u staničnoj liniji melanoma čovjeka CHL-1.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Materijal na kojem je provedeno ovo istraživanje je stanična linija melanoma čovjeka CHL-1. Riječ je o komercijalnoj staničnoj liniji (ATCC[®] CRL-9446[™]) koja se uzgaja u obliku adherentne kulture u Petrijevim zdjelicama za kultivaciju humanih stanica uz dodatak medija DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) kompletiranog s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, eng. *fetal bovine serum*). Stanična linija je uzgajana u inkubatoru s kontroliranim uvjetima, pri 5% CO₂ i temperaturi od 37 °C. Stanice su održavane u eksponencijalnoj fazi rasta u kulturi uz redovno mijenjanje medija i presađivanje.

3.2. METODE

3.2.1. Dizajn sintetskog genskog fragmenta (gBlock) *SHH*

Za izradu ovog diplomskog rada dizajniran je sintetski fragment gena *SHH* (gBlock) uz pomoć javno dostupnog alata *gBlocks[®] Gene Fragments Entry* na internetskoj stranici *Integrated DNA Technologies* (<https://eu.idtdna.com/site/order/gblockentry>). Nukleotidna sekvenca gena *SHH* preuzeta je iz baze podataka NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), koja se nalazi na web adresi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pretraživanjem navedene baze pronađena je kompletna sekvenca ljudskog gena *SHH* (NC_000007.14) koja sadrži sve eksone i introne, dok je za izradu sintetskog fragmenta upotrijebljena samo kodirajuća regija gena (CDS, eng. *coding DNA sequence*) *SHH*. gBlock gena *SHH* dizajnirale su dr. sc. Vesna Musani i mag. biol. exp. Nikolina Rinčić prema sekvenci kodirajuće regije, uz dodatak nasumičnog slijeda nukleotida i palindromske sekvence GAATTC koju prepoznaje restriktijski enzim EcoRI na 5' kraju genskog fragmenta te četiri uzastopna stop kodona, palindromske sekvence GCGGCCGC, koju prepoznaje enzim NotI i dodatni nasumični slijed nukleotida na 3' kraju istog (Slika 7.). Navedeni enzimi će pocijepati gBlock i stvoriti ljepljive krajeve za kloniranje u vektore pocijepane istim enzimima.

***SHH* gBLOCK**

```
atcttagattcggaattcATGCTGCTACTGGCGAGATGTCTGCTACTAGTCCTCGTCTCCTCACTGCTGGTATGCTCGGGACTGGC
GTGCGGACCGGGCAGGGGGTTCGGGAAGAGGAGACATCCAAAAAGCTAACTCCTTTAGCTTACAAGCAATTTATCCCT
AATGTAGCTGAAAAGACTCTAGGTGCTAGTGGAAGATATGAAGGAAAAGATCTCTAGAACTCTGAACGATTTAAGGAAC
TACTCCTAATTACAACCTGATATCATATTTAAGGATGAAGAAAACACTGGAGCAGATAGACTAATGACTCAAAGATGTA
AGGATAAGTTGAACGCTTTGGCAATCTCAGTTATGAACCAATGGCCAGGAGTTAACTACGAGTAACCTGAAGGTTGGGAT
GAAGATGGTCATCACTCAGAAGAGTCTCTACATTACGAAGGTCGTGCAGTAGATATCACTACATCTGATCGTGATCGTAG
TAAGTACGGTATGCTAGCTCGTCTAGCAGTTGAAGCAGGATTCGATTGGGTATACTACGAATCTAAGGCACATATCCATT
GTTCAAGTTAAAGCAGAAAACCTCAGTTGCAGCTAAATCTGGAGGATGTTTCCAGGTTCTGCTACAGTACATCTAGAACAA
GGTGGAAACAAAGCTTGTAAGGATCTAAGTCCTGGAGATCGAGTTCTTGCAGCTGATGACCAAGGTCGACTTCTATACAG
TGATTTCTTACTTTCTAGATCGTGATGACGGAGCTAAGAAGGATTTCTACGTTATCGAACTCGAGAACCTCGTGAGCG
TCTACTTCTAACAGCTGCACATCTACTTTTTGTTGCTCCACATAACGATTCAGCTACAGGTGAACCAGAAGCTTCATCTGGT
TCAGGACCACCTTCAGGTGGTGCACCTGGACCTCGAGCTCTTTTCGCAAGTCGTGTACGTCCTGGACAACGAGTTTACGTT
GTAGCTGAACGTGATGGAGATCGTCGACTTCTACCTGCAGCTGTACATAGTGTACACTAAGTGAAGAGGCAGCTGGAGC
ATACGCACCACCTTACAGCTCAAGGTACAATTCTAATCAACCGAGTACTTGCATCTTGTACGCAGTTATCGAAGAGCATAG
TTGGGCTCATCGAGCATTGCTCCATTCCGTCTAGCGCATGCACTACTTGTGCACTAGCACCTGCGCGTACAGATCGTGG
AGGTGATAGTGGAGGCGGTGATCGAGGAGGTGGAGGAGGCAGAGTAGCACTAACTGCTCCAGGTGCTGCTGATGCTCC
TGGTGCAGGAGCTACTGCGGGTATCCATTGGTACTACAACCTCTCTACCAATAGGAACTTGGCTACTTGATAGTGAAGC
ACTACATCCTCTTGGAAATGGCTGTAAAGTCAAGTTGAtaatagtagcgccgctaataag
```

Slika 7. Konačna sekvenca sintetskog genskog fragmenta *SHH* uz dodatak nasumičnog slijeda nukleotida i palindromske sekvence koju prepoznaje restriksijski enzim EcoRI (plavo) na 5' kraju i četiri uzastopna stop kodona (narančasto), palindromske sekvence koju prepoznaje restriksijski enzim NotI (zeleno) te nasumični slijed nukleotida na 3' kraju sekvence.

3.2.2. Kloniranje gBlock *SHH* u plazmidne vektore

3.2.2.1. Kloniranje gBlock *SHH* u plazmidni vektor pCR-XL-2-TOPO

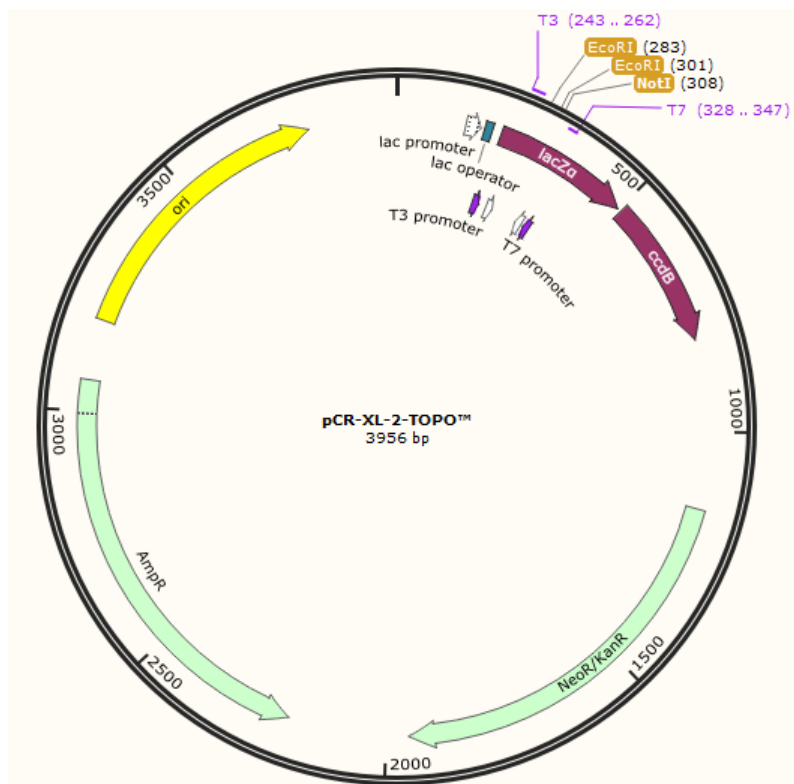
Zbog neuspješnog direktnog kloniranja inserta gBlock *SHH* u plazmidne vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR, najprije sam napravila kloniranje istog u vektor pCR-XL-2-TOPO (Slika 8.), koristeći TOPO™ XL-2 Complete PCR komercijalni set za kloniranje (Invitrogen). Pripremila sam reakcijsku smjesu koja se sastoji od vektora pCR-XL-2-TOPO i otopine soli iz navedenog seta te inserta gBlock *SHH* i vode (Tablica 1.). Kupljeni gBlock *SHH* dolazi pohranjen u tubici u liofiliziranom obliku, ukupne mase 1000 ng te sam ga prije upotrebe centrifugirala (centrifuga Eppendorf) 5 minuta pri 13200 rpm, na sobnoj temperaturi. Potom sam ga otopila u 100 µL prethodno profiltriranog TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), kako bih dobila otopinu koncentracije 10 ng/µL. Dobivenu otopinu sam kratko protresla (vorteks LLG Labware) i stavila 10 minuta na termoblok (Biosan TS-100), uz frekvenciju miješanja od 300 rpm, kako bi se ista dobro otopila. Otopljeni gBlock na kraju sam kratko centrifugirala i višak nakon upotrebe pohranila u zamrzivač na -20 °C.

Reakcijsku smjesu potom sam inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi i odmah zatim napravila transformaciju kemijski kompetentnih bakterija vrste *Escherichia coli*, soj One Shot[®] OmniMAX[™], iz istog seta za kloniranje.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za kloniranje gBlock *SHH* u vektor pCR-XL-2-TOPO.

KOMPONENTA	VOLUMEN
vektor pCR-XL-2-TOPO	0,5 μ L
otopina soli	1 μ L
insert gBlock <i>SHH</i>	1 μ L
voda	3,5 μ L
UKUPNI VOLUMEN	6 μL

U ampulu One Shot bakterija otopljenih na ledu dodala sam 6 μ L reakcijske smjese, lagano promiješala nastavkom za mikropipetu (Eppendorf) i inkubirala 30 minuta na ledu. Smjesu sam zatim zagrijala 45 sekundi na 42 °C, koristeći termoblok i opet ohladila na ledu dvije minute. Na kraju sam u ampulu dodala 250 μ L medija S.O.C. (eng. *Super Optimal Broth*) (Invitrogen) i inkubirala sat vremena na termobloku, pri uvjetima od 37 °C i s frekvencijom miješanja od 300 rpm. Nakon inkubacije razmazala sam 100 μ L bakterijske suspenzije na prethodno pripremljenu čvrstu selektivnu hranjivu podlogu s antibiotikom kanamicinom (50 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) i istu stavila u inkubator (Mettler) na 37 °C preko noći.



Slika 8. Plazmidni vektor pCR-XL-2-TOPO (Preuzeto s www.snapgene.com).

3.2.2.2. Ekstrakcija gBlock *SHH* iz vektora pCR-XL-2-TOPO - *SHH*

Po izolaciji i provjeri ispravnosti sekvence genskog fragmenta *SHH* ugrađenog u plazmidni vektor pCR-XL-2-TOPO - *SHH*, kao što je opisano u poglavljima 3.2.4. *Izolacija plazmidne DNA iz bakterija* i 3.2.5. *Sekvenciranje izolirane plazmidne DNA*, napravila sam izrezivanje *SHH* iz vektora koristeći restriksijske enzime EcoRI (New England Biolabs) i NotI (New England Biolabs), zatim razdvajanje fragmenata pomoću elektroforeze u agaroznom gelu i na kraju pročišćavanje gBlock *SHH* iz gela uz pomoć komercijalnog seta QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

Za ekstrakciju gBlock *SHH* iz vektora pCR-XL-2-TOPO - *SHH* koristila sam jedan od alikvota plazmidne DNA izolirane prema gore navedenom protokolu, masene koncentracije 390,30 ng/ μ L. Najprije sam napravila reakcijsku smjesu za digestiju (Tablica 2.) te sam istu inkubirala u termobloku sat vremena na 37 °C, a zatim još 20 minuta na 65 °C, kako bi došlo do inaktivacije restriksijskih enzima.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za digestiju gBlock *SHH* iz vektora pCR-XL-2-TOPO - *SHH*.

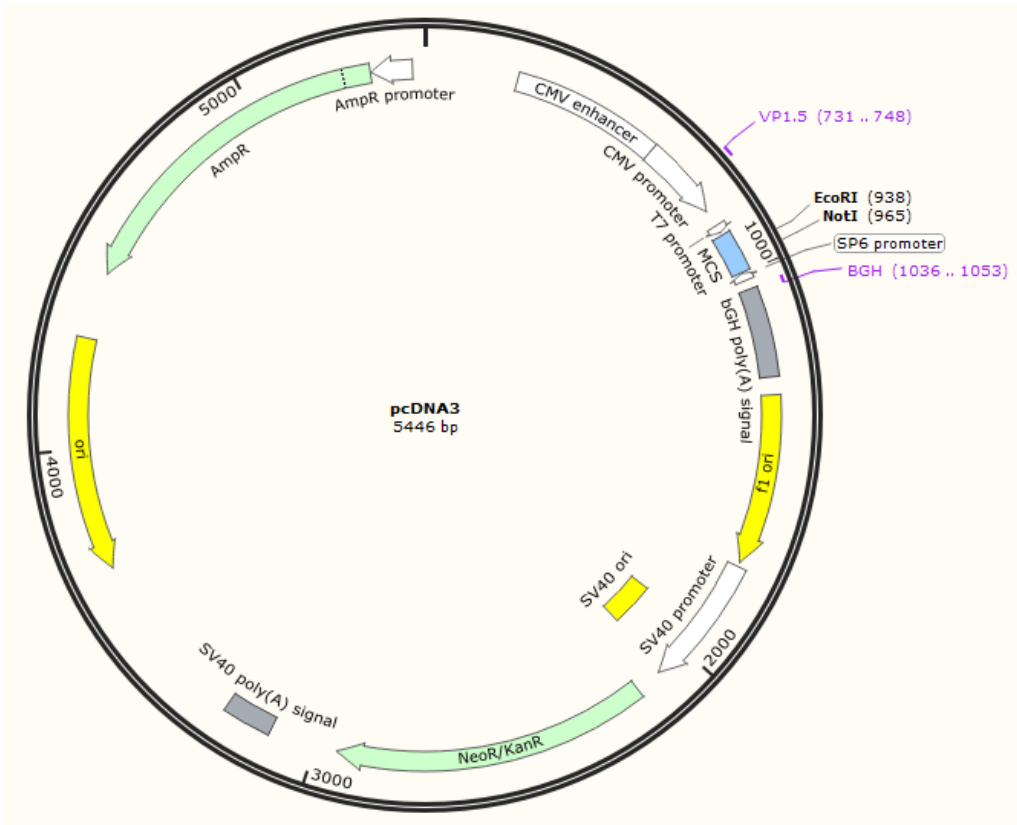
KOMPONENTA	VOLUMEN
plazmidna DNA (<i>SHH</i> - pCR-XL-2-TOPO)	10 μ L (3,9 μ g)
enzim EcoRI	1 μ L
enzim NotI	1 μ L
pufer CutSmart	2 μ L
voda	6 μ L
UKUPNI VOLUMEN	20 μL

Svih 20 μ L reakcijske smjese potom sam pomiješala s 4 μ L boje Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England Biolabs) i nanijela na unaprijed pripremljeni 0,7%-tni agarozni gel (0,28 g agaroze otopljeno u 40 mL pufera TAE zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja). Pripremljeni uzorak zatim sam podvrgnula gel elektroforezi 30 minuta pri stalnom električnom naponu od 90 V. Dobivene produkte vizualizirala sam u mračnoj prostoriji pomoću UV transiluminatora (Elcrom), koji emitira ultraljubičasto zračenje valne duljine 312 nm kroz gel. Orijentirajući se prema markeru na gelu, pažljivo sam pomoću skalpela izrezala komadić gela u kojem se nalazio fragment DNA približne veličine 1430 pb, što odgovara gBlock *SHH*, te ga prebacila u mikroeprevetu od 1,5 mL, unaprijed izvaganu na analitičkoj vagi Mettler PM4000

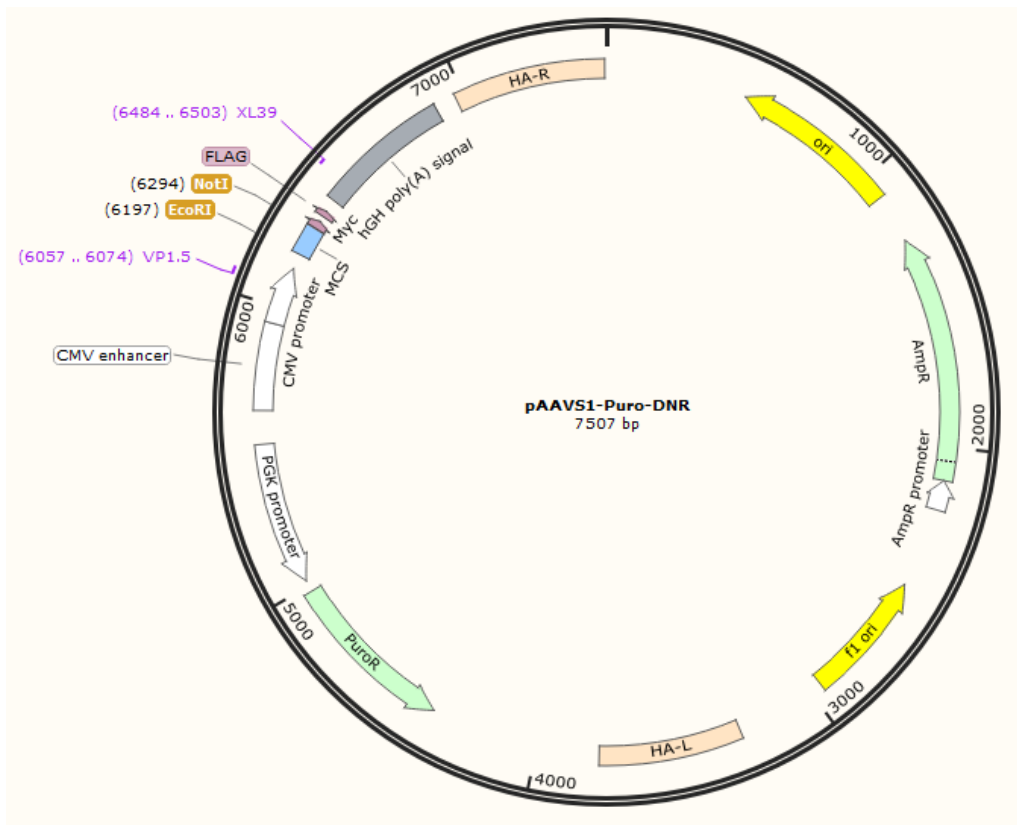
(Mettler Toledo). Po dodatku komadića gela u mikroepripruvenu, istu sam ponovno izvagala te iz dobivenih podataka izračunala točnu masu gela. Zatim sam, prema dobivenoj masi gela, u mikroepripruvenu dodala trostruku količinu pufera QG iz seta QIAquick Gel Extraction i inkubirala na termobloku 10 minuta pri temperaturi od 50 °C, uz protresanje svake dvije do tri minute, kako bi se gel u potpunosti otopio. U međuvremenu sam postavila QIAquick kolonicu u sabirnu mikroepripruvenu od 2 mL i po inkubaciji prebacila sav sadržaj iz mikroepripruvene u kolonicu i centrifugirala jednu minutu pri 13200 rpm, kako bi došlo do vezanja DNA za membranu kolonice. Dobiveni supernatant sam bacila i u kolonicu dodala 750 µL pufera PE te inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi, a zatim ponovno centrifugirala pri istim uvjetima. Po završetku sam bacila supernatant i još jednom centrifugirala kako bih uklonila sav zaostali etanol iz pufera PE. Kolonicu sam potom stavila u čistu mikroepripruvenu od 1,5 mL i u sredinu iste dodala 50 µL pufera za eluciju EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) i centrifugirala jednu minutu pri 13200 rpm. Izoliranom gBlock *SHH* potom sam izmjerila koncentraciju i čistoću koristeći spektrofotometar NanoPhotometer N50/N60 (Implen) te provjerila veličinu izoliranog fragmenta gel elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu.

3.2.2.3. Kloniranje gBlock *SHH* u plazmidne vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR

Kloniranje sintetskog genskog fragmenta *SHH* u plazmidne vektore pcDNA3 (Slika 9.) i pAAVS1-Puro-DNR (Slika 10.) sastoji se od sljedećih koraka: pripreme inserta, digestije plazmidnih vektora, ligacije vektora i inserta te na kraju transformacije kompetentnih bakterija. Kao insert koristila sam ekstrahirani gBlock *SHH* iz plazmidnog vektora pCR-XL-2-TOPO - *SHH* (3.2.2.2. *Ekstrakcija gBlock SHH iz vektora pCR-XL-2-TOPO - SHH*) te ga stoga nije bilo potrebno digestirati restrikcijским enzimima.



Slika 9. Plazmidni vektor pcDNA3 (Preuzeto s www.snapgene.com).



Slika 10. Plazmidni vektor pAAVS1-Puro-DNR (Preuzeto s www.snapgene.com).

Nakon pripreme inserta, napravila sam reakcijske smjese za digestiju plazmidnih vektora pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific) i pAAVS1-Puro-DNR (OriGene). Osim vektora, kao sastavne dijelove reakcijskih smjesa za digestiju, koristila sam enzime EcoRI i NotI, pufer CutSmart (New England Biolabs) i vodu. Točan sastav smjesa za digestiju vektora pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR nalazi u Tablici 3. Pripremljene reakcijske smjese inkubirala sam na termobloku, sat vremena na 37 °C, kako bi došlo do digestije plazmidnih vektora pod utjecajem restriktivnih enzima. Enzim EcoRI prepoznaje palindromski slijed nukleotida GAATTC, a enzim NotI slijed GCGGCCGC te su mjesta cijepanja na plazmidu pcDNA3 prikazana na Slici 11. Pošto prilikom cijepanja navedenim enzimima nastaju ljepljivi krajevi, potrebno je napraviti korak defosforilacije plazmidnih vektora, kako bi se spriječila recirkularizacija istih tijekom ligacije. Stoga sam po inkubaciji digestiranim vektorima dodala 1 µL alkalne fosfataze rSAP (eng. *recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase*) (New England Biolabs) i inkubirala još 30 minuta na 37 °C te potom izvršila inaktivaciju enzima inkubacijom 20 minuta na 65 °C.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za digestiju plazmidnih vektora pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR.

KOMPONENTA	VOLUMEN	KOMPONENTA	VOLUMEN
pcDNA3	1,72 µL (1000 ng)*	pAAVS1-Puro-DNR	2,30 µL (1000 ng)**
enzim EcoRI	1 µL	enzim EcoRI	1 µL
enzim NotI	1 µL	enzim NotI	1 µL
pufer CutSmart	2 µL	pufer CutSmart	2 µL
voda	14,28 µL	voda	13,7 µL
UKUPNI VOLUMEN	20 µL	UKUPNI VOLUMEN	20 µL

* Masena koncentracija plazmidnog vektora pcDNA3 iznosi 582,9 ng/ µL.

** Masena koncentracija plazmidnog vektora pAAVS1-Puro-DNR iznosi 434,25 ng/ µL.



Slika 11. Prikaz dijela sekvence plazmida pcDNA3 (gore) i pAAVS1-Puro-DNR (dolje) s označenim mjestima cijepanja (crvene strelice) i palindromskim sekvencama (sivo) koje prepoznaju enzimi EcoRI i NotI (Preuzeto s www.snapgene.com).

Idući korak u kloniranju je ligacija prethodno pripremljenog inserta i digestiranih plazmidnih vektora. Osim vektora i inserta, za pripremu ligacijskih smjesa koristila sam T4 DNA ligazu (New England Biolabs), T4 DNA ligazni pufer (New England Biolabs) i vodu, a točan sastav smjesa za oba vektora nalazi se u Tablici 4. Potrebne volumene inserta i vektora za željene molarne udjele 1:1 i 1:7 u ligacijskim smjesama odredila sam pomoću Promega Biomath kalkulatora, dostupnog na web adresi <https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>. Radi bolje uspješnosti same ligacije vektora i inserta, prilikom pripreme ligacijskih smjesa dodala sam sve komponente osim T4 DNA ligaze te iste zagrijala pet minuta na 45 °C, koristeći termoblok. Potom sam u sve mikroeprevete s ligacijskim smjesama dodala i T4 DNA ligazu te inkubirala preko noći na sobnoj temperaturi, kako bih postpješila stvaranje fosfodiesterske veze između inserta i plazmida pod utjecajem T4 DNA ligaze.

Tablica 4. Sastavi reakcijskih smjesa za ligaciju vektora pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR i inserta gBlock *SHH* u molarnom udjelu 1:1 i 1:7.

KOMPONENTA	VOLUMEN (1:1)	VOLUMEN (1:7)	KOMPONENTA	VOLUMEN (1:1)	VOLUMEN (1:7)
izolirani gBlock <i>SHH</i>	0,9 µL	6,28 µL	izolirani gBlock <i>SHH</i>	0,65 µL	4,52 µL
pocijepani vektor pcDNA3	1 µL	1 µL	pocijepani vektor pAAVS1-Puro-DNR	1 µL	1 µL
pufer T4 DNA ligaze	2 µL	2 µL	pufer T4 DNA ligaze	2 µL	2 µL
T4 DNA ligaza	1 µL	1 µL	T4 DNA ligaza	1 µL	1 µL
voda	15,1 µL	9,72 µL	voda	15,35 µL	11,48 µL
UKUPNI VOLUMEN	20 µL	20 µL	UKUPNI VOLUMEN	20 µL	20 µL

* Masena koncentracija izoliranog gBlock *SHH* iznosi 14,45 ng/µL.

Sljedeći dan napravila sam transformaciju kompetentnih bakterija ligacijskim smjesama. U tu svrhu koristila sam bakterije vrste *Escherichia coli*, soj DH5α. Iste sam najprije otopila na ledu, pošto su pohranjene u zamrzivaču na -80 °C, te sam potom u ampule s bakterijama dodala po 10 µL određene ligacijske smjese, lagano promiješala nastavkom za mikropipetu i inkubirala 10 minuta na ledu. Nakon toga, smjese sam zagrijala jednu minutu na 42 °C, koristeći termoblok te potom opet ohladila na ledu dvije minute. Zatim sam u svaku ampulu dodala 250 µL medija LB (eng. *Lysogeny Broth*) (Sigma-Aldrich) bez antibiotika i inkubirala sat vremena na termobloku, pri uvjetima od 37 °C i s frekvencijom miješanja od 300 rpm. U međuvremenu sam napravila čvrste selektivne hranjive podloge koristeći agar (Merck), medij LB i antibiotik ampicilin (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). Po inkubaciji sam razmazala po 300 µL bakterijske suspenzije na prethodno pripremljene hranjive podloge i iste potom stavila u inkubator na 37 °C preko noći.

3.2.3. Analiza bakterijskih kolonija lančanom reakcijom polimeraze

Na čvrstim selektivnim hranjivim podlogama, nakon kloniranja gBlock *SHH* u plazmidne vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR, narasle su pojedinačne kolonije bakterija koje su morale primiti određeni plazmidni vektor kako bi stekle rezistenciju na antibiotik ampicilin koji se nalazi u sastavu samih hranjivih podloga. Kako bih provjerila uspješnost

ligacije, odnosno je li došlo do ugrađivanja inserta u plazmidne vektore, koji su potom transformacijom ušli u bakterijske stanice, napravila sam analizu bakterijskih kolonija metodom *Colony PCR*. Navedenom metodom umnaža se specifični odsječak DNA plazmida pcDNA3 duljine 323 pb (Slika 12.), odnosno duljine 447 pb (Slika 13.) kod plazmida pAAVS1-Puro-DNR, koji obuhvaća mjesta cijepanja restriktivnim enzimima EcoRI i NotI, gdje se nakon uspješne ligacije morao ugraditi gBlock *SHH* duljine 1430 pb. Dakle, očekivana veličina PCR produkta nakon uspješne ugradnje je 1753 pb za vektor pcDNA3.1, odnosno 1877 pb za pAAVS1-Puro-DNR.

Prvi korak *colony PCR* metode je priprema reakcijske smjese koja se sastoji od vode, pufera, specifičnih početnica VP1.5 i BGH (Sigma-Aldrich) za plazmid pcDNA3, odnosno VP1.5 i XL39 (Sigma-Aldrich) za plazmid pAAVS1-Puro-DNR, dNTP (Thermo Fisher Scientific) i enzima Taq DNA polimeraze (Roche) (Tablica 5.). Sekvence korištenih specifičnih početnica su:

VP1.5 (FW) → 5' GGACTTTCCAAAATGTCG 3'

BGH (RV) → 5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'

XL39 (RV) → 5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3'



Slika 12. Položaj i sekvence specifičnih početnica VP1.5 i BHG, koje se koriste za umnažanje specifičnog odsječka DNA plazmida pcDNA3 duljine 309 pb, u odnosu na mjesta cijepanja enzima EcoRI i NotI.



Slika 13. Položaj i sekvence specifičnih početnica VP1.5 i XL39, koje se koriste za umnažanje specifičnog odsječka DNA plazmida pAAVS1-Puro-DNR duljine 447 pb, u odnosu na mjesta cijepanja enzimima EcoRI i NotI.

Kako bih osigurala isti omjer svih navedenih komponenti reakcijskih smjesa u svakom uzorku, pripremila sam tzv. *master mix* za veći broj uzoraka, odnosno za sve testne uzorke (broj kolonija), pozitivnu i negativnu kontrolu te jedan dodatni uzorak za pojedini plazmidni vektor. Tako pripremljene reakcijske smjese sam kratko protresla i centrifugirala te sam potom dodala po 10 μL smjese u svaku od unaprijed označenih mikropruveta od 0,2 mL (4titude). Mikropruvete sam označavala brojevima na način da je svaki broj povezan s točno određenom bakterijskom kolonijom na hranjivoj podlozi označenom istim brojem. Na isti način sam označila i set mikropruveta od 2 mL u koje sam dodala 1 mL medija LB s ampicilinom (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), za pripremu bakterijskih starter kultura.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za *colony PCR*.

KOMPONENTA	VOLUMEN (1x)
qH ₂ O	7,72 μL
pufer	1 μL
početnica VP1.5 (100 μM)	0,5 μL
početnica BGH/XL39 (100 μM)	0,5 μL
dNTP	0,2 μL
Taq DNA polimeraza	0,08 μL
UKUPNI VOLUMEN	10 μL

Potom sam s nastavkom za mikropipetu nježno pokupila koloniju označenu brojem jedan na hranjivoj podlozi te istu resuspendirala u reakcijskoj smjesi mikroeprevete od 0,2 mL, označene istim brojem, a zatim i u mediju s antibiotikom unutar pripadajuće mikroeprevete od 2 mL. Isti sam postupak ponovila za sve kolonije na svim čvrstim selektivnim hranjivim podlogama te sam na taj način dobila uzorke spremne za analizu lančanom reakcijom polimeraze i pripadajuće starter kulture. Kao pozitivne kontrole koristila sam 1 μ L nepocijepanog vektora pcDNA3 ili pAAVS1-Puro-DNR, a kao negativnu kontrolu čistu reakcijsku smjesu bez DNA. Mikroeprevete za PCR na kraju sam kratko protresla i centrifugirala te potom stavila u uređaj za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700), koristeći programe prikazane u Tablici 6.

Tablica 6. Programi PCR reakcija za umnažanje slijeda genskog fragmenta *SHH* ugrađenog u plazmidne vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR.

pcDNA3 - SHH	pAAVS1-Puro-DNR - SHH
94 °C 4:00 min	94 °C 4:00 min
94 °C 0:30 min	94 °C 0:30 min
51 °C 0:40 min	55 °C 0:40 min
72 °C 2:00 min	72 °C 2:00 min
72 °C 7:00 min	72 °C 7:00 min
4 °C ∞	4 °C ∞

Bakterijske starter kulture u mikroeprevetama od 2 mL inkubirala sam na termobloku nekoliko sati na 37 °C, s frekvencijom miješanja od 300 rpm, te sam ih potom spremila u frižider na 4 °C. U međuvremenu sam pripremila agarozni gel (1%) za gel elektroforezu na način da sam otopila 80 g agaroze (Sigma) u 80 mL pufera TAE (40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA) u mikrovalnoj pećnici. U otopinu agaroze dodala sam 3 μ L boje *Midori green* (Nippon Genetics) i potom istu izlila u kalup s kadicom i češljicom za elektroforezu. Ostavila sam gel da se polimerizira 30 minuta, nakon čega sam uklonila češljic i uronila kadicu s gelom u sustav za horizontalnu elektroforezu, napunjen TAE puferom. U prvu jažicu dodala sam 3 μ L markera GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), dok sam u ostale jažice redom nanosila po 3 μ L pojedinih uzoraka dobivnih umnažanjem *colony PCR* metodom i prethodno pomiješanih s 1 μ L boje (Gel Loading Dye, Purple (6X), New England Biolabs) i 2 μ L vode na parafilmu. Tako pripremljene uzorke podvrgnula sam gel elektroforezi 30 minuta pri

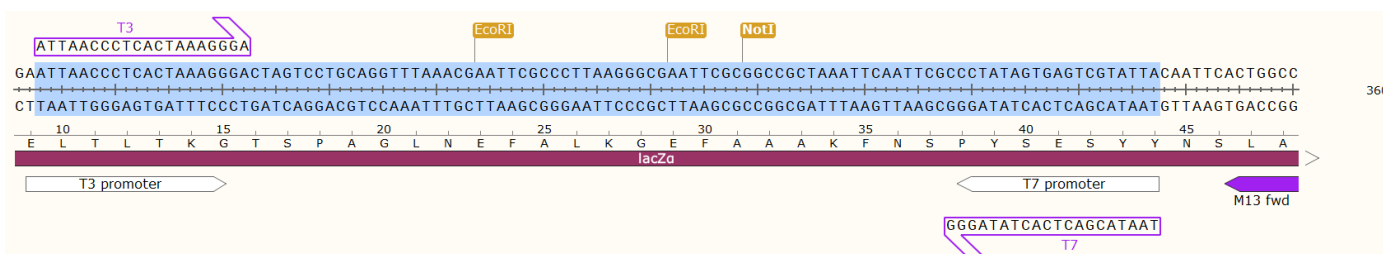
stalnom električnom naponu od 100 V. Kako bih vizualizirala veličinu dobivenih produkata, gel sam slikala na uređaju UVITEC Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge).

Na isti način analizirane su i bakterijske kolonije nakon kloniranja gBlock *SHH* u plazmidni vektor pCR-XL-2-TOPO (potpoglavlje 3.2.2.1. *Kloniranje gBlock SHH u plazmidni vektor pCR-XL-2-TOPO*). Specifične početnice korištene za umnažanje odsječka DNA plazmida pCR-XL-2-TOPO, koji obuhvaća mjesta cijepanja restriksijskim enzimima EcoRI i NotI, su T3 (Sigma-Aldrich) i T7 (Sigma-Aldrich):

T3 (FW) → 5' ATTAACCCCTCACTAAAGGGA 3'

T7 (RV) → 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Korištenjem specifičnih početnica T3 i T7 umnaža se odsječak vektora pCR-XL-2-TOPO duljine 105 pb, koji je prikazan na Slici 14., što znači da očekivana veličina PCR produkta u slučaju uspješne ugradnje genskog fragmenta *SHH* u isti vektor iznosi 1535 pb. Jedina izmjena u odnosu na već opisani protokol je u samom programu PCR uređaja, gdje je zbog upotrebe drugih specifičnih početnica temperatura vezanja istih (eng. *annealing*) promijenjena s 51 °C na 48 °C.



Slika 14. Položaj i sekvence specifičnih početnica T3 i T7, koje se koriste za umnažanje specifičnog odsječka DNA plazmida pCR-XL-2-TOPO duljine 105 pb, u odnosu na mjesta cijepanja enzima EcoRI i NotI.

3.2.4. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Bakterijskim kolonijama kod kojih je pomoću *colony PCR* metode i vizualizacije umnoženih produkata na gel elektroforezi dokazana prisutnost inserta gBlock *SHH* ugrađenog u vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR, a prethodno i u vektor pCR-XL-2-TOPO, potrebno je izolirati plazmidnu DNA, zbog potvrde rezultata PCR reakcije Sangerovom metodom sekvenciranja. Starter kulture tih kolonija nasadila sam u staklene tikvice s tekućom hranjivom

podlogom koja se sastoji od 100 mL medija LB i antibiotika ampicilina (100 µg/mL), odnosno kanamicina (50 µg/mL) kod vektora pCR-XL-2-TOPO, te sam iste inkubirala preko noći na 37 °C u inkubatoru tresilici (Heidolph inkubator 1000).

Za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija koristila sam komercijalni set Nucleobond Xtra Midi (Macherey-Nagel). Najprije sam za svaku od bakterijskih kultura inkubiranih preko noći napravila tzv. *glicerolski stock* na način da sam u prethodno označene epruvete za zamrzavanje od 2 mL dodala po 500 µL bakterijske kulture i 500 µL 50% glicerola (Kemika) i spremila ih u zamrzivač na -80 °C. Preostali sadržaj bakterijske kulture podjednako sam raspodijelila u dvije Falcon epruvete volumena 50 mL. Iste sam centrifugirala 15 minuta na 4 °C pri 5000 rpm. S dobivenih taloga sam odlila supernatante te sam u prvu epruvetu dodala 8 mL pufera za resuspenziju (RES), ohlađenog na 4 °C, dobro promućkala i sav sadržaj prelila u drugu epruvetu te ponovno dobro resuspendirala talog. Na resuspendirani talog dodala sam 8 mL pufera za lizu stanica (LYS), pomiješala sadržaj preokretanjem epruvete pet puta i inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme sam pripremila kolonu za pročišćavanje DNA i natopila je s 12 mL pufera EQU, pažljivo ga dodajući po rubu filtera kolone. Po inkubaciji sam u epruvetu dodala 8 mL pufera za neutralizaciju (NEU) i ponovno nekoliko puta preokrenula istu, sve dok otopina nije promijenila boju iz plave u bijelu. Dobiveni lizat pažljivo sam ulila u unaprijed pripremljenu kolonu te sam pričekala da sva otopina prođe kroz filter. Nakon toga sam ponovno na isti način dodala 5 mL pufera EQU uz rub filtera i po prolasku otopine sam bacila isti te dodala 8 mL pufera za ispiranje (WASH) u kolonu. Svu sakupljenu otpadnu otopinu potom sam bacila i kolonu postavila na novu Falcon epruvetu od 15 mL. Dodala sam 5 mL pufera za eluciju (ELU) i pričekala da se sva DNA s kolone ispere u epruvetu. Po završetku ovog koraka, u epruvetu sam dodala 3,5 mL izopropanola za precipitaciju plazmidne DNA, otopinu dobro protresla te jednoliko rasporedila u pet mikroepruveta od 2 mL i centrifugirala 20 minuta na 4 °C pri 13200 rpm. Dobivene supernatante sam bacila, pazeći pritom da ne uznemirim taloge koje sam zatim resuspendirala s 400 µL 70% etanola i ponovno centrifugirala pet minuta na sobnoj temperaturi pri 13200 rpm. Finalno dobivene taloge plazmidne DNA sam osušila te ih na kraju otopila u 200 µL pufera TE.

Otopljenjnoj plazmidnoj DNA potom sam izmjerila koncentraciju i čistoću koristeći spektrofotometar NanoPhotometer N50/N60 (Implen), koji mjeri apsorbanciju na valnim duljinama 230 nm, 260 nm i 280 nm. Prije početka mjerenja, izvršila sam kalibraciju uređaja nanošenjem 1 µL pufera TE. Isto tako, prilikom mjerenja koncentracije i čistoće plazmidne

DNA nanosila sam po 1 μL uzorka te između svakog mjerenja prebrisala površinu za nanošenje uzoraka.

3.2.5. Sekvenciranje izolirane plazmidne DNA

Sekvenciranjem izolirane plazmidne DNA po Sangerovoj metodi provjerena je ispravnost sekvence ugrađenog genskog fragmenta gBlock *SHH* u plazmidne vektore pCR-XL-2-TOPO, pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR. Sam postupak sekvenciranja napravila je dr.sc. Vesna Musani.

Najprije su napravljene odvojene reakcijske smjese koje se sastoje od komercijalnog seta za sekvenciranje Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), jedne od para početnica (T3 FW i T7 RW za pCR-XL-2-TOPO, VP1.5 FW i BGH RW za pcDNA3 te VP1.5 FW i XL39 RW za pAAVS1-Puro-DNR), vode i plazmidne DNA (Tablica 7.). Po pripremi, reakcijske smjese su kratko protresene i centrifugirane te je potom u unaprijed označene mikroeprovete od 0,2 mL dodano po 5 μL odgovarajuće reakcijske smjese i 3 μL plazmidne DNA.

Tablica 7. Sastav reakcijskih smjesa za sekvenciranje po Sangeru.

KOMPONENTA	VOLUMEN
Big Dye Terminator v3.1	1 μL
plazmidna DNA	3 μL
početnica	1 μL
voda	3 μL
UKUPNI VOLUMEN	8 μL

Tako pripremljene mikroeprovete s reakcijskim smjesama su ponovno protresene i centrifugirane, a zatim stavljene u uređaj za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700) na program:

96 °C 1:00 min
96 °C 0:10 min
50 °C 0:05 min } 25x
60 °C 4:00 min
4 °C ∞

Sljedeći korak je taloženje uzoraka plazmidne DNA centrifugiranjem i otapanje u formamidu (Thermo Fisher Scientific) te konačno očitavanje na instrumentu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) i analiza sekvenci. Sekvence sam analizirala u programu BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2 (Tom Hall) (Hall 1999) uspoređujući dobivene kromatograme svakog uzorka sa sekvencama praznog plazmidnog vektora i inserta, kako bih provjerila je li ugrađen cijeli insert te je li isti ugrađen na pravom mjestu i u ispravnoj orijentaciji unutar vektora.

3.2.6. Rad sa staničnim kulturama

3.2.6.1. Odmrzavanje stanica

Samo odmrzavanje stanica, kao i sav ostali rad sa staničnim kulturama obavljala sam u laminarnom kabinetu za sterilni rad, koristeći sterilne otopine, medije, pufere i posuđe. Radnu površinu kabineta sam neposredno prije početka i odmah nakon završetka rada očistila etanolom te potom sterilizirala UV svjetlom.

Stanična linija melanoma čovjeka CHL-1 bila je zamrznuta u krio-ampulama na -80 °C, u mediju za zamrzavanje (50% serum, 40% medij DMEM, 10% DMSO (dimetil sulfoksid)). Odmah po vađenju krio-ampule iz zamrzivača, istu sam stavila na led kako bi se stanice odmrznule. Za to vrijeme pripremila sam sterilnu staklenu epruvetu te u istu dodala 5 mL medija DMEM (Gibco) za rast stanica, kompletiranog s 10% fetalnog goveđeg seruma (Sigma-Aldrich). Odmah po odvajanju stanica od stjenke krio-ampule, sadržaj sam prelila u pripremljenu staklenu epruvetu s medijem, kako bih izbjegla citotoksični učinak krioprotektanta dimetil sulfoksida na stanice, te centrifugirala pet minuta na 4 °C pri 1200 rcf. Nakon centrifugiranja, dobiveni supernatant sam bacila, a vidljivi talog stanica resuspendirala s 10 mL DMEM medija i zatim prenijela u unaprijed označenu Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm (Sarstedt). Kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile, Petrijevu zdjelicu sam par puta lagano protresla te potom spremila u inkubator (Kambič) s kontroliranim uvjetima (5% CO₂ i temperatura od 37 °C).

3.2.6.2. Održavanje i presađivanje stanica u kulturi

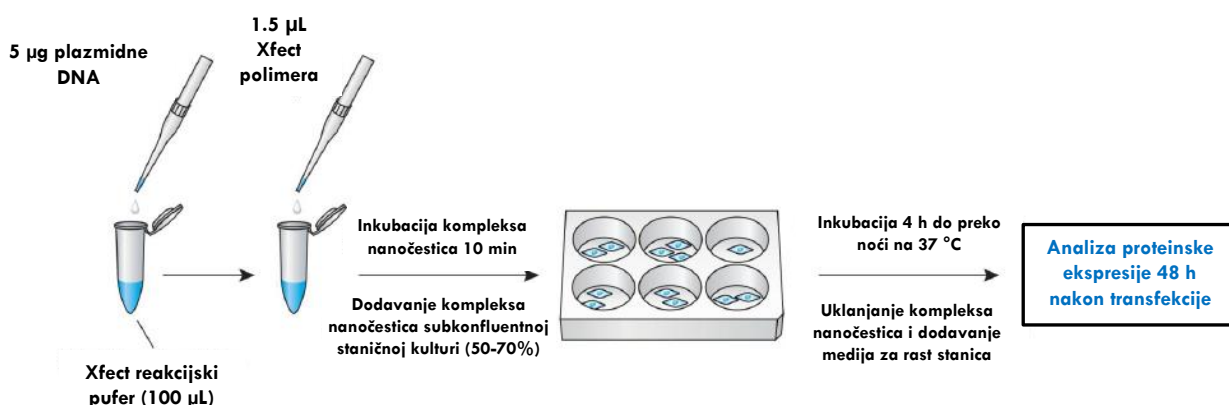
Nakon uspostave adherentne stanične kulture u Petrijevoj zdjelici, stanicama sam mijenjala medij otprilike svaka dva do tri dana, na način da sam sterilnom pipetom uklonila sav medij iz Petrijeve zdjelice te drugom sterilnom pipetom dodala novih 10 mL svježeg medija DMEM. Na taj način sam stanice održavala u kulturi, a kada bi iste postale konfluentne, odnosno prekrile gotovo cijelu površinu Petrijeve zdjelice, presađivala sam ih. Prilikom presađivanja, najprije sam uklonila sav medij iz Petrijeve zdjelice te potom dodala 5 mL pufera PBS (eng. *Phosphate-Buffered Saline*; 1.7 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 1 mM Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7.2), ravnomjerno ga rasporedila po površini, kako bih isprala zaostali medij, te potom uklonila sav sadržaj iz iste. Ispiranje Petrijeve zdjelice puferom PBS nakon uklanjanja medija izuzetno je važno jer zaostali serum iz medija može inaktivirati djelovanje tripsina. Po ispiranju na stanice sam nakapala 1 mL tripsina s dodatkom 1 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) te inkubirala pet minuta, uz povremeno protresanje Petrijeve zdjelice. Isto tako, nekoliko puta tijekom inkubacije stanice sam pregledala pod mikroskopom (Boeco) kako bih mogla utvrditi jesu li se sve odvojile od podloge. Po završetku tripsinizacije, na plutajuće stanice dodala sam 5 mL kompletnog medija DMEM te ih resuspendirala pomoću pipete. Na kraju sam jedan mililitar stanične otopine prenijela u novu Petrijevu zdjelicu i u istu dodala 10 mL svježeg kompletiranog medija, dok sam ostatak sadržaja bacila.

3.2.6.3. Transfekcija stanica

Nakon što su stanice prošle nekoliko pasaža u kulturi, bile su spremne za prolaznu transfekciju plazmidnim vektorom pcDNA3 s ugrađenim genskim fragmentom *SHH* (pcDNA3 - SHH). Kod prolazne transfekcije stanica ne dolazi do stabilne ugradnje vektora u genom stanice, već se u određenim vremenskim periodima, u ovom slučaju nakon 24 i 48 sati od transfekcije prati ekspresija proteina SHH, za koji kodira gen unesen u stanice pomoću plazmidnog vektora.

Za prolaznu transfekciju stanica CHL-1 koristila sam komercijalni set Xfect RNA Transfection Reagent (Takara Bio). Dan prije same transfekcije stanicama sam uklonila sav medij, isprala ih koristeći 5 mL pufera PBS i zatim tripsinizirala (1 mL tripsina s dodatkom 1 mM EDTA). Po odvajanju stanica od podloge, resuspendirala sam ih u 5 mL medija DMEM i sav sadržaj pomoću sterilne pipete prenijela u staklenu epruvetu. Zatim sam 20 μL stanica

resuspendirala u 80 μL prethodno pripremljenog metilenskog modrila (Sigma-Aldrich) i potom 20 μL dobivene suspenzije pažljivo nanijela na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Izbrojala sam sve stanice u četiri velika kvadratna polja komorice, od kojih se svako sastoji od 16 manjih polja, i izračunala ukupan broj stanica u mililitru suspenzije koristeći formulu (broj stanica / 0,4) \times 5 \times 10³. Iz dobivenog ukupnog broja stanica po mililitru suspenzije preračunala sam potreban volumen suspenzije stanica, koji sam nasadila u pločice za uzgoj sa šest bunarića (Sarstedt), tako da u svakom bunariću bude 3 \times 10⁵ stanica. Stanice sam nasađivala u tri bunarića (negativna kontrola + dva uzorka za transfekciju), na način da sam u svaki bunarić dodala izračunati volumen suspenzije stanica te isti zatim nadopunila s odgovarajućim volumenom medija za rast stanica do 2 mL. Na dan transfekcije, u sterilnoj mikroepruveti pomiješala sam 100 μL Xfect pufera i 5 μg plazmidne DNA te dobivenu smjesu miješala pet sekundi. Zatim sam dodala 1,5 μL Xfect polimera (0,3 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ DNA) i sadržaj ponovno miješala 10 sekundi te potom inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, sa stanica u bunarićima uklonila sam sav medij te odmah na njih nakapala smjesu Xfect pufera, polimera i plazmidne DNA i dodala 1 mL DMEM medija bez seruma. Pločicu za uzgoj stanica zatim sam lagano protresla i stavila u inkubator na četiri sata pri uvjetima od 37 °C i 5% CO₂. Po inkubaciji, sa stanica sam uklonila medij s transfekcijskim reagensom, svaki bunarić isprala s 1 mL pufera PBS te potom dodala 2 mL svježeg kompletiranog medija DMEM i pločicu ponovno vratila u inkubator (Slika 15.).



Slika 15. Prikaz protokola za prolaznu transfekciju stanica pomoću komercijalnog seta Xfect RNA Transfection Reagent (Preuzeto i prilagođeno s: www.takarabio.com).

3.2.6.4. Izolacija proteina iz stanica

Prije same izolacije proteina, stanice sam sakupila iz bunarića pločice koju sam za to vrijeme držala na ledu. Nakon 24 sata od transfekcije, iz prva dva bunarića (negativna kontrola

i uzorak za analizu 24 sata nakon transfekcije) pločice za uzgoj stanica uklonila sam sav medij, isprala ih dva puta s 1 mL pufera PBS te potom u svaki bunarić ponovno dodala 1 mL istog pufera i stanice odvojila od podloge na ledu koristeći plastični strugač. Treći bunarić, u kojem se nalazio uzorak za analizu 48 sati nakon transfekcije, držala sam izvan posude s ledom, stanicama sam promijenila medij te ih sakupila na isti način idući dan (48 sati po transfekciji). Dobivenu suspenziju stanica u puferu PBS nakon struganja sam sakupila pomoću mikropipete, prenijela u sterilnu mikroeprevetu i centrifugirala pet minuta pri 1200 rcf u centrifugi ohlađenoj na 4 °C. Dobiveni supernatant nakon centrifugiranja sam pažljivo odlila i talog stanica resuspendirala s 150 µL pufera za lizu stanica, koji se sastoji od inhibitora proteaza i pufera RIPA (25 mM Tris-HCl, 1% Na-deoksiholat, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS). Inhibitori proteaza dodaju se u pufer RIPA u obliku tableta (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), pri čemu na 10 mL pufera ide jedna tableta inhibitora. Nakon dodatka pufera za lizu, mikroeprevete sa staničnim talozima stavila sam u posudu s ledom i svaku sonicirala dva puta po 15 sekundi, koristeći sonikator Labsonic M (Sartorius). Uzorke sam potom centrifugirala 20 minuta pri 13200 rpm, u prethodno ohlađenoj centrifugi na 4 °C. Svaki od dobivenih supernatanta s izoliranim proteinima sam pažljivo sakupila i prebacila u unaprijed označenu mikroeprevetu te pohranila u zamrzivač na -80 °C.

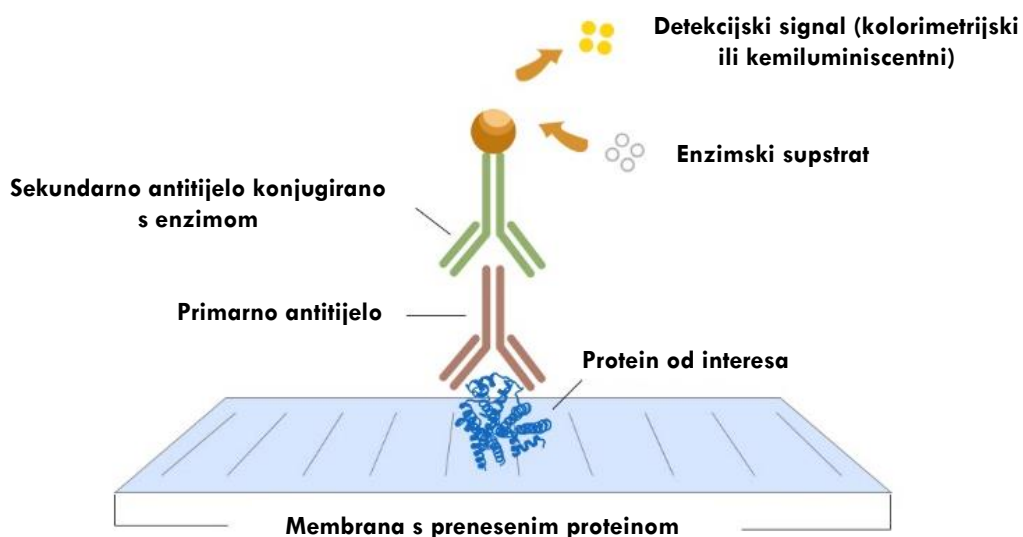
3.2.6.5. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentraciju izoliranih proteina kvantificirala sam kolorimetrijskom metodom prema Bradford-u, uz pomoć komercijalnog seta Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Metoda se temelji na biuretskoj reakciji, odnosno redukciji iona Cu^{2+} posredovanoj proteinima u alkalnom mediju. Redukcijom Cu^{2+} nastaje Cu^+ koji se detektira kolorimetrijski, pošto prilikom vezanja kiseline BCA (eng. *bicinchoninic acid*) za bazične i aromatske aminokiseline u proteinima dolazi do nastanka svijetloplavog do ljubičastog topljivog kompleksa, koji apsorbira svjetlost na 562 nm. Jedan bakreni ion tvori kompleks s četiri do šest peptidnih veza, a intenzitet obojenja proporcionalan je broju peptidnih veza koje sudjeluju u reakciji. Kao rezultat mjerenja dobiva se linearna krivulja iz koje se jednostavno mogu odrediti nepoznate koncentracije uzoraka proteina na temelju standardne krivulje. Kako bih dobila standardnu krivulju, najprije sam napravila niz serijskih razrjeđenja standardnog proteina, albumina iz govedjeg seruma (BSA, eng. *bovine serum albumin*). Početna koncentracija BSA bila je 1 mg/mL, a serijska razrjeđenja koja sam napravila prema uputama iz seta su redom: 2000 µg/mL, 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 25

$\mu\text{g/mL}$ i $0 \mu\text{g/mL}$. Nakon pripreme serijskih razrjeđenja standarda, napravila sam radnu otopinu reagensa A i B iz komercijalnog seta u omjeru 50:1. Potom sam u unaprijed označenu pločicu s 96 bunarića ispipetirala po $200 \mu\text{L}$ radne otopine u duplikatima za svaki standard i uzorak. U iste bunariće sam zatim dodala po $25 \mu\text{L}$ standarda i uzoraka proteina, također svaki u duplikatu. Pločicu sam zatim protresala 30 sekundi i inkubirala 30 minuta na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Po inkubaciji sam pomoću spektrofotometra (Labsystems Multiskan MS) izmjerila apsorbanciju standarda i uzoraka na 570 nm . Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije standarda nacrtala sam standardnu krivulju te uz pomoć računala odredila nepoznate koncentracije proteina (Microsoft Excel).

3.2.7. Westernska metoda otiska

Westernskom metodom otiska detektira se prisutnost specifičnog proteina u određenom uzorku pomoću antitijela specifičnih za taj protein (Slika 16.). U ovom slučaju, Westernska metoda otiska daje nam informaciju o tome je li i u kojoj mjeri došlo do ekspresije proteina SHH nakon prolazne transfekcije stanica CHL-1 vektorom s ugrađenim genskim fragmentom *SHH*.



Slika 16. Prikaz detekcije proteina od interesa pomoću Westernske metode otiska (Preuzeto i prilagođeno s: www.elabscience.com/List-detail-306.html).

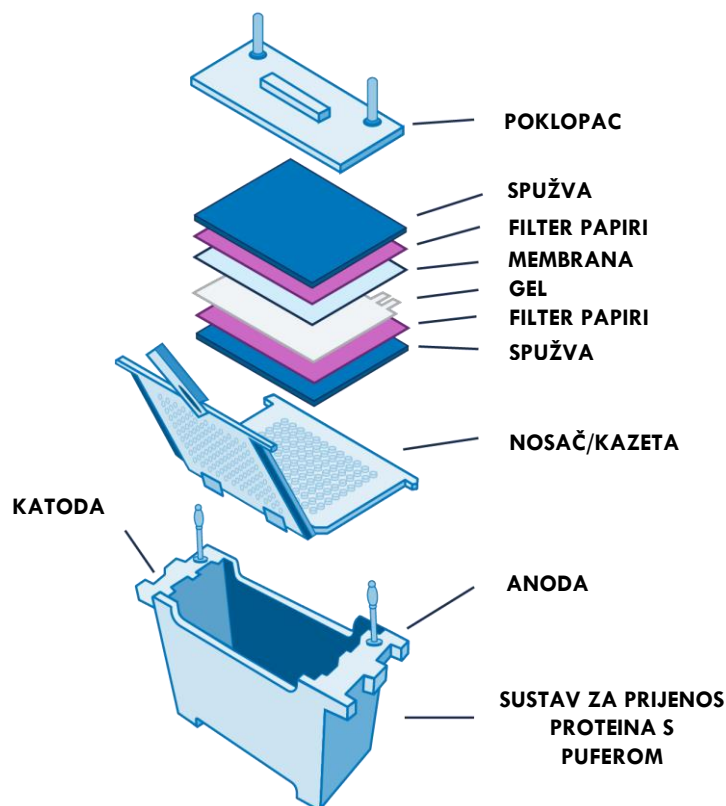
Na protein prenesen s gela na nitroceluloznu membranu veže se primarno antitijelo, koje je specifično za taj protein. Sekundarno antitijelo veže se za Fab fragment primarnog antitijela i konjugirano je s enzimom (npr. peroksidazom hrena), koji u reakciji sa supstratom (kemiluminiscentnim reagensom) daje svjetleći produkt.

Sama metoda sastoji se od nekoliko koraka, od kojih je prvi razdvajanje smjese proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu. SDS (eng. *sodium dodecyl sulfate*) djeluje na način da razara disulfidne veze, odnosno dovodi do denaturacije proteina te maskira naboj novonastalih polipeptidnih lanaca na način da vezanjem za iste osigurava stabilan negativni naboj po jedinici mase proteina te se stoga razdvajanje pomoću elektroforeze temelji isključivo na molekularnoj masi proteina. Drugim riječima to znači da će kroz gel brže putovati proteini manje molekularne mase, a sporije oni veće molekularne mase. Najprije sam pripremila 12%-tni gel za razdvajanje prema sastavu navedenom u Tablici 7., na način da sam prvo pomiješala sve komponente osim amonij-persulfata (APS) i tetrametiletilendiamina (TEMED), koje sam dodala pred samo izlijevanje gela, jer isti djeluju kao katalizatori polimerizacije akrilamida i bisakrilamida. Pripremljeni gel za razdvajanje izlila sam između stakalaca, tako da isti dođe do $\frac{3}{4}$ visine stakala te sam potom do vrha dodala izopropanol i ostavila gel da polimerizira otprilike 30 minuta. U međuvremenu sam napravila 5%-tni gel za sabijanje (Tablica 8.) te isti po završetku polimerizacije gela za razdvajanje i uklanjanju izopropanola izlila do vrha stakala. Odmah zatim sam postavila češljic za formiranje jažica između stakalaca, pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka te opet pustila gel da polimerizira 30 minuta.

Tablica 8. Sastav i omjeri komponenti poliakrilamidnih gelova za razdvajanje i sabijanje.

KOMPONENTA	VOLUMEN
GEL ZA RAZDVAJANJE (12%)	
voda	2,6 mL
30% akrilamid-bisakrilamid mješavina	3,2 mL
1.5 M TRIS-HCl pufer, pH 8.8	2 mL
10% SDS	0,08 mL
10% amonij persulfat	0,08 mL
TEMED	0,008 mL
GEL ZA SABIJANJE (5%)	
voda	2,1 mL
30% akrilamid-bisakrilamid mješavina	0,5 mL
1 M TRIS-HCl pufer, pH 6.8	0,38 mL
10% SDS	0,03 mL
10% amonij persulfat	0,03 mL
TEMED	0,003 mL

U međuvremenu sam denaturirala uzorke prethodno izoliranih proteina na način da sam u mikropruvete, koje sam kao i uzorke cijelo vrijeme držala na ledu, dodala po 50 µg pojedinog uzorka i isti pomiješala s četvrtinom konačnog volumena 4x pufera za nanošenje (LB, eng. *loading buffer*; 0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4 M DTT, 8% SDS, 40% glicerol, 0.001% bromfenol blue). Tako pripremljene uzorke stavila sam pet minuta u termoblok zagrijan na 95 °C i potom ih centrifugirala jednu minutu pri 13200 rpm. Nakon što je gel polimerizirao, pažljivo sam izvadila češljic te stakalca s gelom postavila u sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN III (Bio-Rad) napunjen puferom za elektroforezu (1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS). U prvu jažicu gela dodala sam 4 µL proteinskog markera CozyHi Prestained Protein Ladder (highQu GmbH), a zatim sam redom nanosila uzorke. Nakon toga, pokrenula sam elektroforezu koja se odvijala 1,5 h pri konstantnom naponu od 110 V. Kada se fronta boje iz pufera LB približila donjem rubu gela, zaustavila sam elektroforezu i odvojila gel od stakalca te složila tzv. sendvič za prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu (Amersham Protran BA83, GE Healthcare, veličina pora 0,2 µm). Sendvič sam složila u plastičnom nosaču, tako da sam na prozirni dio nosača stavila najprije spužvicu, zatim dva filter papira, nitroceluloznu membranu, gel te ponovno dva filter papira i spužvicu (Slika 17.).



Slika 17. Slojevi „sendviča“ u nosaču i dijelovi sustava za prijenos proteina na membranu (Preuzeto i prilagođeno s: www.licor.com/bio/guide/westerns/transfer_options).

Sve zajedno sam zatvorila crnim dijelom plastičnog nosača i dobivenu kazetu potom postavila u sustav za prijenos proteina na membranu Mini-PROTEAN III (Bio-Rad) napunjen puferom za prijenos (200 mM Tris, 1.5 M glicin, 10% metanol), pazeći pritom da membrana bude orijentirana prema anodi. Na kraju sam pokrenula prijenos pri konstantnom naponu od 200 mA u trajanju od sat vremena. Nakon završetka prijenosa, membranu sam izvadila iz nosača, označila linije markera kemijskom olovkom, po potrebi razrezala membranu na dva dijela (tako se na istoj membrani može raditi detekcija dva proteina dovoljno različitih molekularnih masa) i stavila u kadicu s 5% otopinom mlijeka u prahu u puferu TBST (eng. *Tris Buffered Saline Buffer with Tween 20*; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.5) za blokiranje, koje sam provodila pola sata na njišućoj tresilici (Ohaus) na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme pripremila sam otopine primarnih antitijela, također u 5% mlijeku u puferu TBST (Tablica 9.), pri čemu sam aktin koristila kao kontrolu količine proteina nanesenih na gel. Po završetku blokiranja membrana u mlijeku, iste sam upakirala u plastične folije, dodala pripremljene otopine primarnih antitijela (ukupni volumen 1 ml po membrani) i potom folije zavarila sa svih strana, pazeći pritom da unutar istih ne zaostanu mjehurići zraka. Membrane s primarnim antitijelima inkubirala sam na mini rotatoru Multi Bio RS-24 (Biosan) preko noći na 4 °C.

Tablica 9. Prikaz primarnih i sekundarnih antitijela korištenih u Westernskoj metodi otiska.

ANTIGEN	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ	ŽIVOTINJA	RAZRJEĐENJE
PRIMARNA ANTITIJELA				
β-ACTIN	Cell Signaling	8H10D10 #3700	mouse	1:2000
SHH	Santa Cruz Biotechnology	(E-1) sc-365112	mouse	1:50
PTCH1	Proteintech	17520-1-AP	rabbit	1:1000
GLI1	Novus Biologicals	NB600-600	rabbit	1:500
GLI2	Santa Cruz Biotechnology	(C-10) sc-271786	mouse	1:200
GLI3	GeneTex	GTX104362	rabbit	1:1000
SEKUNDARNA ANTITIJELA				
HRP Goat Anti-Rabbit IgG	BD Pharmingen	554021	goat	1:6000
HRP Goat Anti-Mouse Ig	BD Pharmingen	554002	goat	1:8000

Idući dan sam isprala primarno antitijelo s membrana na način da sam ih inkubirala tri puta po pet minuta u puferu TBST na njišućoj tresilici. Za to vrijeme napravila sam razrjeđenja sekundarnih antitijela u 5% otopini mlijeka u puferu TBST, kao što je navedeno u Tablici 8. Po ispiranju, membrane sam postavila u kadice te na iste dodala po 5 mL odgovarajuće otopine

sekundarnog antitijela i inkubirala ih na njišućoj tresilici sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, membrane sam ponovno isprala tri puta po pet minuta u puferu TBST, kako bih uklonila višak sekundarnog antitijela. Tijekom ispiranja pripremila sam smjesu kemiluminiscentnih reagensa SuperSignal West PICO i SuperSignal West FEMTO (Thermo Fisher Scientific), na način da sam ih pomiješala u međusobnom omjeru 3:1. Svaku pojedinu membranu potom sam djelomično osušila, postavila na prozirnu foliju i na membranu nakapala smjesu kemiluminiscentnih reagensa te inkubirala pet minuta u mraku. Višak reagensa sam po inkubaciji uklonila pomoću papirnatog ubrusa te membranu prekrila još jednom prozirnomo folijom i zatim slikala na uređaju UVITEC Alliance 4.7.

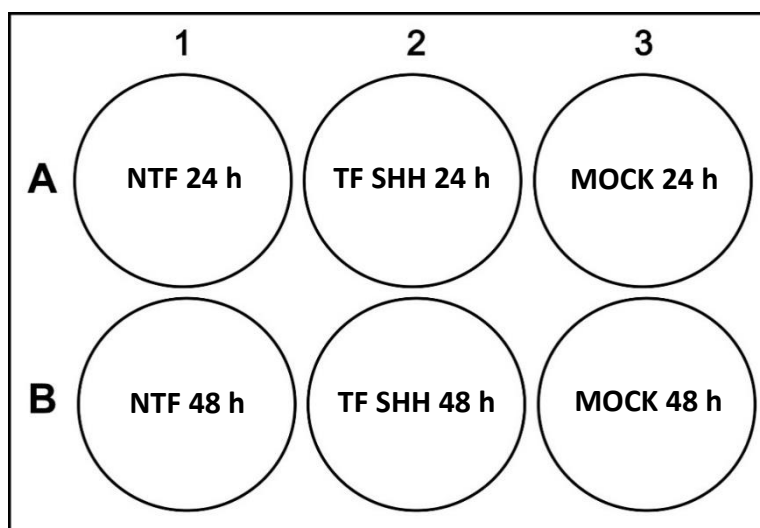
3.2.8. Protočna citometrija

Metodom protočne citometrije pomoću lasera i mikrokapilarne tehnologije možemo kvantificirati određenu subpopulaciju stanica u suspenziji koristeći različite vrste fluorokroma. Guava Muse stolni protočni citometar (Luminex) inovativni je instrument koji uz pomoć komercijalnih setova istovremeno kvantificira do tri stanična parametra poput vijabilnosti stanica, proliferacije, apoptoze, oksidativnog stresa, oštećenja stanica, zatim staničnog ciklusa i aktivacije određenih signalnih puteva (EGFR, MAPK, PI3K, itd.) te mnoge druge. U svrhu ovog diplomskog rada korištena su upravo potonja dva komercijalna seta, odnosno provedena je analiza staničnog ciklusa i aktivacije PI3K/MAPK signalnih puteva kod stanične linije melanoma čovjeka CHL-1 u usporedbi s istom linijom po prolaznoj transfekciji plazmidom s ugrađenim genskim fragmentom *SHH*.

3.2.8.1. Analiza staničnog ciklusa

Upotrebom MUSE komercijalnog seta za analizu staničnog ciklusa (Luminex) na jednostavan način dobivamo informacije o raspodjeli staničnog ciklusa u staničnoj suspenziji linije od interesa. Pošto je stanični ciklus jedan od temeljnih procesa eukariotskih stanica, njegova regulacija je presudna za preživljavanje stanica, ali i popravak genetskih oštećenja te prevenciju nekontrolirane diobe stanica, pošto defekti takve vrste dovode do nastanka tumora. Kako su kod tumora česte mutacije gena uključenih u kontrolu staničnog ciklusa, sama analiza istog je od izuzetne važnosti za bolje razumijevanje mehanizama diobe tumorskih stanica, ali i djelovanja pojedine terapije.

Gore navedeni komercijalni set nam omogućava brzo kvantitativno mjerenje postotka stanica u G0/G1, S i G2/M fazama staničnog ciklusa. Sam postupak započinje nasađivanjem stanica od interesa, u ovom slučaju melanomske stanične linije CHL-1, u pločice za uzgoj sa šest bunarića, tako da broj stanica u svakom bunariću bude 2×10^5 . Stanice sam nasadila u svih šest bunarića pločice (Slika 18.), pošto sam imala tri eksperimentalne skupine: kontrolu (netransfecirane stanice, NTF), stanice transfecirane plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH) i kontrolu toksičnosti samog transfekcijskog reagensa (MOCK). Za svaku eksperimentalnu skupinu nasadila sam po dva bunarića stanica, jer sam iste fiksirala nakon 24 i 48 sati od tretmana, odnosno trenutka transfekcije. Samo brojanje i nasađivanje stanica te prolaznu transfekciju idući dan napravila sam prema protokolu opisanom u potpoglavlju 3.2.6.3. *Transfekcija stanica*. Kod kontrole toksičnosti transfekcijskog reagensa Xfect (MOCK) nisam koristila DNA, već sam tu skupinu stranica tretirala s 1.5 μ L polimera Xfect otopljenog u 100 μ L pufera Xfect.



Slika 18. Eksperimentalne skupine stanične linije CHL-1 za analizu staničnog ciklusa pomoću Guava Muse stolnog protočnog citometra.

NTF - kontrola, netransfecirane stanice; TF SHH - stanice transfecirane plazmidom pcDNA3 - SHH; MOCK - kontrola toksičnosti transfekcijskog reagensa Xfect.

Nakon 24 sata po transfekciji stanice sve tri esperimentalne skupine sam tripsinizirala i potom fiksirala na način da sam iz bunarića uklonila sav medij, svaki bunarić isprala s 1 mL pufera PBS te na stanice nakapala po 200 μ L tripsina s dodatkom 1 mM EDTA i ostavila nekoliko minuta da se stanice odlijepe od podloge. Tripsin sam inaktivirala dodatkom 1 mL kompletnog medija DMEM i sav sadržaj svakog bunarića potom prenijela u unaprijed pripremljene i označene mikroeprevete te ih centrifugirala pet minuta pri 300 x g. Dobiveni

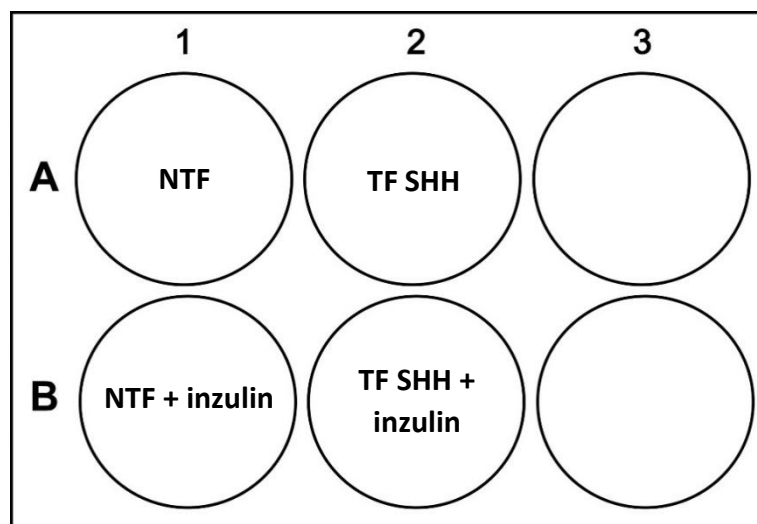
supernatant sam bacila, a talog stanica resuspendirala s 1 mL pufera PBS te ponovno centrifugirala pri istim uvjetima. Za to vrijeme pripremila sam po 1 mL ledeno hladnog 70%-tnog etanola u Falcon epruvetama volumena 15 mL, držeći ih na ledu. Po završetku centrifugiranja, supernatant sam ponovno uklonila, a talog dobro resuspendirala s 50 μ L pufera PBS. Tako pripremljene suspenzije stanica dodavala sam kap po kap u pripremljene epruvete s ledeno hladnim etanolom, koje sam pritom držala na vorteksu, kako bi se izbjeglo stvaranje agregata stanica prilikom fiksacije. Falcon epruvete s fiksim stanicama sam potom stavila u zamrzivač na -20 °C preko noći te isti postupak ponovila sa stanicama u preostala tri bunarića idući dan, odnosno 48 sati od trenutka transfekcije. Na dan analize, po 500 μ L stanica fiksiranih u etanolu prebacila sam u čiste i označene mikroeprevete od 1.5 mL te centrifugirala pet minuta pri 300 x g. Uklonila sam supernatant, a talog resuspendirala s 500 μ L pufera PBS i ponovno centrifugirala pri istim uvjetima. Nakon uklanjanja supernatanta, stanične taloge resuspendirala sam s 200 μ L reagensa Muse Cell Cycle i inkubirala 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije napravila sam po dva očitavanja za svaki uzorak na instrumentu MUSE, a zatim i statističku obradu dobivenih podataka.

3.2.8.2. Analiza aktivacije signalnih puteva PI3K/MAPK

MUSE komercijalni set za analizu aktivacije PI3K/MAPK signalnih puteva (Luminex) omogućava istovremeno praćenje aktivacije oba signalna puta, ali i njihove međusobne umreženosti i međuovisnosti. Korištenjem dva specifična antitijela iz ovog seta moguće je ispitati odnos između PI3K i MAPK puteva, koji reguliraju veliki broj staničnih procesa poput rasta i proliferacije stanica, a međusobno su umreženi svojim nizvodnim efektorima. Analiza se temelji na kvantitativnom mjerenju postotka stanica kod kojih nije došlo do aktivacije ni jednog od PI3K i MAPK signalnih puteva, odnosno postotka stanica s aktiviranim samo jednim ili pak oba signalna puta.

Kao i kod analize staničnog ciklusa, najprije sam nasadila 2×10^5 stanica u četiri bunarića pločice za uzgoj sa šest bunarića, pošto sam imala četiri eksperimentalne skupine: kontrolu (netransfecirane stanice, NTF), stanice transfecirane plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH) i iste te dvije skupine koje su za rasle u mediju DMEM kompletiranom s 10% FBS, uz dodatak 0,01 mg/mL inzulina (Sigma-Aldrich) (Slika 19.). Brojanje i nasađivanje stanica te prolaznu transfekciju također sam napravila prema protokolu opisanom u potpoglavlju 3.2.6.3. *Transfekcija stanica.*

Nakon 24 sata od trenutka transfekcije stanica, iz svih bunarića sam uklonila medij, stanice isprala s 1 mL pufera PBS te ih potom tripsinizirala s 200 μ L tripsina s dodatkom 1 mM EDTA. Po odvajanju stanica od podloge inaktivirala sam djelovanje tripsina dodatkom 1 mL kompletnog medija DMEM i dobivene suspenzije stanica iz svakog bunarića potom prebacila u unaprijed označene mikroeprevete te centrifugirala pet minuta pri 300 x g. Dobivene supernatante sam uklonila, taloge resuspendirala s 500 μ L pufera PBS i ponovno centrifugirala pri istim uvjetima. U međuvremenu sam pripremila radnu otopinu pufera 1X *Assay Buffer*, razrijedivši 5X *Assay Buffer* u destiliranoj vodi. Potom sam svaki od dobivenih taloga resuspendirala sa 100 μ L otopine istog pufera, zatim dodala jednaki volumen pufera za fiksaciju (*Fixation Buffer*) i inkubirala 10 minuta na ledu, a nakon inkubacije centrifugirala. Supernatante sam pažljivo uklonila, a taloge resuspendirala s 200 μ L ledeno hladnog pufera za permeabilizaciju (*Permeabilization Buffer*) te ponovno inkubirala na ledu i centrifugirala. Taloge sam zatim resuspendirala sa 180 μ L otopine pufera 1X *Assay Buffer* i u svaku mikroeprevetu sa staničnom suspenzijom potom dodala 10 μ L mješavine antitijela (5 μ L anti-fosfo-Akt i 5 μ L anti-fosfo-ERK1/2) te inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Po završetku inkubacije, u svaku mikroeprevetu dodala sam 100 μ L otopine pufera 1X *Assay Buffer* i centrifugirala. Dobiveni stanični talog dobro sam resuspendirala s 200 μ L otopine istog pufera i odmah zatim napravila po dva očitavanja za svaki uzorak na instrumentu MUSE. Nakon očitavanja, dobivene rezultate sam analizirala pomoću programa Muse 1.5 Analysis (Luminex), a zatim sam napravila i statističku obradu podataka.



Slika 19. Eksperimentalne skupine stanične linije CHL-1 za analizu aktivacije PI3K/MAPK signalnih puteva pomoću Guava Muse stolnog protočnog citometra.

NTF - kontrola, netransfecirane stanice; TF SHH - stanice transfecirane plazmidom pcDNA3 - SHH.

3.2.9. Statistička obrada podataka

Za analizu staničnog ciklusa i aktivacije PI3K/MAPK signalnih puteva eksperimenti su provedeni najmanje u duplikatu i za svaki od uzoraka izračunata je srednja vrijednost i standardna pogreška. Analiza je napravljena u programu MedCalc for Windows 19.5.3 (MedCalc Software, Belgija), koristeći jednostruku analizu varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom za usporedbu značajnih parova uzoraka. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Rezultati mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

4. REZULTATI

4.1. Dizajn sintetskog genskog fragmenta (gBlock) *SHH*

Sekvenca sintetskog genskog fragmenta *SHH* dizajnirana je na temelju kodirajuće regije gena, no pošto je ista bila previsoke kompleksnosti za sintezu, provedena je optimizacija kodona na način da su zamijenjene ponavljajuće sekvence i smanjen udio GC parova baza, pazeći pritom da proteinski produkt ostane isti (Slika 20.). Konačna sekvenca bila je niske kompleksnosti te je sadržavala 1430 pb, uključujući dodane nasumične sljedove nukleotida na krajevima.

Denied - High Complexity (Scores of 10 or greater)
The identified complexities prevent manufacturing of this sequence. Click Edit for more information.
Total Complexity Score: 85.9

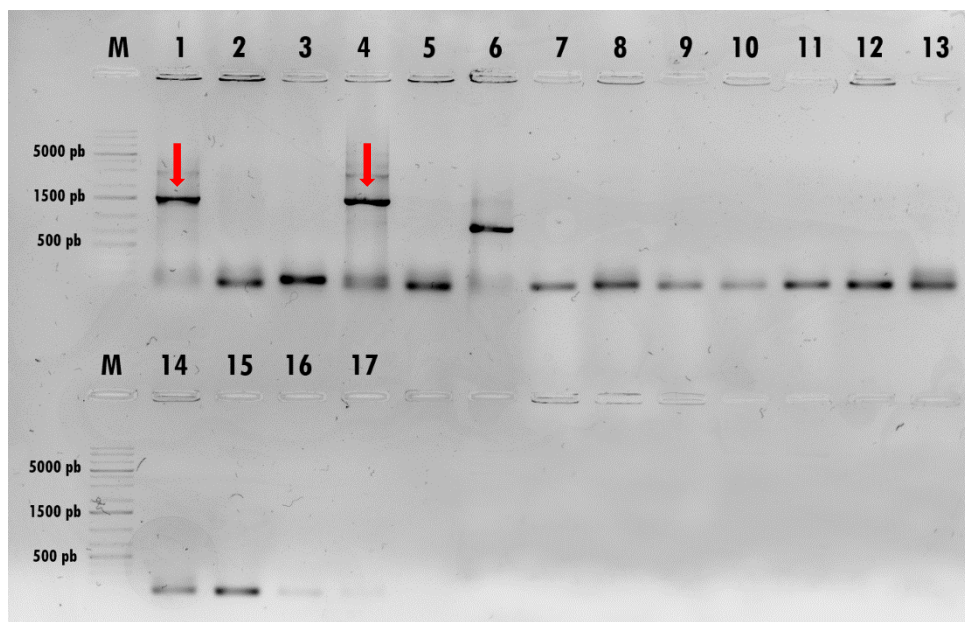
	Complexity Description	Score
EDIT	This sequence contains a window of 100 bases starting at base 1149 with a GC content of 86%. Solution: Redesign this region to have a GC content less than 69%.	13.6
EDIT	The GC content of the segment from position 501 to position 1300 is 73.5%. Solution: Redesign to reduce the GC content below 60%.	13.5
EDIT	Greater than 88% of the bases within a 90 base window starting at position 295 are part of repeats more than 8 bases long within the entire sequence. Solution: Redesign to reduce or eliminate the density of repeats within this window.	11
EDIT	The repeated sequence GCTGC exists at the following locations: 21, 24, 42, 63, 608, 714, 810, 1180, 1276, 1329, 482, 1326. Solution: Redesign to disrupt instances of the repeat near the terminal end(s) or add extra bases to push the repeat internally.	10
EDIT	A palindrome with the sequence ATCGATCGAT exists at the following locations: 1. Solution: Redesign to disrupt the palindrome or add extra bases to push it internally.	10
EDIT	The repeated sequence GAGCG exists at the following locations: 229, 296, 802, 976, 1415, 1058, 1172, 1266, 1284. Solution: Redesign to disrupt instances of the repeat near the terminal end(s) or add extra bases to push the repeat internally.	10
EDIT	The repeated sequence TGATAAATAGTGA exists at the following locations: 1405, 1431. Solution: Redesign to disrupt instances of the repeat near the terminal end(s) or add extra bases to push the repeat internally.	10
EDIT	One or more repeated sequences greater than 8 bases comprise 57.1% of the overall sequence. Solution: Redesign to reduce the repeats to be less than 40% of the sequence.	6.8
EDIT	A hairpin with the stem sequence GCACCTGGAGC exists at the following locations: 633, 1267. Solution: Modify the sequence to reduce the length of the stem or complement to less than 10 bases.	1

Slika 20. Komentari na prvotno dizajniranu sekvencu gBlock *SHH* previsoke kompleksnosti. Nakon optimizacije kodona dobivena je sekvenca uredne kompleksnosti i spremna za sintezu.

4.2. Analiza sekvence gBlock *SHH* u plazmidnim vektorima

Prisutnost inserta gBlock *SHH* u plazmidnom vektoru pCR-XL-2-TOPO, a potom i u vektorima pcDNA3 te pAAVS1-Puro-DNR provjerena je metodom *colony PCR*, a zatim i sekvenciranjem izolirane plazmidne DNA metodom po Sangeru. Vizualizacijom rezultata navedene metode pomoću gel elektroforeze izvršena je pretraga tzv. pozitivnih bakterijskih

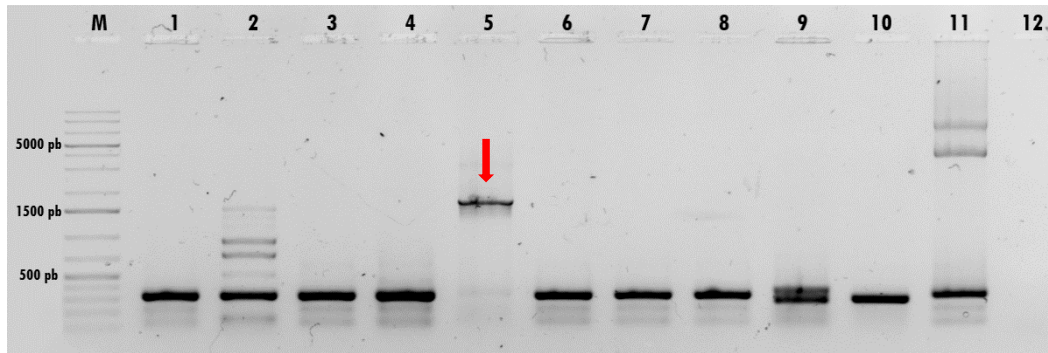
kolonija, odnosno onih koje posjeduju plazmid s ukloniranim gBlock *SHH*. Kod plazmidnog vektora pCR-XL-2-TOPO analizirano je ukupno 15 kolonija, od čega je u dvije dokazana prisutnost željenog inserta, koji s dijelom plazmida obuhvaćenim početnicama T3 i T7, daje produkt veličine 1535 pb (Slika 21.).



Slika 21. Gel elektroforeza produkata *colony PCR* reakcije plazmida pCR-XL-2-TOPO - *SHH*.

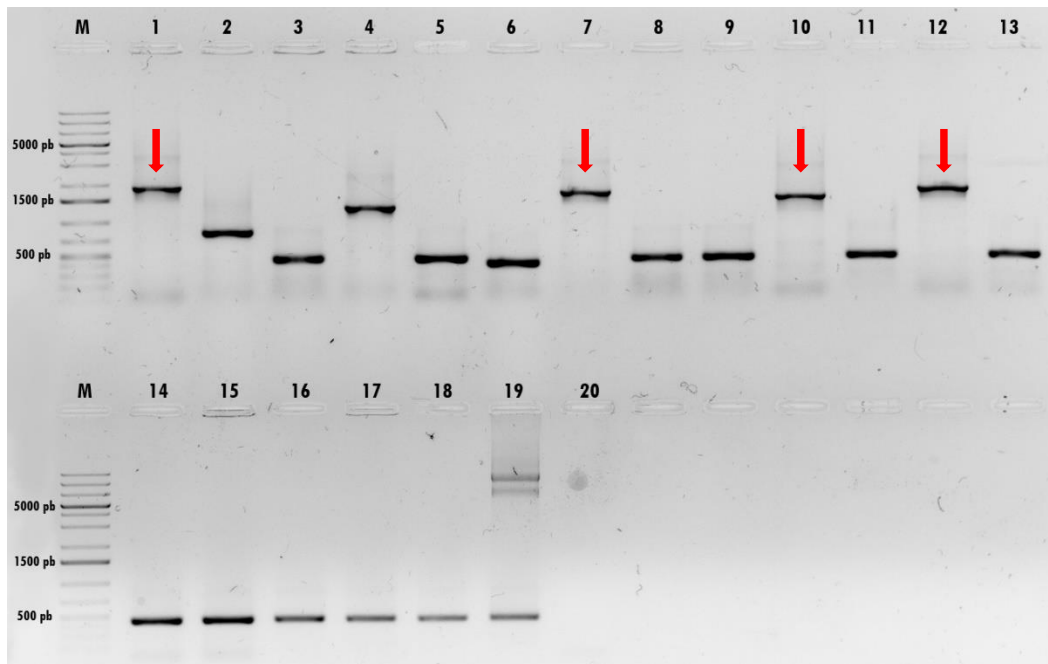
U prvim jažicama oba reda nalazi se marker (M), a zatim slijede uzorci bakterijskih kolonija (1-15) te linearizirani vektor pCR-XL-2-TOPO u jažici 16 i negativna kontrola (reakcijska smjesa bez DNA kalupa) u jažici 17. Veličine fragmenata bakterijskih kolonija 1 i 4 (crvene strelice) odgovaraju željenom produktu veličine 1535 pb.

Na isti način su vizualizirani i produkti umnažanja specifičnih odsječaka DNA plazmida pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR, s potencijalno ugrađenim gBlock *SHH*. Kod vektora pcDNA3 analizirano je 10 kolonija i samo jedna od njih je pokazala prisutnost inserta, odnosno na gel elektroforezi je, kao rezultat *colony PCR* metode s početnicama VP1.5 i BGH, dobiven produkt veličine 1753 pb (Slika 22.). S druge strane, kod vektora pAAVS1-Puro-DNR vizualizirani su produkti 18 kolonija te je kod četiri od njih dokazana ugradnja inserta. Uz upotrebu početnica VP1.5 i XL39, veličina traženih fragmenata iznosila je 1877 pb (Slika 23.). Dobiveni rezultati potvrđeni su pozitivnim signalom pozitivne kontrole i negativnim signalom negativne kontrole.



Slika 22. Gel elektroforeza produkata *colony PCR* reakcije plazmida pcDNA3 - SHH.

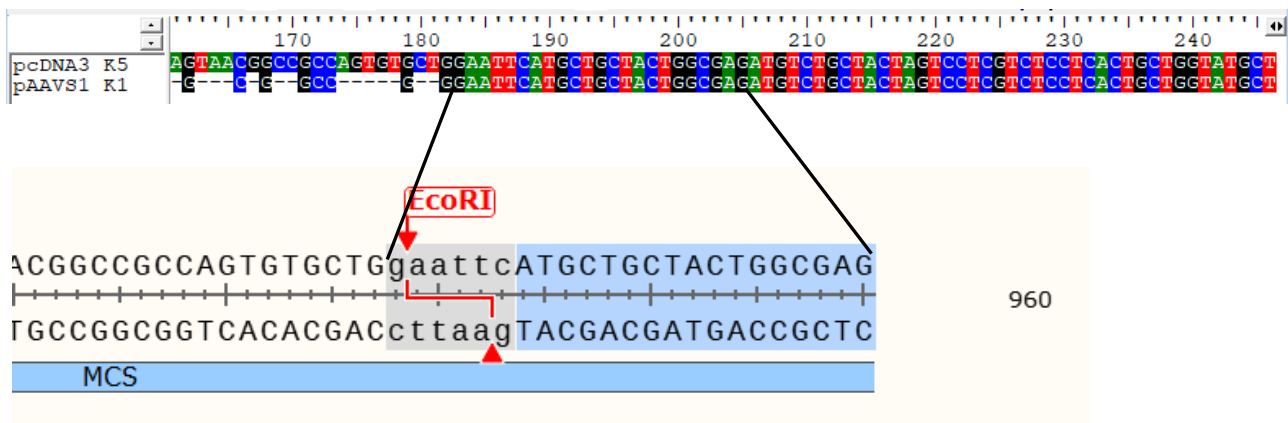
U prvoj jažici nalazi se marker (M), a zatim slijede uzorci bakterijskih kolonija (1-10), pozitivna kontrola (plazmid pcDNA3) u jažici 11 i negativna kontrola (reakcijska smjesa bez DNA kalupa) u jažici 12. Fragment bakterijske kolonije označene brojem 5 (crvena strelica) odgovara veličini traženog produkta od 1753 pb.



Slika 23. Gel elektroforeza produkata *colony PCR* reakcije plazmida pAAVS1-Puro-DNR - SHH.

U prvim jažicama oba reda nalazi se marker (M), a zatim slijede uzorci bakterijskih kolonija (1-18), pozitivna kontrola (plazmid pAAVS1-Puro-DNR) u jažici 19 i negativna kontrola (reakcijska smjesa bez DNA kalupa) u jažici 20. Fragmenti bakterijskih kolonija 1, 7, 10 i 12 (crvene strelice) odgovaraju veličini traženog produkta od 1877 pb.

Nakon provjere veličine fragmenata dobivenih umnažanjem metodom *colony PCR* na gel elektroforezi, izvršena je potvrda rezultata sekvenciranjem po Sangeru. Analiza sekvenci provedena je u programu BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2 (Tom Hall). Utvrđeno je da su bakterijske kolonije broj 5 kod vektora pcDNA3 i broj 1 kod vektora pAAVS1-Puro-DNR imale ugrađenu potpunu i ispravno orijentiranu sekvencu gBlock *SHH* (Slika 24.), dok je kod kolonija broj 7, 10 i 12 potonjeg vektora došlo do ugradnje sekvence u krivoj orijentaciji. Isto tako, kod plazmida pCR-XL-2-TOPO došlo je do ugradnje potpune sekvence u bakterijske kolonije 1 i 4, no također u krivoj orijentaciji. U ovom slučaju to nije predstavljalo problem, pošto se navedeni vektor nije koristio za transfekciju stanica, već samo kao donor pri subkloniranju fragmenta *SHH* u gore navedene vektore.



Slika 24. Analiza rezultata sekvenciranja plazmidne DNA bakterijskih kolonija broj 5 (vektor pcDNA3) i broj 1 (vektor pAAVS1-Puro-DNR) s pravilno ugrađenom sekvencom gBlock *SHH*.

Navedene bakterijske kolonije jedine su imale ugrađenu potpunu i ispravno orijentiranu sekvencu *SHH*, što je vidljivo usporedbom rezultata sekvenciranja s dijelom vektora pcDNA3 na kojem je označen palindromski slijed (sivo) i mjesto cijepanja restrikcijskim enzimom EcoRI te prvih nekoliko nukleotida sekvence *SHH* označenih plavom bojom.

Usporedbom kromatograma svakog uzorka sekvenciranog iz oba smjera sa sekvencama pojedinog praznog plazmidnog vektora i inserta, odabrane su samo one bakterijske kolonije kod kojih je slijed gBlock *SHH* bio ugrađen na pravom mjestu unutar vektora te su iste korištene u daljnjem istraživanju (Slika 25.).

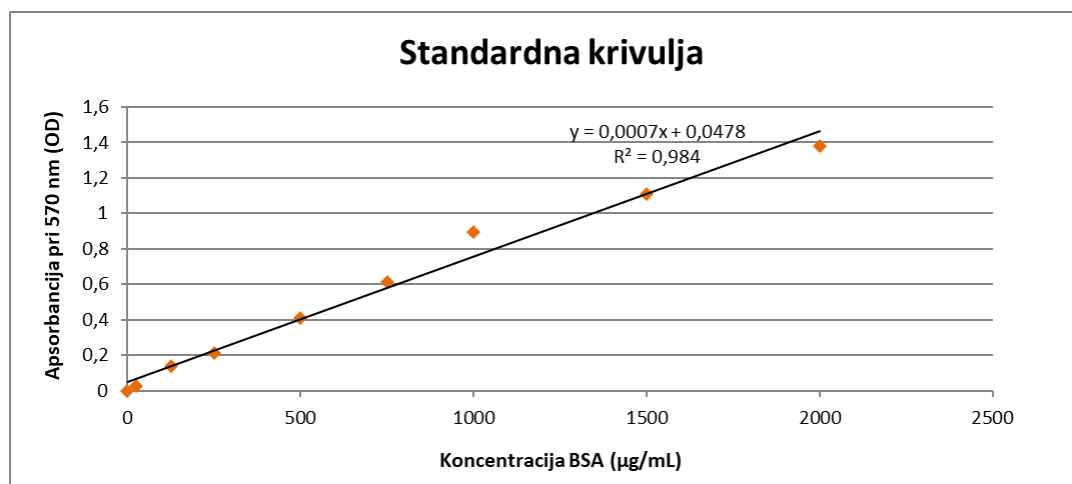


Slika 25. Kromatogram pozitivne bakterijske kolonije broj 5 kod vektora pcDNA3 (gore) i kolonije broj 1 kod vektora pAAVS1-Puro-DNR (dolje).

Na oba kromatograma plavom bojom je označen 5' adenin gBlock *SHH*.

4.3. Analiza proteinske ekspresije

Po prolaznoj transfekciji stanica CHL-1 plazmidnim vektorom pcDNA3 s ugrađenim genskim fragmentom *SHH*, uslijedila je analiza proteinske ekspresije Westernskom metodom otiska samog proteina *SHH*, njegovog primarnog receptora *PTCH1* te transkripcijskih faktora *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*, nakon 24 i 48 sati od trenutka transfekcije. Prvi korak u navedenoj analizi bio je mjerenje koncentracije izoliranih proteina kolorimetrijskom metodom prema Bradford-u. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija niza serijskih razrjeđenja standardnog proteina BSA, početne koncentracije 1 mg/mL, napravljena je linearna standardna krivulja na temelju koje su određene nepoznate koncentracije proteinskih uzoraka (Slika 26.).



Slika 26. Prikaz standardne krivulje prema kojoj su određene nepoznate koncentracije proteina.

Na X osi nalaze se koncentracije serijskih razrjeđenja standardnog proteina BSA, izražene u $\mu\text{g/mL}$, a na osi Y vrijednosti apsorbancije istih pri 570 nm, izražene kao optička gustoća (OD, eng. *optical density*).

Nepoznate koncentracije proteina izračunate su na temelju formule nagiba pravca prikazane na kalibracijskoj krivulji, pri čemu se za dobivanje koncentracije proteina izražene u $\text{ng}/\mu\text{L}$ koristila formula: $x = \left(\frac{y}{0,0007}\right) * 10$ (Tablica 10.).

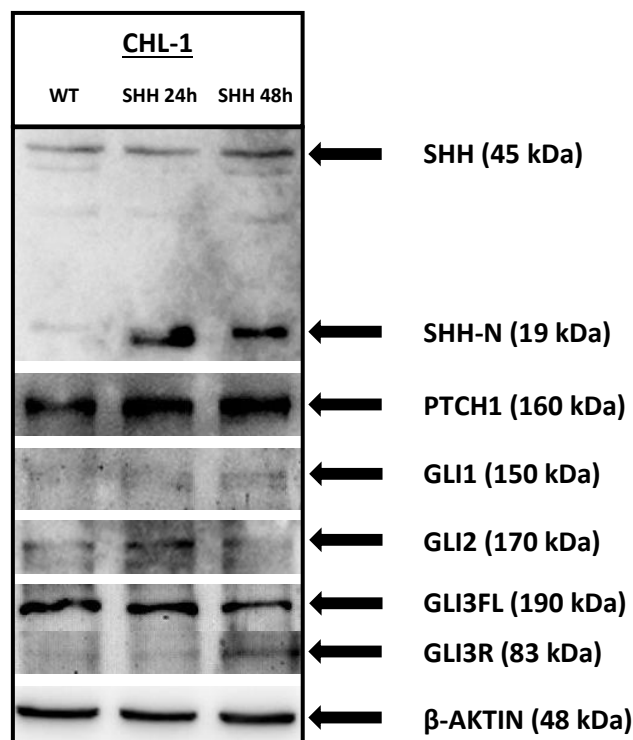
Tablica 10. Izračun nepoznatih koncentracija proteinskih uzoraka na temelju standardne krivulje.

UZORAK	OPTIČKA GUSTOĆA	KONC. ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	KONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	50 μg
CHL-1 NTF	0,466	5250	5,25	9,52381
CHL-1 TF SHH 24h	0,4085	4428,571	4,428571	11,29032
CHL-1 TF SHH 48h	0,5585	6571,429	6,571429	7,608696

* U zadnjem stupcu naveden je volumen proteina koji se nanosi u jažicu za konačnu masu od 50 μg .

NTF - kontrola, proteini izolirani iz netransfeciranih stanica; TF SHH 24/48 h - proteini izolirani iz stanica transfeciranih plazmidom pcDNA3 - SHH nakon 24 h, odnosno 48 h od transfekcije.

Westernskom metodom otiska dokazano je znatno povećanje proteinske ekspresije SHH-N, kao i PTCH1 te nešto slabije GLI1, kod stanične linije CHL-1 transfecirane plazmidom pcDNA3 - SHH nakon 24 i 48 sati od transfekcije (Slika 27.). Nakon 48 h također se može vidjeti blago smanjenje razine proteina GLI3FL i povećanje GLI3R. Za normalizaciju količine proteina nanosenih u pojedinu jažicu korišten je beta aktin.



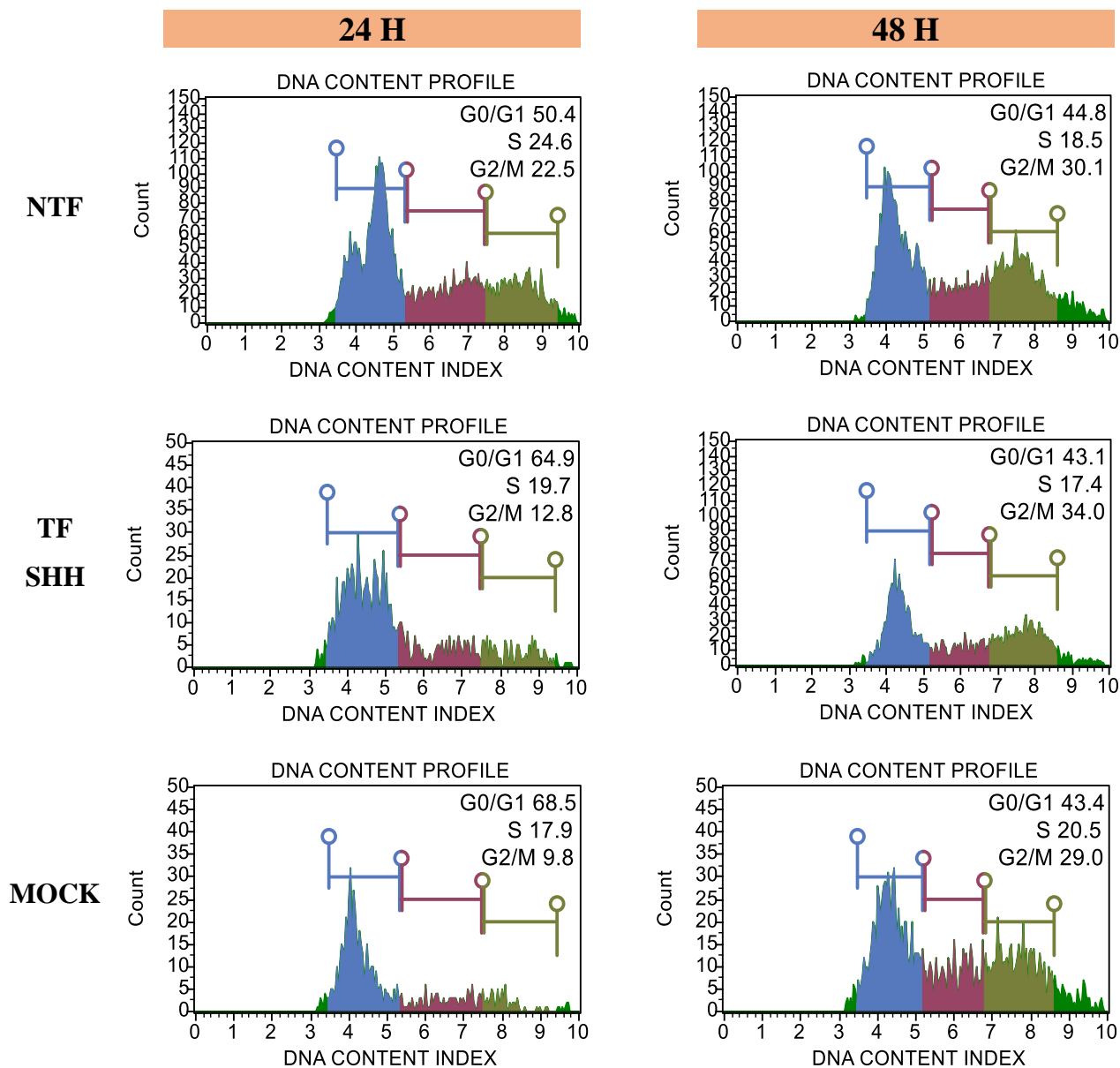
Slika 27. Rezultati analize ekspresije proteina SHH, PTCH1, GLI1, GLI2, GLI3 i β -ACT Westernskom metodom otiska.

Westernskom metodom otiska proteina iz CHL-1 stanica divljeg tipa (WT) i onih transfeciranih vektorom pcDNA3 - SHH nakon 24 sata (SHH 24h) i 48 sati (SHH 48h) od transfekcije, pokazano je povećanje ekspresije proteina SHH-N te njegovih transkripcijskih meta PTCH1 i GLI1.

***PRE-SHH** - neprocesirani oblik proteina SHH; **GLI3FL** - nepocijepani protein GLI3, aktivator (eng. *GLI3 full length*); **GLI3R** - pocijepani oblik proteina GLI3, represor (eng. *GLI3 repressor*).

4.4. Analiza staničnog ciklusa

Kvantitativno mjerenje postotka stanica u G0/G1, S i G2/M fazama staničnog ciklusa napravljeno je pomoću MUSE komercijalnog seta za analizu istog. Upotrebom reagensa Muse Cell Cycle, koji se sastoji od interkalirajuće boje propidij jodida (PI, eng. *propidium iodide*) i RNaze A, dolazi do razlikovanja i mjerenja postotka stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa na temelju diferencijalnog sadržaja DNA. U fazi mirovanja (G0/G1) stanice sadrže po dvije kopije svakog kromosoma te je intenzitet fluorescencije najmanji. Replikacijom DNA u S fazi dolazi do rasta u intenzitetu fluorescencije, dok je ona najjača u trenutku kada se sva kromosomska DNA udvostruči (G2/M faza) te takve stanice fluoresciraju s dvostrukim intenzitetom u odnosu na populaciju stanica G0/G1. Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski vrši izračun na temelju dobivenih signala te prikazuje populacijski profil pojedine eksperimentalne skupine u obliku histograma (Slika 28.).

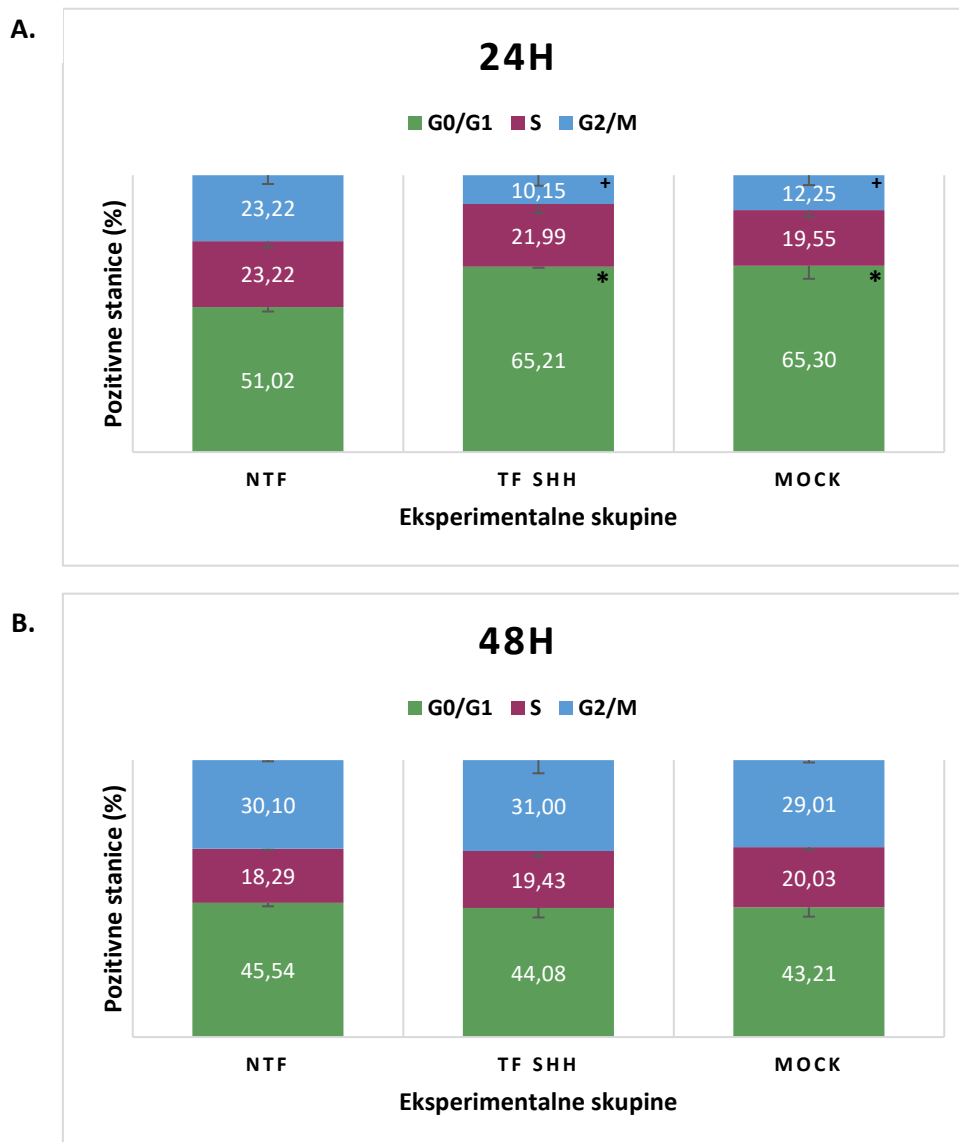


Slika 28. Prikaz populacijskih profila svih eksperimentalnih skupina s obzirom na faze staničnog ciklusa.

*NTF - kontrola, netransfecirane stanice; TF SHH - stanice transfecirane plazmidom pcDNA3 - SHH; MOCK - kontrola toksičnosti transfekcijskog reagensa Xfect.

Statističkom obradom dobivenih rezultata jednostrukom analizom varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom pokazano je da transfekcija plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH) i tretman transfekcijskim reagensom Xfect (MOCK) dovode do statistički značajnog povećanja broja pozitivnih stanica u G0/G1 fazama staničnog ciklusa nakon 24 sata od transfekcije ($P = 0,005$), u odnosu na kontrolnu skupinu (NTF). Suprotno tome, u istim eksperimentalnim skupinama dolazi do statistički značajnog smanjenja broja pozitivnih stanica

u G2/M fazama ($P = 0,023$). Nakon 48 sati od transfekcije nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina, pri čemu je i dalje većina stanica bila u G0/G1 fazama staničnog ciklusa, no vidljivo je i povećanje broja stanica u G2/M fazama, u odnosu na eksperimentalne skupine analizirane 24 h po transfekciji (Slika 29.). Ovi rezultati ukazuju na to da transfekcija proteinom SHH nema učinka na stanični ciklus, jer je uočeni efekt očito posljedica samog postupka transfekcije, a ne ekspresije proteina SHH.

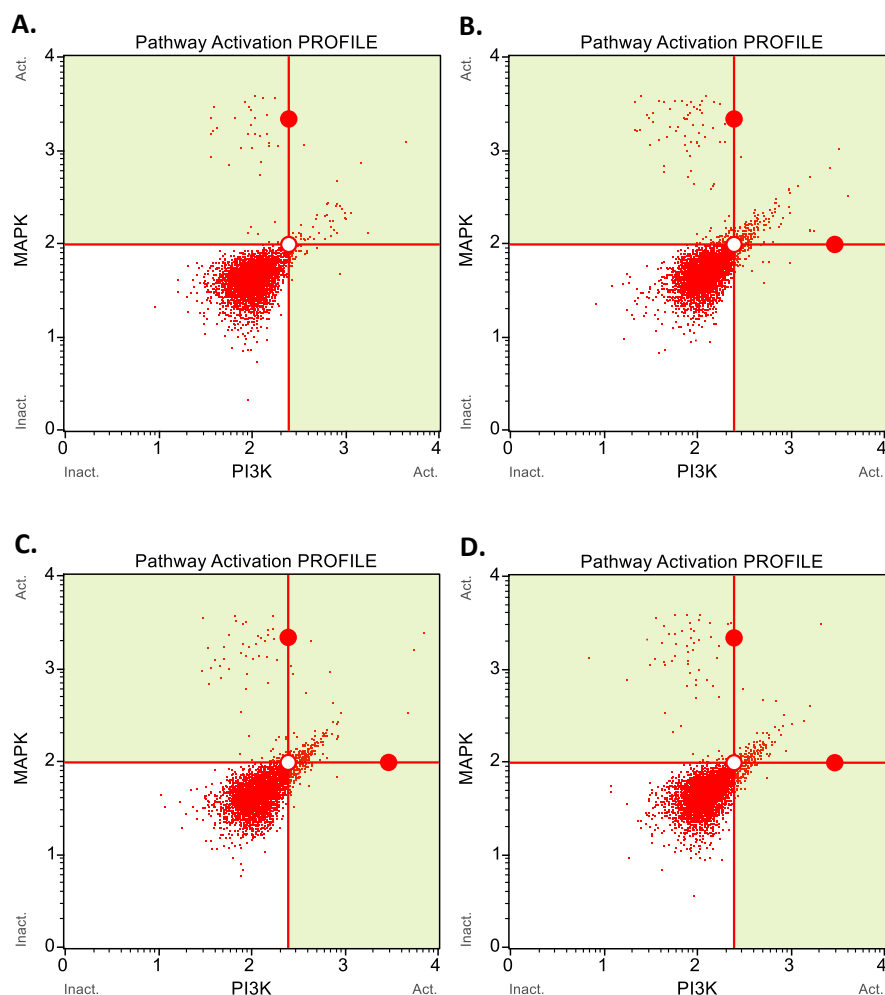


Slika 29. Grafički prikaz postotka aktiviranih stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa nakon 24 (A) i 48 sati (B) od transfekcije.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Transfekcija plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH) i tretman transfekcijskim reagensom Xfect (MOCK) dovode do statistički značajnog povećanja (*) broja pozitivnih stanica u G0/G1 fazama staničnog ciklusa ($P = 0,005$) i smanjenja (+) u G2/M fazama ($P = 0,023$) nakon 24 sata od transfekcije.

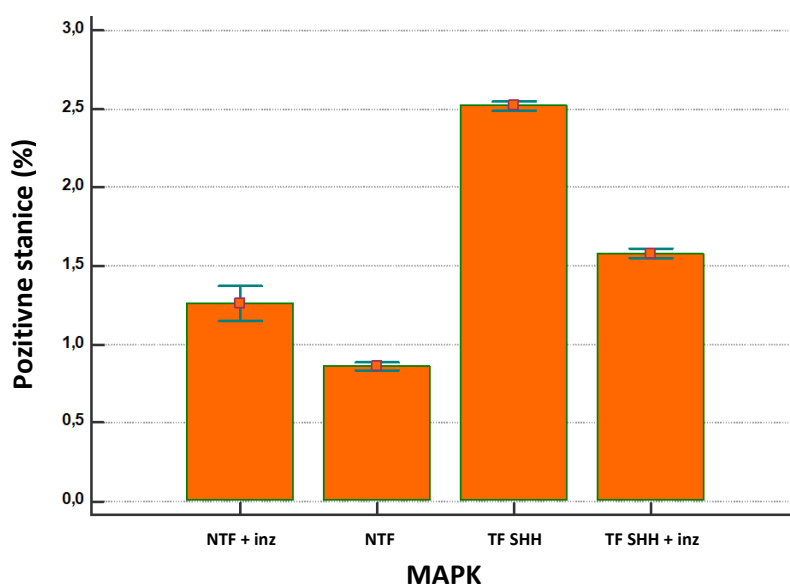
4.5. Analiza aktivacije signalnih puteva PI3K/MAPK

Upotrebom komercijalnog seta za analizu aktivacije PI3K/MAPK signalnih puteva analizirana je aktivacija oba signalna puta, pomoću antitijela anti-fosfo-Akt i anti-fosfo-ERK1/2 iz navedenog seta. Fosforilirani oblik proteinske kinaze Akt, za koji se veže antitijelo anti-fosfo-Akt, povezan je s aktivnošću signalnog puta PI3K, dok antitijelo anti-fosfo-ERK1/2 detektira fosforilirani oblik kinaze MAPK. Ovakva multifaktorska analiza omogućava nam praćenje prostorne i vremenske interakcije između navedenih signalnih puteva. Aktivnost proteinske kinaze B također mogu potaknuti razni faktori rasta i preživljavanja, ali i inzulin, koji je stoga u ovoj analizi bio korišten u svrhu pozitivne kontrole. Populacijski profili pojedinih eksperimentalnih skupina, s obzirom na aktivnost signalnih puteva PI3K/MAPK, prikazani su u obliku *dot plot* dijagrama na Slici 30.



Slika 30. Prikaz populacijskih profila netransfeciranih stanica - NTF (A), stanica transfeciranih plazmidom pcDNA3 - SHH - TF SHH (B), netransfeciranih stanica uz dodatak inzulina - NTF + inzulin (C) i stanica transfeciranih plazmidom pcDNA3 - SHH uz dodatak inzulina - TF SHH + inzulin (D) s obzirom na aktivaciju signalnih puteva PI3K/MAPK.

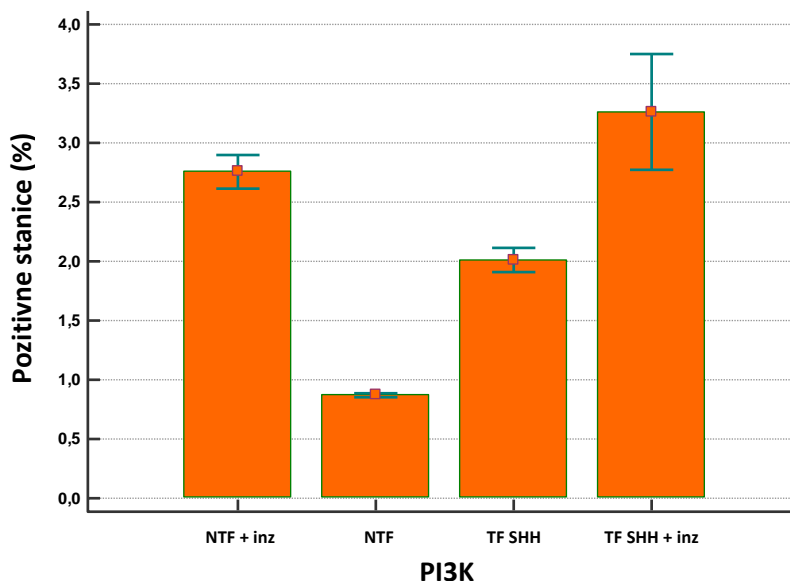
Statističkom obradom dobivenih rezultata jednostrukom analizom varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom utvrđeno je da primarno transfekcija plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH), ali i transfekcija stanica uz dodatak inzulina (TF SHH + inzulin) te sam inzulin kod netransfeciranih stanica (NTF + inzulin), dovodi do statistički značajnog povećanja broja stanica s aktiviranom kinazom MAPK ($P < 0,001$), u odnosu na kontrolnu skupinu (NTF). Isto tako je utvrđena i statistički značajna razlika u aktivaciji MAPK kod svake od gore navedenih eksperimentalnih skupina međusobno (Slika 31).



Slika 31. Grafički prikaz postotka stanica s aktiviranim signalnim putem MAPK.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Primarno transfekcija plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH), ali i dodatak inzulina netransfeciranim (NTF + inzulin) i transfeciranim stanicama (TF SHH + inzulin) dovode do statistički značajnog povećanja broja stanica s aktiviranom kinazom MAPK, u odnosu na kontrolnu skupinu NTF ($P < 0,001$).

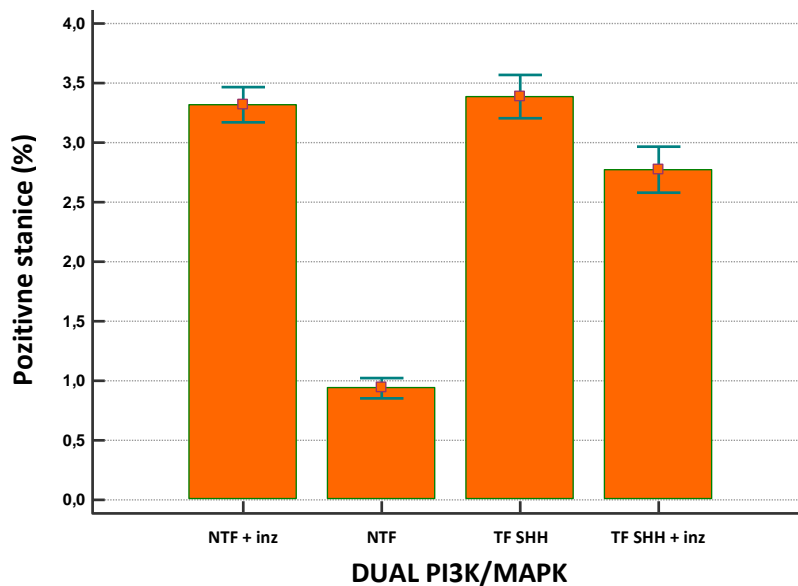
Također, dokazano je da postoji statistički značajno povećanje broja stanica s fosforiliranom proteinskom kinazom Akt, odnosno aktivnim signalnim putem PI3K ($P = 0,003$), kod sve tri eksperimentalne skupine u odnosu na kontrolu (NTF). U ovom slučaju razlika između pozitivne kontrole (NTF + inzulin) te skupina TF SHH i TF SHH + inzulin nije statistički značajna, ali zanimljivo je da postoji značajna razlika u aktivaciji puta PI3K kod skupine TF SHH + inzulin u odnosu na TF SHH (Slika 32.).



Slika 32. Grafički prikaz postotka stanica s aktiviranim signalnim putem PI3K.

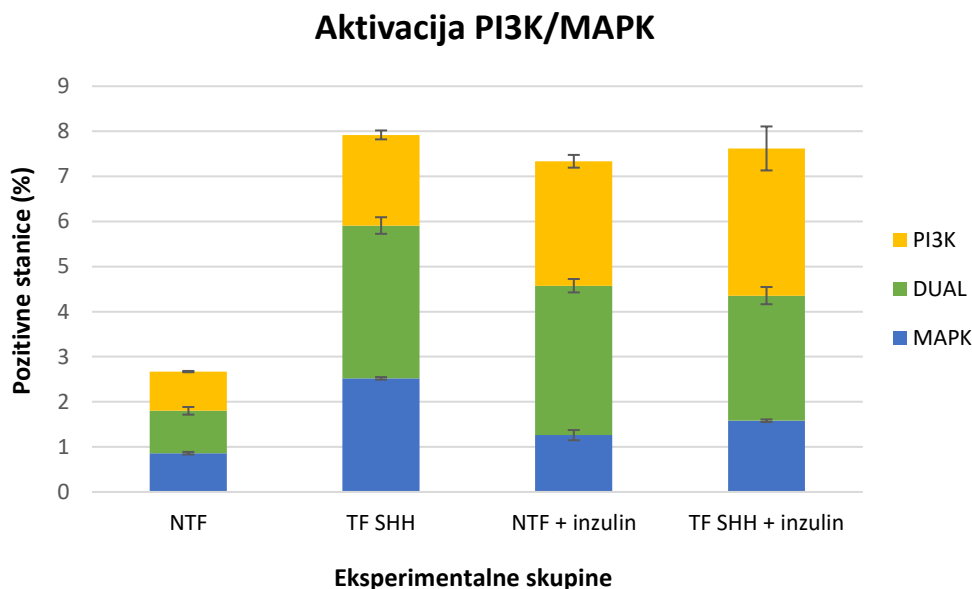
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Transfekcija plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH) te dodatak inzulina netransfeciranim (NTF + inzulin) i transfeciranim stanicama (TF SHH + inzulin) dovode do statistički značajnog povećanja broja stanica s aktiviranim signalnim putem PI3K, u odnosu na kontrolnu skupinu NTF ($P = 0,003$). Također, postoji statistički značajna razlika u aktivaciji puta PI3K kod skupine TF SHH + inzulin u odnosu na TF SHH.

Zaključno, i kod usporedbe aktivacije oba signalna puta (DUAL PI3K/MAPK) utvrđeno je statistički značajno povećanje postotka stanica s aktivirana oba puta kod eksperimentalnih skupina NTF + inzulin, TF SHH i TF SHH + inzulin u odnosu na kontrolnu skupinu NTF ($P < 0,001$). Međusobna razlika u aktivaciji oba signalna puta među gore navedenim skupinama nije statistički značajna (Slika 33.). Sažeti grafički prikaz navedenih rezultata aktivacije signalnog puta PI3K i MAPK te oba puta istovremeno, kod svih eksperimentalnih skupina, nalazi se na Slici 34. Važno je napomenuti da su ovdje prikazani rezultati samo jednog eksperimenta, te da je potrebno provesti još barem dva neovisna ponavljanja da bi rezultati bili pouzdani. Međutim, ovi rezultati naslućuju da transfekcija proteinom SHH stimulira signalne puteve PI3K i MAPK, i to u rasponu usporedivim s inzulinom, međutim kombinirani tretman inzulinom i SHH ne stimulira stanice dodatno.



Slika 33. Grafički prikaz postotka stanica s aktivirana oba signalna puta PI3K i MAPK.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Transfekcija plazmidom pcDNA3 - SHH (TF SHH) i dodatak inzulina netransfeciranim (NTF + inzulin) i transfeciranim stanicama (TF SHH + inzulin) utječu na statistički značajno povećanje broja stanica s aktivirana oba signalna puta PI3K i MAPK, u odnosu na kontrolnu skupinu NTF ($P < 0,001$), no ne postoji statistički značajna razlika u aktivaciji puteva među navedenim eksperimentalnim skupinama.



Slika 34. Sažeti grafički prikaz postotka aktivacije pojedinog signalnog puta u svim eksperimentalnim skupinama.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

5. RASPRAVA

Protein SHH jedna je od tri izoforme sekretornih proteina Hedgehog kod sisavaca, koji djeluju kao mitogeni signal u embriogenezi, odnosno imaju važnu ulogu u rastu i specijalizaciji stanica prilikom razvoja tkiva i organa. Aktivni oblik proteina, SHH-N, djeluje kao ligand te vezanjem za transmembranski receptor Patched pokreće signalni put Hedgehog-Gli (Porter i sur. 1996). Aktivnost signalnog puta HH-GLI najveća je upravo tijekom embriogeneze, dok bi u zdravom odraslom organizmu on trebao biti slabo aktivan ili potpuno inaktivan, osim u somatskim matičnim stanicama zaslužnima za regeneraciju tkiva (Wu i sur. 2017). Mutacije i poremećena funkcija pojedinog dijela signalnog puta ili prekomjerna ekspresija liganda SHH dovode do inicijacije, progresije i invazije tumora (Sari i sur. 2018). Osim s tumorom dojke, jajnika, prostate, probavnog trakta i sl., tijekom posljednjeg desetljeća otkrivena je i poveznica signalnog puta HH-GLI s nastankom melanoma (Stecca i sur. 2007). Danas se melanom smatra jednim od najsmrtonosnijih tipova tumora sa sve većom učestalosti u populaciji. Izuzetno složena patogeneza same bolesti, koja u podlozi ima promjene u jednom ili više povezanih signalnih puteva, zahtjeva daljnja istraživanja usmjerena prema razvoju ciljane terapije.

Naglasak ovog rada bio je na ligandu SHH, čija prekomjerna ekspresija, bilo od strane tumorskih stanica ili egzogeno unesenog rekombinantnog vektora s ugrađenim genom koji kodira protein SHH, može dovesti do autokrine aktivacije signalnog puta HH-GLI ovisne o ligandu (Cochrane i sur. 2015). Najvažniji korak u navedenom procesu predstavljala je sinteza sintetskog genskog fragmenta gBlock *SHH* na temelju kodirajuće regije gena, pošto nije korišten komercijalni rekombinantni fragment. Pri takvoj vrsti sinteze, često dolazi do toga da sintetizirani fragment stanice ne prepoznaju ili ne mogu procesirati. Kod gBlock *SHH* samo procesiranje je od iznimne važnosti, pošto se isti sintetizira u obliku prekursora molekularne mase 45kDa i u ciljanoj stanici dolazi do autokatalitičkog cijepanja na N-terminalni fragment (HH-N) molekularne mase 19 kDa i C-terminalni fragment proteina (HH-C), molekularne mase 25 kDa. SHH-N potom prolazi dvostruku lipidnu modifikaciju i tek kao takav predstavlja aktivnu signalnu molekulu (Porter i sur. 1996). Prvotno je planirano kloniranje sintetskog gBlock *SHH* direktno u vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR, no uslijed neuspjelih pokušaja, proveden je postupak subkloniranja istog fragmenta u plazmidni vektor pCR-XL-2-TOPO i ponovljeno kloniranje u gore navedene vektore po ekstrakciji fragmenta *SHH* iz donor vektora. Analizom bakterijskih kolonija metodom *colony PCR* i sekvenciranjem po Sangeru odabrane su samo bakterijske kolonije s pravilno ugrađenim i orijentiranim gBlock *SHH*.

Dobiveni vektor s ugrađenim genom koji kodira ligand SHH, pcDNA3 - SHH, korišten je za prolaznu transfekciju stanica i analizu proteinske ekspresije te utjecaj iste na stanični ciklus i aktivaciju signalnih puteva PI3K/MAPK, dok će s druge strane vektor pAAVS1-Puro-DNR - SHH biti korišten u budućim istraživanjima za stabilnu transfekciju stanica primjenom sustava CRISPR/Cas9.

Uspješan dizajn i procesiranje gBlock *SHH* od strane stanične linije CHL-1 potvrđeno je Westernskom metodom otiska. Stanična linija melanoma CHL-1 imala je nisku bazalnu ekspresiju proteina SHH, a posebno aktivne forme SHH-N. Prolaznom transfekcijom stanica vektorom pcDNA3 - SHH ekspresija SHH ostala je ista, no došlo je do značajnog povećanja ekspresije SHH-N, čime je dokazan uspješan unos vektora s ugrađenim fragmentom *SHH* u stanice, indukcija proteinske ekspresije i ono najvažnije, potpuno procesiranje proteina u aktivnu signalnu molekulu SHH-N. Isto tako, s povećanjem ekspresije SHH-N koreliralo je i povećanje ekspresije PTCH1 kod eksperimentalnih skupina stanične linije CHL-1 transfecirane plazmidom pcDNA3 - SHH. Navedena korelacija dodatno potvrđuje pravilno procesiranje i očuvanje strukture rekombinantnog proteina SHH-N, pošto se aktivacijom signalnog puta HH-GLI pojačano eksprimira protein PTCH1 te se isti smatra najboljim markerom aktivacije signalnog puta. Osim promjene u ekspresiji PTCH1, nakon 48 sati od trenutka transfekcije zapaženo je i blago povećanje ekspresije proteina GLI1 i GLI3R te smanjenje ekspresije GLI3FL. Slično je dokazano i u staničnim linijama tumora dojke, gdje stimulacija stanica rekombinantnim proteinom SHH dovodi do povećanja ekspresije GLI1 (Ge i sur. 2015). Sve navedene promjene ukazuju na to da u transfeciranim stanicama dolazi do funkcionalne autokrine aktivacije signalnog puta HH-GLI te se jači efekt vidi 48 sati po transfekciji.

Signalni put HH-GLI u interakciji je s brojnim drugim signalnim putevima, kao što su PI3K/Akt, RAF/MEK, K-RAS, EGFR i sl. (Pandolfi i Stecca 2015). Koliko je poznato, ovo je prvo istraživanje interakcije SHH sa signalnim putevima PI3K i MAPK u staničnoj liniji melanoma čovjeka, koristeći ekspresijski vektor kojim stanica sama sebi proizvede i, što je još važnije, endogeno procesira protein SHH. Stecca i sur. (2007) navode da hiperaktivacija signalnih puteva MAPK i Akt dovodi do pojačane aktivnosti transkripcijskih faktora *GLI* u mišjim modelima melanoma. Isto tako, kod tumora jednjaka (Wei i Xu 2011) i gastrointestinalnih stromalnih tumora (Qi i sur. 2018), dolazi do pojačane fosforilacije kinaze Akt i ekspresije signalnih puteva PI3K, MAPK i SHH, uslijed tretiranja staničnih linija rekombinantnim proteinom SHH-N. S tim istraživanjima podudarni su i rezultati dobiveni u

ovom istraživanju. Naime, transfekcija plazmidom pcDNA3 - SHH dovela je do statistički značajnog povećanja broja stanica s aktiviranom kinazom MAPK i fosforiliranom proteinskom kinazom Akt, odnosno aktivnim signalnim putem PI3K u staničnoj liniji melanoma CHL-1. Aktivacija kinaze Akt po transfekciji bila je usporediva sa aktivacijom iste nakon tretmana inzulinom, koji je korišten u svrhu pozitivne kontrole. Moguće je da SHH i inzulin aktiviraju isti signalni mehanizam u ovim stanicama, pošto kombinirani tretman inzulinom i SHH ne dovodi do dodatne stimulacije stanica. S druge strane, transfekcija proteinom SHH nije pokazala učinak na stanični ciklus tretiranih stanica. Iako je dokazano povećanje broja stanica u G0/G1 i smanjenje u G2/M fazama staničnog ciklusa nakon 24 sata od transfekcije proteinom SHH, identičan učinak pokazan je i u eksperimentalnoj skupini za kontrolu toksičnosti transfekcijskog reagensa (MOCK), što znači da do uočene promjene ne dolazi uslijed ekspresije proteina SHH, već samog postupka transfekcije stanica.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju, koji pokazuju postojanje interakcije između signalnih puteva HH-GLI i PI3K/MAPK, otvaraju put daljnjih istraživanja orijentiranih prema razvoju kombiniranih inhibitora različitih dijelova signalne mreže. Prvi korak na tom putu je razvoj *in vitro* modela „knock-in“ stanične linije pomoću sustava CRISPR/Cas9 i vektora pAAVS1-Puro-DNR - SHH, koji je uspješno dizajniran u sklopu ovog diplomskog rada. Stabilnom transfekcijom stanica, odnosno modifikacijom genoma zdravih ili tumorskih stanica navedenim vektorom, moguće je postići trajnu ligand-ovisnu autokrinu aktivaciju signalnog puta HH-GLI u stanicama, koje potom mogu služiti kao model za proučavanje signalnog puta, rasta i razvoja stanica, odgovora na pojedinu vrstu terapije i sl., što predstavlja veliki potencijal u stvaranju što učinkovitije terapije u liječenju melanoma.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju ovog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Uspješno je dizajniran sintetski genski fragment gBlock *SHH*, koji stanice CHL-1 mogu procesirati u aktivni oblik proteina rSHH-N.
2. gBlock *SHH* uspješno je kloniran u plazmidne vektore pcDNA3 i pAAVS1-Puro-DNR, što je potvrđeno sekvenciranjem.
3. Uspješno je provedena prolazna transfekcija stanične linije CHL-1 plazmidnim vektorom pcDNA3 s ugrađenim genskim fragmentom *SHH* (pcDNA3 - *SHH*).
4. Prolazna transfekcija vektorom pcDNA3 - *SHH* dovodi do povećanja ekspresije gena *SHH* u staničnoj liniji CHL-1, što je dokazano na proteinskoj razini metodom Westernskog otiska.
5. Prolazna transfekcija vektorom pcDNA3 - *SHH* dovodi do autokrine aktivacije signalnog puta HH-GLI ovisne o ligandu *SHH* u staničnoj liniji CHL-1, što potvrđuje povećana proteinska ekspresija receptora *PTCH1* i transkripcijskog faktora *GLI1* te smanjenje razine ekspresije proteina *GLI3FL* i povećanje *GLI3R*, 48 sati nakon transfekcije.
6. Prolazna transfekcija stanica CHL-1 vektorom pcDNA3 - *SHH* nema učinka na stanični ciklus.
7. Prolazna transfekcija stanica CHL-1 vektorom pcDNA3 - *SHH* stimulira aktivaciju signalnih putova *PI3K* i *MAPK*.

7. LITERATURA

- Ball N.J., Yohn J.J., Morelli J.G., Norris D.A., Golitz L.E., Hoeffler J.P. (1994): RAS mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J. Invest. Dermatol.* **102**: 285–290.
- Balordi F., Fishell G. (2007): Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci.* **27**: 5936–5947.
- Böni R., Schuster C., Nehrhoff B., Burg G. (2002): Epidemiology of skin cancer. *Neuroendocrinol. Lett.* **23**: 48–51.
- Brink G.R. Van Den (2007): Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol. Rev.* **87**: 1343–1375.
- Brink G.R. Van den, Hardwick J.C.H., Tytgat G.N.J., Brink M.A., Kate F.J. Ten, Deventer S.J.H. Van, Peppelenbosch M.P. (2001): Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse. *Gastroenterology* **121**: 317–328.
- Briscoe J., Théron P.P. (2013): The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 418–431.
- Brownell I., Guevara E., Bai C.B., Loomis C.A., Joyner A.L. (2011): Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell* **8**: 552–565.
- Chamoun Z., Mann R.K., Nellen D., Kessler D.P. Von, Beachy P.A., Basler K., Chamoun Z., Mann R.K., Nellen D., Beachy P.A., Basler K. (2016): Skinny Hedgehog, an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science* **293**: 2080–2084.
- Cochrane C.R., Szczepny A., Watkins D.N., Cain J.E. (2015): Hedgehog signaling in the maintenance of cancer stem cells. *Cancers (Basel)*. **7**: 1554–1585.
- Cooper G.M., Hausman R.E. (2004): *The cell: a molecular approach*. ASM Press. 713.
- Curtin J.A., Stark M.S., Pinkel D., Hayward N.K., Bastian B.C. (2006): PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **126**: 1660–1663.
- Dahmane N., Sánchez P., Gitton Y., Palma V., Sun T., Beyna M., Weiner H., Ruiz i Altaba A. (2001): The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* **128**: 5201–5212.
- Dierks C., Grbic J., Zirlik K., Beigi R., Englund N.P., Guo G.R., Veelken H., Engelhardt M., Mertelsmann R., Kelleher J.F., Schultz P., Warmuth M. (2007): Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat. Med.* **13**: 944–951.
- Fuchs E., Merrill B.J., Jamora C., Dasgupta R. (2001): At the Roots of a Never-Ending Cycle Review. *Dev. Cell* **1**: 13–25.
- Garraway L.A., Widlund H.R., Rubin M.A., Getz G., Berger A.J., Ramaswamy S., Beroukhi R., Milner D.A., Grant S.R., Du J., Lee C., Wagner S.N., Li C., Golub T.R., Rimm D.L., Meyerson M.L., Fisher D.E., Sellers W.R. (2005): Integrative genomic analyses identify

- MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**: 117–122.
- Ge X., Lyu P., Gu Y., Li L., Li J., Wang Y., Zhang L., Fu C., Cao Z. (2015): Sonic hedgehog stimulates glycolysis and proliferation of breast cancer cells: Modulation of PFKFB3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**: 862–868.
- Hall T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser. No. 41.* 95–98.
- Hocker T., Tsao H. (2007): Ultraviolet Radiation and Melanoma: A Systematic Review and Analysis of Reported Sequence Variants. *Hum. Mutat.* **28(6)**: 578–588.
- Hodis E., Watson I.R., Kryukov G. V., Arold S.T., Imielinski M., Theurillat J.P., Nickerson E., Auclair D., Li L., Place C., Dicara D., Ramos A.H., Lawrence M.S., Cibulskis K., Sivachenko A., Voet D., Saksena G., Stransky N., Onofrio R.C., Winckler W., Ardlie K., Wagle N., Wargo J., Chong K., Morton D.L., Stemke-Hale K., Chen G., Noble M., Meyerson M., Ladbury J.E., Davies M.A., Gershenwald J.E., Wagner S.N., Hoon D.S.B., Schadendorf D., Lander E.S., Gabriel S.B., Getz G., Garraway L.A., Chin L. (2012): A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**: 251–263.
- Hui M., Cazet A., Nair R., Watkins D.N., O’Toole S.A., Swarbrick A. (2013): The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy. *Breast Cancer Res.* **15**: 203.
- Ingham P.W., McMahon A.P. (2001): Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**: 3059–3087.
- Jalili A., Mertz K.D., Romanov J., Wagner C., Kalthoff F., Stuetz A., Pathria G., Gschaidner M., Stingl G., Wagner S.N. (2013): NVP-LDE225, a Potent and Selective SMOOTHENED Antagonist Reduces Melanoma Growth In Vitro and In Vivo. *PLoS One* **8**: 1–10.
- Jeng K.S., Chang C.F., Lin S.S. (2020): Sonic hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 758.
- Jenkins D. (2009): Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell. Signal.* **21**: 1023–1034.
- Jia J., Jiang J. (2006): Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 1249–1265.
- Kiuru M., Solomon J., Ghali B., Meulen M. Van Der, Crystal R.G., Hidaka C. (2009): Transient overexpression of Sonic hedgehog alters the architecture and mechanical properties of trabecular bone. *J. Bone Miner. Res.* **24**: 1598–1607.
- Koleva M., Kappler R., Vogler M., Herwig A., Fulda S., Hahn H. (2005): Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1863–1870.
- Kunz M., Vera J. (2019): Modelling of protein kinase signaling pathways in melanoma and other cancers. *Cancers (Basel)*. **11**: 465.
- Lai K., Kaspar B.K., Gage F.H., Schaffer D. V. (2003): Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* **6**: 21–27.
- Liu J., Fukunaga-Kalabis M., Li L., Herlyn M. (2014): Developmental pathways activated in

- melanocytes and melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **563**: 13–21.
- Liu L., Kugler M.C., Loomis C.A., Samdani R., Zhao Z., Chen G.J., Brandt J.P., Brownell I., Joyner A.L., Rom W.N., Munger J.S. (2013): Hedgehog signaling in neonatal and adult lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **48**: 703–710.
- Maner B.S., Dupuis L., Su A., Jueng J.J., Harding T.P., Meisenheimer J., Siddiqui F.S., Hardack M.R., Aneja S., Solomon J.A. (2020): Overview of genetic signaling pathway interactions within cutaneous malignancies. *J. Cancer Metastasis Treat.* **6**: 37.
- Marigo V., Davey R.A., Zuo Y., Cunningham J.M., Tabin C.J. (1996): Biochemical evidence that Patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**: 356–358.
- McGill G.G., Horstmann M., Widlund H.R., Du J., Motyckova G., Nishimura E.K., Lin Y.L., Ramaswamy S., Avery W., Ding H.F., Jordan S.A., Jackson I.J., Korsmeyer S.J., Golub T.R., Fisher D.E. (2002): Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**: 707–718.
- Medema J.P. (2013): Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat. Cell Biol.* **15**: 338–344.
- Menzies A.M., Haydu L.E., Visintin L., Carlino M.S., Howle J.R., Thompson J.F., Kefford R.F., Scolyer R.A., Long G. V. (2012): Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **18**: 3242–3249.
- Meyle K.D., Guldberg P. (2009): Genetic risk factors for melanoma. *Hum. Genet.* **126**: 499–510.
- Niyaz M., Khan M.S., Mudassar S. (2019): Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. *Transl. Oncol.* **12**: 1334–1344.
- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795–801.
- Odent S., Attié-Bitach T., Blayau M., Mathieu M., Augé J., Delezoïde A.L., Gall J.Y. Le, Marec B. Le, Munnich A., David V., Vekemans M. (1999): Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 1683–1689.
- Otsuka A., Levesque M.P., Dummer R., Kabashima K. (2015): Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *J. Dermatol. Sci.* **78**: 95–100.
- Ozretić P., Hanžić N., Proust B., Sabol M., Trnski D., Radić M., Musani V., Ciribilli Y., Milas I., Puljiz Z., Bosnar M.H., Levanat S., Slade N. (2019): Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell lines. *Sci. Rep.* **9**: 1–13.
- Palmieri G., Ombra M.N., Colombino M., Casula M., Sini M.C., Manca A., Paliogiannis P., Ascierto P.A., Cossu A. (2015): Multiple molecular pathways in melanomagenesis: Characterization of therapeutic targets. *Front. Oncol.* **5**: 1–16.
- Pandolfi S., Stecca B. (2015): Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: Implications for cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **17**: 1–36.
- Pepinsky R.B., Zeng C., Went D., Rayhorn P., Baker D.P., Williams K.P., Bixler S.A., Ambrose C.M., Garber E.A., Miatkowski K., Taylor F.R., Wang E.A., Galdes A. (1998):

- Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* **273**: 14037–14045.
- Petrova R., Joyner A.L. (2014): Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Dev.* **141**: 3445–3457.
- Platz A., Egyhazi S., Ringborg U., Hansson J. (2008): Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol. Oncol.* **1**: 395–405.
- Po A., Ferretti E., Miele E., Smaele E. De, Paganelli A., Canettieri G., Coni S., Marcotullio L. Di, Biffoni M., Massimi L., Rocco C. Di, Screpanti I., Gulino A. (2010): Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J.* **29**: 2646–2658.
- Pollock P.M., Harper U.L., Hansen K.S., Yudt L.M., Stark M., Robbins C.M., Moses T.Y., Hostetter G., Wagner U., Kakareka J., Salem G., Pohida T., Heenan P., Duray P., Kallioniemi O., Hayward N.K., Trent J.M., Meltzer P.S. (2003): High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* **33**: 19–20.
- Porter J.A., Young K.E., Beachy P.A. (1996): Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* **274**: 255–259.
- Qi Y., Zhao W., Wang Z., Xie Q., Cao J., Meng X. (2018): Cross regulation of signaling pathways in gastrointestinal stromal tumor. *Oncol. Lett.* **16**: 6770–6776.
- Ramalho-Santos M., Melton D.A., McMahon A.P. (2000): Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* **127**: 2763–2772.
- Roessler E., Belloni E., Gaudenz K., Vargas F., Scherer S.W., Tsui L.C., Muenke M. (1997): Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 1847–1853.
- Ruiz i Altaba A., Palma V., Dahmane N. (2002): Hedgehog–GLI signaling and the growth of the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 24–33.
- Sabol M., Trnski D., Musani V., Ozretić P., Levanat S. (2018): Role of GLI transcription factors in pathogenesis and their potential as new therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 25–62.
- Sari I.N., Phi L.T.H., Jun N., Wijaya Y.T., Lee S., Kwon H.Y. (2018): Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells. *Cells* **7**: 208.
- Sato N., Leopold P.L., Crystal R.G. (1999): Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *J. Clin. Invest.* **104**: 855–864.
- Stecca B., Mas C., Clement V., Zbinden M., Correa R., Piguet V., Beermann F., Ruiz I Altaba A. (2007): Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 5895–5900.
- Thomas N.E. (2006): BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* **16**: 97–103.
- Varjosalo M., Taipale J. (2008): Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes Dev.* **22**: 2454–

2472.

Wei L., Xu Z. (2011): Cross-signaling among phosphoinositide-3 kinase, mitogenactivated protein kinase and sonic hedgehog pathways exists in esophageal cancer. *Int. J. Cancer* **129**: 275–284.

Wu F., Zhang Y., Sun B., McMahon A.P., Wang Y. (2017): Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell Chem. Biol.* **24**: 252–280.

Yauch R.L., Gould S.E., Scales S.J., Tang T., Tian H., Ahn C.P., Marshall D., Fu L., Januario T., Kallop D., Nannini-Pepe M., Kotkow K., Marsters J.C., Rubin L.L., Sauvage F.J. De (2008): A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**: 406–410.

<https://eu.idtdna.com/site/order/gblockentry> (Pristupljeno: 21.08.2019.)

<https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/> (Pristupljeno: 17.09.2019.)

<https://www.elabscience.com/List-detail-306.html> (Pristupljeno: 21.10.2020.)

https://www.licor.com/bio/guide/westerns/transfer_options (Pristupljeno: 21.10.2020.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Pristupljeno: 20.08.2019.)

<https://www.snapgene.com> (Pristupljeno: 17.09.2019.)

<https://www.takarabio.com> (Pristupljeno: 15.10.2020.)

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17. ožujka 1997. godine u Čakovcu. Osnovnu školu završila sam u Prelogu, gdje sam potom nastavila i srednjoškolsko obrazovanje te 2015. godine završila opću gimnaziju u Srednjoj školi Prelog. Iste godine upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i 2018. godine stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice biologije, obranivši završni rad „*Neurobiološka podloga autizma*“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Također, 2018. godine upisala sam diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija odradila sam tri laboratorijske prakse, jednu u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, gdje sam radila na testovima ponašanja sa štakorima izloženima prenatalnoj hipoksiji, zatim u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević”, gdje sam savladala osnove genotipizacije HIV-a te u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Članica sam Udruge studenata biologije BIUS, gdje sam bila dio Sekcije za mikrobiologiju. Tijekom diplomskog studija položila sam Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, A kategorija. Od 2015. do 2019. godine aktivno sam sudjelovala u provedbi popularno-znanstvene manifestacije „Noć biologije“, koja je dio veće manifestacije „Dan i noć na PMF-u“. Isto tako, u razdoblju od 2018. do 2020. godine sudjelovala sam u prvom projektu društveno korisnog učenja na području mikrobiologije u Republici Hrvatskoj, pod nazivom „U društvu mikroba“ (<https://hmd-cms.hr/u-drustvu-mikroba/>), organiziranom od strane Hrvatskog mikrobiološkog društva te financiranom iz Europskog socijalnog fonda i Državnog proračuna. Na svečanoj sjednici povodom Dana fakulteta, 21. travnja 2020. godine, dodijeljena mi je Dekaničina nagrada za izuzetan uspjeh u studiju, kao najboljem studentu generacije diplomskog sveučilišnog studija Eksperimentalna biologija. U akademskim godinama 2016./2017., 2017./2018., 2018./2019. i 2019./2020. dobitnica sam studentske nagrade „Naj student grada Preloga“ te stipendije Zaklade Mikec za nadarene studente.