

Interakcije proteina p53 te karakterizacija stanica otpornih na ciljanu terapiju vemurafenibom u melanomu čovjeka

Radić, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

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:217:320600>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Martina Radić

**INTERAKCIJE PROTEINA p53 TE
KARAKTERIZACIJA STANICA
OTPORNIH NA CILJANU TERAPIJU
VEMURAFENIBOM U MELANOMU
ČOVJEKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Martina Radić

**INTERAKCIJE PROTEINA p53 TE
KARAKTERIZACIJA STANICA
OTPORNIH NA CILJANU TERAPIJU
VEMURAFENIBOM U MELANOMU
ČOVJEKA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr.sc. Maja Herak Bosnar

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Martina Radić

**PROTEIN INTERACTIONS OF p53 AND
CHARACTERIZATION OF CELLS
RESISTANT TO TARGETED THERAPY
BY VEMURAFENIB IN HUMAN
MELANOMA**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Maja Herak Bosnar

Zagreb, 2021.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Maje Herak Bosnar, u sklopu sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Disertacija je izrađena u okviru dva projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivima Otkrivanje novih proteinskih interakcija kao podloga za nove pristupe liječenju melanoma čovjeka – ProNetMel (IP-2013-11-1615) i Struktura, funkcija i evolucija proteina Nme6/Nm23-H6 – Nemo6 (IP-2016-06-4021).

Informacije o mentoru

Dr.sc. Maja Herak Bosnar diplomirala je 1993. molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je i magistrirala (1996.) te obranila doktorsku disertaciju (2002.). Zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković na radnom mjestu znanstvene savjetnice u Laboratoriju za proteinsku dinamiku u Zavodu za molekularnu medicinu. Kao dobitnik stipendije Francuske Republike 1999. boravila je na kraćem usavršavanju u Laboratoriju za unutarstanični prijenos signala i onkogenezu INSERM U528, Institut Curie, u Parizu. Bavi se istraživanjem proteina porodice Nme/Nm23/NDPK u sprječavanju nastanka i širenja metastaza kao i evolucijskom prošlosti gena koji sudjeluju u nastanku i širenju malignih bolesti. U svom znanstvenom opusu objavila je 34 znanstvena rada u časopisima s međunarodnom recenzijom. Voditelj je trenutno aktivnog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Struktura, funkcija i evolucija gena /proteina Nme6/Nm23-H6“. Bila je i voditelj Z-projekta MZOŠ (2007.-2012.) kao i voditelj radnog paketa FP7/Regpot Innomol (2013-2016). Također je bila, i trenutno je voditelj bilateralnih projekata s Francuskom (2009./10. i 2019./20.). Održala je veći broj pozvanih predavanja na inozemnim skupovima. Sudjelovala je u organizaciji velikog broja međunarodnih i domaćih konferencija kao član organizacijskog ili znanstvenog odbora. Glavni je organizator međunarodne konferencije o Nm23/NME/NDPK održane u Dubrovniku 2016. Član je nekoliko znanstvenih i stručnih društava te je član Izvršnog odbora Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, član Nadzornog odbora Hrvatskog društva za istraživanje raka te podpredsjednica Hrvatskog mikroskopijskog društva. Recenzirala je veći broj znanstvenih radova za ugledne svjetske znanstvene časopise (Apoptosis, Laboratory Investigation, N-S Archives of Pharmacology, Marine Drugs, International Journal of Molecular Sciences i dr.). Bila je recenzent za znanstvene projekte Ministarstva znanosti obrazovanja i športa 2006., te za Hrvatsku zakladu za znanost 2018./2019. i 2019./2020. Od 2016. godine članica je Znanstvenog vijeća Instituta Ruđer Bošković te od 2019. i njegova potpredsjednica.

Voditeljica je kolegija Molekulske osnove metastaziranja na Sveučilištu J.J. Strossmeyer u Osijeku te suvoditeljica kolegija Biologija tumorskih stanica na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu gdje je od 2015.-2018. bila i član Vijeća doktorskog studija Biologije. Dosada je vodila nekoliko diplomskih radova s kemijskog i biološkog studija te 5 doktorskih disertacija od kojih su tri uspješno obranjene, a dvije su u pripremi. Vodila je i tri poslijedoktoranda. Sudjelovala je, također, u „Tečajevima u biologiji i medicini“ u organizaciji Instituta Ruđer Bošković tijekom 10 godina kao jedan od predavača i voditelja praktičnog dijela tečaja. Bila je znanstveni recenzent za srednjoškolske udžbenike i pripadajuće radne bilježnice iz biologije nakladnika Neodidacta d.o.o. Jedna je od urednica i autora sveučilišnog priručnika: „Metode u molekularnoj biologiji“, urednice: A. Ambriović Ristov (gl. urednica), A. Brozović, B. Bruvo Mađarić, H. Četković, M. Herak Bosnar, D. Hranilović, S. Katušić Hećimović, N. Meštrović Radan, S. Mihaljević, N. Slade, D. Vujaklija, Zagreb, 2007, izdavač: Institut Ruđer Bošković. Za ovaj izdavački poduhvat dobivena je Nagrada Josip Juraj Strossmayer (HAZU/Zagrebački velesajam) za najuspješniji izdavački pothvat u prirodnim znanostima u 2007. godini. U više je navrata sudjelovala u aktivnostima vezanim za popularizaciju znanosti na Institutu Ruđer Bošković.

Od srca hvala mentorici dr.sc. Maji Herak Bosnar na vodstvu kroz ovu važnu fazu mog života. Svojim stručnim, ali i prijateljskim savjetima omogućili ste da izazovi doktorata budu lakše premostivi. Hvala na utjehama koje sam dobila kada pokusi propadnu na kraju tjedna i poticaju na početku svakog idućeg. Bolju mentoricu nisam mogla poželjeti.

Veliko hvala voditeljici laboratorija dr.sc. Nedi Slade na svoj pruženoj pomoći i savjetima tijekom rada na projektu, kao i idejama i potpori tijekom pisanja disertacije. Bilo je divno biti dio Vašeg tima.

Veliko hvala drugim članovima Laboratorija za proteinsku dinamiku. Hvala mom 'PhD bratu' Bastienu P. Bio je užitak dijeliti s tobom ovo putovanje. Hvala Ani T., Ignaciji V., Anđeli H. i Maji J.J. na svim 'trikovima' koje ste me naučile. Olakšale ste mi brojne korake izrade rada. Hvala tehničarki Martini P. na svoj pruženoj pomoći, razmazila si nas svojom organizacijom. Zahvaljujem Nikolini H. na svom prenesenom znanju na početku mog doktorata.

Zahvaljujem kolegama iz Laboratorija za biofiziku stanice na svoj pomoći pri prilagodbi naprednih mikroskopskih tehnika na naše stanične modele. Posebno hvala Marku Š. i Luciji H. na podukama i strpljenju, kao i dr.sc. Igoru Weberu na omogućenoj suradnji.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za nasljedni rak, Sonji L., Petru O., Maji S., Vesni M., Diani T., Nikolini R. i Matei K., na pomoći, savjetima i suradnji.

Veliko hvala dr. Pierre Rouxu i dr. Nikoli Arsiću s Istraživačkog centra za staničnu biologiju u Montpellieru na srdačnom gostoprimstvu te brojnim pitanjima i savjetima koji su rezultirali novim poglavljem doktorata.

Zahvaljujem dr. Uwe Schlattneru i njegovom istraživačkom timu sa Sveučilišta u Grenobleu na produktivnoj suradnji koja je polučila brojne rezultate u tako kratkom vremenu.

Ono što nam uljepša svaki radni dan te posao pretvori u užitak su kolege koje s vremenom postanu prijatelji. Stoga veliko hvala mojim 'curama s kata' Ani T., Anamariji Đ., Luciji L., Josipi S. i Eni P. na svakom zajedničkom ručku na kojemu smo dijelile šale, brige i savjete. Također, hvala Andrei H.K. što mi je uljepšala bezbroj vožnji biciklom do posla, Petri M. na mnogim životnim savjetima te Eli Š. i Kseniji B. na smijanju od srca.

Veliko hvala Ivani i Domagoju na svim druženjima i razgovorima koji su me punili novom energijom. Veselim se svakom budućem izletu.

Hvala Kristini i Robertu što su uz mene od prvog dana studiranja. Ne postoje kilometri koji bi nas uspjeli razdvojiti.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji. Hvala mami na svoj bezuvjetnoj ljubavi. Zaista nema osobe koja više vjeruje u mene. Veliko hvala tati i bratu na svoj podršci i povjerenju.

*Luka, hvala ti što postojiš. Činiš me boljom osobom svaki dan.
Where are we going next?*

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| SAŽETAK..... | X |
| ABSTRACT | XI |
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. LITERATURNI PREGLED | 4 |
| 2.1. Melanom čovjeka | 4 |
| 2.1.1. Signalni put MAPK igra važnu ulogu u tumorigenezi melanoma | 5 |
| 2.1.2. Pretvorba epitelne u mezenhimalnu stanicu u metastaziranju tumora | 7 |
| 2.1.3. Trenutne metode liječenja melanoma | 8 |
| 2.1.3.1. Ciljana terapija..... | 9 |
| 2.1.4. Otpornost na ciljanu terapiju u melanomima | 10 |
| 2.2. Porodica proteina p53..... | 12 |
| 2.2.1. Izoforme proteina p53..... | 13 |
| 2.2.1.1. Inaktivacija p53 u melanomu čovjeka | 15 |
| 2.2.2. Izoforme proteina p73..... | 16 |
| 2.2.3. Interakcije proteina p53 s drugim izoformama porodice proteina p53 | 18 |
| 2.3. Porodica proteina NME/NDPK/Nm23..... | 20 |
| 2.3.1. NME1, prvi otkriveni supresor metastaziranja | 21 |
| 2.3.2. Proteini NME u melanomu čovjeka..... | 22 |
| 2.3.3. Interakcije proteina p53 s članovima porodice proteina NME | 22 |
| 2.4. Porodica proteina GLI..... | 24 |
| 2.4.1. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) | 24 |
| 2.4.2. Izoforme proteina GLI..... | 25 |
| 2.4.3. Uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju melanoma | 27 |
| 2.4.4. Interakcije proteina GLI s proteinom p53..... | 27 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 28 |
| 3.1. Materijali | 28 |
| 3.1.1. Otopine, puferi, kemikalije i tekuće hranjive podloge za uzgoj staničnih linija i bakterija | 28 |
| 3.1.2. Komercijalno dostupni kompleti kemikalija..... | 31 |
| 3.1.3. Protutijela za metode western blota, koimunoprecipitacije i imunofluorescencije | 33 |
| 3.1.4. Početnice za kloniranje i qPCR te male interferirajuće molekule RNA | 35 |
| 3.1.5. Uređaji, programi i potrošni materijal..... | 38 |
| 3.2. Metode manipulacije DNA | 40 |
| 3.2.1. Kloniranje Gateway® | 40 |
| 3.2.1.1. Priprema ulaznih vektora (Gateway® Entry vektor, pENTR)..... | 41 |
| 3.2.1.2. Priprema ekspresijskih vektora..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2. Klasično kloniranje | 41 |
| 3.2.3. Priprema kemokompetentnih stanica E. coli..... | 43 |
| 3.2.4. Transformacija stanica E. coli..... | 43 |
| 3.2.5. Izolacija plazmidne DNA | 44 |
| 3.2.6. Određivanje koncentracije DNA i RNA | 44 |
| 3.2.7. Elektroforeza u agaroznom gelu | 44 |
| 3.2.8. Kvantitativni PCR (qPCR)..... | 44 |
| 3.2.8.1. Izolacija ukupne RNA | 45 |
| 3.2.8.2. Sinteza cDNA iz ukupne RNA..... | 45 |
| 3.2.8.3. Ekspresija izoformi gena TP53..... | 45 |
| 3.2.8.4. Ekspresija gena porodica Nme i Gli te izoformi gena TP73..... | 47 |
| 3.2.8.5. Ekspresija gena uključenih u proces EMT-a | 47 |
| 3.3. Rad s kulturom stanica..... | 48 |
| 3.3.1. Kultura ljudskih stanica raka | 48 |
| 3.3.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi..... | 48 |
| 3.3.3. Uspostavljanje otpornih staničnih linija..... | 49 |
| 3.3.4. Zamrzavanje i odmrzavanje stanica..... | 49 |
| 3.3.5. Brojanje stanica | 49 |
| 3.3.6. Prolazna transfekcija ljudskih tumorskih stanica u kulturi | 50 |
| 3.3.7. Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim molekulama RNA | 50 |
| 3.3.8. Određivanje stanične vijabilnosti testom MTT..... | 50 |
| 3.3.9. Analiza staničnog ciklusa metodom protočne citometrije | 51 |
| 3.3.10. Migracija stanica tumora | 51 |
| 3.3.10.1. Metoda „cijeljenja rane“ (engl. wound healing assay ili scratch assay)..... | 52 |
| 3.3.10.2. Sustav Boydenovih komorica (engl. Boyden chamber assay)..... | 52 |
| 3.4. Metode u analizi proteina..... | 53 |
| 3.4.1. Izolacija proteina | 53 |
| 3.4.1.1. Izolacija proteina za analizu western blota | 53 |
| 3.4.1.2. Izolacija proteina za analizu koimunoprecipitacije..... | 53 |
| 3.4.2. Određivanje koncentracije proteina | 53 |
| 3.4.3. Metoda koimunoprecipitacije | 54 |
| 3.4.3.1. Imunoprecipitacija uz pomoć paramagnetskih zrnaca (Dynabeads® Protein G) | 54 |
| 3.4.3.2. Imunoprecipitacija uz pomoć agaroznih zrnaca protu-FLAG | 54 |
| 3.4.4. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)..... | 55 |
| 3.4.5. Western blot..... | 56 |
| 3.5. Metode konfokalne mikroskopije..... | 57 |
| 3.5.1. Snimanje živih stanica (engl. live cell imaging)..... | 57 |
| 3.5.2. Priprema stanica za imunofluorescenciju i bojanje citoskeleta..... | 57 |
| 3.5.3. Metoda FRET/FLIM..... | 57 |
| 3.6. Statistička analiza | 59 |

| | |
|--|-----------------|
| 4. REZULTATI..... | 60 |
| 4.1. Interakcije proteina p53 u melanomu čovjeka..... | 60 |
| 4.1.1. Interakcije egzogenih proteina p53 s drugim članovima porodica p53, NME i GLI određene metodom koimunoprecipitacije | 60 |
| 4.1.2. Interakcije endogenih proteina p53 s članovima porodica p53 i NME određene metodom koimunoprecipitacije | 63 |
| 4.1.3. Istraživanje interakcija proteina p53 s odabranim proteinskim partnerima korištenjem metode FRET/FLIM..... | 67 |
| 4.1.4. Određivanje lokalizacije potencijalnih proteinskih partnera tijekom 24 sata koristeći metodu snimanja živih stanica (engl. live-cell imaging) konfokalnim mikroskopom | 71 |
| 4.2. Karakterizacija stanica melanoma otpornih na vemurafenib | 73 |
| 4.2.1. Potvrda otpornosti stanica melanoma na vemurafenib i promjena fenotipa otpornih stanica | 73 |
| 4.2.2. Biljezi EMT-a u stanicama otpornim na vemurafenib | 77 |
| 4.2.3. Istraživanje utjecaja pojave otpornosti na vemurafenib na migraciju stanica u kulturi | 82 |
| 4.2.4. Određivanje signalnih puteva uključenih u pojavu otpornosti na vemurafenib | 84 |
| 4.2.5. Utjecaj pojave otpornosti na vemurafenib na faze staničnog ciklusa | 87 |
| 4.2.6. Genska i proteinska ekspresija članova porodica p53, NME i GLI | 93 |
| 4.2.7. Utjecaj utišavanja proteina NME1 i NME2 na otpornost stanica WM793B na vemurafenib..... | 99 |
| 5. RASPRAVA | 103 |
| 5.1. Interakcije proteina p53 u melanomu čovjeka..... | 103 |
| 5.2. Karakterizacija stanica melanoma otpornih na vemurafenib | 109 |
| 6. ZAKLJUČAK | 121 |
| 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 122 |
| 8. LITERATURNI IZVORI..... | 124 |
| 9. ŽIVOTOPIS | CXXXVIII |

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

SAŽETAK

INTERAKCIJE PROTEINA p53 TE KARAKTERIZACIJA STANICA OTPORNIH NA
CILJANU TERAPIJU VEMURAFENIBOM U MELANOMU ČOVJEKA

MARTINA RADIĆ

Institut Ruđer Bošković

Melanom je jedan od najagresivnijih tumora čovjeka te je vodeći uzrok smrti oboljelih od tumora kože. Iako su saznanja o molekularnoj pozadini bolesti dovela su do otkrića novih terapija, dugotrajno liječenje onemogućeno je pojavom otpornosti. Iznenadujuće, iako je u melanomu tumorski supresor p53 rijetko mutiran, ne obavlja svoju funkciju u suzbijanju tumora.

Glavni fokus našeg rada otkrivanje je mehanizama otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom te istraživanje proteinskih interakcija proteina p53 koje bi mogle biti jedan od razloga njegove inaktivacije. Razvili smo i okarakterizirali stanice melanoma otporne na vemurafenib te proučili interakcije proteina p53 s članovima proteinskih porodica p53, NME i GLI. Naši rezultati pokazuju aktivaciju signalnog puta MAPK i PI3K/AKT pojavom otpornosti na terapiju. Također, pokazali smo da protein p53 ostvaruje interakcije s pojedinim izoformama proteina p53 i p73, ali ne i s članovima porodice NME i GLI. Ovim radom smo ukazali na moguću važnost interakcija unutar porodice p53.

(137 stranica, 47 slika, 25 tablica, 163 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: melanom, p53, NME, GLI, ciljana terapija, vemurafenib

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

Ocjenjivači:

1. dr. sc. Neda Slade, zn. savj.
 2. prof. dr. sc. Igor Weber, zn. savj.
 3. izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

ABSTRACT

PROTEIN INTERACTIONS OF p53 AND CHARACTERIZATION OF CELLS
RESISTANT TO TARGETED THERAPY BY VEMURAFENIB IN HUMAN
MELANOMA

MARTINA RADIĆ

Ruđer Bošković Institute

Melanoma is one of the most aggressive human tumors and the leading cause of death of skin cancer patients. Even though the molecular understanding of underlying mechanisms driving melanoma has led to the discovery of new therapies, long-term success has been hampered by the development of drug resistance. Surprisingly, although the tumor suppressor p53 is rarely mutated in melanoma, its tumor-suppressive function seems to be impaired.

The main focus of this work is the discovery of mechanisms of resistance to targeted therapy by vemurafenib together with the study of protein interactions of p53 that could be one of the causes of its inactivation. We developed and characterized vemurafenib-resistant melanoma cells and studied the interactions of p53 with members of the p53, NME, and GLI protein families. Our results show activation of the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways after the development of resistance. We further show that the p53 protein interacts with individual isoforms of the p53 and p73 proteins, but not with members of the NME and GLI families. In this work, we pointed out the possible importance of interactions within the p53 family.

(137 pages, 47 figures, 25 tables, 163 references, original in Croatian)

Keywords: melanoma, p53, NME, GLI, targeted therapy, vemurafenib

Mentor: Dr. Maja Herak Bosnar, Senior Scientist

Reviewers:

1. Dr. Neda Slade, Senior Scientist
2. Prof. dr. Igor Weber, Senior Scientist
3. Assoc. prof. dr. Maja Matulić

Substitute: Assoc. prof. dr. Inga Urlić

1. UVOD

Melanom je tumor kože koji nastaje iz melanocita. Za razliku od drugih vrsta tumora kože, sklon je brzom rastu i metastaziranju što ga čini izrazito agresivnim [1]. Otkriće ciljane terapije i imunoterapije predstavlja revolucionaran korak u liječenju melanoma te se danas prva linija liječenja, nakon kirurškog uklanjanja tumora, zasniva na navedene dvije terapije. Bolesnicima s mutiranim proteinom BRAF^{V600E} daje se ciljana terapija u obliku monoterapije inhibitora onkoproteina BRAF (BRAFi) ili u kombinaciji s inhibitorima proteina MEK (MEKi). U slučaju kad je protein BRAF divljeg tipa, primjenjuje se imunoterapija [2]. Iako inicijalno daju dobre rezultate, djelovanje novih terapija narušeno je pojavom otpornosti. Otpornost na lijekove dobro je poznata karakteristika tumora, a razlozi otpornosti mogu biti brojni i različiti. U 80% melanoma otpornih na BRAFi razlog pojave otpornosti reaktivacija je signalnog puta MAPK [3].

Vrlo je interesantno da tumorski supresor p53 u melanomu gotovo nikad nije mutiran [4]. Unatoč tome, p53 u melanomu ne obavlja svoju supresorsku funkciju. Dosad je opisano nekoliko mehanizama koji bi mogli biti odgovorni za inaktivaciju p53 tijekom melanomageneze. Tako je pojačana degradacija proteina p53 vjerojatno glavni razlog njegove inaktivacije, a može biti posljedica povećane ekspresije E3 ubikvitinske ligaze MDM2 [5] ili MDM4 [6], kao i posljedica mutacije u proteinu p14^{CDKN2A} koja, također, dovodi do pojačane razgradnje p53 uz pomoć njegovog negativnog regulatora MDM2 [7]. Drugi važan mehanizam inaktivacije djelovanje je proteina iASPP (engl. *Inhibitor of Apoptosis Stimulating Protein of p53*) kao funkcionalnog antagonista proteina p53. Monomeri iASPP stupaju u interakciju s p53 i reguliraju njegovu transkripcijsku aktivnost te time inhibiraju apoptozu koju izaziva p53, ali na taj način istovremeno ne utječu na zastoj staničnog ciklusa kojeg uzrokuje p53 [8]. Također, može doći do utišavanja *TP53* epigenetskim mehanizmima. Međutim, fenomen inaktivacije p53 u melanomu nije u potpunosti razjašnjen.

Dosad opisana uloga proteina porodice NME u melanomagenezi, kao i pokazane direktne interakcije proteina p53 i NME1/2 u različitim tumorskim stanicama [9], potaknule su nas na proučavanje njihove uloge u otpornosti na ciljanu terapiju u melanomima te njihovim potencijalnim inhibitornim interakcijama. Poznata je uloga NME1, a u posljednje vrijeme i NME2, u sprječavanju metastaziranja melanoma [10,11]. Protein NME1 suzbija

melanomagenezu tako da potiče popravak oštećenja DNA uzrokovanog UV zračenjem, vjerojatno zahvaljujući svojoj aktivnosti 3'-5' egzonukleaze [12,13].

Uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju tumora kože, pa tako i melanoma, temeljito je istražena. Dokazano je da je za rast i razvoj melanoma potreban aktivan signalni put HH-GLI te da transkripcijsku aktivnost proteina GLI1 regulira signalni put MAPK [14]. Također, pojačana ekspresija GLI2 povezana je s invazijom i metastaziranjem melanoma *in vitro* i *in vivo* [15]. Važnu ulogu transkripcijskih faktora GLI nalazimo i u pojavi otpornosti na ciljanu terapiju u melanomima. U staničnim linijama melanoma otpornim na vemurafenib, kao i u kliničkim uzorcima, pokazana je povećana razina GLI1 i GLI2. Njihovim utišavanjem vratila se osjetljivost stanica otpornih na vemurafenib, a tretman inhibitorom proteina GLI, Gant61, doveo je do smanjene invazije stanica melanoma [16].

Unatoč velikom napretku u razumijevanju razvoja melanoma, on ostaje jedan od najinvazivnijih tumora, tim više što se kod njega razvija otpornost na liječenje. Smatramo da su novi molekularni pristupi liječenju i bolje razumijevanje mehanizama otpornosti na terapiju ključni za buduće kliničke pristupe. Temelj ovog rada identifikacija je molekularnih značajki otpornih stanica melanoma i važnost proteinskih porodica p53, NME i GLI u procesu stjecanja otpornosti. Naša je hipoteza da bi različite uloge u karcinogenezi, nepravilna ekspresija, različite lokalizacije i/ili međusobne inhibitorne interakcije proteina porodica p53, NME i GLI mogle biti važne ili čak ključne za razvoj otpornosti na ciljanu terapiju u melanomu.

Istraživanje interakcija divljeg tipa proteina p53 kao mogućeg razloga njegove inaktivacije usmjerili smo na članove proteinskih porodica p53, NME i GLI. Među navedenim proteinskim porodicama pokazane su izravne ili funkcionane interakcije koje su detaljno opisane u literaturnom pregledu. Istraživanje smo započeli proučavanjem interakcija egzogenog proteina p53 α s članovima proteinskih porodica p53, NME i GLI u stanicama melanoma. Na temelju potvrđenih direktnih interakcija s članovima porodice p53 (s izoformama TAp73 α , TAp73 β , Δ Np73 α i Δ 133p53 α) te dostupnih literaturnih podataka koji pokazuju interakcije p53-NME [9], odlučili smo istražiti interakcije endogenog proteina p53 α s članovima proteinskih porodica p53 i NME. Interakcije na endogenoj razini pokazane su samo s izoformama TAp73. Zaključno, analizirali smo interakcije odabranih proteinskih partnera (p53 α /p53 β , p53 α / Δ Np73 α , p53 α /TAp73 α) metodom FRET/FLIM i proučili njihovu lokalizaciju metodom snimanja živih stanica. Interakcije proteinskih partnera u jezgri pokazane su navedenom metodom.

Kako bismo proučili mehanizam otpornosti melanoma na ciljanu terapiju vemurafenibom te moguću uključenost proteinskih porodica p53, NME i GLI na pojavu otpornosti na vemurafenib, razvili smo stanične linije melanoma, WM793B i A375M, otporne na vemurafenib. Mehanizam otpornosti potvrdili smo testom MTT te okarakterizirali promjene nastale nakon pojave otpornosti. Provjerili smo promjenu fenotipa stanica bojanjem staničnog citoskeleta, ekspresiju biljega procesa EMT-a te razliku u migraciji stanica pojavom otpornosti na vemurafenib. Također, odredili smo signalne puteve koji su aktivirani pojavom otpornosti te promjene nastale u staničnom ciklusu. Uključenost proteinskih porodica p53, NME i GLI u pojavu otpornosti na vemurafenib provjerena je analizom ekspresije na genskoj i proteinskoj razini. Primijetili smo snažno smanjenje ekspresije proteina NME1 i NME2 u otpornim stanicama WM793B u odnosu na parentalne. Kako bismo provjerili povezanost s pojavom otpornosti, utišali smo proteine NME1 i NME2 u parentalnoj liniji WM793B te provjerili vijabilnost stanica pri rastućim koncentracijama vemurafeniba i ekspresiju biljega EMT. Naši rezultati pokazali su da smanjena ekspresija proteina NME1 i NME2 nije uzrok već posljedica pojave otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B.

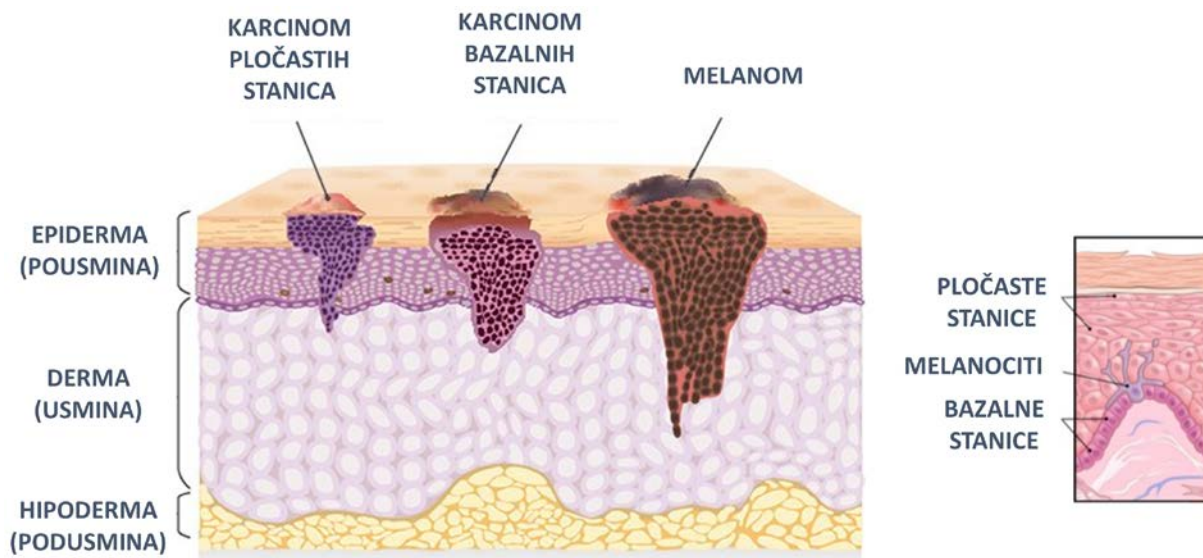
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Melanom čovjeka

Melanom je najopasniji tip tumora kože. Nastaje iz melanocita, stanica koje proizvode pigment melanin koji daje boju koži, očima i kosi. Melanin nastaje procesom melanogeneze u nekoliko koraka koji uključuju dekarboksilaciju, oksidaciju i polimerizaciju aminokiseline tirozin. Pigmentacija naše kože rezultat je dva događaja – sinteze melanina i transporta melanina iz melanocita u keratinocyte koji ih okružuju [17]. Melanin, pakiran u melanosomima, složena je makromolekula sposobna reflektirati ili apsorbirati ultraljubičasto (engl. *Ultraviolet*, UV) zračenje i tako spriječiti ili smanjiti oštećenje molekule DNA uzrokovano UV zračenjem. Melanociti se u koži nalaze u donjem sloju epiderme, a osim u koži nalazimo ih, iako manjim dijelom, i u mnogim drugim dijelovima tijela poput oka, unutarnjeg uha, vaginalnog epitela, srca, itd. [18]. Tijekom razvoja embrija melanociti nastaju iz neuralnog grebena, multipotentnih matičnih stanica s velikim potencijalom migracije. Migracija stanica neuralnog grebena počinje djelomičnom ili potpunom pretvorbom stanice iz epitelne u mezenhimalnu (engl. *Epithelial to Mesenchymal Transition*, EMT) koja omogućuje stanicama neuralnog grebena da se odvoje od neuroepitela i ektoderma [19]. Tako odvojene stanice kreću se unutar embrija u razvoju, stupaju u interakciju sa staničnim okolišem te se naposljetku smještaju na određenim mjestima u tijelu. Nabrojana svojstva mogla bi biti jedan od razloga zašto su melanomi, tumori porijeklom iz melanocita, izrazito agresivni i skloni metastaziranju [18].

Tumori kože dijele se na karcinom pločastih stanica (planocelularni), karcinom bazalnih stanica (bazocelularni) te melanom (**Slika 1**). Tumori kože u koje ne ubrajamo melanom (engl. *Nonmelanoma Skin Cancer*, NMSC) najzastupljeniji su tumori u bijeloj populaciji i brojna istraživanja pokazuju da učestalost pojavljivanja raste [20]. Maligni melanom čini manje od 5% malignih tumora kože, ali zbog izražene sklonosti brzom rastu i metastaziranju odgovoran je za gotovo 60% smrtonosnih ishoda tumora kože, što ga čini jednim od najagresivnijih tumora u ljudi [1]. Prema bazi podataka GLOBOCAN 2018, Hrvatska ima srednju stopu pojave melanoma kože u usporedbi s drugim zemljama Europe te s 597 novih slučajeva i 221 smrtnim ishodom u 2018. godini, melanom obuhvaća 2,4% slučajeva tumora i 1,5% smrti uzrokovanih tumorima [21]. Procjene pojave tumora i smrtnosti povezanih s istim za europske zemlje u 2020. godini govore da bi moglo biti 382 nova slučaja

melanoma u muškaraca te 324 novih slučajeva melanoma u žena u Hrvatskoj tijekom 2020. godine [22].



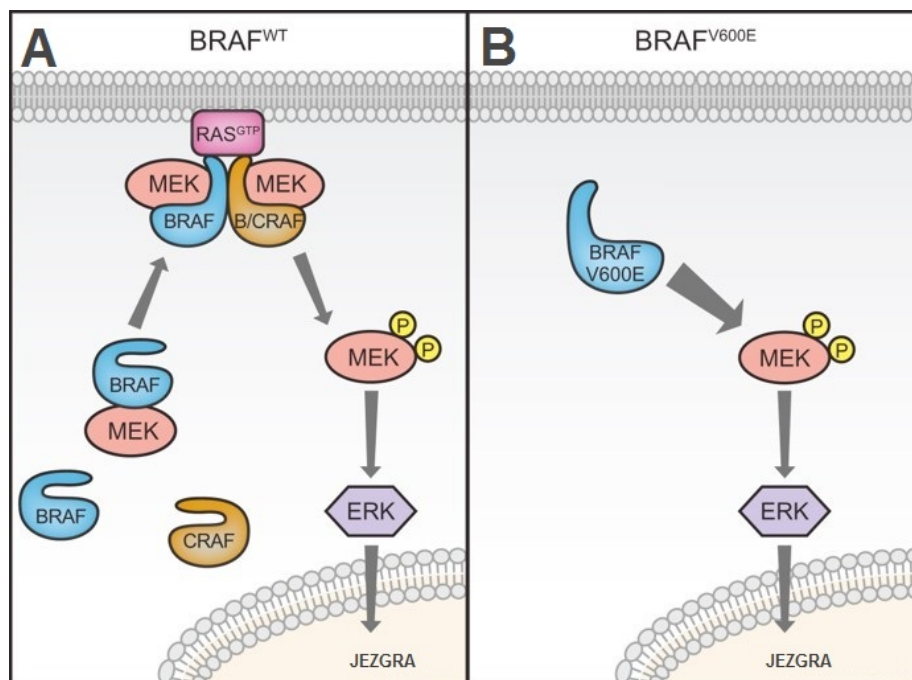
Slika 1. Vrste tumora kože. Tumori kože dijele se na karcinome pločastih stanica koji nastaju iz pločastih stanica koje grade epidermu, karcinome bazalnih stanica koji nastaju iz bazalnih stanica na bazalnoj membrani i melanome koji nastaju iz melanocita, stanica koje proizvode pigment melanin koji daje boju koži, očima i kosi. Maligni melanom čini manje od 5% malignih tumora kože, ali odgovoran je za gotovo 60% smrtonosnih ishoda tumora kože. Preuzeto i prilagođeno s poveznice <https://molepatrol.com.au/blog/types-of-skin-cancer/> [23].

2.1.1. Signalni put MAPK igra važnu ulogu u tumorigenezi melanoma

Razvojem genomskih analiza velike protočnosti dolazi do velikog napretka u razumijevanju biologije i molekularne genetike tumora. Projekt tumorskog genoma (engl. *Cancer genome project*), istraživanje provedeno na Sangerovom institutu u Cambridgeshireu, UK, dovelo je do otkrića uloge signalnog puta kinaze MAP (engl. *Mitogen-Activated Protein*), tj. signalne kaskade RAS-RAF-MEK-ERK u tumorigenezi melanoma. Otkriveno je, naime, da preko 60% melanoma posjeduje mutaciju serinske/treoninske proteinske kinaze BRAF (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma homolog B*) [24]. Kasnije je pokazano da je protein BRAF mutiran u oko 50% melanoma, od kojih preko 90% posjeduje mutaciju na kodonu 600, a od njih preko 90% otpada na točkastu mutaciju T1799A koja rezultira zamjenom valina glutaminskom kiselinom na mjestu 600 u aminokiselinskom slijedu proteina (BRAF^{V600E}) [25].

Signalni put MAPK (također poznat kao RAS-RAF-MEK-ERK) prenosi signal s receptora na površini stanice sve do DNA u jezgri stanice te je jedan od centralnih signalnih elemenata jer regulira osnovne stanične procese poput stanične proliferacije, diferencijacije,

regulacije staničnog ciklusa, odgovora na stres i apoptoze [26]. Prijenos signala počinje vezanjem liganda na receptor tirozinske kinaze (engl. *Receptor Tyrosine Kinase*, RTK) čime se aktivira kinazna aktivnost receptora i dolazi do autofosforilacije unutarstaničnog dijela receptora. Fosforilirani tirozinski aminokiselinski ogranak prepoznaje protein GRB2 (engl. *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*) pomoću strukturalno očuvane proteinske domene SH2 koja prepoznaje fosforilaciju na tirozinu. GRB2 se veže na faktor razmjene nukleotida guanina, SOS (engl. *Son of Sevenless*), čime ga aktivira te SOS uklanja GDP s proteina RAS. Nabrojani koraci omogućuju aktivaciju proteina RAS vezanjem GTP-a čime započinje kinazna kaskada. Aktivirani RAS aktivira serinske/treoninske proteinske kinaze RAF, dok RAF kinaze fosforiliraju i aktiviraju protein MEK (poznat i kao MAP2K, engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*). Aktivirani MEK fosforilira i aktivira ERK (engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinases*), također poznat i kao MAPK (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Aktivirani ERK prelazi u jezgru gdje fosforilacijom regulira aktivnost raznih transkripcijskih faktora utječući tako na biološke funkcije stanice [27,28].



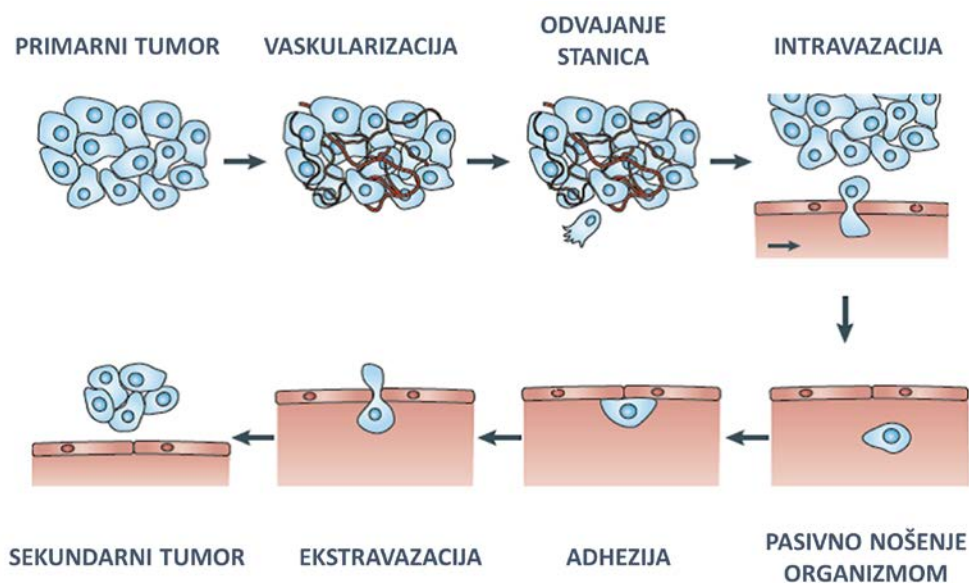
Slika 2. Shematski prikaz signalnog puta MAPK. A) Prijenos signala uz prisutnost liganda membranskih receptora u stanicama s normalnim prijenosom signala MAPK. B) Prijenos signala signalnog puta MAPK kada je protein BRAF mutiran (BRAFF^{V600E}). Do prijenosa signala dolazi nizvodno od mutiranog proteina BRAF i bez uzvodne aktivacije. Preuzeto i prilagođeno prema Haling i suradnici (2014) [29].

U stanicama tumora ponekad se dogodi da je jedan od proteina signalnog puta MAPK mutiran i tada dolazi do prijenosa signala nizvodno od tog proteina čak i bez prisutnosti liganda membranskog receptora. To je ključan korak tumorigeneze jer omogućuje brzu staničnu diobu i rast tumora. Na **Slici 2A** prikazana je kinazna kaskada od aktivacije proteina RAS do prelaska aktiviranog proteina ERK u staničnu jezgru normalnih stanica. Na **Slici 2B** prikazan je prijenos signala nizvodno od mutiranog proteina BRAF^{V600E} gdje vidimo da uzvodna aktivacija nije potrebna u slučaju mutacije jednog od proteinskih članova signalnog puta. Otkriće ovog signalnog puta, ključnog u razvoju i progresiji melanoma, rezultiralo je razvojem novih, ciljanih terapija (vidi poglavlje 2.1.3.1).

2.1.2. Pretvorba epitelne u mezenhimalnu stanicu u metastaziranju tumora

Pretvorba epitelne u mezenhimalnu stanicu (EMT) evolucijski je očuvan razvojni proces u kojemu epitelne stanice gube staničnu polarnost i stanične adhezije, dobivaju svojstva invazije i pokretljivosti te postaju mezenhimalne stanice. Prvotno je proces EMT-a opisan u kontekstu normalne stanične diferencijacije tijekom razvoja embrija, a kasnije je pokazano da sudjeluje i u zacjeljivanju rana, fibrozi organa i karcinogenezi. Njegova uloga u karcinogenezi temelji se na promoviranju metastaziranja tako da tumorskim stanicama povećava sposobnost pokretanja, omogućuje invaziju i otpornost na apoptotičke podražaje. Budući da je metastaziranje glavni uzrok smrtnosti povezanih s tumorima, sprječavanje i tretiranje metastaza ključ je uspjeha u borbi protiv tumorskih oboljenja.

Kaskada metastaziranja uključuje nekoliko koraka koji su shematski prikazani na **Slici 3**. Prvi korak odvajanje je stanica od primarnog tumora. Zatim dolazi do intravazacije (engl. *Intravasation*), tj. prodiranja stanica u krvotok ili limfni sustav. Takve stanice nazivaju se cirkulirajuće tumorske stanice (CTC, engl. *Circulating Tumor Cells*) i one su pasivno nošene organizmom sve dok ne dođe do ekstravazacije (engl. *Extravasation*) u udaljenim tkivima i organima koja može dovesti do stvaranja metastaza [30]. Kako bi tumorska stanica postala pokretljiva, mora proći mnogo pretvorbi. Jedna od njih je proces EMT-a, a uz to treba aktivirati gene za diferencijaciju, usporiti proliferaciju, regulirati gene uključene u stanične veze i adheziju, aktivirati proteaze koje će pomoći kretanju kroz izvanstanični prostor i slično. Mehanizam metastaziranja i EMT-a veoma je kompleksan, a ono što ga čini još kompleksnijim jest heterogenost populacije stanica. Sve stanice neće proći proces EMT-a u isto vrijeme, niti će sve koje su uspješno prošle pretvorbu EMT-a postati metastatske [31].



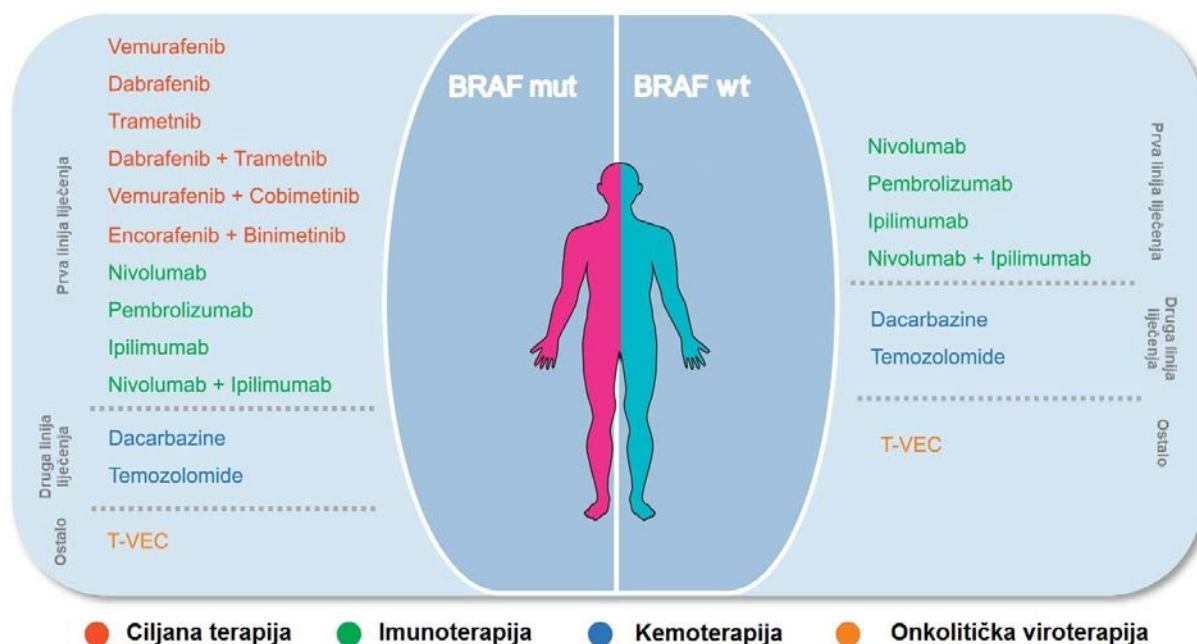
Slika 3. Shematski prikaz kaskade metastaziranja. Metastaziranje je proces od nekoliko koraka koje započinje odvajanjem stanica od primarnog tumora. Zatim slijedi intravazacija ili prodiranje u krvotok ili limfni sustav nakon čega su cirkulirajuće tumorske stanice pasivno nošene organizmom sve dok ne dođe do ekstravazacije i naseljavanja u udaljenim organima što može dovesti do stvaranja metastaza. Preuzeto i prilagođeno prema Wirtz i suradnici (2011) [32].

2.1.3. Trenutne metode liječenja melanoma

Trenutne mogućnosti u liječenju melanoma temelje se uglavnom na kirurškom odstranjivanju tumora, kemoterapiji, imunoterapiji i ciljanoj terapiji. Ovisno o karakteristikama tumora, poput stadija, lokalizacije, genetičkog profila, ali i općenitom zdravstvenom stanju bolesnika, primjenjuje se jedna od navedenih terapija ili kombinacija nekoliko različitih terapija [33]. Kirurško odstranjivanje najčešća je metoda koja se koristi za liječenje primarnog ili ranog stadija melanoma. Kod pacijenata s metastatskim melanomom manja je vjerojatnost izlječenja kirurškim odstranjivanjem, iako se ukupno preživljenje bolesnika s jednom metastazom povećava nakon takvog tretmana. No, zbog čestog velikog broja metastaza, te otežane detekcije manjih metastatskih lezija češće se pribjegava drugim oblicima liječenja [34].

Kemoterapija je često korištena metoda za liječenje kasnih stadija metastatskog melanoma u pacijenata s progresivnim melanomom. Pri tome se najčešće koriste dakarbazin ili temozolomid. No, prva linija liječenja melanoma kod blažih oblika bolesti oslanja se na ciljanu terapiju i imunoterapiju i ponajprije ovisi o mutacijskom statusu proteina BRAF (**Slika 4**). Kod bolesnika s mutiranim proteinom BRAF najčešće se primjenjuje ciljana terapija budući da odgovor na imunoterapiju često dugo traje. Ciljana terapija se daje kao monoterapija inhibitorom proteina BRAF (BRAFi) ili u kombinaciji s inhibitorom proteina

MEK (BRAFi/MEKi). Onkolitički virusi vrsta su imunoterapije koja koristi viruse za uništavanje tumorske stanice. Prvi onkolitički virus za liječenje tumora, odobren od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*) 2015. godine, bio je T-VEC, modificirani *herpes simplex* virus koji inficira i uništava stanice tumora. Mrtve stanice otpuštaju tumorske antigene koji stimuliraju imunološki odgovor što na kraju rezultira uništavanjem tumorskih stanica [2].



Slika 4. Metode liječenja metastatskog melanoma u bolesnika kod kojih nije moguće kirurško odstranjivanje tumora. Prva linija liječenja uvelike ovisi o mutacijskom statusu proteina BRAF. Bolesnici s mutiranim proteinom BRAF mogu primiti ciljanu terapiju ili imunoterapiju, ali budući da odgovor na imunoterapiju često dugo traje, češće se pribjegava ciljanjoj terapiji. Preuzeto i prilagođeno prema Kozar i suradnici (2019) [2].

2.1.3.1. Ciljana terapija

Ciljana terapija sprječava rast stanica tumora tako da inhibira određene proteine u signalnom putu koji su odgovorni za nastanak i rast tumora, a da, pritom, nemaju nikakav utjecaj na normalne stanice. Iako se ponekad smatra podskupom kemoterapije, puno je specifičnija od klasične kemoterapije u kojoj citotoksičnim agensima djelujemo na diobu svih stanica koje se brzo dijele [35]. Ciljana terapija podrazumijeva liječenje malim molekulama ili monoklonskim protutijelima. Monoklonska protutijela karakterizira velika selektivnost, ali glavni nedostatak je što se radi o biološkim makromolekulama koje ne mogu ući u stanicu stoga su njihove ciljne mete ograničene na izvanstanični prostor ili površinu stanice. Za razliku od njih male molekule variraju u selektivnosti i, zahvaljujući svojoj veličini, mogu

inhibirati širi spektar proteinskih meta. Uglavnom ih čine inhibitori proteinskih kinaza (tirozinske ili serinske/treoninske proteinske kinaze). Proteinske kinaze fosforiliraju hidroksilnu (-OH) skupinu aminokiselina serin, treonin i tirozin i time potiču nizvodnu signalnu kaskadu. Budući da su to uglavnom receptori faktora rasta koji su u tumorima vrlo često mutirani ili pojačano eksprimirani u odnosu na normalne stanice, predstavljaju izvrsne mete za ciljanu terapiju. Agencija za hranu i lijekove (FDA) do danas je odobrila 43 male molekule u svojstvu inhibitora za liječenje tumora [36].

Prvi odobreni BRAFi za liječenje metastatskog melanoma bio je vemurafenib, a počeo se koristiti za liječenje bolesnika 2011. godine. Dvije godine poslije toga, FDA je odobrila drugi BRAFi, dabrafenib. Iako su inicijalno pokazivali sjajne rezultate u liječenju melanoma, dugoročno liječenje nije bilo moguće zbog pojave otpornosti na terapiju (vidi poglavlje 2.1.4). Budući da je signalni put MAPK često reaktiviran pojavom otpornosti na BRAFi, razvijeni su inhibitori proteina MEK. Trametinib, prvi otkriveni MEKi, dobio je odobrenje Agencije za hranu i lijekove 2013. godine. Nakon toga uslijedilo je korištenje kombinirane ciljane terapije BRAFi/MEKi koja je pokazala veće preživljenje bolesnika u odnosu na monoterapiju BRAFi. Međutim, nekoliko mjeseci nakon početka liječenja kombiniranom terapijom, baš kao i monoterapijom, pojavila se otpornost tumora na liječenje [2].

2.1.4. Otpornost na ciljanu terapiju u melanomima

Najčešći mehanizam otpornosti na ciljanu terapiju u melanomima reaktivacija je signalnog puta MAPK koja se događa u oko 80% tumora otpornih na inhibitore proteina BRAF. Učestala reaktivacija signalnog puta MAPK ukazuje na to da su tumorske stanice o njemu ovisne te brzo nađu načina da zaobiđu njegovu inhibiciju. Glavni mehanizmi reaktivacije puta MAPK uključuju promjene na proteinima BRAF, NRAS, MEK1/2 i neurofibromin 1 (NF1) [2,3]. Pored signalnog puta MAPK, u melanomima otpornim na ciljanu terapiju često je aktiviran i signalni put PI3K-mTOR. Do aktivacije tog puta može doći zbog gubitka funkcije proteina PTEN (mutacijom ili delecijom gena *PTEN*) ili aktivacijom receptorske tirozinske kinaze [37,38]. Važnu ulogu u pojavi otpornosti igra i mikrookoliš tumora. Pokazano je da stromalne stanice pridonose intrinzičnoj otpornosti na terapiju tako da luče faktore rasta i time aktiviraju signalne puteve MAPK i PI3K. Do reaktivacije navedenih signalnih puteva može doći i preko mikroRNA (miRNA) koje reguliraju ekspresiju gena uključenih u MAPK i PI3K [2]. Melanomske stanične linije koje su razvile otpornost na inhibitore BRAF i MEK zbog korištenja kombinirane terapije BRAFi/MEKi pokazuju snažnu ovisnost o navedenoj kombiniranoj terapiji što pruža potencijalnu terapijsku priliku za liječenje takvih tumora.

Snažna ovisnost o BRAFi nije primijećena kod staničnih linija otpornih samo na inhibitore proteina BRAF [39].

Krayem i suradnici pokazali su važnost aktivnog proteina p53 pri liječenju melanoma vemurafenibom. Pokazano je da PRIMA-1^{Met} (APR-246), lijek koji reaktivira funkciju proteina p53 tako da mutiranom p53 vraća konformaciju divljeg tipa, povećava osjetljivost melanoma s mutiranim BRAF^{V600E/K} na vemurafenib. Navedeno je pokazano *in vitro* na panelu melanomskih staničnih linija, osjetljivih i otpornih na vemurafenib, kao i *in vivo* na modelu mišjih presađaka (engl. *Xenograft Mouse Model*). Smatra se da aktivacija p53 inhibira PI3K/AKT signalni put što uzrokuje veću osjetljivost melanoma s mutiranim proteinom BRAF na vemurafenib [40].

2.2. Porodica proteina p53

Protein p53, kojeg kodira gen *TP53*, otkriven je 1979. godine kao protein koji je u interakciji s T antigenom virusa SV40 [41,42]. Pokazano je da je važan tumor-supresorski gen te je stoga često mutiran u tumorima. Mutiran je u oko 50% slučajeva tumora, dok se gubitak njegove funkcije smatra značajkom svih tumora. Protein p53 transkripcijski je faktor koji regulira nekoliko staničnih puteva uključenih u preživljenje stanice, zaustavljanje staničnog ciklusa, popravak DNA, apoptozu i senescenciju. Njegova uloga u sprječavanju nastanka tumora temelji se na činjenici da na određene podražaje, kao što su oštećenje DNA, hipoksija ili aktivacija onkogeni, aktivira enzime za popravak DNA, zaustavlja stanični ciklus ili izaziva apoptozu. U homeostatskom stanju organizma bez stresa, razina p53 veoma je niska zahvaljujući negativnim regulatorima tog proteina. Koncentraciju p53 u stanici regulira ubikvitinska ligaza E3, MDM2, koja ga označava za razgradnju u proteasomu [43].

Porodica proteina p53 sastoji se od tri do sada otkrivena člana: p53, p63 i p73 koji su kodirani genima *TP53*, *TP63* i *TP73*. Svaki od tih članova sadrži mnoštvo izoformi zahvaljujući transkripciji s alternativnih promotora, alternativnom izrezivanju ili alternativnom mjestu inicijacije translacije. Iako je *TP53* najčešće mutiran gen u tumorima čovjeka, ponekad je teško povezati mutacijski status tog gena s kliničkim ishodom. Otkriće da gen *TP53* kodira za više različitih izoformi proteina moglo bi objasniti tu pojavu budući da izoforme pokazuju različite biološke aktivnosti, koje također ovise i o vrsti tumora i staničnom kontekstu [44].

Kod sva tri člana porodice proteina p53 nalazimo veliku sličnost u strukturi. Na N-kraju proteina nalaze se dvije transaktivacijske domene (TAD I i TAD II, engl. *Transactivation Domain*), a njihova je uloga aktivacija p53-ciljnih gena. Duge izoforme proteina p53 (p53 α , p53 β i p53 γ) sadrže obje TAD, dok Δ 40p53 izoforme sadrže samo TAD II, a proteini p63 i p73 sadrže samo TAD I. Regija bogata prolinom (PRD, engl. *Proline-Rich Domain*) koja sadrži slijed aminokiselina PXXP (gdje P označava prolin, a X bilo koju drugu aminokiselinu) važna je za apoptotsku aktivnost p53, baš kao i TAD II. Kratke izoforme proteina p53 (Δ 133p53 i Δ 160p53) ne sadrže PRD. Središnja domena proteina područje je za vezanje na DNA (DBD, engl. *DNA-binding domain*) čija struktura je dobro očuvana kod svih članova porodice proteina p53. DBD sadrži cinkov atom koordiniran s tri cisteina i jednim histidinom koji stabilizira strukturu važnu za interakciju proteina p53 s molekulom DNA [45]. C-kraj proteina sastoji se od oligomerizacijskog područja (OD, engl. *Oligomerization Domain*) važnog za stvaranje tetramera i signala za smještaj u jezgru (NLS, engl. *Nuclear Localization Signal*). Oligomerizacijsko područje ne nalazimo kod β i γ izoformi proteina

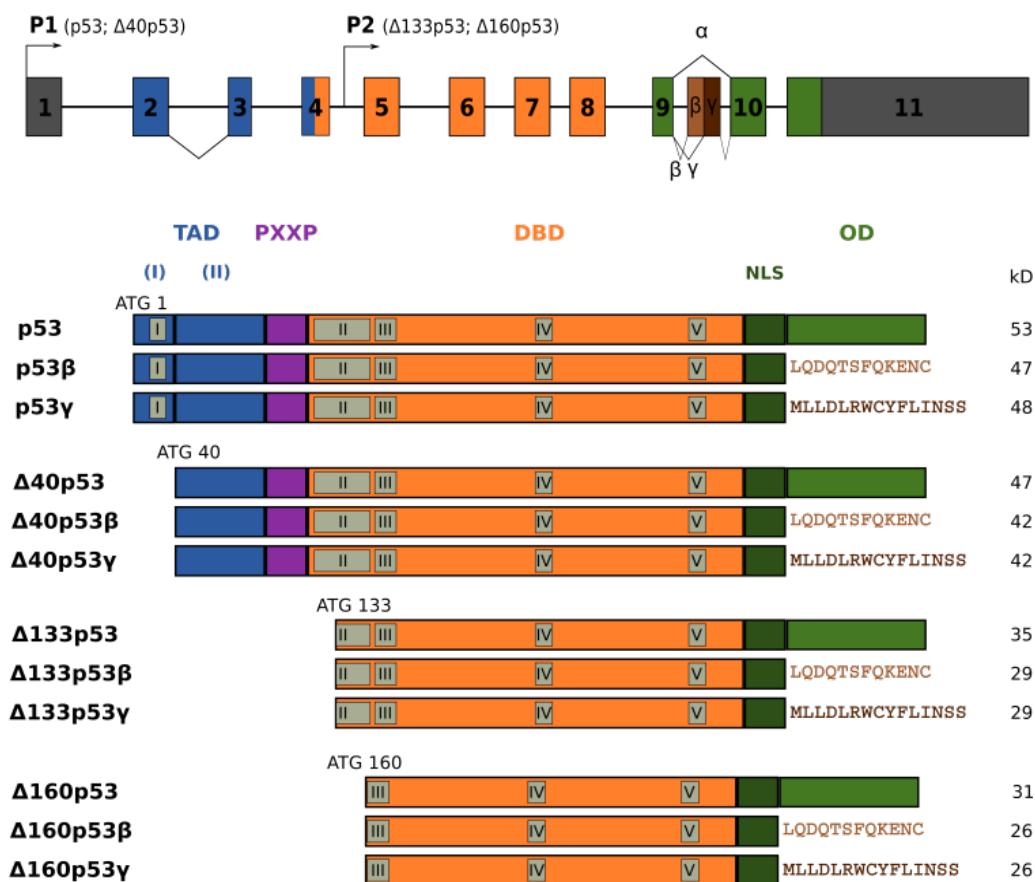
p53. C-kraj proteina p53 sadrži još i bazično područje (BD, engl. *Basic Domain*) koje je bogato lizinom, te podliježe brojnim posttranslacijskim modifikacijama. U nekim slučajevima pozitivno regulira funkciju TAD I, a negativno TAD II [46]. Kod proteina p63 i p73 na C-kraju nalazimo područje sa tzv. sterilnim motivom α (SAM, engl. *Sterile- α -Motif*) koje posreduje u proteinskim interakcijama. Najveća očuvanost strukture proteina nalazi se u središnjem području odgovornom za vezanje na DNA gdje je oko 60% strukture identično između proteina p53 i p63, te p53 i p73, dok je identičnost u TAD I oko 30%, a u OD oko 40% [47]. Shematski prikaz domena izoformi proteina p53 prikazan je na **Slici 5**, a domena izoformi proteina p73 na **Slici 6**.

Osim važne uloge u tumorigenezi, porodica proteina p53 uključena je u mnoge druge funkcije u stanici. Protein p63 ključan je za epidermalnu morfogenezu i razvoj udova tijekom embriogeneze, a inaktivacija p63 (engl. *p63-knockout*) dovodi do ozbiljnih kraniofacijalnih deformacija i nemogućnosti razvoja kože te životinje često umiru nekoliko dana nakon rođenja [48]. Izoforme proteina p73 važne su u razvoju mozga. Tako u mišjem mozgu u razvoju nalazimo visoku ekspresiju izoformi $\Delta Np73$ koje su važne za suzbijanje programirane stanične smrti posredovane proteinom p53 tijekom razvoja neurona [49]. Miševi s inaktiviranim p73 pokazuju mnoge neurološke i imunološke defekte poput disgeneze hipokampusa, hidrocefalije, kronične infekcije i upala [50]. Ipak, do jasnijih spoznaja istraživači su došli inaktivacijom određenog skupa izoformi. Tako inaktivacija $\Delta Np73$ dovodi do pojačane osjetljivosti na oštećenje DNA što objašnjava činjenicu zašto tumori s većom ekspresijom $\Delta Np73$ pokazuju povećanu otpornost na kemoterapiju [51], dok inaktivacija TAp73 dovodi do povećanog razvoja tumora te neplodnosti [52]. Miševi s inaktiviranim p53 u manjem broju slučajeva razvijaju anomalije, kao što su kraniofacijalne deformacije, ali u većem broju slučajeva dolazi do spontanog razvoja neoplazmi, najčešće u razdoblju od 3 do 6 mjeseci starosti [53,54].

2.2.1. Izoforme proteina p53

Do sada je poznato 12 izoformi proteina p53. Na temelju građe na N-kraju proteina mogu se podijeliti u dvije skupine: 1) duge izoforme koje sadrže potpunu ili djelomičnu TAD (TA i $\Delta 40$) i 2) kratke izoforme bez TAD ($\Delta 133$ i $\Delta 160$). Na temelju strukture na C-kraju proteina razlikujemo α , β i γ izoforme (**Slika 5**). Izoforme mogu nastati uz pomoć nekoliko mehanizama: transkripcije s alternativnih promotora (TA izoforme se prepisuju s promotora P1, a $\Delta 133$ izoforme s promotora P2), alternativnog izrezivanja introna (intron 2 - $\Delta 40$ izoforme, intron 9 - α , β i γ izoforme) te alternativnog mjesta inicijacije translacije ($\Delta 40$ i

$\Delta 160$ izoforme). Zahvaljujući alternativnom mjestu inicijacije translacije, od 9 molekula mRNA dobivamo 12 proteinskih izoformi [44].



Slika 5. Shematski prikaz izoformi proteina p53. Prikazani su alternativni promotori (P1 i P2) te područja alternativnog izrezivanja (α , β , γ). S promotora P1 prepisuju se izoforme p53 α , p53 β , p53 γ koje sadrže potpuno transaktivacijsko (TA) područje, te izoforme $\Delta 40$ p53 koje sadrže djelomično područje TA. Izoforme $\Delta 40$ p53 mogu nastati i zbog alternativnog mjesta inicijacije translacije na ATG 40. S promotora P2 prepisuju se izoforme $\Delta 133$ p53 i $\Delta 160$ p53 kojima nedostaje TA i dio domene za vezanje na DNA. Preuzeto i prilagođeno prema Marcel i Bourdon (2010) [55].

Prijašnja istraživanja su pokazala da su izoforme p53 pojačano eksprimirane u mnogim tumorima, a prognostička vrijednost pojedine izoforme ovisi o mutacijskom statusu gena *TP53* i o vrsti tumora (pregledno prikazano u Bourdon i Joruz [44]). Na primjer, pojačana ekspresija izoforme $\Delta 40$ p53 α u mucinoznom tumoru jajnika divljeg tipa *TP53* povezana je s boljim kliničkim ishodom pacijenata u odnosu na smanjenu ekspresiju navedene izoforme. Nadalje, pojačana ekspresija izoforme $\Delta 133$ p53 α u tumoru jajnika s mutiranim genom *TP53* ukazuje na bolji klinički ishod pacijenata u odnosu na smanjenu

ekspresiju navedene izoforme [56,57]. U tumoru dojke čije stanice sadrže mutirani gen *TP53*, ekspresija izoforme p53 β povezana je s dužim preživljenjem, dok je ekspresija izoformi $\Delta 40p53$ povezana s agresivnim, trostruko negativnim tipom raka dojke [58]. Izoforme, osim što utječu na aktivnost proteina p53, pokazale su se i važnim proteinskim biljezima u mnogim vrstama tumora. No, isto tako, one pokazuju i funkcije neovisne o proteinu p53. Tako izoforma $\Delta 133p53\beta$ promovira potencijal matičnih stanica raka, a pojačana ekspresija te izoforme korelira s povećanim metastatskim potencijalom u staničnim linijama tumora dojke [59]. U kolorektalnom karcinomu $\Delta 133p53\beta$ povisuje razinu IL-6 koji aktivira signalne puteve RhoA-ROCK i JAK-STAT te tako doprinosi invaziji i metastaziranju tumora [60].

2.2.1.1. Inaktivacija p53 u melanomu čovjeka

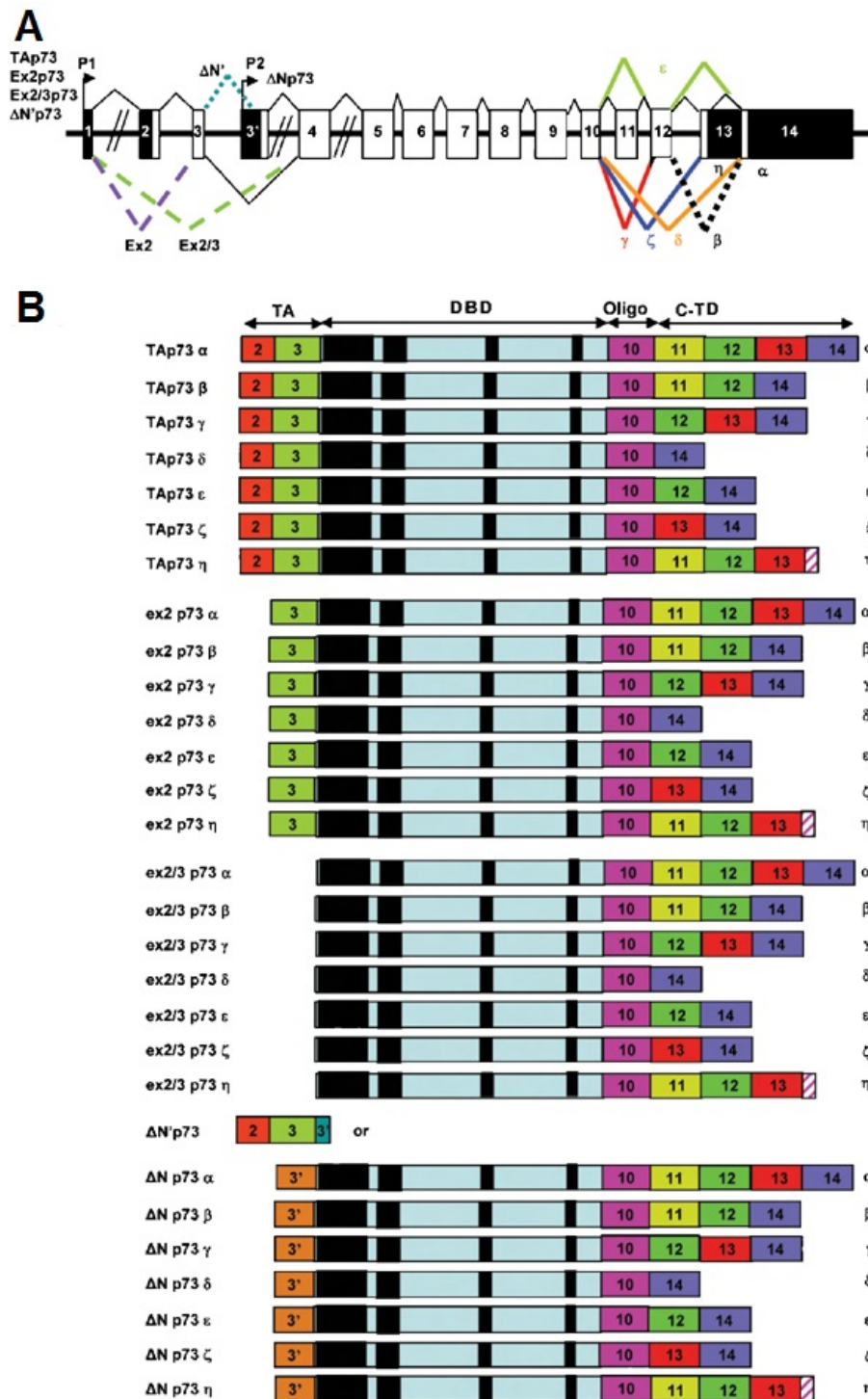
Protein p53 najčešće je u tumorima inaktiviran mutacijama, a neki mutanti dobivaju nove, onkogene funkcije (GOF, engl. *gain of function*). Većina mutanata proteina p53 ima mutacije u DBD, i to u kodu za aminokiseline uključene u vezanje proteina uz molekulu DNA (tzv. kontaktni mutanti) ili u kodu za aminokiseline važne za održavanje strukture područja odgovornog za vezanje uz molekulu DNA (tzv. strukturalni mutanti). Kod strukturalnih mutanata dolazi do velike konformacijske promjene proteina i nastajanja unutarnje šupljine ili pukotine proteina koje onemogućuju interakciju s molekulom DNA. Većina mutanata p53 potiče EMT što uzrokuje sijanje (engl. *spreading*) stanica s primarnog tumora i nastajanje metastaza. Divlji tip proteina p53 sprječava staničnu migraciju i invaziju (što su glavne karakteristike EMT). U melanomima, za razliku od drugih vrsta tumora čovjeka, protein p53 rijetko je mutiran (u manje od 10% slučajeva) [4]. Ipak, ne obavlja svoju funkciju tumorskog supresora. Predloženo je nekoliko mehanizama koji objašnjavaju inaktivaciju p53 u melanomogenezi. Jedan od njih fosforilacija je proteina iASPP (engl. *Inhibitor of Apoptosis Stimulating Protein of p53*) preko kompleksa ciklin B1/CDK1 čime se onemogućuje tvorba dimera iASPP što dovodi do translokacije monomera iASPP u jezgru. Monomeri iASPP stupaju u interakciju s p53 i inhibiraju apoptozu izazvanu pomoću p53 regulirajući njegovu transkripcijsku aktivnost, ali istovremeno ne utječu na zastoj staničnog ciklusa uzrokovan djelovanjem proteina p53 [8]. Na inaktivaciju ili smanjenu razinu proteina p53 utječe pojačana degradacija posredovana E3-ubikvitinskom ligazom MDM2, koja je često prekomjerno eksprimirana u melanomima [5]. Također, dolazi i do pojačane ekspresije MDM4 koji inhibira p53 vežući se za njegovu TAD [6]. Nadalje, česte su mutacije lokusa *CDKN2* koji kodira za p14^{CDKN2A}, koji stupa u interakciju s MDM2 i sprječava ga da označi

p53 za ubikvitinaciju te tako stabilizira p53 [7]. Do utišavanja gena *TP53* može doći i zbog epigenetskih promjena [61,62].

2.2.2. Izoforme proteina p73

Protein p73 ima još brojnije izoforme pa tako u teoriji postoji 29 proteinskih izoformi te čak 35 molekula mRNA kodiranih genom *TP73*. S obzirom na razliku u strukturi N-kraja proteina razlikujemo pet transkripata: TA, Ex2, Ex2/3, $\Delta N'$ i ΔN , a s obzirom na C-kraj sedam: α , β , γ , δ , ϵ , ζ i η . Izoforme nastaju zbog transkripcije s alternativnih promotora (TA izoforme se prepisuju s promotora P1, ΔN izoforme s promotora P2) te alternativnog izrezivanja na N-kraju (Ex2, Ex2/3 i $\Delta N'$), kao i alternativnog izrezivanja na C-kraju (α , β , γ , δ , ϵ , ζ i η). Transkript $\Delta N'$ p73 u konačnici rezultira istim proteinskim produktom kao i izoforma ΔN p73 koja se prepisuje od promotora P2. No, postoji mogućnost da translacija započinje od prvog startnog kodona AUG, smještenog u eksonu 2 te završava stop-kodonom u eksonu 3' što vodi do ekspresije kratke izoforme koja se sastoji samo od N-terminalne domene proteina p73 (**Slika 6**) [43].

Protein p73 gotovo nikad nije mutiran u tumorima. Ipak, izoforme proteina p73 imaju potpuno različite uloge u tumorigenezi. Tako izoforme TAp73 pokazuju značajnu ulogu u supresiji tumora, dok izoforme ΔN p73 pokazuju onkogeno svojstvo. Pojačana ekspresija izoformi proteina p73 kojima nedostaje cijela ili dio transaktivacijske domene na N-kraju proteina (ΔN p73, Ex2p73 i Ex2/3p73) nađena je u mnogim vrstama tumora te su tim izoformama pripisana antiapoptotska svojstva, kao i mogućnost inhibicije funkcije proteina p53 i TAp73 [63–65].



Slika 6. Shematski prikaz izoformi proteina p73. Prikazani su alternativni promotori (P1 i P2) i područja alternativnog izrezivanja (Ex2, Ex2/3, $\Delta N'$, α , β , γ , δ , ϵ , ζ i η). Izoforme TAp73 koje se prepisuju s promotora P1 sadrže očuvanu TAD. Izoforme $\Delta Np73$ koje se prepisuju s promotora P2 skraćene su na N-kraju te nemaju TAD. Preuzeto i prilagođeno prema Murray-Zmijewski i suradnici (2006) [43].

2.2.3. Interakcije proteina p53 s drugim izoformama porodice proteina p53

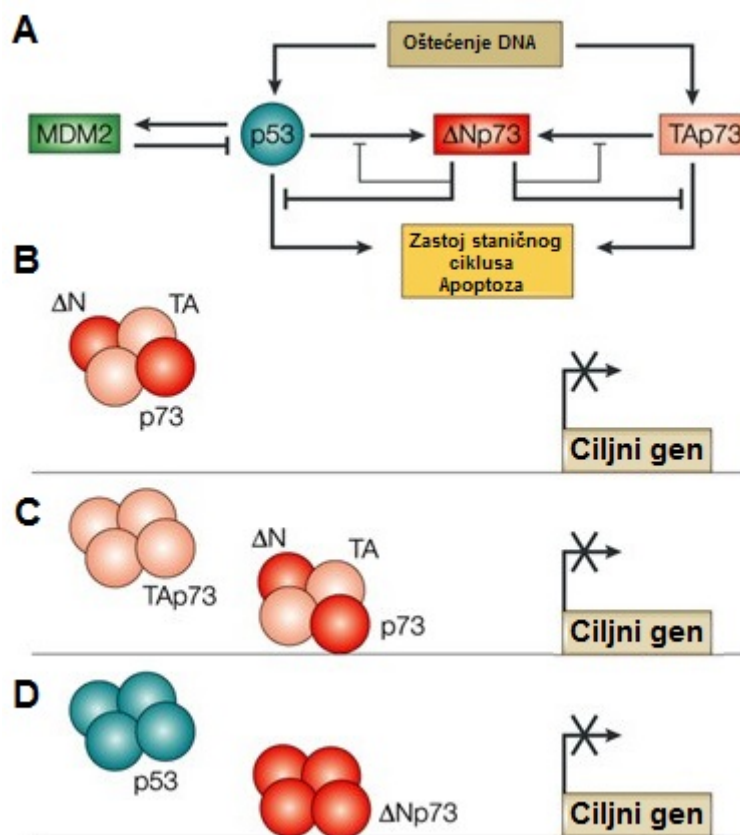
Izoforme porodice proteina p53 uz pomoć oligomerizacijske domene stvaraju transkripcijski aktivne tetramere. No, nije izgledno da će sve podjedinice s jednakom vjerojatnošću graditi različite tetramere, a i aktivnost pojedinih tetramera ovisi o tome od kojih su izoformi sastavljeni. Billant i suradnici istražili su utjecaj izoformi porodice proteina p53 na aktivnost divljeg tipa proteina p53 na modelu kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Pokazali su da su izoforme p53 α i Δ 40p53 α transkripcijski aktivne izoforme proteina p53, dok Δ 133p53 α i Δ 160p53 α ne pokazuju transkripcijsku aktivnost, što je i za očekivati budući da nemaju transaktivacijsko područje te im nedostaje dio područja za vezanje uz DNA. Nadalje, pokazali su da Δ 133p53 α i Δ 160p53 α imaju dominantno-negativni utjecaj na transkripcijsku aktivnost izoformi p53 α i Δ 40p53 α . Uvođenjem mutacija koje onemogućuju tetramerizaciju Δ 133p53 α i Δ 160p53 α izoformi utjecaj na transkripcijsku aktivnost proteina p53 α je poništen. Istraživanja našeg laboratorija su pokazala da izoforme p53 inhibiraju transkripcijsku i apoptotsku aktivnost TAp73 β tvoreći heterokomplekse [66]. Transkripcijska aktivnost izoformi proteina p73 pokazana je na izoformama TAp73 α i TAp73 β , a za izoforme Δ Np73 α i Δ Np73 β pokazano je da imaju dominantno-negativni utjecaj na transkripcijsku aktivnost divljeg tipa proteina p53 i TAp73. Istraživači su došli do zaključka da je protein p53 α inhibiran izoformama porodice proteina p53 koje nisu transkripcijski aktivne, a mogu tvoriti heterotetramere [67].

Marcel i suradnici pokazali su da je postojanje proteinskih kompleksa p53 α /p53 β i p53 α /p53 γ ovisno o promotoru budući da su ih uspjeli koimunoprecipitirati samo u prisutnosti promotora na koji se protein p53 veže. Budući da niti p53 β ni p53 γ ne posjeduju oligomerizacijsko područje, kompleksi najvjerojatnije nisu tetrameri [68]. Za izoformu Δ 40p53 α pokazana je direktna interakcija s p53 α [69]. Također je pokazano da izoforma Δ 40p53 α inhibira, a izoforma p53 β potiče zastoj staničnog ciklusa i apoptozu u stanicama melanoma čovjeka tako da utječu na transkripciju gena *CDKN1A* (koji kodira za p21) i *BBC3* (kodira za protein PUMA) koje je ovisno o proteinu p53 [70]. Također, pokazana je direktna interakcija izoforme Δ 133p53 α s divljim tipom proteina p53 α te je pokazano da Δ 133p53 α inhibira apoptozu i zastoj u fazi G1 staničnog ciklusa koji su uvjetovani proteinom p53 [71]. Općenito, utjecaj izoformi porodice proteina p53 na stanični odgovor proteina p53 α ovisan je o vrsti stanica i tkiva.

Dominantno-negativni utjecaj izoformi Δ Np73 na izoforme p53 i TAp73 otkriven je početkom stoljeća. Nađeno je da izoforme Δ Np73 imaju onkogeno svojstva [72], pojačano su eksprimirane u tumorima [73], te da do inhibicije proteina p53 dolazi zbog kompeticije

homotetramera $\Delta Np73$ za vezna mjesta za p53 na molekuli DNA (**Slika 7D**), dok do inhibicije TAp73 dolazi zbog direktnih proteinskih interakcija i nastajanja manje aktivnih heterotetramera TAp73/ $\Delta Np73$ (**Slika 7C**) ili zarobljavanja (engl. *sequestration*) TAp73 (**Slika 7B**) [74,75]. Dok su direktne proteinske interakcije izoformi $\Delta Np73$ s divljim tipom proteina p53 potvrđene [73], za izoforme TAp73 takve interakcije nisu potvrđene.

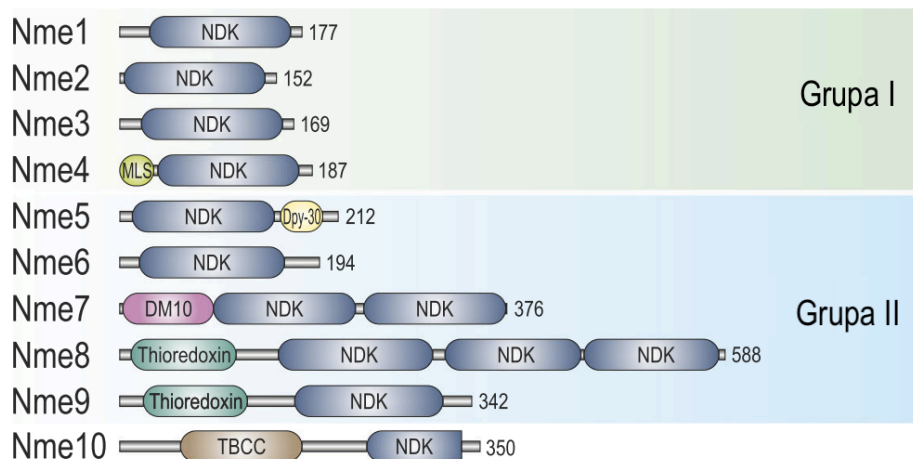
Interakcije proteina p53 pokazane su i s proteinom p63. Pojačana ekspresija izoformi proteina p63 zapažena je u stanicama i kliničkim uzorcima melanoma u usporedbi s melanocitima te je pokazano da dolazi do nastanka kompleksa između $\Delta Np63\beta$ i p53 α koji inhibira transkripcijsku aktivnost proteina p53 [76].



Slika 7. Protein $\Delta Np73$ regulira funkciju proteina TAp73 i p53. A) Kao odgovor na oštećenje DNA aktiviraju se p53 i TAp73. Oni mogu transkripcijski transaktivirati $\Delta Np73$ koji može inhibirati funkciju p53 i TAp73 u zastoju staničnog ciklusa i apoptozi. Inhibicija apoptoze koja je uzrokovana $\Delta Np73$ rezultat je B) zarobljavanja TAp73, C) stvaranja manje aktivnih heterotetramera TAp73- $\Delta Np73$ ili D) kompeticije s p53 za ista ciljna vezna mjesta. Preuzeto i prilagođeno prema Melino i suradnici (2002) [77].

2.3. Porodica proteina NME/NDPK/Nm23

Nukleozid-difosfatske kinaze (NDPK) čine porodicu enzima koji sudjeluju u metabolizmu nukleotida. Otkriveni su sredinom 20. stoljeća kao enzimi koji prenose γ -fosfat s nukleozid trifosfata (NTP) na nukleozid difosfate (NDP). Prijenos terminalnog fosfata obavlja se „ping-pong“ mehanizmom preko fosfo-histidinskog intermedijera velike energije. Glavni donor fosfata je ATP nastao oksidativnom fosforilacijom budući da je to daleko najzastupljeniji NTP u stanici [78,79]. Kako su NDPK zadužene za održavanje nukleotidnog sastava u stanicama, smatraju se 'housekeeping' enzimima. Porodica proteina kojoj pripadaju NDPK poznata je pod tri imena: NME, NDPK i Nm23. Budući da svi članovi porodice nukleozid-difosfatskih kinaza nisu katalitički aktivni, a Nm23 stariji je naziv često korišten u kliničkim studijama, danas je uvriježen naziv ove porodice proteina NME. Do sada je pronađeno deset gena *NME* u sisavaca (**Slika 8**) [80]. Po filogenetskim značajkama, strukturi eksona i introna te proteinskim domenama, proteini NME dijele se u dvije grupe. U grupu I ubrajamo proteine NME 1-4 za koje je dokazano da posjeduju kinaznu aktivnost. NME1 i NME2 uglavnom se nalaze u citosolu, dok su proteini NME3 i NME4 smješteni u mitohondriju [81–83]. NDPK je kod eukariota aktivan isključivo u obliku heksamera. Smatra se da NME1 (NDPK A) i NME2 (NDPK B) podjedinice tvore većinu staničnih izoenzima NDPK koji obavljaju barem 80% ukupne stanične aktivnosti NDPK. Oni mogu tvoriti heksamere u svim mogućim kombinacijama (A6, A5B1, ... B6) [84,85]. Osim enzimske aktivnosti NDPK, ovi proteini posjeduju i mnoge druge biokemijske funkcije: regulatori su transkripcije te imaju aktivnost proteinske kinaze i DNaze [86]. NDP kinaze imaju i mnogobrojne biološke funkcije u stanici te su uključeni u razne stanične procese poput diferencijacije, proliferacije, supresije metastaziranja te vezikularnog transporta [87]. Grupi II čine proteini NME 5-9 za koje nije dokazana multimerna forma, kao ni aktivnost NDPK [86]. Proteini grupe II slabije su istraženi od grupe I, a njihovu biokemijsku i biološku ulogu u stanici tek treba razjasniti. Protein NME10 evolucijski je odvojen od ostalih članova porodice NME budući da je domena NDK u odgovarajući gen umetnuta relativno nedavno te je njegovo evolucijsko podrijetlo sasvim različito od ostalih članova porodice. Također, NME10 jedini ima nepotpunu domenu NDK što je vidljivo na **Slici 8** [88].



Slika 8. Shematski prikaz domena članova porodice proteina NME u čovjeka. Porodica proteina NME sastoji se od 10 članova koji su podijeljeni u dvije grupe. U grupu I ubrajamo NME1 – NME4, a u grupu II NME5 – NME9, dok NME10 ima drugačije evolucijsko podrijetlo. Brojevi predstavljaju aminokiseline. Proteinske domene prikazane su obojenim kućicama. Skraćenica MLS predstavlja signal za smještaj u mitohondrij, a NDK domenu nukleozid-difosfatske kinaze. Preuzeto i prilagođeno prema Četković i suradnici (2015) [86].

2.3.1. NME1, prvi otkriveni supresor metastaziranja

Veliki interes za proteinsku porodicu NME u biologiji tumora javio se kada je otkriveno da gen *nm23* (engl. *non-metastatic clone 23*), poznat kao supresor metastaziranja u mišjem modelu melanoma, zapravo kodira za jednu od podjedinica enzima NDPK, NDPK A [89]. Važna karakteristika supresora metastaziranja sprječavanje je nastajanja metastaza, ali, za razliku od tumorskih supresora, oni ne utječu na rast primarnog tumora. Djelovanjem supresora metastaziranja, stanice će izgubiti ili neće ni dobiti karakteristike metastatskih stanica, ali će i dalje biti tumorigene [90]. Uloga proteina NME1 kao supresora metastaziranja potvrđena je s nekoliko otkrića. Pokazano je da smanjena ekspresija ili potpuni gubitak ekspresije *NME1* korelira s formiranjem metastaza i lošim kliničkim ishodom u oboljelih od različitih tipova tumora kao što su melanom, tumor dojke, tumor jajnika, hepatocelularni karcinom, karcinom grlića maternice i karcinom želuca [91,92]. Nadalje, učestalost metastaza u plućima značajno je povećana u mišu s inaktiviranim *NME1* (engl. *NME1-knockout*) sklonom hepatocelularnom karcinomu [93]. Nadalje, utišavanje *NME1*, ali ne i *NME2*, doprinijelo je razvoju metastatskog fenotipa nekoliko neinvazivnih tumorskih staničnih linija kroz utjecaj na staničnu adheziju, migraciju i invaziju. Utišavanje *NME1* dovodi do destabilizacije E-kadherina, translokacije β -katenina u jezgru i aktivacije transkripcijskog faktora TCF/LEF-1, a sve su to značajke procesa EMT-a [94]. Molekularni mehanizam kojim NME1 suprimira metastaze još nije poznat, ali mogao bi uključivati neke do sada poznate

uloge proteina NME1 kao što su njegova enzimaska aktivnost (NDPK, aktivnost histidinske kinaze te aktivnost 3'-5' egzonukleaze), složena mreža proteinskih interakcija ili regulacija nizvodnih gena [95].

Ipak, mnogi radovi pokazuju da prekomjerna ekspresija *NME1* ili vrlo rijetka mutacija *NME1*^{S120G} povećava invazivna svojstva te korelira s napretkom bolesti i općenito lošim ishodom u neuroblastomu kod djece [96]. Navedena istraživanja upućuju na zaključak da *NME1* ima različite uloge u različitim tipovima tumora. Iako je uloga NME2 u biologiji tumora manje istražena od poznatijeg člana porodice, NME1, pokazano je da posjeduje aktivnost supresora metastaziranja. Slično kao i kod NME1, ekspresija NME2 korelira s lošijim ishodom u pacijenata s određenim tipovima tumora [97].

2.3.2. Proteini NME u melanomu čovjeka

Kao i u mnogim drugim tipovima metastatskih tumora i u staničnim linijama i kliničkim uzorcima melanoma pokazana je smanjena ekspresija proteina NME1. NME1 ima važnu ulogu u sprječavanju metastaziranja u melanomu [11], ali isto tako suzbija i melanomagenezu izazvanu UV zračenjem. Naime, NME1 potiče popravak oštećenja DNA uzrokovanog UV-zračenjem, koji je vjerojatno zahvaljujući svojoj aktivnosti 3'-5' egzonukleaze [12,13]. Nedavno istraživanje otkrilo je subpopulaciju stanica sa smanjenom ekspresijom proteina NME1 (*NME1*^{LOW}) u staničnim linijama melanoma i ukazalo na važnost vrlo malignih varijanti *NME1*^{LOW} stanica melanoma. Naime, izolacijom tih stanica utvrđena je povećana kolektivna invazija *in vitro* u 3D-agregatima u Matrigelu, kao i veliki broj metastaza na plućima i jetri u modelima mišjih presađaka *NME1*^{LOW}. Modeli mišjih presađaka parentalnih stanica, s miješanom populacijom stanica koje ekspimiraju NME1 jako ili slabo, nisu pokazali pojavu metastaza [98]. Iako NME1 pokazuje snažno djelovanje supresora metastaziranja, pokazalo se da ima i ulogu u rastu melanoma. NME1 dovodi do rasta subpopulacije matičnih stanica melanoma u 3D-staničnim kulturama i povećanog rasta tumora *in vivo*. Utišavanje ekspresije NME1 dovodi do značajnog smanjenja veličine tumora *in vitro* i *in vivo* [99]. Ova nedavna istraživanja različitih subpopulacija stanica melanoma pokazuju važnost heterogene ekspresije NME1 u melanomima i oprečnu ulogu proteina koji se u biologiji tumora uglavnom smatra supresorom metastaziranja.

2.3.3. Interakcije proteina p53 s članovima porodice proteina NME

U okviru porodice proteina NME, dosad su najviše istraživani NME1 i NME2. Udio identičnih aminokiselinskih ostataka u primarnoj strukturi ovih dvaju proteina iznosi 88% te

se razlikuju samo u njih 18. Ipak, tih 12% čini veliku razliku budući da je površina NME1 kiselog, a NME2 bazičnog karaktera [100]. Upravo to bi moglo objasniti veliku razliku u broju i tipu interakcijskih partnera, a sukladno tome i raznolikost biokemijskih funkcija (ako izuzmemo aktivnost NDPK) ta dva vrlo srodna proteina. H. Jung i suradnici otkrili su direktne interakcije između proteina NME1 i p53, kao i između proteina NME2 i p53 metodom koimunoprecipitacije endogenih i egzogenih proteina u nekoliko staničnih linija. Proteinske interakcije posredovane su disulfidnim vezama preko cisteinskog bočnog ogranka Cys145 u NME1 i Cys176 u proteinu p53. Također, pokazali su da NME1 aktivira p53 uklonjenjem MDM2, negativnog regulatora p53, iz kompleksa p53-MDM2 [9]. Opažanje ovih direktnih interakcija NME-p53 nije ponovilo nijedno neovisno istraživanje od objavljivanja tog članka 2007. godine. Međutim, pronađene su indirektne interakcije između NME i p53, tj. utjecaj proteina NME na aktivnost proteina p53 preko nekih drugih proteinskih partnera p53, primjerice interakcija NME1 i MIF koja rezultira disocijacijom kompleksa MIF-p53. Budući da je pokazano da MIF suzbija aktivnost proteina p53, disocijacijom kompleksa omogućena je apoptoza i zaustavljanje staničnog ciklusa posredovano proteinom p53 [101]. Zanimljiva je i interakcija NME2 s negativnim regulatorom p53, MDM2. Pokazana je i poveznica između povećane ekspresije MDM2 i smanjene sposobnosti NME2 da suzbija pokretljivost stanica [102].

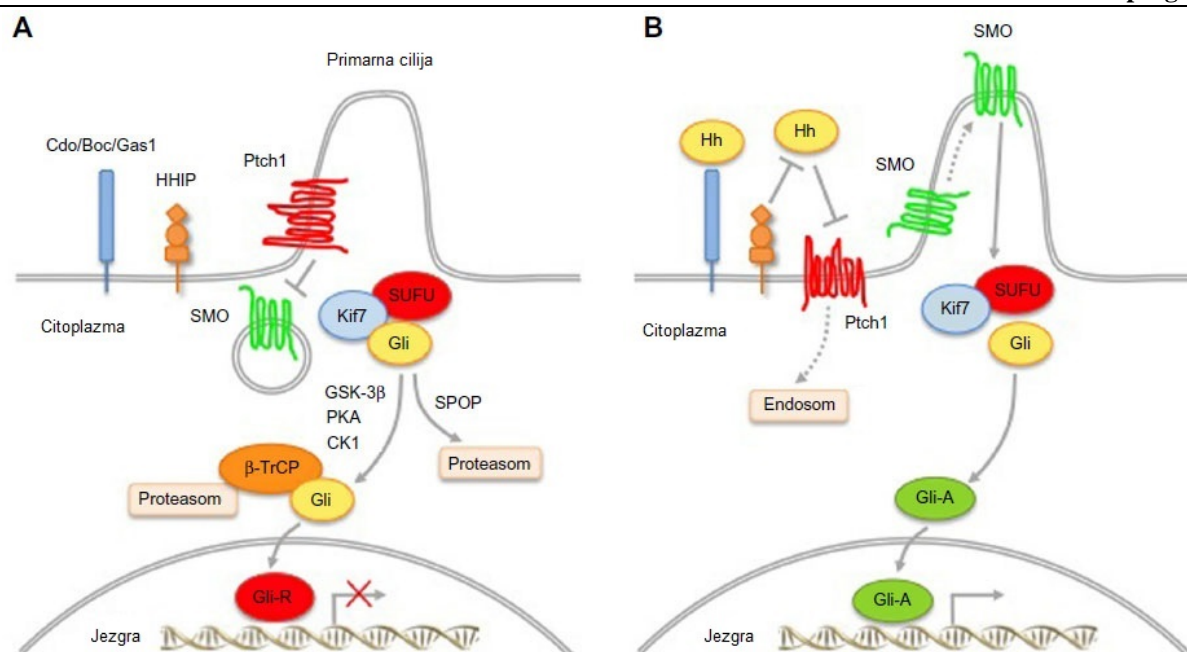
2.4. Porodica proteina GLI

Porodica proteina GLI dio su *Hedgehog-GLI* (HH-GLI) signalnog puta važnog u razvoju i diferencijaciji organizma. Signalni put HH-GLI vrlo je dobro očuvan u životinja s bilateralnom simetrijom, a promjene u regulaciji signalnog puta dovode do kongenitalnih malformacija. Usprkos iznimnoj važnosti tijekom razvoja embrija, signalni put HH-GLI neaktivan je nakon rođenja, a ostaje aktivan samo u matičnim i praroditeljskim stanicama. Naknadna aktivacija HH-GLI signalnog puta u odraslim stanicama dovodi do pojave tumora [103].

2.4.1. Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI)

Signalni put Hedgehog-GLI u sisavaca sastoji se od tri liganda HH (*Desert*, DHH, *Indian*, IHH i *Sonic Hedgehog*, SHH), dva transmembranska receptora *Patched1* i *Patched2* (PTCH1 i PTCH2), transmembranskog receptora spregnutog s G-proteinom (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR) *Smoothed* (SMO) i tri transkripcijska faktora GLI (GLI1, GLI2 i GLI3) koji su regulirani supresorom SUFU (engl. *Suppressor of Fused*). PTCH1 glavni je receptor, dok se PTCH2 rijetko spominje u literaturi [104]. Prijenos signala u signalnom putu HH-GLI počinje vezanjem liganada HH na receptor PTCH1 (**Slika 9B**). Proteini Cdo, Boc i Gas1 ponašaju se kao koreceptori liganada HH, a protein koji stupa u interakciju s HH (engl. *Hedgehog interacting protein*, HHIP) natječe se s PTCH1 za vezanje na ligand HH te se na taj način ponaša kao negativni regulator signalnog puta HH-GLI [105,106]. Receptor PTCH nalazi se u primarnoj ciliji (duga, nepokretna organela na apikalnoj površini mnogih vrsta stanica) te vezanjem liganada dolazi do relokalizacije kompleksa na endosomalne vezikule. Relokalizacija aktivira SMO koji se translocira u primarnu ciliju [107]. Daljnji prijenos signala dovodi do formiranja aktivne forme transkripcijskih faktora GLI (GLI-A) koji u jezgri aktiviraju transkripciju ciljnih gena HH [108]. U odsutnosti liganada HH, receptor PTCH1 sprječava ulazak SMO u primarnu ciliju i na taj način inhibira njegovu funkciju (**Slika 9A**). To rezultira nastankom represorske forme transkripcijskih faktora GLI2 i GLI3 (GLI2/3-R) cijepanjem N-kraja proteina. GLI-R odlaze u jezgru gdje smanjuju transkripciju ciljnih gena HH [108].

Aktivacija signalnog puta HH-GLI može se odvijati na kanonski ili nekanonski način. Kanonski način aktivacije podrazumijeva vezanje liganada HH na receptor PTCH1, dok nekanonski način aktivacije podrazumijeva sve mehanizme aktivacije transkripcijskih faktora GLI koji se dogode neovisno o SMO [109].



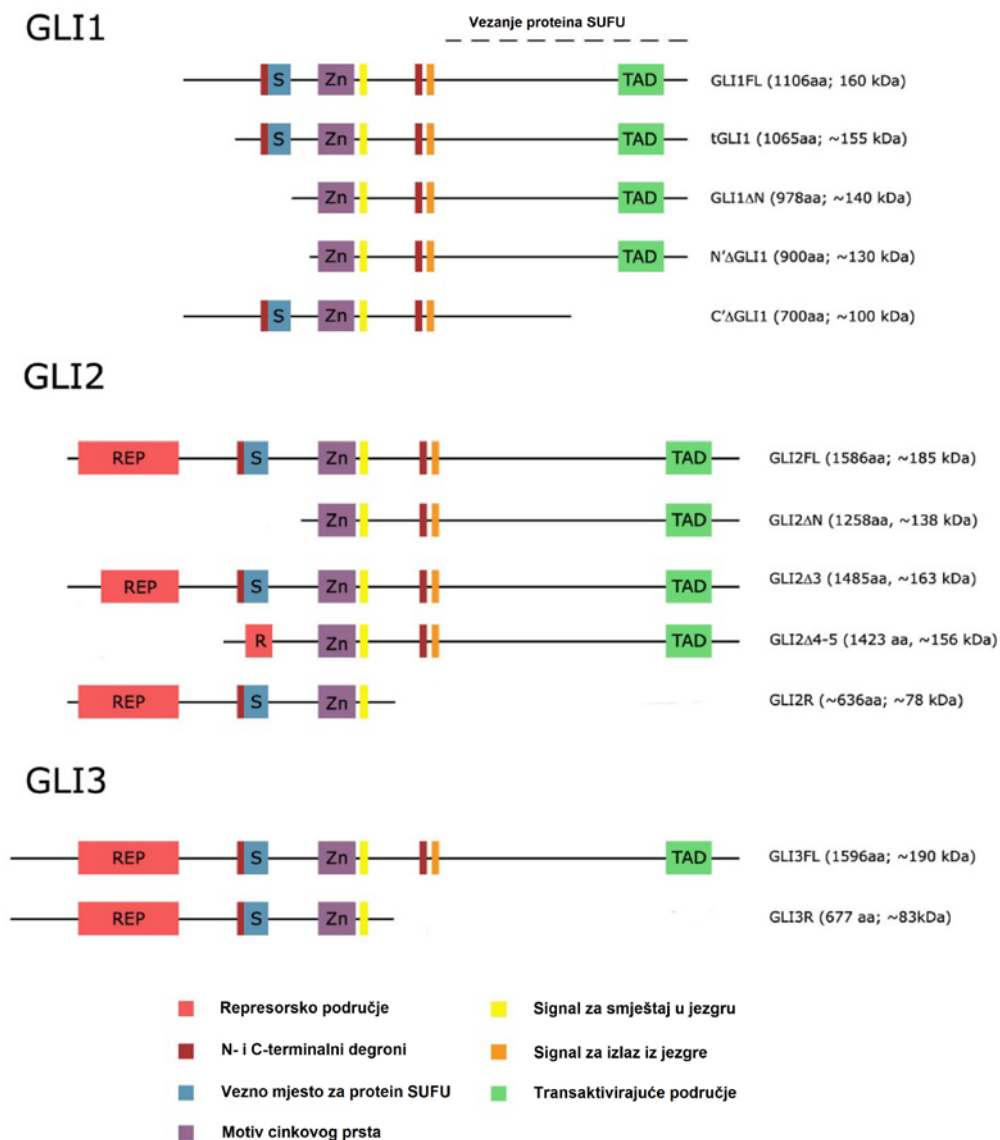
Slika 9. Pojednostavljeni prikaz signalnog puta Hedgehog-GLI u sisavaca. A) u odsutnosti liganada HH dolazi do formiranja represorske forme transkripcijskih faktora GLI (GLI-R) koji dolaskom u jezgra inhibiraju transkripciju ciljnih gena HH. B) u prisutnosti liganada HH aktivne forme transkripcijskih faktora GLI (GLI-A) potiču transkripciju ciljnih gena HH. Preuzeto i prilagođeno prema Pandolfi i suradnici (2015) [108].

2.4.2. Izoforme proteina GLI

Proteini GLI transkripcijski su faktori s motivom cinkovih prstiju kojim se vežu na slijed 5'-GACCACCCA-3' u promotorima ciljnih gena [110]. Porodica proteina GLI sastoji se od tri člana (GLI1, GLI2 i GLI3) od kojih svaki ima nekoliko do sada poznatih izoformi (**Slika 10**). Proteini GLI2 i GLI3 na N-kraju imaju represorsko područje, dok kod proteina GLI1 takvo područje ne postoji što bi značilo da GLI2 i GLI3 mogu djelovati kao aktivatori ili represori signalnog puta, dok je GLI1 uglavnom aktivator. Represorske izoforme proteina GLI2 i GLI3 (GLI2/3-R) nastaju proteolitičkim cijepanjem transaktivirajućeg područja. Alternativno izrezivanje razlog je tome da proteini GLI1 i GLI2 imaju više izoformi od proteina GLI3.

Izoforme GLI1 Δ N, tGLI1 i N' Δ GLI1 razlikuju se od GLI1FL po aminokiselinama koje im nedostaju na N-kraju proteina. Izoforme GLI1 Δ N i tGLI1 nastale su zahvaljujući alternativnom izrezivanju, dok je izoforma N' Δ GLI1 nastala posttranslacijskom modifikacijom. Izoforma tGLI1 pronađena je samo u tumorskom uzorku glioblastoma i tumora dojke, a ne i u pripadajućem zdravom tkivu za razliku od drugih izoformi koje se nalaze kako u tumorskom, tako i u zdravom tkivu. Transkripcijska aktivnost navedene tri izoforme razlikuje se po ciljnim genima koje aktiviraju, ali i po jačini aktivacije pojedinih

ciljnih gena zbog razlike u mehanizmu aktivacije ili razlike u sposobnosti translokacije u jezgru [111]. Izoforma N'ΔGLI1 slabi je aktivator transkripcije i prisutna je u većoj količini u stanici od izoforme GLI1FL zbog gubitka veznog mjesta za protein SUFU, koji je supresor transkripcijskih faktora GLI i negativni regulator signalnog puta HH-GLI. Izoforma C'ΔGLI1 slabi je represor transkripcije [103]. Izoforma GLI2ΔN puno je snažniji aktivator transkripcije od najduže izoforme GLI2, GLI2FL. Postranslacijska modifikacija, uz proteolitičku razgradnju, mogla bi biti važan mehanizam regulacije aktivacijske i represorske aktivnosti proteina GLI [112]. Protein GLI3 nema izoformi nastalih alternativnim izrezivanjem. Jedine do sada poznate izoforme su GLI3FL i GLI3-R koja nastaje proteolitičkom razgradnjom duge izoforme GLI3.



Slika 10. Shematski prikaz izoforni porodice proteina GLI. Svaki od tri člana porodice proteina GLI (GLI1, GLI2 i GLI3) sastoji se od nekoliko, do sada poznatih izoforni. Preuzeto i prilagođeno prema Sabol i suradnici (2018) [103].

2.4.3. Uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju melanoma

Uloga signalnog puta HH-GLI u razvoju tumora kože, pa tako i melanoma temeljito je istražena i pokazalo se da je signalni put HH-GLI uključen u melanomagenezu. Aktivan signalni put HH-GLI potreban je za rast i razvoj melanoma, a signalni put MAPK regulira nuklearnu lokalizaciju i transkripcijsku aktivnost proteina GLI1 [14]. Također, pojačana ekspresija GLI2 povezana je s invazijom i metastaziranjem melanoma *in vitro* i *in vivo*. Modeli mišjih presađaka pokazali su da melanomi s jačom ekspresijom GLI2 češće dovode do metastaza u kostima od melanoma sa slabijom ekspresijom GLI2 [15].

Važnu ulogu transkripcijskih faktora GLI nalazimo i u pojavi otpornosti na ciljanu terapiju u melanomima. Faião-Flores i suradnici pokazali su povećanu razinu GLI1 i GLI2 u staničnim linijama melanoma otpornim na vemurafenib u usporedbi s linijama osjetljivim na vemurafenib. Isto je potvrđeno i na kliničkim uzorcima melanoma. Pojačana ekspresija GLI1/2 pokazala se neovisna o kanonskoj signalizaciji HH i povezana je s nekanonskim signalnim putem HH koji uključuje TGFβ/SMAD signalizaciju. Utišavanjem GLI1 i GLI2 vraćena je osjetljivost stanicama otpornim na vemurafenib, a tretman inhibitorom proteina GLI, Gant61, doveo je do smanjene invazije stanica melanoma [16].

2.4.4. Interakcije proteina GLI s proteinom p53

Funkcionalne interakcije signalnog puta HH-GLI i tumorskog supresora p53 potvrdilo je nekoliko istraživanja iako direktne interakcije proteina GLI i p53 do danas nisu potvrđene. Istraživanja pokazuju da p53 inhibira aktivnost, lokalizaciju i razinu ekspresije proteina GLI1 i time sprječava rast i proliferaciju tumora nastalog djelovanjem GLI1. S druge strane, GLI1 potiskuje protutumorsku aktivnost p53 što uzrokuje p53-GLI1 inhibicijsku petlju [113]. Moguće je da do inhibicije proteina p53 dolazi zbog aktivacije MDM2, ubikvitinsko-proteinske ligaze koja je negativni regulator p53. Signalni put HH-GLI uzrokuje fosforilaciju MDM2 čime se on aktivira, a mutirani SMO pojačava vezanje p53 na MDM2 što dovodi do njegove razgradnje [114]. Do prekida interakcije MDM2-p53 i obnavljanja funkcije p53 kao supresora tumora može doći smanjenjem aktivnosti GLI3, što ukazuje na potencijalnu upotrebu inhibitora proteina GLI kao protutumorskih lijekova [115]. Utjecaj proteina p53 na aktivnost GLI1 može se objasniti kompeticijom za vezanje na TAF9, protein koji se veže uz TATA slijed. Pokazano je da je kompleks GLI1-TAF9 važan za onkogenu aktivnost, a p53 se

veže za TAF9 većim afinitetom od proteina GLI1, što bi moglo biti uzrok smanjene aktivnosti GLI1 [116]. Sve navedeno pokazuje da je u aktivnosti p53 i GLI ključna ravnoteža te da gubitak p53 dovodi do aktivacije GLI što, naposljetku, uzrokuje sijanje tumorskih matičnih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Otopine, puferi, kemikalije i tekuće hranjive podloge za uzgoj staničnih linija i bakterija

Popis otopina i pufera koje smo koristili u izradi rada i njihov sastav prikazan je u **Tablici 1**, dok je sastav tekućih hranjivih podloga za uzgoj stanica ili bakterija prikazan u **Tablici 2**.

Tablica 1. Popis otopina i pufera te njihov sastav.

| Otopina | Sastav |
|--|---|
| MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid) | 5 mg/mL MTT u PBS-u |
| Otopina akrilamida i bisakrilamida (AAS) za pripremu poliakrilamidnog gela | 29,2% (w/v) akrilamid, 0,8% (w/v) bisakrilamid |
| Otopina APS-a za pripremu poliakrilamidnog gela | 10% (w/v) APS |
| Otopina formaldehida za fiksaciju stanica | 4% (v/v) formaldehid u PBS-u |
| Otopina mlijeka za blokiranje membrane | 5% (w/v) mlijeka u prahu u puferu TBST |
| Otopina <i>Naphtol Blue</i> za bojanje membrane | 10% (v/v) metanol, 2% (v/v) octena kiselina, 0,1% (w/v) <i>Naphtol Blue</i> |
| Otopina SDS-a za pripremu poliakrilamidnog gela | 10% (w/v) SDS |
| Otopina tripanskog modrila za brojanje stanica | 0,03 % (w/v) tripansko modrilo, 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid, engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>), 1 g dm ⁻³ BSA |
| Otopina Triton X-100 za permeabilizaciju stanica | 0,1% (v/v) Triton X-100 u PBS-u |
| Otopina za odbojavanje membrane | 50% (v/v) metanol, 7% (v/v) octena kiselina |
| PBS (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>), fosfatni pufer | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O, pH=7,4 |
| PBST pufer | 0,1% (v/v) Tween-20 u PBS-u |
| Pufer za nanošenje polinukleotidnih uzoraka na gel (5 × LB) | 0,25% (w/v) bromfenolno modrilo, 0,25% (w/v) ksilen cijanol, 35% (v/v) glicerol |
| Pufer za nanošenje proteinskih uzoraka na gel (4 × LB) | 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 M DTT; 8% (v/v) SDS; 40% (v/v) glicerol; 0,001% (w/v) bromfenolno modrilo |
| RB (engl. <i>Running Buffer</i>), pufer za SDS-PAGE | 1 M glicin, 50 mM Tris, 1% (v/v) SDS |
| Standardna otopina albumina iz seruma goveda (BSA, engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>) | Razrjeđuje se u koncentracijama od 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 ng/μL serijskim razrjeđenjem izvorne otopine koncentracije 2,0 mg/mL (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD) |
| TAE, pufer za elektroforezu u agaroznom gelu | 40mM Tris, 20mM octena kiselina, 1mM EDTA |

Tablica 1. – nastavak – Popis otopina i pufera te njihov sastav.

| Otopina | Sastav |
|--|---|
| TB (engl. <i>Transfer Buffer</i>), pufer za prijenos proteina na membranu | 200 mM Tris, 1,5 M glicin, 10% (v/v) metanol |
| TBST (engl. <i>Tris buffered saline Tween</i>), pufer za ispiranje membrana | 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7,5 |
| TENN, pufer za imunoprecipitaciju | 50 mM Tris pH 7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) NP-40 |
| Tris pufer za pripravu poliakrilamidnog gela za razdvajanje | 1,5 M Tris, pH 8,8 |
| Tris pufer za pripravu poliakrilamidnog gela za sabijanje | 1,0 M Tris, pH 6,8 |

Tablica 2. Hranjive podloge za uzgoj i održavanje ljudskih tumorskih stanica i bakterija u kulturi.

| Hranjiva podloga | Sastav / proizvođač |
|---|--|
| Hranjiva podloga <i>Lebovitz's L-15</i> koji omogućuje rast stanica u okolišu bez kontrole razine CO ₂ | Thermo Fisher Scientific, SAD Nadopunjena dodatkom 10% (v/v) seruma govedeg fetusa (FBS), 100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina, 1 mM L-glutamina i 1 mM natrijevog piruvata |
| Hranjiva podloga za uzgoj stanica RPMI (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>) | Lonza, Švicarska Nadopunjena dodatkom 10% (v/v) seruma govedeg fetusa (FBS), 100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina, 1 mM L-glutamina i 1 mM natrijevog piruvata |
| Hranjiva podloga za uzgoj stanica DMEM (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) | Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD Nadopunjena dodatkom 10% (v/v) seruma govedeg fetusa (FBS), 100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina, 1 mM L-glutamina i 1 mM natrijevog piruvata |
| Krioprotektivna hranjiva podloga za zamrzavanje stanica | 45% (v/v) RPMI 1640, 45% (v/v) FBS, 10% (v/v) DMSO |
| Kruta hranjiva podloga za uzgoj bakterija <i>Luria-Bertani</i> (LB) | 5 g dm ⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm ⁻³ NaCl, 10 g dm ⁻³ tripton, 13 g dm ⁻³ agar |
| Otopina tripsina za presađivanje stanica | 0,05% (w/v) tripsin, 1 mM EDTA |
| Podloga za uklapanje stanica na predmetna stakalca | DAKO, Danska Doda se 1 µg/mL fluorescentne boje za DNA DAPI |
| Reducirana tekuća hranjiva podloga <i>Opti-MEM</i> ® | Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD |
| Tekuća hranjiva podloga za uzgoj bakterija <i>Luria-Bertani</i> (LB) | 5 g dm ⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm ⁻³ NaCl, 10 g dm ⁻³ tripton |

Proizvođači osnovnih kemikalija te komponenti koje smo koristili za nadopunjavanje tekućih hranjivih podloga prikazani su u **Tablici 3**.

Tablica 3. Osnovne kemikalije i komponente za nadopunjavanje tekućih hranjivih podloga te za tretman stanica.

| Komponenta hranjive podloge | Sastav / proizvođač |
|--|-------------------------------|
| Agar | Merck, SAD |
| Agarozna | Roche, Švicarska |
| Akrilamid / Bisakrilamid | Sigma Aldrich, SAD |
| APS, Amonijev persulfat | Sigma Aldrich, SAD |
| Bromfenol plavo | Sigma Aldrich, SAD |
| DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) | Sigma, Njemačka |
| DNaza I | Qiagen, Njemačka |
| DTT, Ditiotreitrol | Sigma Aldrich, SAD |
| EDTA, Etilendiamintetraoctena kiselina | Kemika, Hrvatska |
| Faloidin TRITC, P-1951 | Sigma, Njemačka |
| FBS, Serum govedeg fetusa (engl. <i>Fetal Bovine Serum</i>) | Sigma Aldrich, SAD |
| Kalcein – AM, 17783 | Sigma Aldrich, SAD |
| Kanamycin | Pliva, Hrvatska |
| KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 / KCl / NaCl / CaCl_2 | Kemika, Hrvatska |
| L-glutamin | Sigma Aldrich, SAD |
| Metanol / etanol / DMSO / octena kiselina / 2-propanol / glicin / glicerol / formaldehid | Kemika, Hrvatska |
| MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid) | Chemicon, SAD |
| Naftol plavo | Kemika, Hrvatska |
| Natrijev piruvat | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| NP- 40 | Calbiochem, SAD |
| Penicilin / streptomycin | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| Podloga LB za uzgoj bakterija u prahu | Sigma Aldrich, SAD |
| SDS, natrijev dodecil-sulfat | Sigma Aldrich, SAD |
| TEMED, N, N, N, N-tetrametiletildiamin | Sigma Aldrich, SAD |
| Tripsin | Sigma Aldrich, SAD |
| Tris-baza | Sigma Aldrich, SAD |
| Tween-20 | Sigma Aldrich, SAD |
| Vemurafenib (PLX4032, RG7204, #S1267) | Selleck Chemicals, SAD |

3.1.2. Komercijalno dostupni kompleti kemikalija

Popis komercijalno dostupnih kompleta kemikalija, enzima i standarda koje smo koristili pri izradi rada prikazan je u **Tablici 4**.

Tablica 4. Komercijalno dostupni kompleti, enzimi i standardi.

| Naziv kompleta | Primjena | Proizvođač |
|--|--|--|
| <i>1 Kb Plus DNA Ladder</i> | DNA-biljeg za određivanje molekulske mase nukleinskih kiselina raspona od 0,1 do 12 kb | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>BioRad Precision Plus Protein Dual Color Standard</i> | Proteinski biljeg za određivanje molekulske mase proteina raspona od 10 do 250 kDa | Bio-Rad, SAD |
| <i>Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i> | Inhibitori proteaza koji se koriste za izolaciju proteina | Roche, Švicarska |
| <i>Dharmafect Transfection Reagent 4</i> | Transfekcijski reagens | Dharmacon, SAD |
| <i>Dynabeads® Protein G</i> | Paramagnetska zrnca za određivanje interakcija endogenih proteina | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>Elektroligaza</i> | Enzim koji služi za spajanje nizova DNA katalizirajući stvaranje fosfodiesterne veze | New England BioLabs, SAD |
| <i>Emerald MAX PCR Master Mix</i> | DNA polimeraza za umnažanje odsječaka PCR | TakaraBio, Japan |
| <i>Enzimi HindIII i BamHI XhoI i EcoRI</i> | <i>FastDigest</i> restrikcijski enzimi korišteni prilikom kloniranja | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>Gateway LR Clonase II Enzyme Mix</i> | Komercijalni komplet za LR reakciju u kloniranju <i>Gateway</i> | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>Gateway™ pENTR™ / D-TOPO™ cloning kit</i> | Komercijalni komplet za kloniranje odsječaka PCR u TOPO vektor | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>GoTaq Colorless Master Mix</i> | Taq DNA polimeraza za preamplifikaciju TP53 izoformi prije reakcije qPCR | Promega, SAD |
| <i>Herculase II Fusion DNA Polymerases, #600677</i> | DNA polimeraza za umnažanje odsječaka PCR | Agilent, SAD |
| <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i> | Komercijalni komplet za reverznu transkripciju RNA u komplementarnu DNA (cDNA) | Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific SAD |
| <i>Lipofectamine 2000</i> | Transfekcijski reagens | Invitrogen, SAD |
| <i>Midori Green</i> | Fluorescentna boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina | Bulldog-Bio, SAD |
| <i>Muse Cell Cycle Reagent</i> | Reagens za stanični ciklus | Merck Millipore, SAD |
| <i>NucleoBond Xtra – plasmid Midiprep</i> | Komercijalni komplet s kolonicama za izolaciju plazmidne DNA | Macherey-Nagel, Njemačka |

Tablica 4. – nastavak – Komercijalno dostupni kompleti, enzimi i standardi.

| Naziv kompleta | Primjena | Proizvođač |
|--|--|---|
| <i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i> | Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>Protu-FLAG</i> agarozna zrnca | Komercijalni komplet za određivanje interakcija egzogenih proteina nakon prolazne transfekcije stanica u kulturi | Sigma Aldrich, SAD |
| <i>PureLink® RNA Mini Kit</i> | Komercijalni komplet s kolonicama za izolaciju ukupne RNA | Ambion, Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>QIAGEN Plasmid Maxi Kit</i> | Komercijalni komplet s kolonicama za izolaciju plazmidne DNA | QiaGen, Njemačka |
| <i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i> | Komercijalni komplet s kolonicama za izolaciju plazmidne DNA | QiaGen, Njemačka |
| <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> | Kolonice za pročišćavanje produkata reakcije PCR iz gela | QiaGen, Njemačka |
| <i>QIAquick PCR Purification Kit</i> | Komercijalni komplet s kolonicama za pročišćavanje produkata reakcije PCR | QiaGen, Njemačka |
| <i>SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i> | Kemiluminescentni reagens za detekciju signala na membrani | Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</i> | Kemiluminescentni reagens za detekciju signala na membrani | Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>Takyon Low Rox SYBR MasterMix dTTP Blue</i> | Komercijalni komplet za qPCR s nespecifičnom fluorescentnom bojom SYBR | Eurogentec, Belgija |
| <i>TaqMan Gene Expression Assay</i> | Komercijalni komplet za analizu genske ekspresije qPCR (sastoji se od neobilježenih početnica za PCR i probe <i>TaqMan</i>) | Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific SAD |
| <i>TaqMan Gene Expression Master Mix</i> | Komercijalni komplet za analizu genske ekspresije qPCR (sadrži sve osim kalupa i početnica) | Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific SAD |
| <i>Turbofect</i> | Transfekcijski reagens | Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate</i> | Kemiluminescentni reagens za detekciju signala na membrani | PerkinElmer, SAD |
| <i>Xfect</i> | Transfekcijski reagens | Takara Bio, SAD |

3.1.3. Protutijela za metode western blota, koimunoprecipitacije i imunofluorescencije

Za određivanje ekspresije proteina metodom western blota ili određivanje proteinskih interakcija metodom koimunoprecipitacije koristili smo primarna protutijela prikazana u **Tablici 5** te sekundarna protutijela prikazana u **Tablici 6**.

Tablica 5. Popis primarnih protutijela za metode western blota i koimunoprecipitacije. Razrjeđenja protutijela za metodu western blota pripravljena su u 5%-tnom mlijeku u TBST-u. Za protutijela korištena samo za metodu koimunoprecipitacije razrjeđenja nisu napisana.

| | Naziv protutijela | Porijeklo | Razrjeđenje | Proizvođač |
|---------------------|-----------------------------------|-----------|-------------|--|
| Protu-p53 | DO-1 (FL izoforme) | Miš | 1/2000 | Santa Cruz, SAD, #sc-126 |
| | SAPU (sve izoforme) | Ovca | 1/5000 | Dobiveno ljubaznošću dr. Bourdon |
| | TSR α (α izoforme) | Miš | 1/1000 | Dobiveno ljubaznošću dr. Bourdon |
| | KJC8 (β izoforme) | Kunić | 1/1000 | Dobiveno ljubaznošću dr. Bourdon |
| Protu-p73 | EP436Y (sve izoforme) | Kunić | 1/2000 | Abcam, UK, #ab40658 |
| | ER-15 (sve izoforme) | Miš | | BD Biosciences, SAD, #558785 |
| | GC-15 (sve izoforme) | Miš | | BD Biosciences, SAD, #558787 |
| | Bethyl (TA izoforme) | Kunić | | Bethyl Laboratories, SAD, #A300-126A |
| | E-4 (TA izoforme) | Miš | | Santa Cruz, SAD, #sc-17823 |
| Protu-NME | NME1/NME2 | Kunić | 1/3000 | Dobiveno ljubaznošću dr. Lascu i dr. Volarević |
| | NME1 | Miš | 1/1000 | Calbiochem, #OP48 |
| Protu-GLI | GLI1 (V812) | Kunić | 1/1000 | Cell Signaling, SAD, #2534S |
| | GLI2 | Kunić | 1/1000 | Aviva Systems Biology, UK, #ARP31885_T100 |
| | GLI2 (C-10) | Miš | 1/200 | Santa Cruz, SAD, #sc-271786 |
| | GLI3 | Kunić | 1/600 | ProteinTech, SAD, #19949-1-AP |
| EMT -biljezi | β -katenin | Miš | 1/1000 | Sigma Aldrich, SAD, #C7207 |
| | E-kadherin | Kunić | 1/1000 | Cell Signaling, SAD, #24E10 |
| | N-kadherin | Miš | 1/500 | BD Biosciences, SAD, #610920 |
| | Fibronektin | Miš | 1/200 | Santa Cruz, SAD, #sc-8422 |
| | Vimentin | Miš | 1/200 | Santa Cruz, SAD, #sc-32322 |
| Ostali | β -aktin | Miš | 1/3000 | Proteintech, SAD, #60008-1-1g |
| | FLAG M2 | Miš | 1/1000 | Sigma-Aldrich, SAD, #F1804 |
| | AKT (40D4) | Miš | 1/1000 | Cell Signaling, SAD, #2920 |
| | pAKT (Ser473) | Kunić | 1/200 | Cell Signaling, SAD, #9271 |
| | ERK1 (K-23) | Kunić | 1/1000 | Santa Cruz, SAD, #sc-94 |
| | pERK (E-4) | Miš | 1/1000 | Santa Cruz, SAD, #sc-7383 |

Tablica 6. Popis sekundarnih protutijela za metodu western blota. Razrjeđenja protutijela pripravljena su u 5%-tnom mlijeku u TBST-u. Sekundarna protutijela obilježena su peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *Horseradish peroxidase*).

| Naziv protutijela | Porijeklo | Razrjeđenje | Proizvođač |
|--|-----------|-------------|---|
| Protumišje obilježeno HRP-om | Konj | 1/5000 | Cell signaling, SAD, #7076 |
| Protukuničje obilježeno HRP-om | Koza | 1/5000 | Cell signaling, SAD, #7074 |
| Protuoščje obilježeno HRP-om | Magarac | 1/10 000 | Jackson ImmunoResearch, SAD, #713-035-003 |
| Protukuničje neobilježeno | Koza | 1/500 | Jackson ImmunoResearch, SAD, #111-035-003 |
| Protukoščje obilježeno HRP-om | Magarac | 1/3000 | Jackson ImmunoResearch, SAD, #705-005-003 |
| Protukuničje na lake lance obilježeno HRP-om | Miš | 1/10 000 | Jackson ImmunoResearch, SAD, #211-032-171 |
| Protumišje na lake lance obilježeno HRP-om | Koza | 1/10 000 | Jackson ImmunoResearch, SAD, #115-035-174 |

Popis primarnih i sekundarnih protutijela koje smo koristili za metodu imunofluorescencije nalazi se u **Tablici 7**.

Tablica 7. Popis primarnih i sekundarnih protutijela za metodu imunofluorescencije. Razrjeđenja protutijela pripravljena su u PBS-u s 10% (v/v) FBS-a.

| Naziv protutijela | Porijeklo | Razrjeđenje | Proizvođač |
|----------------------|-----------|-------------|-----------------------------|
| E-kadherin | Miš | 1/50 | Santa Cruz, SAD, #sc-8426 |
| β -katenin | Miš | 1/500 | Sigma Aldrich, SAD, #C7207 |
| Protumišje FITC | Kunić | 1/50 | Abcam, UK, #ab6724 |
| Protumišje Alexa 594 | Koza | 1/200 | Thermo Fisher, SAD, #A11005 |

3.1.4. Početnice za kloniranje i qPCR te male interferirajuće molekule RNA

Početnice koje smo koristili za umnožavanje produkata PCR izoformi gena *TP53* i *TP73* koje smo klonirali u TOPO vektor da bi dobili *Gateway* ulazni vektor (pENTR) koji sadrži naš gen od interesa prikazane su u **Tablici 8**, a početnice koje smo koristili za klasično kloniranje gena *TP53* i *TP73* u pEGFP N1 i pmCherry C1 vektore nalaze se u **Tablici 9**. Za svaki gen imamo dvije početnice, jednu obilježenu slovom F (engl. *Forward*) koja sjeda na kodon START, a drugu obilježenu slovom R (engl. *Reverse*) koja sjeda na kodon STOP kalupa DNA.

Tablica 8. Početnice za reakciju PCR uz pomoć enzima herkulaze za kloniranje u TOPO vektor. STOP u nazivu gena označava da sadrži stop-kodon na kraju sekvence.

| Plazmid | Početnica | Sekvenca |
|-----------------------------|-----------|---------------------------------------|
| p53 α | F | 5'-CACCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATC-3' |
| | R | 5'-GTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC-3' |
| p53 α STOP | F | 5'-CACCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATC-3' |
| | R | 5'-TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC-3' |
| p53 β | F | 5'-CACCATGGAGGAGCCGCAGTCAG-3' |
| | R | 5'-ACAATTTTCTTTTTGAAAGCTGGTCTGG-3' |
| p53 β STOP | F | 5'-CACCATGGAGGAGCCGCAGTCAG-3' |
| | R | 5'-TTAACAATTTTCTTTTTGAAAGCTGGTCTGG-3' |
| TAp73 β | F | 5'-CACCATGGCCCAGTCCACCGC-3' |
| | R | 5'-GGGCCCCCAGGTCCTGA-3' |
| TAp73 β STOP | F | 5'-CACCATGGCCCAGTCCACCGC-3' |
| | R | 5'-TCAGGGCCCCCAGGTCCTGA-3' |
| Δ Np73 α | F | 5'-CACCATGCTGTACGTCGGTGAC-3' |
| | R | 5'-GTGGATCTCGGCCTCCG-3' |
| Δ Np73 α STOP | F | 5'-CACCATGCTGTACGTCGGTGAC-3' |
| | R | 5'-TCAGTGGATCTCGGCCTCCG-3' |

Tablica 9. Nukleotidni slijed početnica za umnažanje gena p53 α , p53 β , Δ Np73 α i TAp73 α metodom PCR za kloniranje u plazmide pmCherry C1 i pEGFP N1.

| Plazmid | Početnica | Sekvenca |
|------------------------------------|-----------|--|
| pmCherry C1 p53 α | F | 5'-GTCTACAAGCTTCGATGGAGGAGCCGCAGTCA-3' |
| | R | 5'-GTCTACGGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC-3' |
| pmCherry C1 p53 β | F | 5'-GTCTACAAGCTTCGATGGAGGAGCCGCAGTCA-3' |
| | R | 5'-GTCTACGGATCCTTAACAATTTTCTTTTTGAAAG-3' |
| pmCherry C1 Δ Np73 α | F | 5'-GTCTACAAGCTTCGATGCTGTACGTCGGTGAC-3' |
| | R | 5'-GTCTACGGATCCTCAGTGGATCTCGGCCTC-3' |
| pmCherry C1 TAp73 α | F | 5'-GTCTACAAGCTTCGATGGCCCAGTCCACCGCC-3' |
| | R | 5'-GTCTACGGATCCTCAGTGGATCTCGGCCTC-3' |
| pEGFP N1 p53 α | F | 5'-GTCTACCTCGAGATGGAGGAGCCGCAGTCA-3' |

R 5'-GTCTACGAATTCGGTCTGAGTCAGGCCCTTC-3'

Tablica 10 prikazuje početnice koje smo koristili za reakciju preamplifikacije dugih i kratkih izoformi gena *TP53* prije reakcije qPCR. Početnice koje smo koristili za određivanje ekspresije izoformi gena *TP53* reakcijom qPCR nalaze se u **Tablici 11**. Popis ekspresijskih kompleta TaqMan koje smo koristili za određivanje ekspresije gena porodica *Nme*, *Gli* te izoformi gena *TP73* prikazan je u **Tablici 12**. Početnice koje smo koristili za određivanje ekspresije gena biljega EMT-a nalaze se u **Tablici 13**.

Tablica 10. Početnice za reakciju preamplifikacije dugih i kratkih izoformi gena *TP53*.

| Izoforme | Početnica | Sekvenca |
|-------------------------------|-----------|-----------------------------------|
| Duge (p53 i Δ40p53) | F | 5'-GTCACCTGATGAGGAGCCGCA-3' |
| | R | 5'-CTTCCCAGCCTGGGCATCCTTG-3' |
| Kratke (Δ133p53) | F | 5'-TTCCAGTTGCTTTATCTGTTCACTTGT-3' |
| | R | 5'-CTTCCCAGCCTGGGCATCCTTG-3' |

Tablica 11. Početnice za određivanje ekspresije gena *TP53*.

| Izoforma | Početnica | Sekvenca |
|-----------------|-----------|---------------------------------|
| Sve p53 | F | 5'-CCATCTACAAGCAGTCACAGCA-3' |
| | R | 5'-TTCTTGCGGAGATTCTCTTCCT-3' |
| p53α | F | 5'-AGACCTATGGAACTACTTCCT-3' |
| | R | 5'-CTCACGCCCACGGATCTGA-3' |
| p53β | F | 5'-AGACCTATGGAACTACTTCCT-3' |
| | R | 5'-AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT-3' |
| p53γ | F | 5'-AGACCTATGGAACTACTTCCT-3' |
| | R | 5'-TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG-3' |
| Δ40p53α | F | 5'-GATCCATTGGAAGGGCAGGCC-3' |
| | R | 5'-CTCACGCCCACGGATCTGA-3' |
| Δ40p53β | F | 5'-GATCCATTGGAAGGGCAGGCC-3' |
| | R | 5'-AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT-3' |
| Δ40p53γ | F | 5'-GATCCATTGGAAGGGCAGGCC-3' |
| | R | 5'-TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG-3' |
| Δ133p53α | F | 5'-ACTCTGTCTCCTTCCTTCCTACAG-3' |
| | R | 5'-CTCACGCCCACGGATCTGA-3' |
| Δ133p53β | F | 5'-ACTCTGTCTCCTTCCTTCCTACAG-3' |
| | R | 5'-AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT-3' |
| Δ133p53γ | F | 5'-ACTCTGTCTCCTTCCTTCCTACAG-3' |
| | R | 5'-TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG-3' |

Tablica 12. Popis TaqMan ekspresijskih kompleta za određivanje ekspresije gena porodica *Nme* i *Gli* te izoformi gena *TP73*. *GUSB* i *TBP* označavaju referentne gene β -glukuronidaze i proteina koji se veže uz slijed TATA (engl. *TATA-binding protein*).

| Gen | Ekspresijski komplet |
|-----------------------------------|----------------------|
| <i>Nme1</i> | Hs00264824_m1 |
| <i>Nme2</i> | Hs00897133_g1 |
| <i>Gli1</i> | Hs01110766_m1 |
| <i>Gli2</i> | Hs01119974_m1 |
| <i>Gli3</i> | Hs00609233_m1 |
| <i>TP73</i> (izoforme TA) | Hs00232088_m1 |
| <i>TP73</i> (izoforme Δ N) | Hs01065727_m1 |
| <i>GUSB</i> | Hs00939627_m1 |
| <i>TBP</i> | Hs00427620_m1 |

Tablica 13. Početnice za određivanje ekspresije gena biljega procesa EMT-a.

| Biljeg | Početnica | Sekvenca |
|--------------|-----------|------------------------------|
| <i>SNAIL</i> | F | 5'-GCTGCAGGACTCTAATCCAGA-3' |
| | R | 5'-ATCTCCGGAGGTGGGATG-3' |
| <i>SLUG</i> | F | 5'-TGGTTGCTTCAAGGACACAT-3' |
| | R | 5'-GTTGCAGTGAGGGCAAGAA-3' |
| <i>TWIST</i> | F | 5'-CCGGAGACCTAGATGTCATTGT-3' |
| | R | 5'-CCCACGCCCTGTTTCTTTGA-3' |

Tablica 14. Male interferirajuće molekule RNA (siRNA) za utišavanje ekspresije NME.

| siRNA | Naziv | Proizvođač |
|--------|---|----------------|
| siNME1 | <i>ON-TARGETplus Human NME1 siRNA-Smartpool-5nmol</i> | Dharmacon, SAD |
| siNME2 | <i>ON-TARGETplus Human NME2 siRNA-Smartpool-5nmol</i> | Dharmacon, SAD |
| siCTRL | <i>ON-TARGETplus Non-targeting siRNAs</i> | Dharmacon, SAD |

3.1.5. Uređaji, programi i potrošni materijal

Uređaji koje smo koristili za izradu rada navedeni su u **Tablici 15**, računalni programi koje smo koristili pri izradi rada navedeni su u **Tablici 16**, dok je potrošni materijal prikazan u **Tablici 17**.

Tablica 15. Uređaji koje smo koristili u izradi rada.

| Uređaj | Proizvođač |
|--|---|
| Centrifuga <i>Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital</i> | MSE, UK |
| Centrifuga tip <i>5414 R</i> | Eppendorf, Njemačka |
| Inkubator za uzgoj stanica | Kambič, Slovenija |
| Kabinet za rad u sterilnim uvjetima | Iskra, Slovenija |
| Laserski pretražni konfokalni mikroskop <i>Leica TCS SP8 X FLIM</i> | Leica Microsystems, Njemačka |
| Magnetska miješalica <i>MSH Basic</i> | Ika, Njemačka |
| Spektrofotometar <i>NanoPhotometer® N60</i> | Implen, Njemačka |
| Spektrofotometar za mikrotitarske pločice <i>ELISA Multiskan MS</i> | Labsystems, Finska |
| Sustav za elektroforezu i prijenos na membranu <i>Mini-Protean III</i> | Bio-Rad, SAD |
| Sustav za elektroforezu <i>Mini-Protean II</i> | BioRad, SAD |
| Sustav za prijenos proteina <i>Mini Trans-Blot</i> | BioRad, SAD |
| Termoblok <i>Thermomixer Comfort</i> | Eppendorf, Njemačka |
| Tresilica za bakterije <i>Unimax 1010</i> | Heidolph, Njemačka |
| Ultrazvučna sonda za izolaciju proteina | Labsonic® M, Montreal Biotech, Kanada |
| Ultrazvučni sonikator <i>Labsonic® M</i> i sonda promjera 1 mm | Montreal Biotech, Kanada |
| Uređaj za analizu staničnog ciklusa <i>Muse Cell Analyzer</i> | Merck Millipore, SAD |
| Uređaj za detekciju signala na membrani <i>Alliance 4.7</i> | UVItec Cambridge, UK |
| Uređaj za elektroforezu u agaroznom gelu <i>Wide Mini-Sub Cell GT</i> ili <i>Sub-Cell GT</i> | BioRad, SAD |
| Uređaj za PCR <i>2720 Thermal Cycler</i> | Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD |
| Uređaj za PCR <i>GeneAmp PCR System 2700</i> | Applied Biosystems, SAD |
| Uređaj za qPCR <i>Applied Biosystems 7300</i> | Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD |
| Uređaj za qPCR <i>CFX96 Real-Time PCR</i> | BioRad, SAD |
| Vaga tip <i>PM 4000</i> | Mettler Toledo, SAD |
| Zibalica <i>Gyro-rocker SSL3</i> | Stuart®, Cole-Parmer Ltd., UK |

Tablica 16. Računalni programi koje smo koristili u izradi rada.

| Program | Proizvođač |
|--|---|
| <i>Bio-Rad CFX Manager 3.1</i> | BioRad, SAD |
| <i>ImageJ Fiji</i> | National Institutes of Health, SAD |
| <i>Leica Application Suite X (LAS X) 3.3.0.16799</i> | Leica Microsystems, Njemačka |
| <i>MATLAB</i> | MathWorks, SAD |
| <i>MedCalc</i> | MedCalc Software Ltd, Belgija |
| <i>Microsoft Office Excel 2016</i> | Microsoft Corporation, SAD |
| <i>Photoshop CS4</i> | Adobe Inc, SAD |
| <i>Prism 7.04</i> | GraphPad, SAD |
| <i>SnapGene</i> | GSL Biotech LLC, SAD |
| <i>StepOne Software v2.3</i> | Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD |
| <i>SymPhoTime64</i> | PicoQuant, Njemačka |
| <i>UVIBand</i> | UVItec Cambridge, UK |

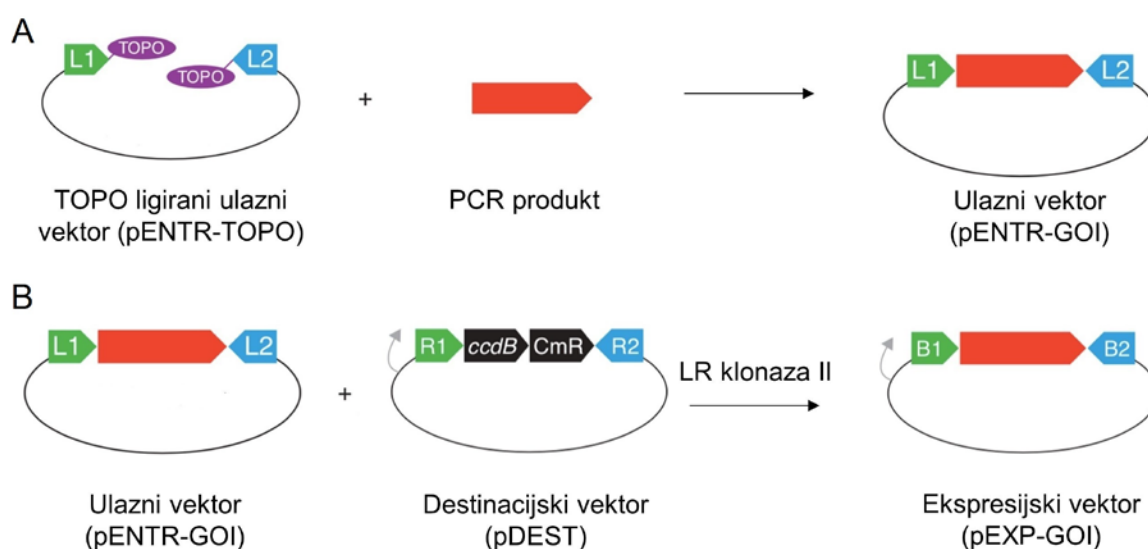
Tablica 17. Laboratorijski pribor i potrošni materijal.

| Materijal | Proizvođač |
|---|-----------------------------|
| Ampule za smrzavanje stanica od 2 mL | Greiner Bio-One, Njemačka |
| Mikroeprovete za PCR | Sarstedt, Njemačka |
| Mikroeprovete, od 1,5 ili 2,0 mL | Eppendorf, Njemačka |
| Neubauerova komorica za brojanje stanica | Neubauer, Blaubrand |
| Nitrocelulozna membrana za vezanje proteina, Amersham Protran 0,2 μ m | Whatman, GE Healthcare, USA |
| Petrijeve zdjelice promjera 3 cm s 4 bunarića i staklenim dnom za konfokalnu mikroskopiju | Cellvis, SAD |
| Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 ili 6 cm | Falcon, SAD |
| Plastične epruvete od 15 ili 50 mL | Falcon, SAD |
| Plastični inserti za migraciju po principu Boydenovih komorica s veličinom pora 8,0 μ m | Falcon, SAD |
| Pločice za PCR s 96 bunarića | Falcon, SAD |
| Pločice za uzgoj kulture stanica s 6, 24 ili 96 bunarića | Falcon, SAD |
| Predmetno stakalce s osam bunarića i odvojjivim silikonskim pregradama | Ibidi, Njemačka |

3.2. Metode manipulacije DNA

3.2.1. Kloniranje Gateway®

Sustav *Gateway* metoda je s velikom protočnošću osmišljena za brzo kloniranje velikog broja gena u vektore s različitim karakteristikama. Sustav se temelji na rekombinacijskom sustavu bakteriofaga lambda zahvaljujući kojemu nije potrebno korištenje restriksijskih enzima što uvelike ubrzava proces kloniranja. Prvi korak priprema je ulaznih vektora (pENTR) koji sadrže gen od interesa (GOI). Postoji nekoliko metoda za pripremu ulaznih vektora. Jedna od njih je reakcija BP pomoću koje se GOI umnoži početnicama koje sadrže attB mjesta rekombinacije te se pomoću klonaze BP rekombinira s donorskim vektorom (pDONR) koji sadrži mjesta rekombinacije attP. Druga metoda, ujedno i korištena u ovom radu, temelji se na aktivnosti DNA topoizomeraze I. Kod TOPO-kloniranja, linearizirani ulazni vektor, kovalentno vezan enzimom topoizomeraza na oba 3'-kraja (pENTR-TOPO), koristi se za efikasnu ligaciju produkta PCR u brznoj reakciji. Kao i kod pripreme ulaznih vektora, i kod pripreme ekspresijskih vektora postoji nekoliko strategija. Mi smo koristili reakciju klonazom LR u kojoj dobiveni ulazni vektor, koji sadrži GOI te ima attL mjesta rekombinacije, u reakciji s destinacijskim vektorom (pDEST), koji sadrži mjesta rekombinacije attR, daje ekspresijski vektor. Destinacijski vektor sadrži gen *ccdB* koji kodira za protein toksičan za bakterije te ako ne dođe do rekombinacije, bakterije koje sadrže destinacijski vektor neće izrasti na ploči nakon transformacije. Korištene metode shematski su prikazane na **Slika 11**.



Slika 11. Shematski prikaz kloniranja Gateway koji smo koristili za uspostavljanje EGFP i mCherry ekspresijskih vektora. A) Ulazni vektor kreiran je pomoću vektora TOPO i produkta PCR gena od interesa (GOI). B) Ekspresijski vektor dobiven je rekombinacijom ulaznog vektora koji nosi naš GOI i destinacijskog vektora u reakciji LR pomoću klonaze LR. Preuzeto i prilagođeno prema F. Katzen i suradnici (2007) [117].

3.2.1.1. Priprema ulaznih vektora (*Gateway*® Entry vektor, pENTR)

Odsječak PCR umnožili smo pomoću enzima *Herculase II*. Reakciju PCR pripremili smo pipetiranjem 10-20 ng plazmidne DNA kao kalupa, 5 μ L 5 \times pufera, 0,25 μ L dNTP, 0,75 μ L svake od početnica (F i R, c = 10 μ M), 0,75 μ L enzima te nadopunili mQH₂O do volumena od 25 μ L. Reakcija se odvijala u uređaju za PCR *GeneAmp 2700* prema uvjetima prikazanim u **Tablici 18**.

Tablica 18. Uvjeti PCR koje smo koristili za umnožavanje gena za pripremu ulaznih vektora kod kloniranja *Gateway*.

| Broj ciklusa | Ciklus | Temperatura/°C | Vrijeme/min |
|--------------|----------------------|----------------|-------------|
| 1 | Početna denaturacija | 95 | 2 |
| 25 | Denaturacija | 98 | 0,33 (20") |
| 25 | Sparivanje | 62* | 0,33 (20") |
| 25 | Sinteza | 72 | 2** |
| 1 | Završna sinteza | 72 | 3 |
| 1 | Kraj reakcije | 4 | ∞ |

* - temperatura sparivanja početnica je $T_m - 5$ °C

** - vrijeme sinteze ovisi o veličini PCR fragmenta, uzima se 1 min za 1 kb

TOPO-reakciju pripremili smo pipetiranjem 0,5 μ L *Gateway* vektora TOPO, 0,5 μ L produkta PCR, 1 μ L otopine soli te nadopunili mQH₂O do volumena od 6 μ L. Reakcija se odvijala 5 min na sobnoj temperaturi, a u slučaju da je produkt PCR veći od 1 kb vrijeme reakcije produžili smo do 30 min. Nakon reakcije pristupili smo transformaciji bakterijskih stanica (poglavlje 3.2.4).

3.2.1.2. Priprema ekspresijskih vektora

Nakon kloniranja ulaznog vektora (pENTR), prebacivanje GOI u bilo koji od ekspresijskih vektora vrlo je jednostavno. Pomiješali smo ulazni vektor i destinacijski vektor u odgovarajućem puferu s enzimom LR klonaza prema uputama proizvođača. Reakciju smo inkubirali najmanje 1 sat pri 25 °C te inaktivirali dodatkom proteinaze K 10 min pri 37 °C. Nakon toga smjesa je spremna za bakterijsku transformaciju.

3.2.2. Klasično kloniranje

Pomoću DNA polimeraze iz komercijalnog kompleta *Emerald Master Mix* koristeći početnice specifične za gene p53 α , p53 β , Δ Np73 α i TAp73 α umnožili smo navedene gene iz plazmida

pcDNA3. Početnice sadrže restrikcijska mjesta za enzime HindIII i BamHI za kloniranje u plazmid pmCherry-C1 te restrikcijska mjesta za enzime XhoI i EcoRI za kloniranje u plazmid pEGFP-N1. Kod dizajna početnica vodili smo pažnju da okvir čitanja našeg gena od interesa ostane u okviru čitanja gena fluorescentnog proteina i obrnuto. Smjesu za svaku reakciju pripremili smo miješanjem 25 μL *Emerald Master Mix*a, po 2 μL obje početnice (F i R, c = 10 μM), 50 ng plazmidnog kalupa te nadopunili mqH₂O do 50 μL . Reakcija PCR odvijala se u uređaju *GeneAmp 2700*. Uvjeti su prikazani u **Tablici 19**.

Tablica 19. Uvjeti PCR koje smo koristili kod umnožavanja gena za klasično kloniranje.

| Broj ciklusa | Ciklus | Temperatura/°C | Vrijeme/min |
|--------------|----------------------|----------------|-------------|
| 1 | Početna denaturacija | 95 | 1 |
| 30 | Denaturacija | 95 | 0,5 |
| 30 | Sparivanje | 65* | 0,5 |
| 30 | Sinteza | 72 | 2** |
| 1 | Završna sinteza | 72 | 5 |
| 1 | Kraj reakcije | 4 | ∞ |

* - temperatura sparivanja početnica je $T_m - 5^\circ\text{C}$

** - vrijeme sinteze ovisi o veličini PCR fragmenta, uzima se 1 min za 1 kb

Nakon reakcije PCR, produkt smo razdvojili elektroforezom u agaroznom gelu (poglavlje 3.2.7) i pročistili pomoću komercijalnih kolonica *QIAquick Gel Extraction Kit* prema protokolu za izolaciju iz gela. Ukoliko su koncentracije pročišćenog produkta PCR bile između 50-100 ng/ μL pristupili smo restrikcijskoj razgradnji. Za razgradnju „praznog“ plazmida pmCherry-C1 ili pEGFP-N1 u restrikcijsku smjesu ukupnog volumena 30 μL stavili smo 3 μg plazmida, po 1 μL svakog od enzima (HindIII/BamHI ili XhoI/EcoRI) te 3 μL 10 \times pufera za razgradnju. Za razgradnju produkta PCR u 25 μL produkta dodali smo po 1 μL svakog od enzima (HindIII/BamHI ili XhoI/EcoRI) i 3 μL 10 \times pufera za razgradnju. Reakcija je tekla 40 min pri 37 $^\circ\text{C}$ nakon čega smo ju inaktivirali 10 min pri 80 $^\circ\text{C}$. Pročistili smo reakcijsku smjesu kroz kolonicu iz komercijalnog kompleta *QIAquick PCR Purification Kit*, eluirali u 30 μL mqH₂O te izmjerili koncentraciju razgrađenog produkta PCR i razgrađenog vektora. Koristeći kalkulator NEB (New England BioLabs, <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) za izračun ligacijske smjese, odredili smo koliko se inserta i vektora treba koristiti za 150 ng ukupne DNA uz uvjet da je omjer insert:vektor = 3:1. Otpipetirali smo dobivenu količinu vektora i inserta te nadopunili mqH₂O do 5 μL . Zatim smo dodali 5 μL ligacijskog pufera i 1 μL ligaze. Ligacijska smjesa se inkubirala 30 min na

sobnoj temperaturi nakon čega se enzim inaktivirao 15 min pri 65 °C. Ligacijsku smjesu smo spremili pri -20 °C ako smo ju koristili u roku od tjedan dana ili smo odmah pristupili bakterijskoj transformaciji (poglavlje 3.2.4).

3.2.3. Priprema kemokompetentnih stanica *E. coli*

Za pripremu kemokompetentnih bakterija *E. coli* inokulirali smo 5 µL bakterija u 50 mL svježe tekuće hranjive podloge LB i treskali u tresilici pri 37 °C do OD₆₀₀ vrijednosti od 0,3 – 0,4. Alikvotirali smo po 25 mL bakterijske kulture i držali na ledu 10 – 20 min. Slijedilo je centrifugiranje pri 6000 × g 5 min. Supernatant smo odbacili, a taloge resuspendirali u 12,5 mL 50 mM CaCl₂ ohlađenog na 4 °C i ostavili na ledu 20 min. Opet je slijedilo centrifugiranje 5 min pri 6000 × g. Supernatant smo odbacili, a taloge resuspendirali u 2,5 mL otopine A (25 mL 0,1 M CaCl₂, 20 mL H₂O, 5 mL glicerola) i ostavili na ledu preko noći. Idući dan alikvotirali smo po 50 µL pripremljenih bakterija u sterilne mikroeprovete i spremili u zamrzivač na -80 °C.

3.2.4. Transformacija stanica *E. coli*

Transformaciju kemokompetentnih bakterijskih stanica toplinskim šokom izveli smo tako da smo u alikvot bakterijskih stanica od 50 µL dodali otprilike 100 ng plazmidne DNA te inkubirali najmanje 5 min na ledu što je omogućilo adsorpciju DNA na površinu bakterijske stanice. Nakon toga izazvali smo toplinski šok od 45 s pri 42 °C koji je uzrokovao unos strane DNA u bakterijsku stanicu. Smjesu smo vratili 2 min na led nakon čega smo dodali 500 µL tekuće hranjive podloge za opravak (podloga LB bez dodanih antibiotika) i treskali u tresilici 45-60 min pri 37 °C. Određeni volumen bakterijske smjese (npr. 100 i 500 µL) razmazali smo na agarozne ploče s antibiotikom tako da smo nakon inkubacije preko noći pri 37 °C dobili pojedinačne kolonije. Ploče smo spremili na 4 °C kako bismo spriječili daljnji rast bakterijskih kolonija i stvaranje tzv. satelitnih kolonija te smo ih na taj način mogli čuvati idućih nekoliko tjedana. Za izolaciju plazmidne DNA inkubirali smo pojedinačne kolonije u tekućoj hranjivoj podlozi LB s prikladnim antibiotikom, stavili u tresilicu pri 37 °C preko noći te nastavili kako je opisano u poglavlju 3.2.5. Ukoliko je došlo do uspješne transformacije, određeni alikvot transformiranih bakterijskih stanica smo pomiješali s 50%-tnom vodenom otopinom glicerola (v/v) u omjeru 1:1. Na taj način mogli smo pohraniti transformirane bakterije na dulje vrijeme pri -80 °C.

3.2.5. Izolacija plazmidne DNA

Izolaciju plazmidne DNA proveli smo korištenjem komercijalnih kompleta prema uputama proizvođača. Nakon izolacije odredili smo koncentraciju plazmidne DNA (poglavlje 3.2.6) te provjerili uzorak na gel elektroforezi (poglavlje 3.2.7) kako bismo molekulsku masu izoliranog plazmida usporedili s molekulskom masom ishodnog plazmida.

3.2.6. Određivanje koncentracije DNA i RNA

Koncentraciju plazmidne DNA i ukupne RNA odredili smo spektrofotometrom *NanoPhotometer® N60*. Kao slijepu probu koristili smo 1 μ L otopine za eluciju DNA ili RNA (mqH₂O ili pufer za eluiranje), dok je za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina bio potreban 1 μ L uzorka. Koncentraciju smo odredili očitavanjem apsorbancije na 260 nm, valnoj duljini na kojoj nukleinske kiseline apsorbiraju zračenje. Čistoću uzorka provjerili smo očitavanjem omjera apsorbancija na 260 i 280 nm te 260 i 230 nm (A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}). Vrijednost A_{260}/A_{280} za čistu DNA iznosi oko 1,8, a za čistu RNA oko 2,0. Ako je vrijednost A_{260}/A_{230} u rasponu od 2,0 do 2,2 smatrali smo da su nukleinske kiseline dovoljno čiste. Kvalitetu smo dodatno provjerili elektroforezom u agaroznom gelu (poglavlje 3.2.7).

3.2.7. Elektroforeza u agaroznom gelu

Agarozni gel za razdvajanje nukleinskih kiselina pripremili smo otapanjem agaroze u puferu TAE uz zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici. Kada se sva agarozna otopila u puferu i smjesa malo ohladila, dodali smo boju za detekciju nukleinskih kiselina *Midori Green*. Ovisno o veličini plazmida ili odsječaka PCR koji razdvajamo koristili smo gel različite gustoće (0,8% – 2%). Uzorke smo pripremili miješanjem s 5 \times puferom za nanošenje uzorka na gel tako da je konačna koncentracija pufera bila 1 \times . U jednu jažicu nanijeli smo biljeg DNA za određivanje molekulske mase nukleinskih kiselina raspona od 0,1 do 12 kb (*1 Kb Plus DNA Ladder*). Elektroforeza se provodila u uređaju *Wide Mini-Sub Cell GT* ili *Sub-Cell GT*.

3.2.8. Kvantitativni PCR (qPCR)

Metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR) odredili smo razinu ekspresije gena u uzorku. Dvije su uobičajene metode za detekciju produkta PCR u stvarnom vremenu. Jedna je korištenje nespecifičnih fluorescentnih boja koje se interkaliraju u dvolančanu molekulu DNA (*SYBR green*), a druga podrazumijeva korištenje specifičnih hidrolizirajućih sonda DNA obilježenih fluorescentnom bojom (*TaqMan*). Nespecifične fluorescentne boje fluoresciraju samo kada su

interkalirane u dvolančanu DNA, a specifične sonde fluoresciraju kada Taq polimeraza odcijepi fluorofor sa sonde zahvaljujući svojoj 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti. Prednost nespecifičnih u odnosu na specifične sonde je to što zahtijevaju samo par početnica kako bismo mogli pratiti amplifikaciju reakcije (fluorescentna boja je ista za bilo koji gen), a nedostatak što su manje specifične, tj. interkaliraju se u bilo koji produkt PCR, pa tako i dimer početnica. Prvi korak metode bila je izolacija ukupne RNA iz uzorka iz koje smo zatim sintetizirali komplementarnu DNA (cDNA). Svakim ciklusom reakcije količina produkta PCR eksponencijalno je rasla. Ciklus u kojemu je fluorescencija prešla prag detekcije naziva se vrijednost Ct (engl. *threshold cycle*). Ukoliko je neki gen bio jače eksprimiran, prije bi prešao prag detekcije te je njegova vrijednost Ct bila manja u odnosu na manje eksprimirani gen. Vrijednost Ct normalizirali smo u odnosu na referentni gen te smo razinu ekspresije izražavali kao promjenu ekspresije u odnosu na referentni gen i računali prema formuli

$$2^{-\Delta Ct}$$

u kojoj je

$$\Delta Ct = Ct(\text{ciljni gen}) - Ct(\text{referentni gen}).$$

3.2.8.1. Izolacija ukupne RNA

Sve korake prikupljanja stanica i izolacije RNA obavljali smo na ledu i u centrifugi ohlađenoj na 4 °C. Stanice iz kojih smo izolirali RNA postrugali smo pomoću sterilne strugalice u PBS-u i centrifugirali 5 min pri 300 × g. Supernatant smo bacili, a talog stanica pohranili pri -80 °C ako s izolacijom RNA nismo započinjali odmah. Koristili smo komplet za izolaciju (*PureLink® RNA Mini Kit*) uz tretman DNazom I prema uputama proizvođača. Izoliranu RNA pohranili smo pri -80 °C. Koncentraciju RNA odredili smo kako je opisano u poglavlju 3.2.6.

3.2.8.2. Sinteza cDNA iz ukupne RNA

Iz ukupne RNA sintetizirali smo cDNA metodom reverzne transkripcije koristeći komercijalni komplet (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*) prema uputama proizvođača. Reakcija se odvijala u uređaju za PCR *GeneAmp 2700* prema uvjetima: 10 min pri 25 °C, 120 min pri 37 °C, 5 min pri 85 °C te beskonačno pri 4 °C. Ako smo u reakciju krenuli s 2 µg RNA, u 20 µL reakcijske smjese dobili smo 100 ng/µL cDNA koju smo razrijedili do koncentracije od 25 ng/µL.

3.2.8.3. Ekspresija izoformi gena *TP53*

Razinu ekspresije pojedinih izoformi gena *TP53* proveli smo metodom qPCR u dva koraka. U prvom koraku, metodi preamplifikacije, umnožili smo 9 različitih izoformi mRNA koje smo podijelili na duge (p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ) i kratke (Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ). Preamplifikaciju smo proveli koristeći polimerazu Taq DNA iz kompleta *GoTaq Colorless Master Mix*. Pipetirali smo 12,5 μ L navedenog Master Mixa, 1 μ L cDNA za duge izoforme (25 ng kalupa cDNA) ili 2 μ L cDNA za kratke izoforme (50 ng kalupa cDNA), po 1 μ L svake od početnica (F i R, c = 10 μ M) te smo nadopunili vodom do 25 μ L. Reakcija se odvijala u uređaju za PCR 2720 *Thermal Cycler* prema uvjetima prikazanima u **Tablici 20**.

Tablica 20. Uvjeti za reakciju PCR preamplifikacije dugih i kratkih izoformi gena *TP53*.

| Broj ciklusa | Ciklus | Temperatura/°C | Vrijeme |
|--------------|----------------------|----------------|----------|
| 1 | Početna denaturacija | 95 | 3' |
| 35 | Denaturacija | 94 | 30" |
| 35 | Sparivanje | 60 | 40" |
| 35 | Sinteza | 72 | 90" |
| 1 | Završna sinteza | 72 | 7' |
| 1 | Kraj reakcije | 4 | ∞ |

Nakon reakcije uzorke smo razrijedili u omjeru 1:400 za duge izoforme i 1:200 za kratke izoforme. Za reakciju qPCR uzeli smo 5 μ L mastermiksa iz kompleta *Takyon™ Low ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP*, 0,4 μ L svake od početnica (F i R, c = 10 μ M), 1 μ L razrijeđenog preamplificiranog uzorka te smo nadopunili vodom do 10 μ L. Reakcija za svaki uzorak odvijala se u duplikatu, a za svaki gen napravili smo negativnu kontrolu bez dodatka cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju za qPCR *CFX96* prema uvjetima prikazanima u **Tablici 21**.

Tablica 21. Uvjeti za reakciju PCR za određivanje ekspresije gena *TP53*. Zadnji korak, taljenje, označava reakciju taljenja odsječaka PCR u rasponu od 72 – 95 °C s porastom od 0,5 °C svakih 5 s.

| Broj ciklusa | Ciklus | Temperatura/°C | Vrijeme |
|--------------|----------------------|----------------------|---------|
| 1 | Početna denaturacija | 95 | 3' |
| 40 | Denaturacija | 95 | 15" |
| 40 | Sparivanje | 63 | 20" |
| 40 | Sinteza | 72 | 10" |
| 1 | Taljenje | 72 – 95 (porast 0,5) | 5" |

3.2.8.4. Ekspresija gena porodica *Nme* i *Gli* te izoformi gena *TP73*

Ekspresiju gena porodica *Nme* i *Gli* odredili smo korištenjem *TaqMan* ekspresijskih kompleta (**Tablica 12**). U reakcijsku smjesu pipetirali smo 10 μL *TaqMan Gene Expression Master Mix*, 1 μL *TaqMan Gene Expression Assay*, 4 μL kalupa cDNA (100 ng) te nadopunili vodom do volumena od 20 μL . Reakcija za svaki uzorak odvijala se u duplikatu, a za svaki gen napravili smo negativnu kontrolu bez dodatka cDNA. Kao referentni gen koristili smo β -glukuronidaza (*GUSB*) i gen za protein koji se veže za TATA slijed (*TBP*). Uvjeti reakcije PCR bili su sljedeći: 10 min pri 95 °C te 40 ciklusa od 15 s pri 95 °C i 1 min pri 60 °C. Reakcija se odvijala u uređaju za qPCR *Applied Biosystems 7300*.

3.2.8.5. Ekspresija gena uključenih u proces EMT-a

Kako bismo izveli reakciju qPCR pipetirali smo 5 μL mastermiksa iz kompleta *Takyon™ Low ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP*, 0,4 μL svake od početnica (F i R, c = 10 μM), 1 μL razrijeđenog preamplificiranog uzorka te nadopunili vodom do 10 μL . Reakcija za svaki uzorak odvijala se u duplikatu, a za svaki gen napravili smo negativnu kontrolu bez dodatka cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju za qPCR *CFX96* prema uvjetima prikazanim u **Tablici 22**.

Tablica 22. Uvjeti za reakciju PCR za određivanje ekspresije biljega EMT-a. Zadnji korak, taljenje, označava reakciju taljenja PCR fragmenata u rasponu od 72 – 95 °C s porastom od 0,5 °C svakih 5 s.

| Broj ciklusa | Ciklus | Temperatura/°C | Vrijeme |
|--------------|----------------------|----------------------|---------|
| 1 | Početna denaturacija | 95 | 3' |
| 40 | Denaturacija | 95 | 15" |
| 40 | Sparivanje | 63 | 20" |
| 40 | Sinteza | 72 | 10" |
| 1 | Taljenje | 72 – 95 (porast 0,5) | 5" |

3.3. Rad s kulturom stanica

3.3.1. Kultura ljudskih stanica raka

U izradi ovog rada koristili smo stanične linije melanoma čovjeka prikazane u **Tablici 23**, koje su dobivene ljubaznošću dr. sc. Danielea Bergamaschija (Blizard Institute, London, UK). Osim navedenih stanica, koristili smo staničnu liniju H1299 (metastaza malih stanica karcinoma pluća, ATCC® CRL-5803™) s djelomičnom homozigotnom delecijom gena *TP53*, za ekspresiju proteina porodice p53 koje smo koristili kao proteinske standarde u metodi western blota te staničnu liniju HeLa (rak grlića maternice, ATCC® CCL-2™) koju smo koristili za prilagodbu metode FRET/FLIM za rad na humanim stanicama. Stanice su rasle pričvršćene za podlogu zdjelice u tekućoj hranjivoj podlozi za uzgoj stanica RPMI (melanomi) ili DMEM (H1299 i HeLa). Uzgajale su se u vlažnoj atmosferi pri konstantnim uvjetima od 37 °C i 5% CO₂ u inkubatoru za uzgoj stanica. Rad u kulturi stanica izvodili smo u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima.

Tablica 23. Stanične linije melanoma čovjeka. A375M je stanična linija metastatskog melanoma, dok je WM793B stanična linija primarnog melanoma. Obje linije sadrže divlji tip proteina p53 i mutirani protein BRAF (p. V600E).

| Stanična linija | ATCC® | Porijeklo | Status p53 | Status BRAF | Hranjiva podloga |
|-----------------|-----------|---------------------|------------|---------------------|------------------|
| A375M | CRL_1619™ | Metastatski melanom | Divlji tip | c.1799T>A (p.V600E) | RPMI 1640 |
| WM793B | CRL_2806™ | Primarni melanom | Divlji tip | c.1799T>A (p.V600E) | RPMI 1640 |

3.3.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Stanicama u kulturi mijenjali smo tekuću hranjivu podlogu svaka dva do tri dana. Kada bi narasle do 90% popunjenosti zdjelice, stanice smo presađili postupkom koji nazivamo tripsinizacija. Najprije smo uklonili hranjivu podlogu, zatim isprali fosfatnim puferom PBS te dodali 1 mL otopine tripsina i ostavili da djeluje 3 min u inkubatoru. Kada smo stanice odvojili, resuspendirali smo ih u 3 mL tekuće hranjive podloge. Ukoliko smo ih samo održavali u kulturi, ostavili bi 1/10 stanica u zdjelici i nadopunili novom tekućom hranjivom podlogom. Ukoliko smo nasadivali određeni broj stanica za daljnje eksperimente, stanice bismo izbrojali (vidi poglavlje 3.3.5).

3.3.3. Uspostavljanje otpornih staničnih linija

Stanične linije otporne na vemurafenib (A375M R1, A375M R2, WM793B R1 i WM793B R2) uzgajali smo iz parentalnih staničnih linija osjetljivih na vemurafenib (A375M i WM793B) višemjesečnim tretmanom vemurafenibom. Parentalne stanice koje smo tretirali vemurafenibom nasadili smo u maloj gustoći (tako da budu približno 20% konfluentne), tekuću hranjivu podlogu smo im mijenjali tri puta na tjedan, a presadili smo ih kada bi postigle punu konfluenciju. Kako bismo stvorili staničnu liniju A375M otpornu na vemurafenib, stanice smo uzgajali u tekućoj hranjivoj podlozi s postupno rastućom koncentracijom vemurafeniba (0,5; 0,75; 0,8; 0,9 i 1 μM) tijekom 8 tjedana. Stanice su nakon toga održavane u tekućoj podlozi s 1 μM (A375M R1) ili 2 μM (A375M R2) vemurafenibom. Kako bismo stvorili staničnu liniju WM793B otpornu na vemurafenib, stanice smo uzgajali u tekućoj podlozi s 3 μM vemurafenibom jedan tjedan, a tijekom idućih sedam tjedana bile su izložene 4 μM vemurafenibu. Pojavu otpornosti na vemurafenib potvrdili smo testom MTT (vidi poglavlje 3.3.8). Linije R1 uzgajali smo u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom 2-7 mjeseci, a linije R2 u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom 7-12 mjeseci.

3.3.4. Zamrzavanje i odmrzavanje stanica

Zamrzavanje stanica počeli smo tripsinizacijom, potom smo resuspendirali stanice u 5 mL tekuće hranjive podloge i prebacili u sterilnu staklenu epruvetu. Ostavili smo na ledu 30 min i nakon toga centrifugirali 5 min pri temperaturi od 4 °C na 300 × g. Nakon centrifugiranja odlili smo supernatant, a talog stanica resuspendirali u 1 mL krioprotektivne hranjive podloge za smrzavanje stanica. Stanice smo prebacili u ampule za smrzavanje i pohranili na temperaturi od -80 °C (najviše nekoliko mjeseci), a za duže skladištenje u tekući dušik.

Tek odležene stanice iz ampula za smrzavanje prebacili smo u sterilnu epruvetu s 5 mL tekuće hranjive podloge. Stanice smo centrifugirali 5 min pri temperaturi od 4 °C na 300 × g, supernatant odlili te smo talog stanica resuspendirali u tekućoj hranjivoj podlozi za uzgoj stanica i prebacili u sterilnu zdjelicu.

3.3.5. Brojanje stanica

Za brojanje stanica nakon tripsinizacije koristili smo Neubauerovu komoricu. Tripsinizirane stanice, resuspendirane u 3 mL tekuće hranjive podloge, razrijedili smo pet puta u tripanskom modrilu tako da smo pomiješali 20 μL stanica sa 80 μL tripanskog modrila. Žive stanice aktivno izbacuju boju izvan stanice i ostaju nebojane dok se u mrtvim stanicama boja nakuplja. Suspenziju stanica s tripanskim modrilom nanijeli smo na komoricu za brojenje

stanica ispod pokrovnog stakalca. Stanice smo izbrojali u ukupno 4 kvadranta, a svaki kvadrant se sastoji od 16 kvadratića. Ukupni broj stanica po mililitru izračunali smo prema formuli:

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

3.3.6. Prolazna transfekcija ljudskih tumorskih stanica u kulturi

Stanice smo nasadili 24 sata prije prolazne transfekcije u određenom broju kako bismo na dan transfekcije bile 80 do 90% konfluentne. Staničnu liniju A375M transficirali smo korištenjem komercijalnog kompleta *Turbofect*, a staničnu liniju WM793B korištenjem komercijalnog kompleta *Xfect* prema uputama proizvođača.

3.3.7. Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim molekulama RNA

Prolaznu transfekciju stanica malim interferirajućim molekulama RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*) koristili smo kako bismo utišali gene *NME1* i *NME2*, tj. spriječili translaciju transkripata mRNA. Metodom direktnog utišavanja na adherentnim stanicama proveli smo transfekciju siRNA prema uputama proizvođača *Dharmacon*. Za provjeru utišavanja metodom western blota skupili smo stanice 48 i 72 sata nakon transfekcije. Dio stanica ponovno smo nasadili te skupili 96 sati poslije za provjeru uspješnosti utišavanja u dužem vremenskom periodu potrebnom za metodu MTT.

3.3.8. Određivanje stanične vijabilnosti testom MTT

Test MTT kolorimetrijska je metoda određivanja preživljenja stanica nakon tretmana kemijskim agensima. MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) žuti je spoj topljiv u vodi koji se u živim, metabolički aktivnim stanicama pomoću enzima sukcinat-dehidrogenaze reducira u ljubičaste kristale formazana. Kako formazan nije topljiv u vodi, otapamo ga dodatkom DMSO. Spektrofotometrijski se izmjeri apsorbancija otopina pri 570 nm koja je proporcionalna koncentraciji nastalog formazana, a koncentracija formazana je razmjerna broju živih stanica.

Kako bismo odredili letalnu dozu pri kojoj 50% stanica umire (IC50, engl. *inhibitory concentration*), stanice smo nasadili na pločicu s 96 bunarića. Nasadili smo između $2,0$ do $2,5 \times 10^4$ stanica ovisno o staničnoj liniji i podlinijama osjetljivim na vemurafenib. Stanice smo tretirali 24 sata nakon nasađivanja dodatkom rastućih koncentracija agensa. Potrebno je staviti

barem deset koncentracija agensa, netretirane stanice i slijepu probu. Netretirane stanice rastu u tekućoj hranjivoj podlozi za uzgoj stanica i predstavljaju negativnu kontrolu, a bunarići bez nasadenih stanica su slijepa proba i tamo se samo dodaje MTT. Sve stanice smo nasadili u kvadriplikatima te one predstavljaju jedan biološki uzorak. Stanice smo ostavili u tretmanu 72 sata te smo iz bunarića uklonili tekuću hranjivu podlogu i dodali 40 μL otopine MTT ($\gamma = 0,5 \text{ g dm}^{-3}$). Nakon trosatne inkubacije uzoraka u pločici pri 37 °C, u bunariće smo dodali po 170 μL DMSO i pločice smo potom stavili na tresilicu 5 min kako bi se sav formazan otopio. Apsorbanciju otopina pri valnoj duljini od 570 nm izmjerili smo na spektrofotometru za mikrotitarske pločice. Postotak preživljenja stanica na temelju srednjih vrijednosti kvadriplikata očitanih apsorbancija izračunali smo prema formuli:

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

Vrijednosti IC50 izračunali smo u programu *GraphPad Prism 7.04*.

3.3.9. Analiza staničnog ciklusa metodom protočne citometrije

Za analizu staničnog ciklusa metodom protočne citometrije nasadili smo 2×10^5 stanica po bunariću u pločici sa 6 bunarića. Idući dan tretirali smo ih protutumorskim lijekom koji uzrokuje dvolančane lomove u molekuli DNA, etopozidom i inhibitorom proteina GLI1/2, GANTOM-61 te smo ostavili jedan bunarić netretiranih stanica. Stanice smo, 24 sata nakon tretmana, isprali PBS-om, tripsinizirali i centrifugirali 5 min na $300 \times g$. Supernatant smo odbacili, isprali u PBS-u te ponovili korak centrifugiranja. Stanični talog smo resuspendirali u 50 μL PBS-a te dodavali kap po kap resuspendiranih stanica u prethodno pripremljene tubice s 1 mL etanola ohlađenim na 4 °C. Postupak dodavanja smo radili na uređaju za vorteksiranje. Tubice smo pohranili preko noći na -20 °C. Tako pripremljene stanice mogu se pohraniti i na duži period od 2 do 3 mjeseca. Idući dan smo prebacili 200 μL stanica u etanolu u čiste tubice, centrifugirali 5 min na $300 \times g$ te odbacili supernatant. Resuspendirali smo stanice u 500 μL PBS-a te ponovili korak centrifugiranja nakon čega smo stanice resuspendirali u 200 μL reagensa za stanični ciklus te inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla. Tako pripremljene stanice očitali smo na instrumentu *Muse Cell Analyzer*.

3.3.10. Migracija stanica tumora

Najjednostavnija metoda za praćenje migracije stanica jest metoda „cijeljenja rane“ (engl. *wound healing assay* ili *scratch assay*) koja se temelji na praćenju dinamike prekrivanja praznina na sloju adherentnih stanica. Nastavkom za pipete zagrebemo površinu konfluentnih stanica čime se stvara praznina. Stanice se dobro isperu tako da se uklone one koje su odlijepljene te se prati migracija stanica prema središtu sve dok ne dođe do zatvaranja rane.

S druge strane, najpoznatija komercijalna metoda za određivanje migracije stanica jest metoda koja se temelji na principu Boydenovih komorica. Sustav se sastoji od dva odjeljka razdvojena poroznom membranom određene veličine pora koja je manja od promjera stanice. Stanice iz gornje komorice u kojoj je tekuća hranjiva podloga bez dodanog seruma fetusa goveda (FBS) putuju prema donjoj komorici gdje je tekuća hranjiva podloga uz dodatak FBS-a. Iako su obje metode često korištene za ispitivanje migracije stanica tumora, informacije koje se dobiju navedenim metodama su različite. Naime, ove dvije vrste stanične migracije ovise o različitim načinima preuređivanja staničnog citoskeleta, dok se za metodu „cijeljenja rane“ treba u obzir uzeti i proliferacija stanica.

3.3.10.1. Metoda „cijeljenja rane“ (engl. *wound healing assay* ili *scratch assay*)

Stanice smo nasadili na pločicu s 24 bunarića dan prije eksperimenta tako da na dan eksperimenta budu konfluentne, ali i dalje u jednom sloju. U svakom bunariću zagrebali smo jednu ravnu liniju vrhom nastavka za pipete tako da smo odvojili stanice od podloge na tom dijelu. Stanice smo isprali u PBS-u tri puta kako bismo uklonili odvojene stanice te smo dodali novu tekuću hranjivu podlogu. Nastalu prazninu snimili smo pod mikroskopom u trenutku uzrokovanja rane te 8 i 24 sata poslije. Rezultate smo obradili pomoću programa *ImageJ* i prikazali kao postotak zatvorene površine.

3.3.10.2. Sustav Boydenovih komorica (engl. *Boyden chamber assay*)

Koristili smo plastične inserte koji rade prema principu Boydenovih komorica s membranom veličine pora 8 μm . U gornju komoricu nasadili smo 20 000 stanica u 250 μL tekuće hranjive podloge bez dodanog FBS-a. Svaku staničnu liniju nasadili smo u triplikatu. U donju komoricu stavili smo 750 μL kompletirane tekuće hranjive podloge. Stanice su migrirale tijekom sat vremena nakon čega smo komorice isprali uranjanjem u PBS te stavili na bojanje u 750 μL otopine kalceina u PBS-u koncentracije 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ jedan sat. Obojane stanice snimili smo pod mikroskopom, a broj stanica koje su migrirale odredili pomoću programa *ImageJ*.

3.4. Metode u analizi proteina

3.4.1. Izolacija proteina

Sve korake prikupljanja stanica i izolacije proteina provodili smo na ledu i u centrifugi ohlađenoj na 4 °C. Stanice iz kojih smo izolirali proteine sastrugali smo pomoću sterilne strugalice u PBS-u i centrifugirali 5 min pri 300 × g. Supernatant smo odbacili, a talog stanica pohranili pri -80 °C ako s izolacijom proteina nismo započinjali odmah.

3.4.1.1. Izolacija proteina za analizu western blota

Proteine smo iz taloga stanica izolirali u puferu PBS uz dodatak inhibitora proteaza. Talogu stanica iz jedne Petrijeve zdjelice promjera 10 cm odgovaralo je 100 µL pufera s inhibitorom proteaza. Postupak izolacije napravili smo na sonifikatoru pomoću ultrazvučne sonde promjera 1 mm pri amplitudi od 80 Hz tako da smo sonificirali dva puta po 10 s uz stanku od 10 s između ponavljanja. Ultrazvučni valovi narušili su integritet staničnih membrana oslobađajući proteine iz stanica. Proteine smo pohranili pri -80 °C i koristili za analizu western blota.

3.4.1.2. Izolacija proteina za analizu koimunoprecipitacije

Za analizu koimunoprecipitacije proteine smo izolirali iz blagog pufera za lizu stanica, TENN, s dodatkom inhibitora proteaza koji omogućava očuvanje interakcija među proteinima. Postupak izolacije proteina isti je kao u poglavlju 3.4.1.1, a nakon izolacije proteina slijedi centrifugiranje od 20 min pri 16 000 × g. Stanični proteini su u supernatantu koji se prebaci u novu tubicu i može se pohraniti pri -80 °C ili koristiti odmah za metodu koimunoprecipitacije.

3.4.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina odredili smo pomoću komercijalnog kompleta *BCA Protein Assay Kit*. Metoda se temelji na biuretovoj reakciji gdje dolazi do redukcije bakrovih iona iz Cu^{2+} u Cu^{+} u prisutnosti proteina pri bazičnim uvjetima. Nakon dodavanja bikinkonične kiseline (BCA, engl. *bicinchoninic acid*) dolazi do formiranja ljubičasto obojenih kompleksa Cu^{+} i BCA s maksimumom apsorbancije na 562 nm.

Na mikrotitarsku pločicu od 96 bunarića nanijeli smo po 20 µL standarda albumina iz seruma goveda (BSA, engl. *bovine serum albumin*) u koncentracijama od 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 ng/µL dobivenih serijskim razrjeđivanjem matične otopine koncentracije 2,0 mg/mL. Uzorke proteina nepoznate koncentracije nanijeli smo u duplikatima razrijeđenim 10

puta tako da smo stavili 2 μL uzorka i 18 μL mQH_2O , a kao slijepu probu nanijeli smo 20 μL mQH_2O . U svaki bunarić dodali smo 200 μL reagensa za određivanje koncentracije koji se priredi miješanjem otopina A i B u omjeru 50:1. Uzorke u pločici inkubirali smo 30 min pri 37 °C te smo apsorbancije očitali na spektrofotometru za mikrotitarske pločice. Baždarni pravac izračunali smo iz očitanih apsorbancija standardnih otopina, a iz pripadne jednadžbe pravca izračunali smo koncentracije otopina proteina.

3.4.3. Metoda koimunoprecipitacije

Metoda koimunoprecipitacije koristi se za proučavanje proteinskih interakcija i temelji se na činjenici da se izdvajanjem proteina iz staničnog lizata pomoću određenog protutijela mogu izdvojiti i njegovi proteinski partneri. Za proučavanje interakcija endogenih proteina koristili smo paramagnetska zrnca *Dynabeads® Protein G* na koje možemo vezati protutijelo specifično na određeni protein, a za proučavanje interakcija egzogenih proteina nakon prolazne transfekcije stanica u kulturi koristili smo protu-FLAG agarozna zrnca budući da je jedan od potencijalnih proteinskih partnera imao FLAG-privjesak.

3.4.3.1. Imunoprecipitacija uz pomoć paramagnetskih zrnaca (Dynabeads® Protein G)

Za imunoprecipitaciju uz pomoć magnetskih zrnaca, resuspendirali smo zrnca vorteksiranjem nakon čega smo 50 μL prebacili u mikroepruvetu. Na magnetskom stalku zrnca smo odvojili od otopine te uklonili supernatant. Na zrnca smo dodali 2 μg protutijela razrijeđenog u 200 μL PBS s 0,02% (v/v) Tween-20 te inkubirali na mješalici 40 min pri sobnoj temperaturi. Pomoću magnetskog stalka odvojili smo zrnca od otopine te smo odbacili supernatant. Zrnca smo isprali u 200 μL PBS-a s 0,02% Tween-20 nježno pipetirajući te smo odvojili supernatant. Dodali smo 1 mg ukupnih proteina na magnetska zrnca i nježno resuspendirali pipetiranjem. Uzorak smo inkubirali na rotoru pri 4 °C preko noći. Zrnca smo odvojili na magnetskom stalku od otopine, a supernatant spremili radi određivanja uspješnosti vezanja proteina od interesa na protutijelo. Oprali smo zrnca tri puta koristeći 200 μL pufera za ispiranje te smo bacili supernatant. Zatim smo resuspendirali zrnca u 100 μL pufera za ispiranje i prebacili u čistu mikroepruvetu da bi izbjegli koeluciju proteina vezanih za stjenku mikroepruvete. U odvojeni supernatant dodali smo 20 μL pufera za eluiranje, resuspendirali i zagrijali 10 min pri 70 °C. Tako pripremljeni uzorci bili su spremni za nanošenje na SDS-poliakrilamidni gel.

3.4.3.2. Imunoprecipitacija uz pomoć agaroznih zrnaca protu-FLAG

Za imunoprecipitaciju uz pomoć agaroznih zrnaca protu-FLAG uzeli smo 40 μL potpuno promiješane agaroze te smo dodali 500 μL pufera TENN kako bismo isprali zrnca. Uzorak smo centrifugirali 30 s pri $12\,000 \times g$ pri čemu agarozna smola ostaje u talogu, a 400 μL tekućine iz supernatanta smo odbacili. Ispiranje smo ponovili još dva puta s 1 mL pufera TENN. Važno je da se uzorak ne vorteksira ni u jednom trenutku, već se miješa izvrtnjem. Na pripremljena agarozna zrnca protu-FLAG dodali smo uzorak od 200 μg ukupnih proteina izoliranih kako je opisano u poglavlju 3.4.1.2 te smo nadopunili do ukupnog volumena od 200 μL puferom TENN. Mikroeprove zalijepljene parafilmom inkubirali smo na rotoru preko noći pri $4\text{ }^\circ\text{C}$. Slijedi centrifugiranje od 30 s pri $12\,000 \times g$ poslije kojeg smo spremili supernatant za određivanje uspješnosti vezanja. Smolu smo isprali dva puta s 1 mL pufera PBS, centrifugirali 30 s pri $12\,000 \times g$ te bacili 900 μL tekućine iz supernatanta. Zatim smo isprali zadnji put s 1 mL pufera PBS s 0,05% (v/v) Tween-20 i centrifugirali 30 s pri $12\,000 \times g$. Odbacili smo tekućinu iz supernatanta tako da ostane otprilike 10 μL . Dodali smo 10 μL 2 \times pufera za nanošenje proteinskih uzoraka na gel (2 \times LB) i nježno pipetirali da se resuspendiraju agarozne kuglice. Uzorke smo zagrijali 10 min pri $70\text{ }^\circ\text{C}$ te nanijeli na SDS-poliakrilamidni gel.

3.4.4. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE prvi je korak u analizi proteina metodom western blota. Gelovi za elektroforezu pripremili smo kako je prikazano u **Tablici 24**. Priprema gelova ide u dva koraka. U prvom koraku izlili smo donji gel, tzv. gel za razdvajanje i nakon toga lagano pipetom dodali 2 mL deH₂O kako bi gornji rub gela ostao ravan te kako bi se spriječilo isušivanje gela. Za polimerizaciju treba otprilike 15 min nakon čega smo u drugom koraku izlili gornji gel, tzv. gel za sabijanje i umetnuli češljice za elektroforezu.

Tablica 24. Sastav poliakrilamidnog gela za sabijanje i razdvajanje proteina.

| Komponente otopine | Gel za sabijanje/mL | Gel za razdvajanje/mL | | | | |
|--|---------------------|-----------------------|-----|-----|------|-----|
| | 5% | 7% | 8% | 10% | 11% | 12% |
| deH ₂ O | 2,7 | 4,95 | 4,6 | 4,0 | 3,65 | 3,3 |
| 30%-tna otopina akrilamida i bisakrilamida | 0,67 | 2,35 | 2,7 | 3,3 | 3,65 | 4,0 |
| Tris pufer * | 0,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| 10%-tna otopina SDS-a | 0,04 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 10%-tna otopina APS-a | 0,04 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| | | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| TEMED | 0,004 | 0,007 | 0,006 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| Ukupni volumen | 4 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

* pufer za gel za sabijanje i gel za razdvajanje se razlikuju

U mikroepruvetu smo otpipetirali 25-50 μg ukupnih proteina ovisno o jačini ekspresije proteina od interesa u stanici. Zatim smo dodali pufer za nanošenje proteina na gel ($4 \times \text{LB}$) tako da konačna koncentracija pufera bude $1 \times$. Pripremljene uzorke kuhali smo 5 min pri 95°C nakon čega smo ih nanijeli na gel. Na gel smo nanijeli i biljeg za određivanje molekulske mase proteina. Elektroforeza se odvija u sustavu za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III s puferom za SDS-PAGE. Uzorci putuju otprilike 30 min pri naponu od 90V u gelu za sabijanje nakon čega se napon poveća na 110 V. Uzorci putuju u električnom polju dok ne dođu do kraja gela.

3.4.5. Western blot

Nakon elektroforeze razdvojene proteine s gela prenijeli smo na nitroceluloznu membranu veličine pora $0,2 \mu\text{m}$ u sustavu za prijenos na membranu *Mini-Protean III* u puferu za prijenos proteina. Prijenos se odvija pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA tijekom 2 sata ili pri konstantnom naponu od 13 V preko noći. Uspješnost prijenosa proteina na membranu provjerili smo bojanjem otopinom za bojanje membrane *Naphtol Blue*. Zatim smo odbojali membranu otopinom za odbojavanje da bi se maknuo višak boje s membrane koji nije vezan za proteine. Membranu smo ispirali u puferu TBST nakon čega smo blokirali u 5%-tnoj (*w/v*) otopini mlijeka u prahu u puferu TBST. Primarna protutijela pripremili smo u otopini 5%-tnog mlijeka te inkubirali membrane 2 sata na sobnoj temperaturi ili preko noći pri 4°C . Nakon primarnog protutijela membrane smo isprali puferom TBST te inkubirali u sekundarnom protutijelu pripremljenom u otopini 5%-tnog mlijeka.

Izuzetak od opisanog protokola jest protutijelo KJC8, korišteno za detekciju izoformi β proteina p53, za koje smo primijenili western blot u tri koraka. To je metoda kojom se može pojačati slabi signal proteina koji su slabije eksprimirani tako da se nakon inkubacije membrane primarnim protutijelom stavi sekundarno protutijelo koje nije obilježeno peroksidazom iz hrena (HRP), a zatim slijedi inkubacija sekundarnim protutijelom obilježenim HRP-om. Poboljšanje osjetljivosti metode posljedica je činjenice da povećanje koraka vezanja različitih protutijela rezultira povećanjem broja vezanih protutijela obilježenih HRP-om u zadnjem koraku, a samim time i jačim signalom. U ovoj metodi membranu nismo bojali bojom *Naphtol Blue*, a sve korake ispiranja membrane i pripreme otopine 5%-tnog mlijeka provodili smo u puferu PBST.

Za detekciju signala koristili smo kemiluminescentni reagens *Western Lightning Plus-ECL*. Proteini koji su slabije eksprimirani zahtijevaju „jači“ kemiluminescentni reagens pa smo koristili *SuperSignal West Pico* i *SuperSignal West Femto Substrate*. Za očitavanje signala koristili smo uređaj *Alliance 4.7*.

3.5. Metode konfokalne mikroskopije

Snimanje živih i fiksiranih stanica proveli smo na laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopu *Leica TCS SP8 X* opremljenim s *HC PL APO CS2 63×/1.40* objektivom s uljnom imerzijom, laserskom diodom na 405 nm i superkontinuiranim pobudnim laserom s emisijom u području 470-650 nm.

3.5.1. Snimanje živih stanica (engl. *live cell imaging*)

Za snimanje živih stanica koristili smo komoricu za kontrolu temperature koja održava fiziološku temperaturu od 37 °C te tekuću hranjivu podlogu *Lebovitz's L-15* koja omogućava rast stanica u okolišu bez kontrole razine CO₂. Koristili smo valne duljine pobude te detekcijski raspon valnih duljina od 488 nm i 500-550 nm za EGFP te 575 nm i 588-650 nm za mCherry.

3.5.2. Priprema stanica za imunofluorescenciju i bojanje citoskeleta

Stanice smo nasadili na predmetno stakalce s osam bunarića i silikonskim pregradama koje se mogu odvojiti te, 24 sata nakon nasađivanja, uklonili tekuću hranjivu podlogu, a stanice isprali fosfatnim puferom (PBS). Fiksirali smo ih otopinom formaldehida 10 min pri sobnoj temperaturi i isprali u PBS-u te permeabilizirali otopinom Triton X-100 nakon čega je opet slijedilo ispiranje u PBS-u. Tako pripremljene fiksirane stanice koristili smo za imunofluorescenciju i bojanje citoskeleta. Za metodu imunofluorescencije stanice smo inkubirali s primarnim protutijelima preko noći na 4 °C. Idući dan stanice smo isprali u PBS-u te inkubirali sa sekundarnim protutijelima 45 min pri sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS-u stanice smo uklopili u medij za uklapanje s dodanom fluorescentnom bojom za obilježavanje DNA, DAPI. Koristili smo sekundarna protutijela konjugirana s fluoroforima fluorescein-izotiocijanatom (FITC, engl. *fluorescein isothiocyanate*) te Alexa Fluor 594, što je omogućilo detekciju na fluorescencijskom mikroskopu. Za bojenje citoskeleta konjugatom faloidin TRITC-om, stanice smo nakon fiksiranja inkubirali u otopini faloidin TRITC-a u PBS-u (50 µg/mL) 40 min pri sobnoj temperaturi. Koristili smo valne duljine pobude te

detekcijski raspon valnih duljina od: 490 nm i 500-550 nm za FITC, 590 nm i 600-650 nm za Alexa-594, 405 nm i 430-500 nm za DAPI te 545 nm i 555-605 nm za TRITC.

3.5.3. Metoda FRET/FLIM

FRET (engl. *Förster Resonance Energy Transfer*) je pojava prijenosa energije između dva kromofora (donora i akceptora). Do prijenosa energije dolazi neradijativno, preko dipol-dipol sprežanja ako su donor i akceptor u neposrednoj blizini (< 10 nm). FRET se može koristiti za praćenje proteinskih interakcija u biološkim sustavima kao što su stanice, tkiva i organizmi. Jedna od često korištenih metoda za mjerenje FRET-a je FLIM (engl. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). Metoda se temelji na praćenju smanjenja vremena života pobuđenog stanja molekule donora do kojeg dolazi prilikom FRET-a [118–120]. Postoji mnoštvo fluorescentnih proteina koji čine dobre FRET-parove, a mi smo se odlučili za EGFP (donor) i mCherry (akceptor) [121].

FLIM mjerenja proveli smo na laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopu Leica SP8 X FLIM sparenom s modulom za brojanje pojedinačnih fotona i mjerenje njihove vremenske korelacije (TCSPC, engl. *Time-Correlated Single Photon Counting*). Kontrola temperature i razine CO₂ u uzorku živih stanica provedena je kako je opisano u poglavlju 3.5.1. Za detekciju fotona koristili smo spektralne FLIM fotomultiplikatore (SP) kojima je instrument opremljen. Analiza rezultata mjerenja napravljena je u programu *SymPhoTime64*. Detekcija fotona podešena je na 100 ponavljanja sa stopom izbrojanih fotona između 200 i 500 kcounts/s. Donorski fluorofor (EGFP) pobuđen je pulsnim superkontinuiranim laserom pri 488 nm, frekvencijom laserskog pulsa namještenom na 40 MHz. Kako bismo dobili vrijeme života samog donora bez prisutnosti akceptora, snimali smo stanice koje ekspimiraju protein p53 fuzioniran s proteinom EGFP nakon prolazne transfekcije stanica u kulturi. Vrijeme života donora, τ_0 , dobili smo prilagodbom („fitanjem“) eksponencijalnog modela fluorescentnog trnjenja (engl. *fluorescent decay*):

$$N(t) = Ae^{-t/\tau_0}$$

na eksperimentalnu krivulju trnjenja. Dobivena vrijednost služila je kao konstantni parameter u analizama potencijalnih proteinskih partnera metodom FRET. Kako bismo dobili vrijeme života donora u prisutnosti akceptora prolazno smo transficirali stanice s plazmidima koji kodiraju za potencijalne proteinske partnere i to za jedan u fuziji s donorskom molekulom (EGFP), a za drugi s akceptorskom molekulom (mCherry). Za analizu rezultata mjerenja tih uzoraka koristili smo tzv. dvoeksponencijalni model fluorescentnog trnjenja koji je zapravo linearna kombinacija dva eksponencijalna modela:

$$N(t) = A_1 e^{-t/\tau_0} + A_2 e^{-t/\tau_q},$$

gdje se amplitude A_1 i A_2 , kao i tipično vrijeme života fluorescencije donora u prisutnosti akceptora (engl. *lifetime*), τ_q , variraju tijekom postupka prilagodbe modela. Postotak molekula donora koje su u interakciji s akceptorom izračunali smo prema formuli:

$$D_F = A_2 / (A_1 + A_2)$$

gdje je D_F postotak donorskih molekula u kojima dolazi do FRET-a [122]. Za svaki par fluorescentno obilježenih proteina proveli smo mjerenja efekta FRET na 40 stanica, a D_F vrijednost prikazali smo kao medijan s interkvartilnim rasponom.

3.6. Statistička analiza

U statističkoj analizi rezultata eksperimenata koristili smo programe *GraphPad Prism* (v. 7.04), *MATLAB* ili *MedCalc* (v. 18.11.3). Svi eksperimenti ponovljeni su barem tri puta, a na slikama je uvijek prikazan jedan reprezentativni primjer. U opisu svake slike naveden je statistički test korišten u analizi, a rezultati koji su međusobno statistički značajno različiti označeni su zvjezdicom (*). U programu *GraphPad Prism 7.04* značajnost različitosti rezultata prikazana je brojem zvjezdica od jedne zvjezdice (*) do četiri zvjezdice (****), što je uvriježen način prikazivanja u biologiji ukoliko se želi stratificirati statistička značajnost, tj. naglasiti rezultate koji su statistički vrlo različiti. Broj zvjezdica povezan s p-vrijednošću prikazan je u **Tablici 25**.

Tablica 25. Značaj broja zvjezdica na prikazanim rezultatima.

| Broj zvjezdica | p-vrijednost |
|----------------|--------------|
| * | < 0,05 |
| ** | < 0,01 |
| *** | < 0,001 |
| **** | < 0,0001 |

4. REZULTATI

4.1. Interakcije proteina p53 u melanomu čovjeka

Interakcije divljeg tipa proteina p53 s članovima porodice proteina p53, NME i GLI analizirali smo metodom koimunoprecipitacije i metodom FRET/FLIM. Budući da su neke izoforme navedenih proteinskih porodica u korištenim stanicama vrlo slabo eksprimirane, najprije smo analizirali interakcije s egzogenim proteinima nakon prolazne transfekcije stanica u kulturi metodom koimunoprecipitacije. Zatim smo metodom koimunoprecipitacije s endogenim proteinima, koristeći protutijelo za određenu izoformu ili skupinu izoformi, pokušali potvrditi pronađene interakcije. Na kraju, kako bismo dobili neovisnu potvrdu interakcija te njihovu lokalizaciju, koristili smo metodu FRET/FLIM. Treba napomenuti da su sve interakcije proučavane s divljim tipom proteina p53 α . Kako se u literaturi naziv 'protein p53' odnosi upravo na najdužu izoformu proteina p53 - p53 α , radi jednostavnosti u daljnjem tekstu koristit ćemo skraćeni naziv.

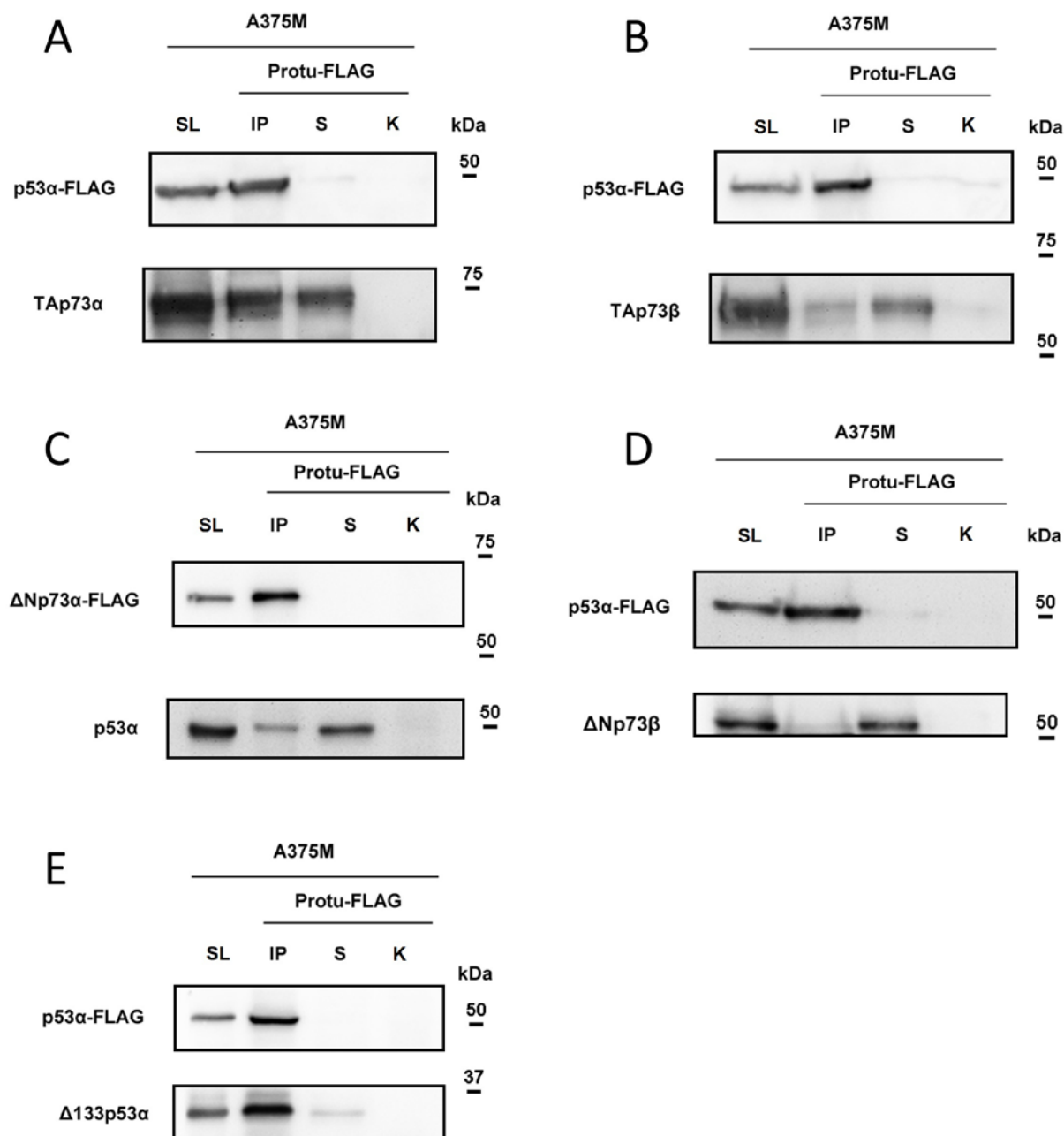
4.1.1. Interakcije egzogenih proteina p53 s drugim članovima porodica p53, NME i GLI određene metodom koimunoprecipitacije

Ovo poglavlje disertacije (4.1.1) sadrži rezultate objavljene u sklopu diplomskog rada Ivana Bradića, mag. chem. Ivan je eksperimentalni dio diplomskog rada odradio u Laboratoriju za proteinsku dinamiku na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Maje Herak Bosnar te mojim neposrednim voditeljstvom. Rad je obranjen na Kemijskom odsjeku PMF-a 2019. godine.

Kako bismo promatrali proteinske interakcije na egzogenoj razini, izolirali smo proteine nakon prekomjerne ekspresije potencijalnih proteinskih partnera prolaznom transfekcijom stanica A375M. Jedan od potencijalnih proteinskih partnera bio je obilježen privjeskom FLAG te smo ga izdvojili metodom koimunoprecipitacije pomoću agaroznih zrnaca na koja je kovalentno vezano protutijelo protu-FLAG. Izdvajanjem proteina s privjeskom FLAG izdvajamo i sve njegove proteinske partnere. Tako izdvojene proteine razdvojili smo poliakrilamidnom gel-elektroforezom (SDS-PAGE) i analizirali metodom western blota.

Rezultati interakcija proteina p53 s izoformama proteina p53 i p73 prikazani su na **Slici 12**. Interakciju proteina p53 pokazali smo s tri izoforme proteina p73 - TAp73 α , TAp73 β

i $\Delta Np73\alpha$, dok s izoformom $\Delta Np73\beta$ interakcija nije pokazana. Interakcija je također primijećena s $\Delta 133p53\alpha$, izoformom proteina p53.

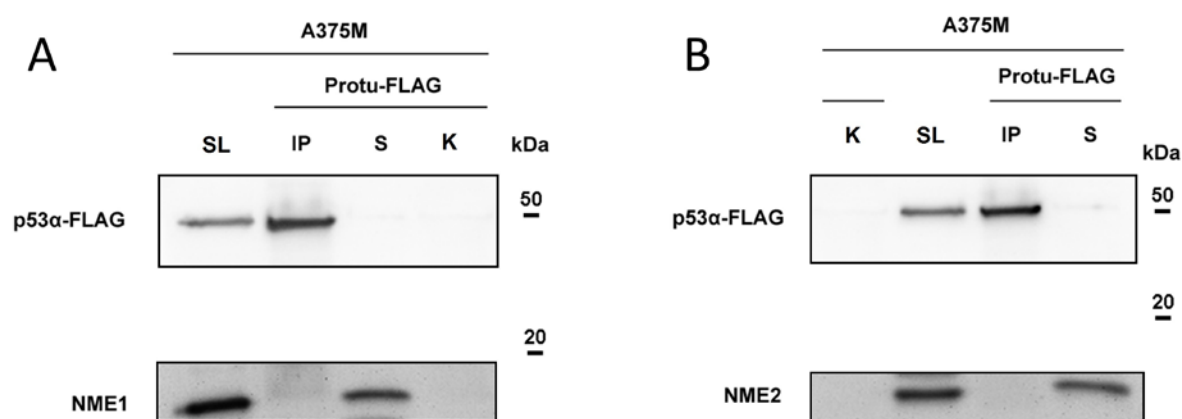


Slika 12. Interakcije egzogenih proteina p53 s drugim članovima porodice p53.

Interakcije smo promatrali nakon prolazne transfekcije stanica melanoma A375M vektorima koji nose gen potencijalnih proteinskih partnera. Jedan je od potencijalnih proteinskih partnera bio obilježen privjeskom FLAG (p53 α -FLAG ili $\Delta Np73\alpha$ -FLAG), dok je drugi partner bio bez privjeska. Ukupni stanični lizat nanijeli smo kao kontrolu ekspresije proteina (SL). Uzorke smo imunoprecipitali korištenjem protutijela protu-FLAG (IP), a za provjeru uspješnosti imunoprecipitacije nanijeli smo supernatant (S). Kao kontrolu koristili smo stanični lizat imunoprecipitiran bez prekomjerno ekspimiranih egzogenih proteina (K). Koristili smo 200 μ g ukupnih proteina za svaku reakciju imunoprecipitacije. Za detekciju proteina na membrani koristili smo protutijelo protu-FLAG za proteine obilježene privjeskom

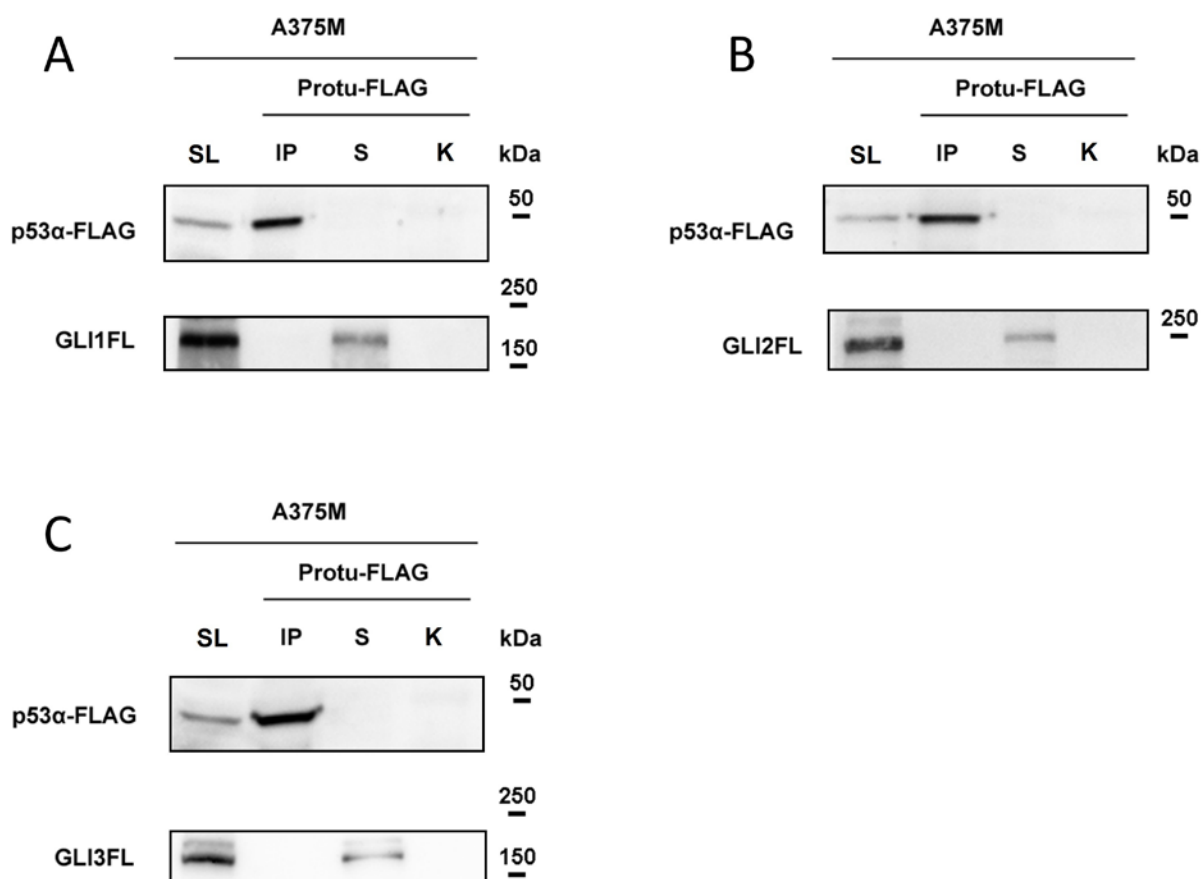
FLAG, protutijelo EP436Y za izoforme proteina p73 bez privjeska FLAG, DO-1 za p53 bez privjeska FLAG te SAPU za $\Delta 133p53\alpha$. Svaki eksperiment ponovljen je tri puta.

Rezultati koimunoprecipitacije proteina p53 s proteinima NME1 i NME2 nakon njihove prekomjerne ekspresije prikazani su na **Slici 13**. Rezultati ovog eksperimenta ukazuju na to da spomenuti proteini ne interagiraju.



Slika 13. Interakcije egzogenih proteina p53 s proteinima NME1 (A) i NME2 (B). Interakcije smo promatrali nakon prolazne transfekcije stanica melanoma A375M vektorima koji nose gen potencijalnih proteinskih partnera. Jedan je od potencijalnih proteinskih partnera bio obilježen privjeskom FLAG (p53 α -FLAG), dok je drugi partner bio bez privjeska (NME1 i NME2). Ukupni stanični lizat nanijeli smo kao kontrolu ekspresije proteina (SL). Uzorke smo imunoprecipitali korištenjem protutijela protu-FLAG (IP), a za provjeru uspješnosti imunoprecipitacije nanijeli smo supernatant (S). Kao kontrolu koristili smo stanični lizat imunoprecipitiran bez prekomjerno eksprimiranih egzogenih proteina (K). Koristili smo 200 μ g ukupnih proteina za svaku reakciju imunoprecipitacije. Za detekciju proteina na membrani koristili smo protutijelo protu-FLAG za p53 α -FLAG, tj. protutijelo NME1/NME2 za protein NME1 i NME2. Svaki eksperiment ponovljen je tri puta.

Interakcije proteina p53 s proteinima GLI1, GLI2 i GLI3 nakon prekomjerne ekspresije prikazane su na **Slici 14**. Kao i u slučaju interakcija p53 s proteinima porodice NME, ni s proteinima porodice GLI interakcije nisu utvrđene. Zaključno, metodom koimunoprecipitacije na egzogenim proteinima pokazali smo jedino interakcije p53 s drugim članovima porodice p53 - TAp73 α , TAp73 β , Δ Np73 α i $\Delta 133p53\alpha$.



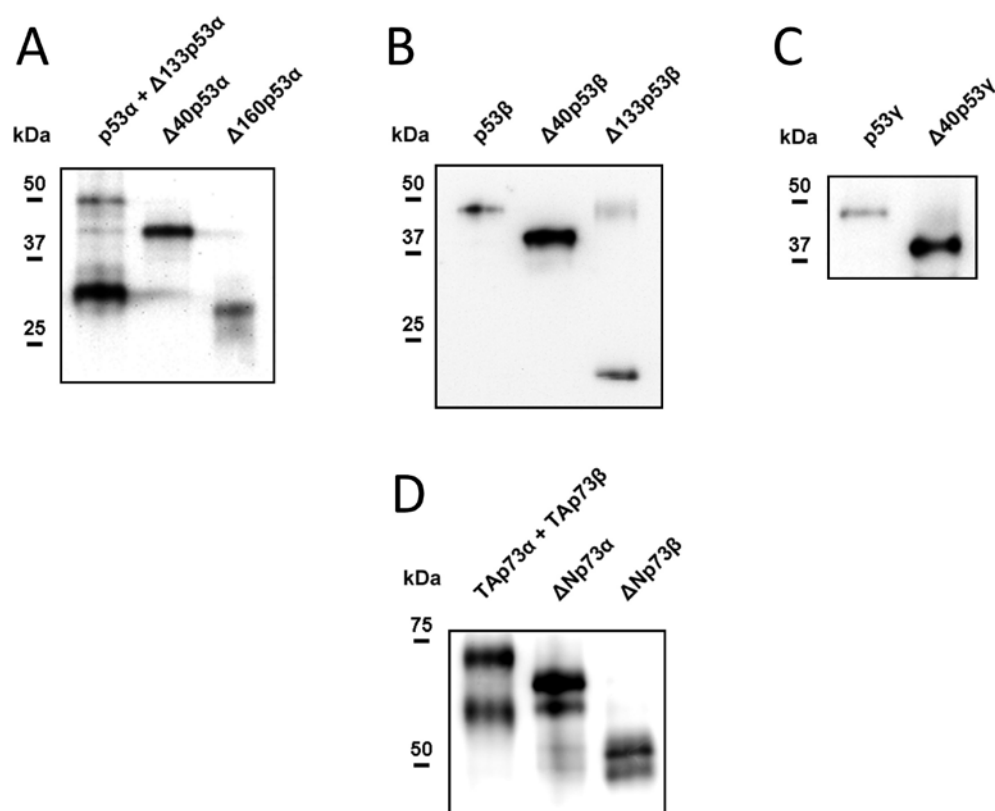
Slika 14. Interakcije egzogenih proteina p53 s proteinima GLI1 (A), GLI2 (B) i GLI3 (C). Interakcije smo promatrali nakon prolazne transfekcije stanica melanoma A375M vektorima koji nose gen potencijalnih proteinskih partnera. Jedan je od potencijalnih proteinskih partnera bio obilježen privjeskom FLAG (p53α-FLAG), dok je drugi partner bio bez privjeska (GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL). Ukupni stanični lizat nanijeli smo kao kontrolu ekspresije proteina (SL). Uzorke smo imunoprecipitali korištenjem protutijela protu-FLAG (IP), a za provjeru uspješnosti imunoprecipitacije nanijeli smo supernatant (S). Kao kontrolu koristili smo stanični lizat imunoprecipitiran bez prekomjerno eksprimiranih egzogenih proteina (K). Koristili smo 200 µg ukupnih proteina za svaku reakciju imunoprecipitacije. Za detekciju proteina p53α-FLAG koristili smo protutijelo protu-FLAG, a za detekciju proteina GLI1, GLI2 i GLI3 protutijelo protu-GLI1, protu-GLI2 (#ARP31885) i protu-GLI3. Svaki eksperiment ponovljen je tri puta.

4.1.2. Interakcije endogenih proteina p53 s članovima porodica p53 i NME određene metodom koimunoprecipitacije

Istraživanja interakcija endogenog proteina p53 s članovima porodica p53 i NME proveli smo na staničnim linijama melanoma koje eksprimiraju divlji tip proteina p53 (p53wt), a to su linija primarnog melanoma WM793B (ATCC® CRL_2806™) i linija metastatskog melanoma A375M (ATCC® CRL_1619™). Proteinske interakcije koje smo pokazali na egzogenim proteinima pokušali smo potvrditi na endogenim proteinima upotrebom

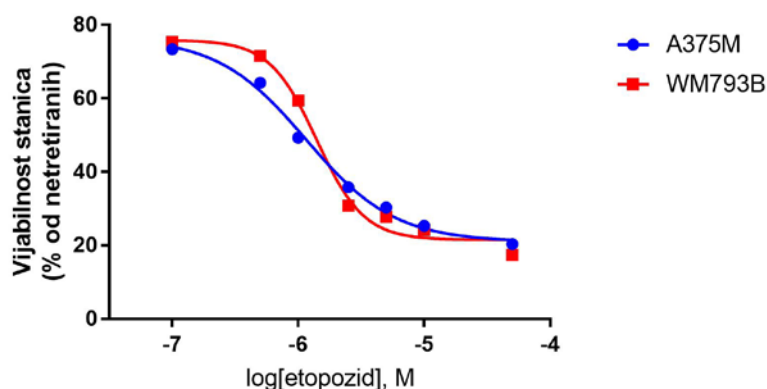
magnetskih zrnaca DynaBeads™ Protein G koja vežu imunoglobulinske lance protutijela. Protutijelo specifično za pojedinu izoformu, odnosno skupinu izoformi, vezali smo na magnetska zrnca te izdvojili određenu izoformu ili skupinu izoformi zajedno s njihovim proteinskim partnerima i na taj način detektirali interakcije endogenih proteina u staničnom lizatu.

Za lakšu identifikaciju velikog broja izoformi proteina p53 i p73 metodom western blota, koristili smo proteinske standarde (Slika 15). Standarde proteina dobili smo tako da smo transficirali staničnu liniju H1299 plazmidima koji nose gene za izoforme proteina p53 i p73 te, 24 sata nakon transfekcije skupili stanice i izolirali proteine. Stanična linija H1299 ima djelomičnu homozigotnu deleciju gena *TP53* i kao rezultat toga ne eksprimira izoforme proteina p53 te je dobar izbor za ekspresiju proteinskih standarda.



Slika 15. Proteini koje smo koristili kao standarde za određivanje molekulske mase pojedine izoforme. Proteine smo dobili tako što smo transficirali staničnu liniju H1299 plazmidima koji nose gene naših proteina. Stanična linija H1299 ima djelomičnu homozigotnu deleciju gena *TP53* te ne eksprimira izoforme proteina p53. Standarde smo nanosili na gel kada smo provjeravali ekspresiju proteina p53 i p73 metodom western blota, no u radu nisu prikazivani na svakoj slici, već su sumarno prikazani ovdje.

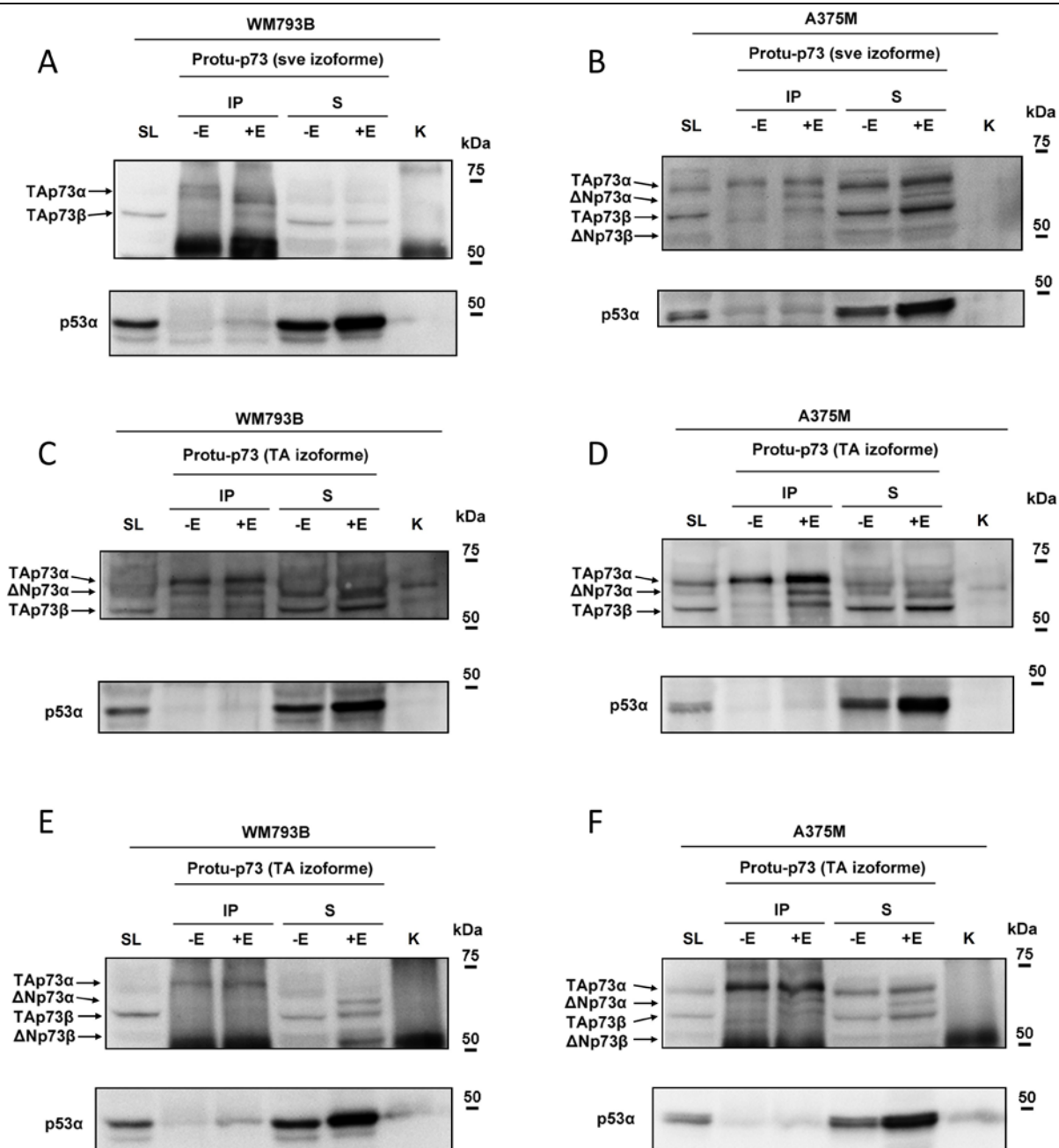
Interakcije endogenih proteina u staničnim linijama A375M i WM793B metodom koimunoprecipitacije određivali smo u uvjetima bez stresa (-E) i u uvjetima genotoksičnog stresa izazvanog dodatkom etopozida (+E). Etopozid je kemoterapeutik širokog spektra koji formira kompleks molekule DNA s enzimom topoizomeraza II i na taj način uzrokuje lomove u DNA. Na **Slici 16** prikazan je test MTT kojim smo odredili vijabilnost stanica A375M i WM793B pri rastućim koncentracijama etopozida kako bismo odredili dozu pri kojoj otprilike 50% stanica umire te smo koristili koncentraciju od 1 μ M etopozida pri daljnjim pokusima. Promatrali smo ekspresiju naših proteina od interesa te smo primijetili značajno povećanje ekspresije proteina p53 nakon tretmana 1 μ M etopozidom tijekom 24 sata. Dobiveni rezultati proteinske ekspresije nakon genotoksičnog stresa provedeni su u suradnji s dr.sc. Nikolinom Hanžić te su prikazani u njezinoj doktorskoj disertaciji [123].



Slika 16. Određivanje koncentracije etopozida za pokuse izazivanja oštećenja DNA.

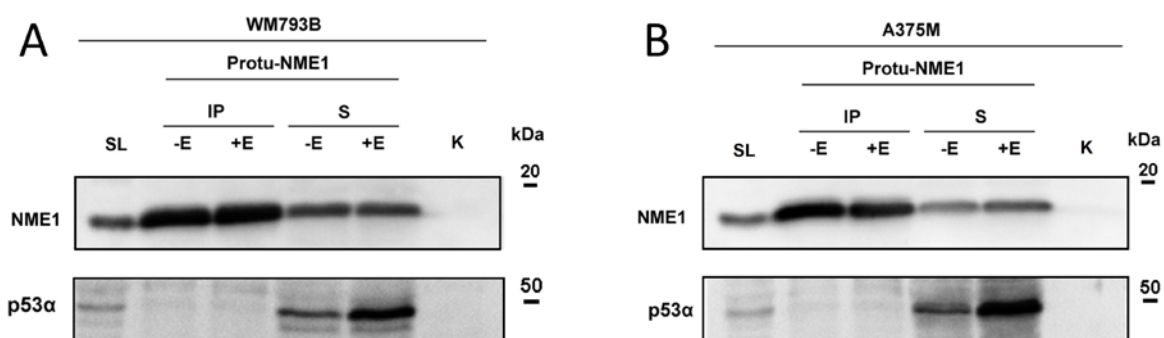
Interakcije endogenih proteina određivali smo u uvjetima bez stresa i s izazivanjem genotoksičnog stresa korištenjem etopozida. U tu svrhu odredili smo vijabilnost stanica A375M i WM793B pri rastućim koncentracijama etopozida koristeći test MTT.

Na **Slici 17** prikazane su interakcije proteina p53 s izoformama proteina p73 na endogenoj razini. Koristili smo protutijela koja prepoznaju sve izoforme proteina p73 (ER-15) ili samo izoforme TAp73 (A300-126A i E-4). Interakcije proteina p53 s izoformama proteina p73 potvrđene su imunoprecipitacijom svih izoformi, kao i imunoprecipitacijom isključivo izoformi TAp73. Rezultati analize western blota nisu tako jasni kao u prethodnom poglavlju na egzogenim proteinima budući da se tu radi o proteinima s niskom razinom ekspresije, a također imunoprecipitiramo skupinu izoformi pomoću koje dobijemo veći broj signala koje je teže interpretirati.



Slika 17. Interakcije endogenih proteina p53 s izoformama proteina p73 u staničnim linijama melanoma WM793B (A,C,E) i A375M (B,D,F). Koimunoprecipitaciju smo proveli koristeći protutijelo ER-15 koje prepoznaje sve izoforme proteina p73 (A), protutijelo GC-15 koje također prepoznaje sve izoforme proteina p73 (B), protutijelo A300-126A koje prepoznaje TAp73 (C,D) te protutijelo E-4 koje također prepoznaje izoforme TAp73 (E,F). Koristili smo 1 mg ukupnih proteina za svaku reakciju imunoprecipitacije. Za detekciju proteina na membrani metodom western blota koristili smo protutijelo DO-1 za p53α te protutijelo EP436Y za izoforme proteina p73. Ukupni stanični lizat nanijeli smo kao kontrolu ekspresije proteina (SL), a kao kontrolu imunoprecipitacije koristili smo magnetska zrnca bez dodatka protutijela (K). Uzorci su imunoprecipitirani (IP) bez tretmana etopozidom (-E) i nakon tretmana 1 μM etopozidom tijekom 24 sata (+E), a za provjeru uspješnosti imunoprecipitacije nanesen je supernatant (S). Svaki eksperiment ponovljen je tri puta.

Slika 18 prikazuje interakcije proteina p53 s proteinom NME1 na endogenoj razini. Iako interakcije nisu pokazane na egzogenim proteinima, odlučili smo imunoprecipitirati endogene proteine budući da u literaturi postoji podatak da su ta dva proteina u direktnoj interakciji [9]. Međutim, interakciju nismo potvrdili ni na endogenoj razini.



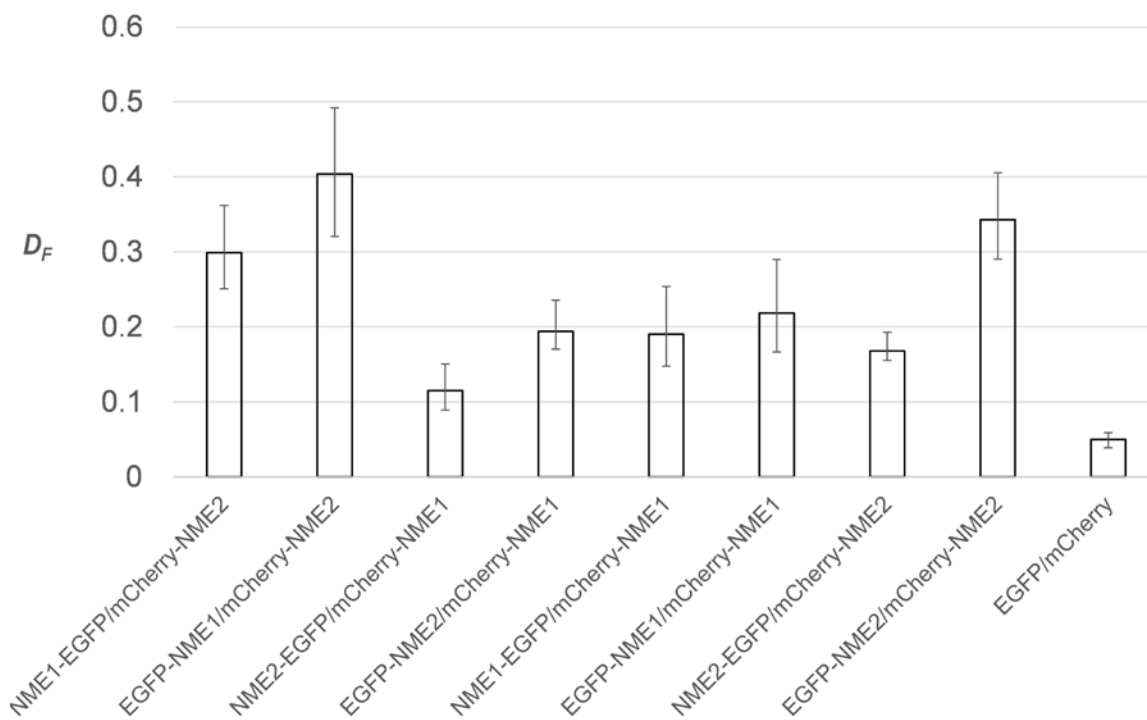
Slika 18. Interakcije endogenih proteina p53 s proteinom NME1 u staničnim linijama melanoma WM793B (A) i A375M (B). Koimunoprecipitaciju smo proveli koristeći protutijelo OP48 koje prepoznaje NME1. Koristili smo 1 mg ukupnih proteina za svaku reakciju imunoprecipitacije. Za detekciju proteina na membrani metodom western blota koristili smo protutijelo DO-1 za p53α te protutijelo OP48 za NME1. Ukupni stanični lizat nanesen je kao kontrola ekspresije proteina (SL), a kao kontrola imunoprecipitacije korištena su magnetska zrnca bez dodatka protutijela (K). Uzorci su imunoprecipitirani (IP) bez tretmana etopozidom (-E) i nakon tretmana 1 μM etopozidom tijekom 24 sata (+E), a za provjeru uspješnosti imunoprecipitacije nanesen je supernatant (S). Svaki eksperiment ponovljen je tri puta.

4.1.3. Istraživanje interakcija proteina p53 s odabranim proteinskim partnerima korištenjem metode FRET/FLIM

Istraživanje proteinskih interakcija metodom FRET/FLIM metodološki je zahtjevnije od prethodno korištene metode koimunoprecipitacije i to ne samo zbog pripreme koja zahtijeva ukloniravanje gena od interesa u vektore koji nose gen za fluorescentne proteine već i zato što zahtijeva korištenje posebno opremljenog konfokalnog mikroskopa i sofisticirane metode analize. No, takva metoda ima i svoje prednosti, a neke od njih su mogućnost praćenja lokalizacije interakcija u stanici, određivanje postotka molekula u interakciji i vrlo mala mogućnost dobivanja lažno pozitivnih interakcija. Da bi se mogle pratiti moguće interakcije parova proteina, potencijalni proteinski partneri trebaju biti obilježeni fluoroforima koji čine „dobar FRET-par“ [121]. Mi smo koristili EGFP kao molekulu donora i mCherry kao molekulu akceptora. Pobuđivanjem molekule donora laserskim zračenjem točno određene valne duljine dobivamo donor u pobuđenom elektronskom stanju koji može prenijeti energiju

na akceptor ako su proteini dovoljno blizu (na udaljenosti manjoj od 10 nm), a na toj su udaljenosti samo ako su u interakciji. Prenošenje energije je neradijativno (preko sprezanja dipol-dipol), a ta pojava se naziva FRET (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Ako akceptor nije u blizini (proteini nisu u interakciji), donor će se vratiti u osnovno elektronsko stanje radijativno, tj. emisijom svjetlosti, budući da je pobuđeno energetsko stanje nestabilno i ne može se održati. Uobičajeno se eksperimentalno FRET efekt određuje mjerenjem razlike u fotofizikalnim svojstvima donora ili akceptora koja nastupa zbog neradijativnog prijenosa energije. U našem slučaju mjerili smo vrijeme života donora u pobuđenom stanju koje se u prisutnosti akceptora smanjuje te se takva metoda naziva FLIM (engl. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). Kao kontrolu koristili smo plazmide koji ekspimiraju fluorescentne proteine EGFP (donor) i mCherry (akceptor).

FRET/FLIM metodu prilagodili smo za rad na humanim stanicama uz pomoć kolega iz Laboratorija za biofiziku stanice koristeći stanice HeLa. Kao pozitivnu kontrolu uzeli smo proteine za koje znamo da su u interakciji u stanici, a to su NME1 i NME2 koji tvore enzimatski aktivne heksamere. Kako bismo provjerili kako položaj molekule donora i akceptora u odnosu na proteine NME utječe na njihovu interakciju, odlučili smo molekulu donora (EGFP) fuzionirati na N-kraj proteina (EGFP-NME1 i EGFP-NME2) ili na C-kraj proteina (NME1-EGFP i NME2-EGFP), dok je molekula akceptora (mCherry) fuzionirana uvijek na N-kraju proteina (mCherry-NME1 i mCherry-NME2). Donor i akceptor su proteini značajne molekulske mase koja iznosi oko 27 kDa, što je u ovom slučaju veće od mase naših proteinskih partnera te njihov položaj na proteinu može utjecati na interakcije. Vrijednost D_F , tj. postotak donorskih molekula u kojima dolazi do FRET-a uz prisutnost akceptora (FRET-populacija), prikazana je na **Slici 19** za svaku od 8 kombinacija FRET-parova NME1/NME1, NME1/NME2 i NME2/NME2. Zadnji stupac predstavlja kontrolu (sami donor i akceptor, EGFP i mCherry) koji pokazuju vrijednost D_F od oko 0,05.



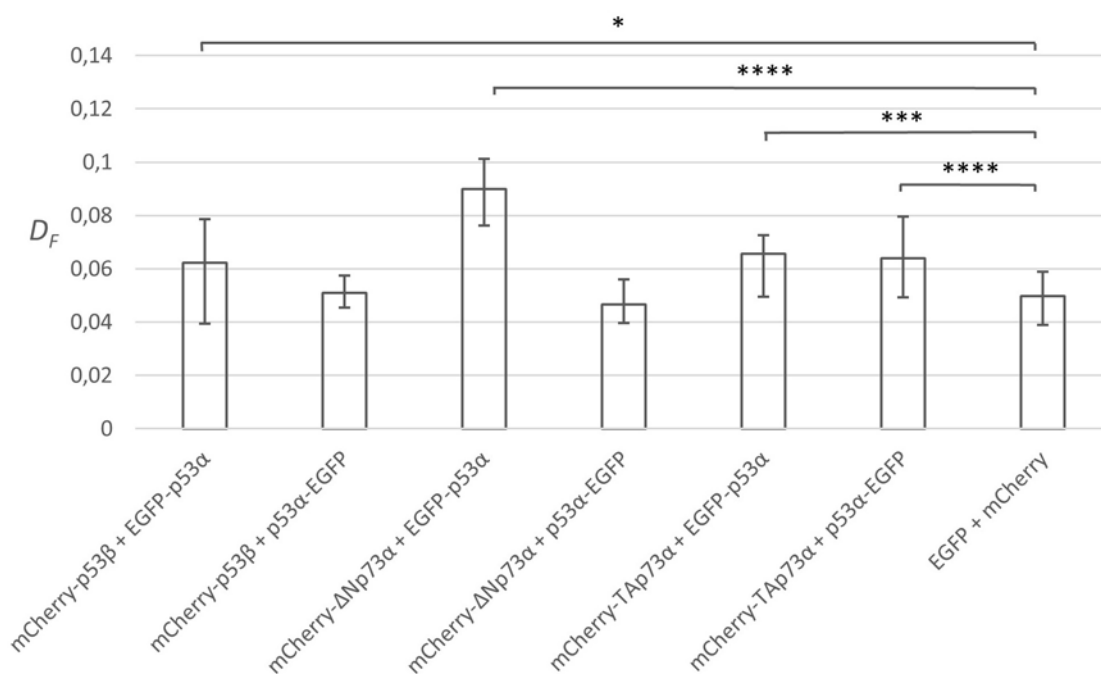
Slika 19. FRET-populacija (D_F) različitih kombinacija fluorescentno obilježenih proteina NME: NME1/NME2, NME1/NME1 ili NME2/NME2. Molekula donora (EGFP) fuzionirana je ili na N-kraj ili C-kraj proteina NME, dok je molekula akceptora (mCherry) uvijek na N-kraju proteina NME. FRET-populacija, D_F , prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon na uzorku od 18 stanica iz svake grupe. Eksperimenti su napravljeni koristeći stanice HeLa. Preuzeto i prilagođeno prema Radić i suradnici (2020) [122].

Pokazali smo da proteini NME stupaju u interakciju te u nekim slučajevima dobivamo FRET-populaciju vrijednosti do 0,4, a to bi značilo da je 40% populacije proteina fuzioniranog s donorom u interakciji s proteinom fuzioniranim s akceptorom. Također, vidjeli smo da veću FRET-populaciju daju FRET-parovi u kojima je molekula EGFP na N-kraju proteina. Interakcije smo promatrali u citoplazmi stanice budući da su proteini NME1 i NME2 velikom većinom lokalizirani u citoplazmi.

Nakon što smo uspješno potvrdili interakcije proteina NME, metodom FRET/FLIM istražili smo interakcije proteina p53 s proteinima p53 β , Δ Np73 α te TAp73 α . U ovom slučaju protein p53 imao je fuzioniran EGFP na N-kraju (EGFP-p53 α) ili C-kraju (p53 α -EGFP) dok je drugi proteinski partner imao fuzioniran privjesak mCherry na N-kraju proteina (**Slika 20**). Interakcije smo promatrali u staničnoj jezgri budući da su navedeni proteinski partneri najvećim dijelom tamo lokalizirani. Vidljivo je da položaj privjeska EGFP na proteinu p53 utječe na interakcije s proteinima p53 β i Δ Np73 α . Kada je EGFP na C-kraju (p53 α -EGFP) interakcija nema, tj. FRET-populacija pokazuje istu vrijednost kao i kod kontrolne grupe

(EGFP i mCherry). S druge strane, kada je EGFP na N-kraju, FRET-populacija je statistički značajno veća od kontrolne grupe što ukazuje na postojanje interakcija između potencijalnih partnera. Takav utjecaj položaja privjeska EGFP na proteinu p53 na interakciju s proteinom TAp73 α nismo primijetili te FRET-par p53 α /TAp73 α pokazuje gotovo jednaku FRET-populaciju u oba slučaja koja je statistički značajno veća od kontrolne grupe.

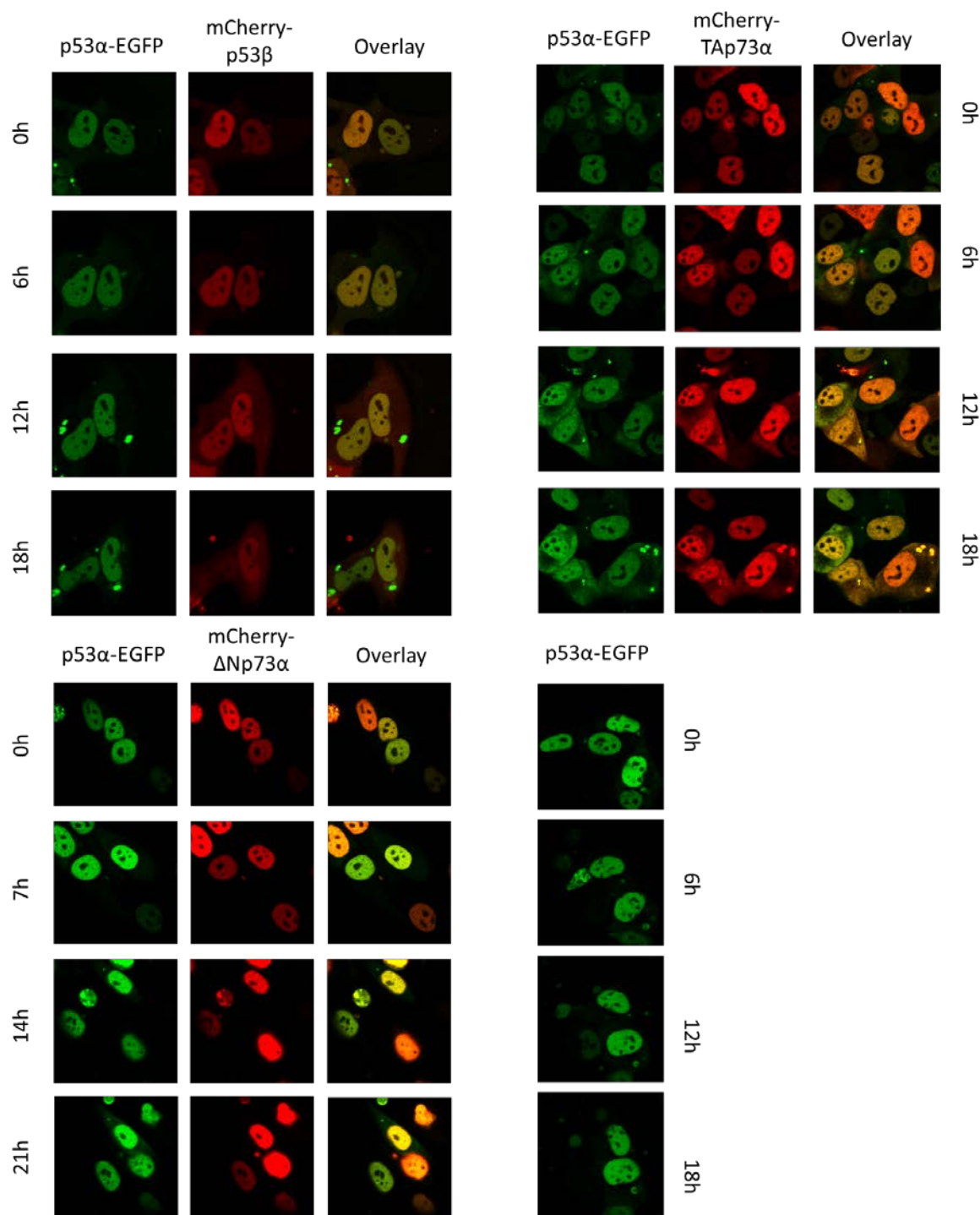
Zaključno, metodom FRET/FLIM pokazali smo interakcije proteina p53 sa sva tri promatrana proteinska partnera - p53 β , Δ Np73 α i TAp73 α . Primijetili smo da položaj privjeska EGFP na proteinu p53 utječe na interakcije s proteinima p53 β i Δ Np73 α te smo zaključili da za daljnje eksperimente ispitivanja interakcija trebamo koristiti protein p53 s fuzioniranim privjeskom EGFP na njegovom N-kraju (EGFP-p53 α).



Slika 20. FRET-populacija (D_F) različitih kombinacija fluorescentno obilježenog proteina p53 s drugim izoformama porodice p53: p53 α /p53 β , p53 α / Δ Np73 α , p53 α /TAp73 α . Molekula donora (EGFP) fuzionirana je ili na N-kraj ili C-kraj proteina p53 α , dok je molekula akceptora (mCherry) uvijek na N-kraju proteinskog partnera. FRET-populacija, D_F , prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon na uzorku od 40 stanica. Za statističku usporedbu navedenih proteinskih partnera s kontrolnom grupom (EGFP i mCherry) korišten je Mann Whitney test u programu *GraphPad Prism 7.04*.

4.1.4. Određivanje lokalizacije potencijalnih proteinskih partnera tijekom 24 sata koristeći metodu snimanja živih stanica (engl. *live-cell imaging*) konfokalnim mikroskopom

Stanična lokalizacija potencijalnih proteinskih partnera tijekom 24 sata prikazana je na **Slici 21**.



Slika 21. Snimanje živih stanica koje eksprimiraju potencijalne proteinske partnere: p53α/p53β, p53α/TAp73α, p53α/ΔNp73α te sam protein p53. Zeleni fluorescentni protein (EGFP) fuzioniran je ili na N-kraj ili C-kraj proteina p53, dok je crveni fluorescentni protein

(mCherry) uvijek na N-kraju proteinskog partnera. Stanice su snimane 24 sata nakon transfekcije u vremenskom periodu od 24 sata.

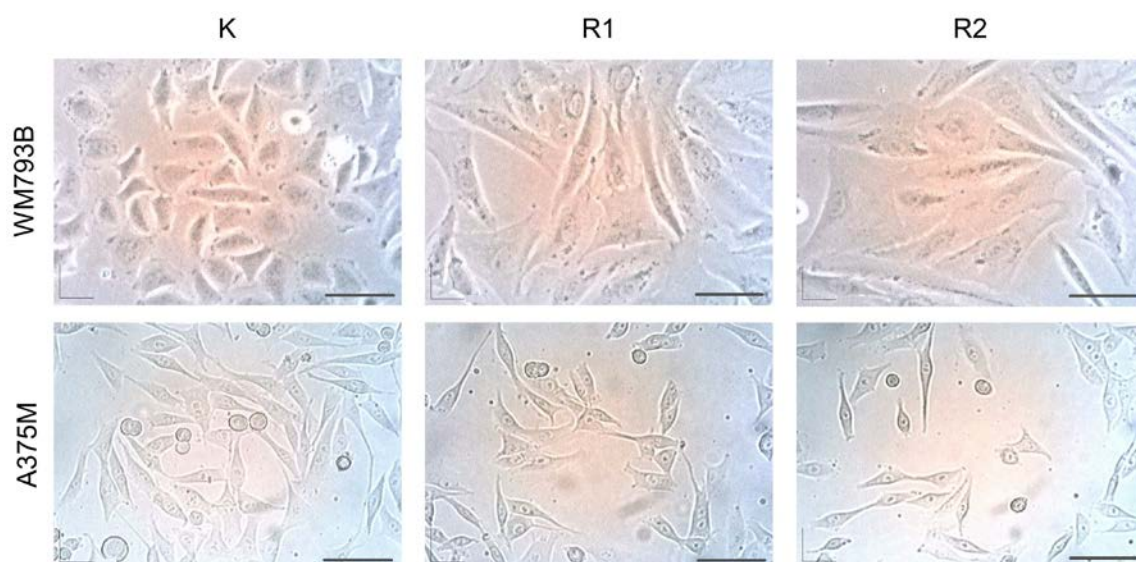
Žive stanice koje eksprimiraju proteinske partnere p53 α /p53 β , p53 α /TAp73 α , p53 α / Δ Np73 α te sam protein p53, snimali smo pomoću fluorescencijskog konfokalnog mikroskopa. Protein p53 obilježen je fluorescentnim proteinom EGFP, dok su njegovi proteinski partneri obilježeni fluorescentnim proteinom mCherry. Stanice smo snimali tijekom 24 sata, a prikazane su reprezentativne snimke. Odabrali smo četiri vremenske točke u kojima se vidi dinamika lokalizacije proteinskih partnera. Primijetili smo da transficirane stanice pojačano umiru tijekom snimanja. Razlog može biti preveliko nakupljanje prekomjerno eksprimiranih fluorescentnih proteina, ali i stres uzrokovan transfekcijom. Protein p53 i njegovi proteinski partneri, p53 β , TAp73 α i Δ Np73 α , najvećim dijelom su lokalizirani unutar jezgre iako se manja količina proteina može pronaći i u citoplazmatskom dijelu stanice. Lokalizacija u citoplazmi vidljiva je najviše za proteine p53 β , TAp73 α i p53 α (**Slika 21**). Iako je moguće da ti proteini budu zastupljeni i u citoplazmi, uzrok takve lokalizacije može biti i prekomjerna ekspresija fluorescentnih proteina u stanici zbog koje dolazi do nespecifične lokalizacije.

4.2. Karakterizacija stanica melanoma otpornih na vemurafenib

Kako bismo istražili zasada nepoznate razloge otpornosti melanoma na liječenje inhibitorom proteina BRAF, vemurafenibom, uzgajali smo podlinije stanica A375M i WM793B otporne na vemurafenib (A375M-R i WM793B-R). Stanične linije A375M i WM793B imaju mutirani protein BRAF (BRAF^{V600E}) pa su pogodne za liječenje vemurafenibom. Podlinije otporne na vemurafenib (R) dobili smo višemjesečnim uzgojem u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak vemurafeniba kako je opisano u poglavlju 3.3.3. Linije R1 uzgajali smo u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom 2-7 mjeseci, a linije R2 u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom 7-12 mjeseci. Parentalne stanice A375M i WM793B, iz kojih smo dobili otporne podlinije, koristili smo kao kontrolne stanice u eksperimentima i označene su slovom K.

4.2.1. Potvrda otpornosti stanica melanoma na vemurafenib i promjena fenotipa otpornih stanica

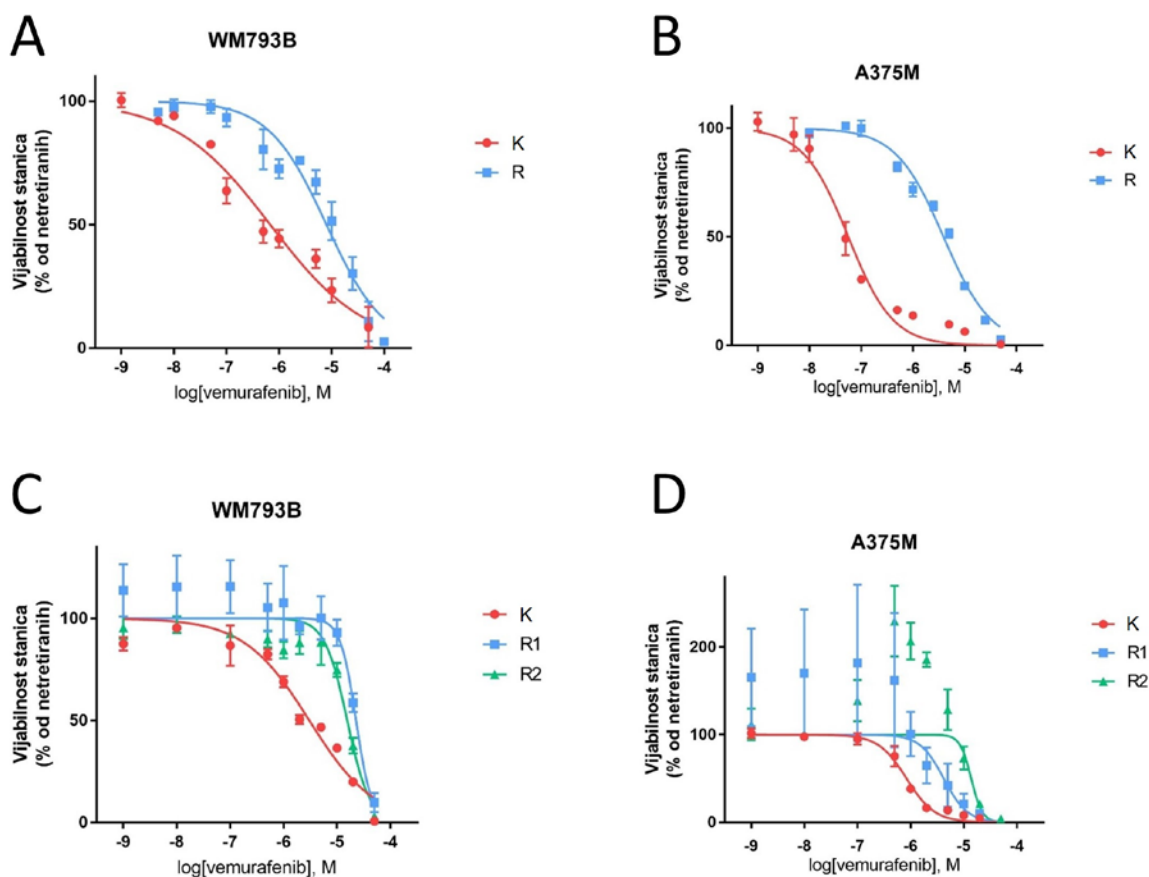
Nakon višemjesečnog tretmana vemurafenibom stanice su promijenile fenotip (**Slika 22**). Stanice primarnog melanoma, WM793B, postale su vretenaste i izdužene što je karakteristika mezenhimalnih stanica, dok je kontrolna linija (K) epitelne morfologije. Za razliku od primarnog melanoma, kod metastatske stanične linije A375M, nema takve jasno vidljive promjene morfologije. Kontrolna (K), kao i otporne stanične linije (R1 i R2), pokazuju karakteristike mezenhimalnih stanica.



Slika 22. Promjena fenotipa staničnih linija melanoma WM793B i A375M nakon višemjesečnog tretmana vemurafenibom vidljiva je pod svjetlosnim mikroskopom. Oznaka R1 predstavlja tretman vemurafenibom tijekom 3 mjeseca, a oznaka R2 tretman višemjesečan.

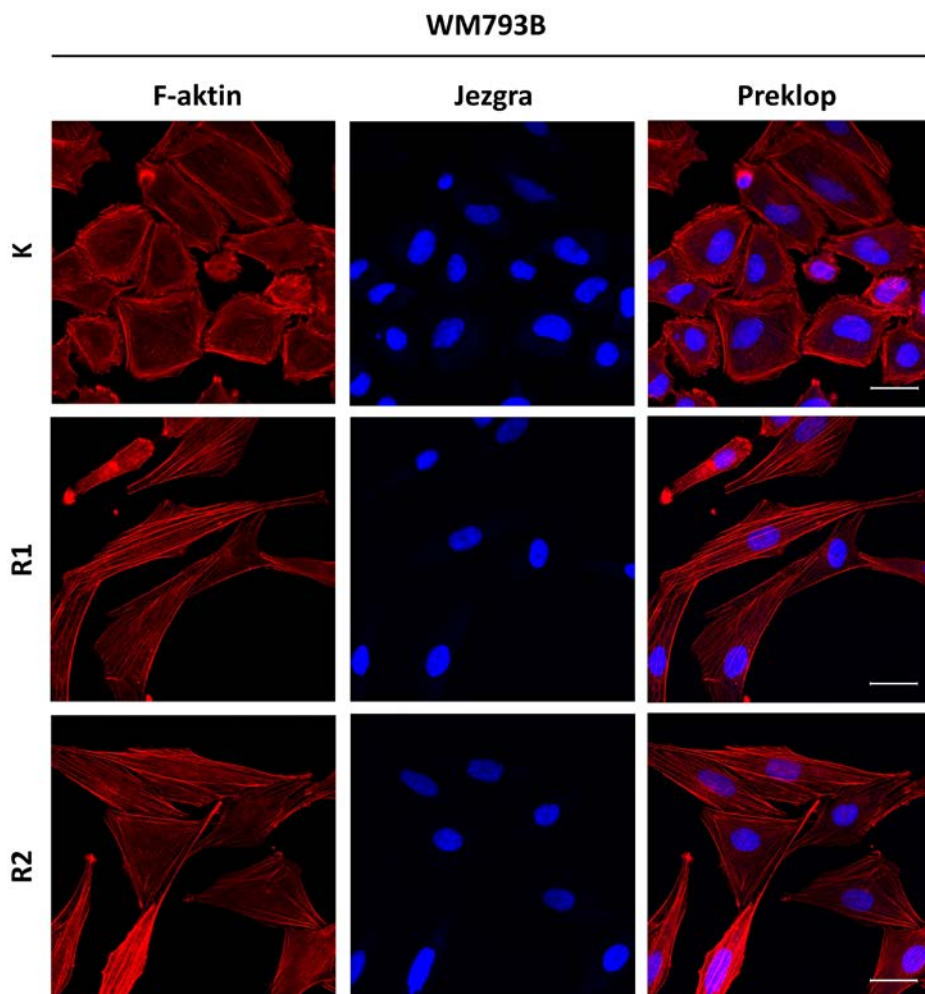
tijekom 7 mjeseci, dok je kontrolna parentalna linija označena s **K**. Ljestvica veličine, prikazana u kutu desno, iznosi 150 μm .

Kako bismo potvrdili pojavu otpornosti na vemurafenib napravili smo test MTT kojim smo usporedili vijabilnost parentalnih staničnih linija (**K**) s vijabilnošću potencijalno otpornih staničnih linija (**R1** i **R2**) za stanice WM793B i A375M tijekom tretmana vemurafenibom rastućih koncentracija (**Slika 23**). Vrijednost IC₅₀ (engl. *half-maximal inhibitory concentration*), tj. koncentracija pri kojoj 50% stanica umire trebala bi se razlikovati za 1-2 reda veličine između kontrolnih staničnih linija i staničnih linija tretiranih vemurafenibom kako bi se stanice mogle okarakterizirati otpornima na vemurafenib. Obje stanične linije pokazale su promjene u vrijednosti IC₅₀ dva mjeseca nakon početka uzgoja u mediju s vemurafenibom. Pojavom otpornosti na vemurafenib stanična linija WM793B pokazala je povećanje vrijednosti IC₅₀ sa $6,78 \times 10^{-7}$ M na $7,95 \times 10^{-6}$ M što je povećanje od 11,7. Stanična linija A375M pojavom otpornosti na vemurafenib pokazala je povećanje vrijednosti IC₅₀ sa $5,65 \times 10^{-8}$ M na $3,91 \times 10^{-6}$ M što je povećanje od 69,1. Dužim tretmanom vemurafenibom pojavljuju se maksimumi preživljenja otpornih stanica upravo pri koncentraciji vemurafeniba pri kojoj su uzgajane. Navedeno je najuočljivije na staničnoj liniji A375M (**Slika 23D**) iako se može primijetiti i na staničnoj liniji WM793B (**Slika 23C**). S takvim podacima nemoguće je dobiti pravilne sigmoidalne krivulje. Ovisnost vijabilnosti stanica o koncentraciji vemurafeniba daje zvonolike krivulje. Samim time i izračun vrijednosti IC₅₀ je otežan. Stanična linija WM793B daje 7,5 puta veću vrijednost IC₅₀ kod linije R1 u usporedbi s kontrolom i 5,1 puta veću vrijednost IC₅₀ kod linije R2 u usporedbi s kontrolom (IC₅₀ (**K**) = $3,03 \times 10^{-6}$ M, IC₅₀ (**R1**) = $2,27 \times 10^{-5}$ M, IC₅₀ (**R2**) = $1,55 \times 10^{-5}$ M). Stanična linija A375M daje 5,0 puta veću vrijednost IC₅₀ kod linije R1 u usporedbi s kontrolom i 16,5 puta veću vrijednost IC₅₀ kod linije R2 u usporedbi s kontrolom (IC₅₀ (**K**) = $8,41 \times 10^{-7}$ M, IC₅₀ (**R1**) = $4,21 \times 10^{-6}$ M, IC₅₀ (**R2**) = $1,38 \times 10^{-5}$ M).



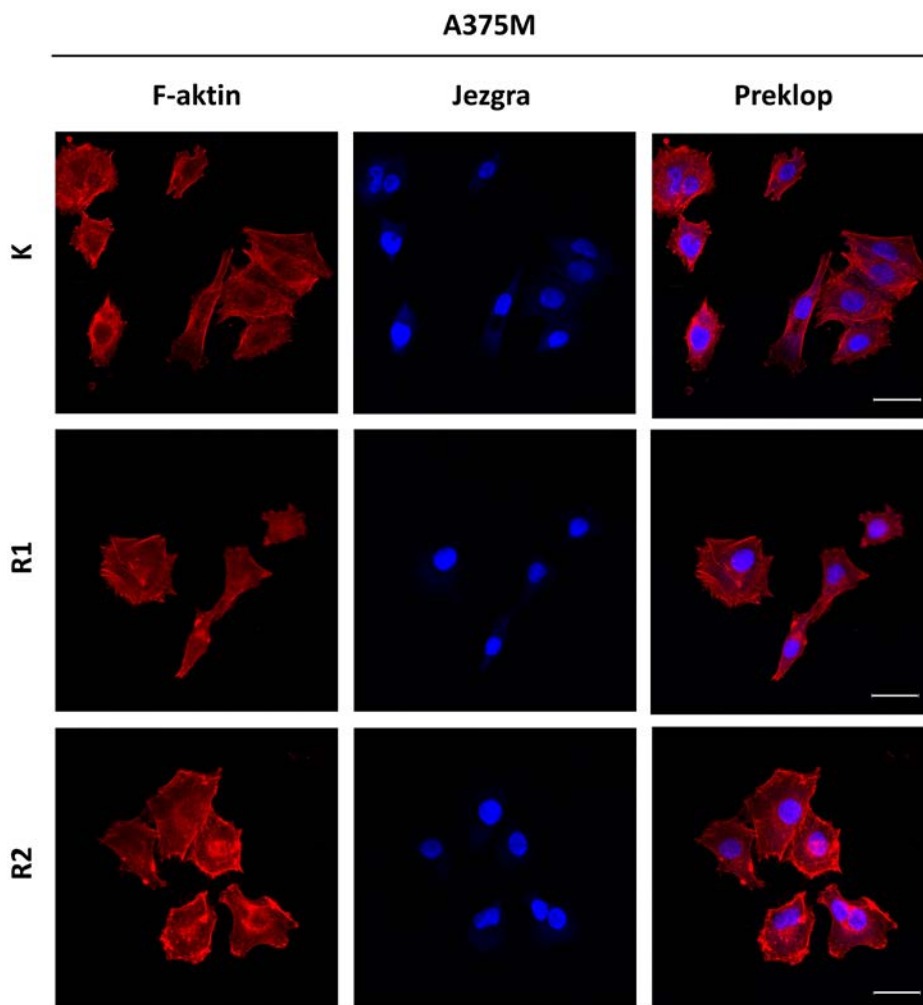
Slika 23. Vjabilnost kontrolnih (K) te odgovarajućih podlinija stanica otpornih na vemurafenib (R1 i R2) za stanične linije WM793B (A i C) i A375M (B i D) pri rastućim koncentracijama vemurafeniba. A) i B) MTT napravljen dva mjeseca nakon početka tretmana vemurafenibom, C) i D) MTT test ponovljen nakon što su stanice bile 3 mjeseca u mediju s vemurafenibom (R1) i 7 mjeseci u mediju s vemurafenibom (R2). Prikazane su srednje vrijednosti tri biološke replike sa standardnom devijacijom. Svaka biološka replika je napravljena u triplikatu.

Kako bismo ustvrdili do kakvih je promjena staničnog citoskeleta došlo pojavom otpornosti na vemurafenib, koristili smo faloidin, peptid koji se selektivno veže za aktinske filamente. Faloidin pripada skupini falotoksina, a u prirodi se nalazi u jednoj od najotrovnijih gljiva, zelenoj pupavki (*Amanita phalloides*). Zahvaljujući jakom i selektivnom vezanju na F-aktin, derivati obilježeni fluorescentnim privjeskom (u našem slučaju TRITC - tetrametilrodamin) koriste se za detekciju aktina u biomedicinskim istraživanjima. Parentalne (K) te odgovarajuće stanice otporne na vemurafenib (R1 i R2) bojane konjugatom faloidin-TRITC prikazane su na **Slici 24** za staničnu liniju WM793B te **Slici 25** za staničnu liniju A375M.



Slika 24. Kontrolne stanice WM793B (K) te odgovarajuće podlinije stanica otporne na vemurafenib (R1 i R2) bojane konjugatom faloidin-TRITC koji se veže za F-aktin i fluorescentnom bojom DAPI. Ljestvica veličine, prikazana u kutu desno na preklopu, iznosi 30 μm . Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

U otpornoj staničnoj liniji WM793B možemo primijetiti puno više stresnih vlakana u usporedbi s parentalnim stanicama. Stresna vlakna naglašavaju izduženi i vretenasti oblik stanica otpornih na vemurafenib. U parentalnim stanicama WM793B vidimo gusti kortikalni aktin.



Slika 25. Kontrolne stanice A375M (K) te odgovarajuće podlinije stanica otporne na vemurafenib (R1 i R2) bojane konjugatom faloidin-TRITC koji se veže za F-aktin i fluorescentnom bojom DAPI. Ljestvica veličine, prikazana u kutu desno na preklopu, iznosi 30 μ m. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

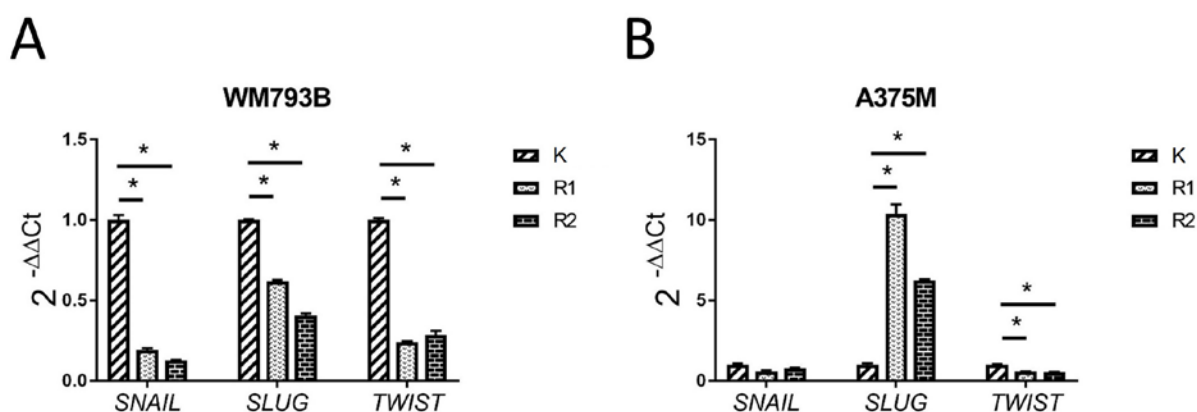
Pojavom otpornosti na vemurafenib nije došlo do velikih promjena citoskeleta stanica A375M te su otporne i parentalne stanice iste morfologije.

4.2.2. Biljezi EMT-a u stanicama otpornim na vemurafenib

Pojavom otpornosti na vemurafenib došlo je do promjene morfologije stanica te smo stoga odlučili istražiti biljege procesa EMT-a. Promjene u obliku stanice, migracijskoj sposobnosti te fundamentalne promjene u ekspresijskom profilu stanice glavne su značajke procesa EMT-a. Poznato je da proces EMT-a može utjecati na bilo koji korak u procesu metastaziranja; migraciju, invaziju, prodiranje u krvne žile (intravazaciju), izlazak iz žila (ekstravazaciju), pa čak i na dormanciju tumorskih stanica. No, nakon nabrojanih koraka metastaziranja, stanice tumora koje posjeduju karakteristike EMT-a mogu se rediferencirati u epitelni fenotip

obrnutim procesom – mezenhimalno-epitelnom tranzicijom (MET, engl. *Mesenchymal to Epithelial Transition*). Kod stanica tumora, za razliku od normalnih, netumorskih stanica, moguće je da se već dogodio, barem djelomični, proces EMT-a. Stoga tumorske stanice često pokazuju i epitelne i mezenhimalne karakteristike. Djelomični proces EMT-a povećava invazivna svojstva stanica, generira cirkulirajuće tumorske stanice i tumorske matične stanice te utječe na otpornost stanica na protutumorske lijekove [124].

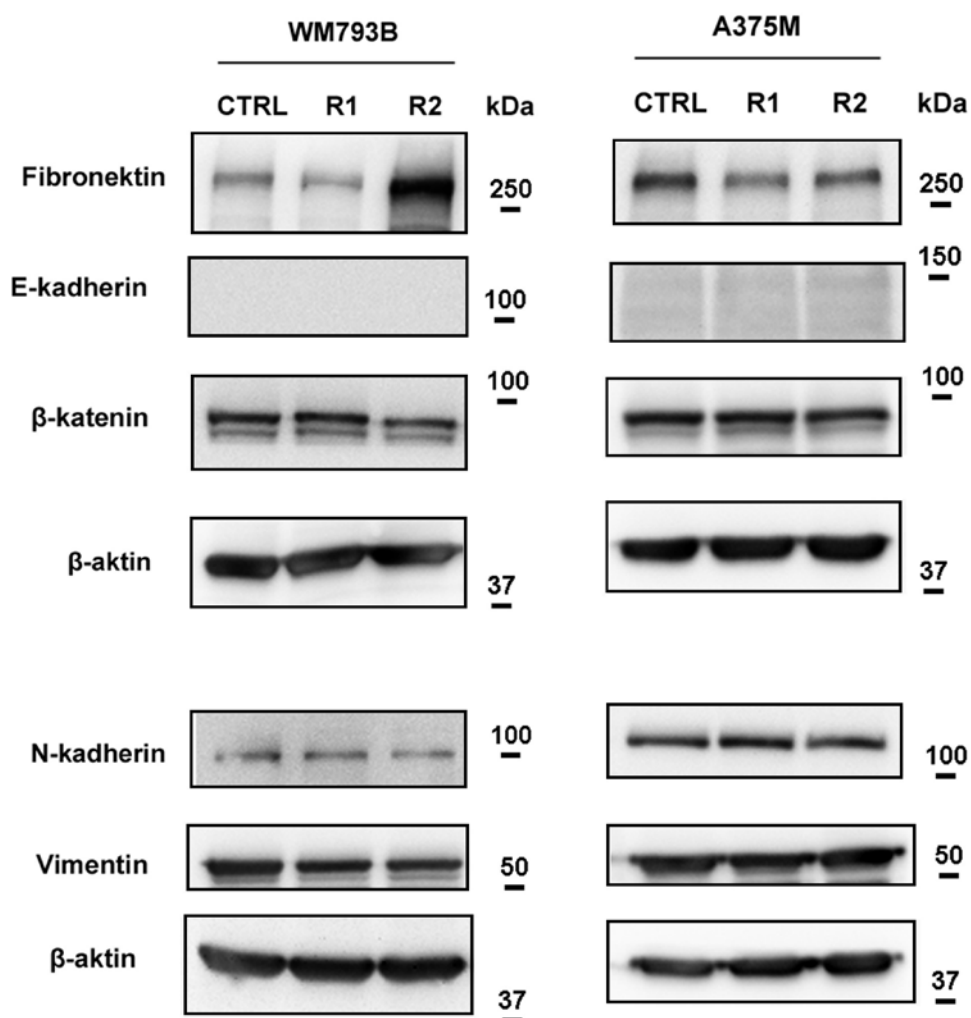
Snail, Slug i Twist transkripcijski su faktori koji reguliraju ekspresiju tumorskih supresora, poput E-kadherina. Gubitak ekspresije E-kadherina ključni je korak procesa EMT-a. Transkripcijski faktori Snail i Slug proteini su s domenom cinkovog prsta te direktni represori E-kadherina preko interakcije njihove COOH-terminalne domene sa slijedom 5'-CACCTG-3' u promotoru E-kadherina. Uključeni su u pojavu otpornosti na apoptozu i na taj način pomažu progresiji tumora. Twist je također represor E-kadherina koji je uključen u progresiju tumora tako što smanjuje ekspresiju E-kadherina i potiče EMT [125]. **Slika 26** prikazuje ekspresiju gena *SNAIL*, *SLUG* i *TWIST* u parentalnim linijama WM793B (A) i A375M (B) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (R1 i R2).



Slika 26. Ekspresija gena *SNAIL*, *SLUG* i *TWIST* u staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B). Prikazana je ekspresija u parentalnim linijama (K) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (R1 i R2). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija pojedinog gena normalizirana prema referentnom genu *TBP* te prema parentalnoj liniji, K ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Statistička analiza je napravljena u programu MedCalc koristeći test One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer.

Pojavom otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B dolazi do smanjenja ekspresije sva tri markera EMT-a, dok u staničnoj liniji A375M dolazi do smanjenja ekspresije markera TWIST te povećanja ekspresije markera SLUG.

Na proteinskoj razini provjerili smo ekspresiju biljega EMT-a, fibronektina, N-kadherina i vimentina, koji se pojačano ekspimiraju kada stanica prođe EMT te β -katenina koji povezuje E-kadherin sa staničnim skeletom te se gubitkom E-kadherina oslobađa i odlazi u jezgu. Rezultati ekspresije biljega EMT-a na proteinskoj razini prikazani su na **Slici 27**.



Slika 27. Ekspresija biljega EMT-a u staničnim linijama melanoma WM793B i A375M na proteinskoj razini. Kod obje stanične linije nanoseni su proteinski uzorci parentalne linije (**K**) te podlinija otpornih na vemurafenib (**R1** – tretman vemurafenibom tijekom 4 mjeseca i **R2** – tretman vemurafenibom tijekom 10 mjeseci). Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin. Eksperimenti su ponovljeni na najmanje tri biološke replike.

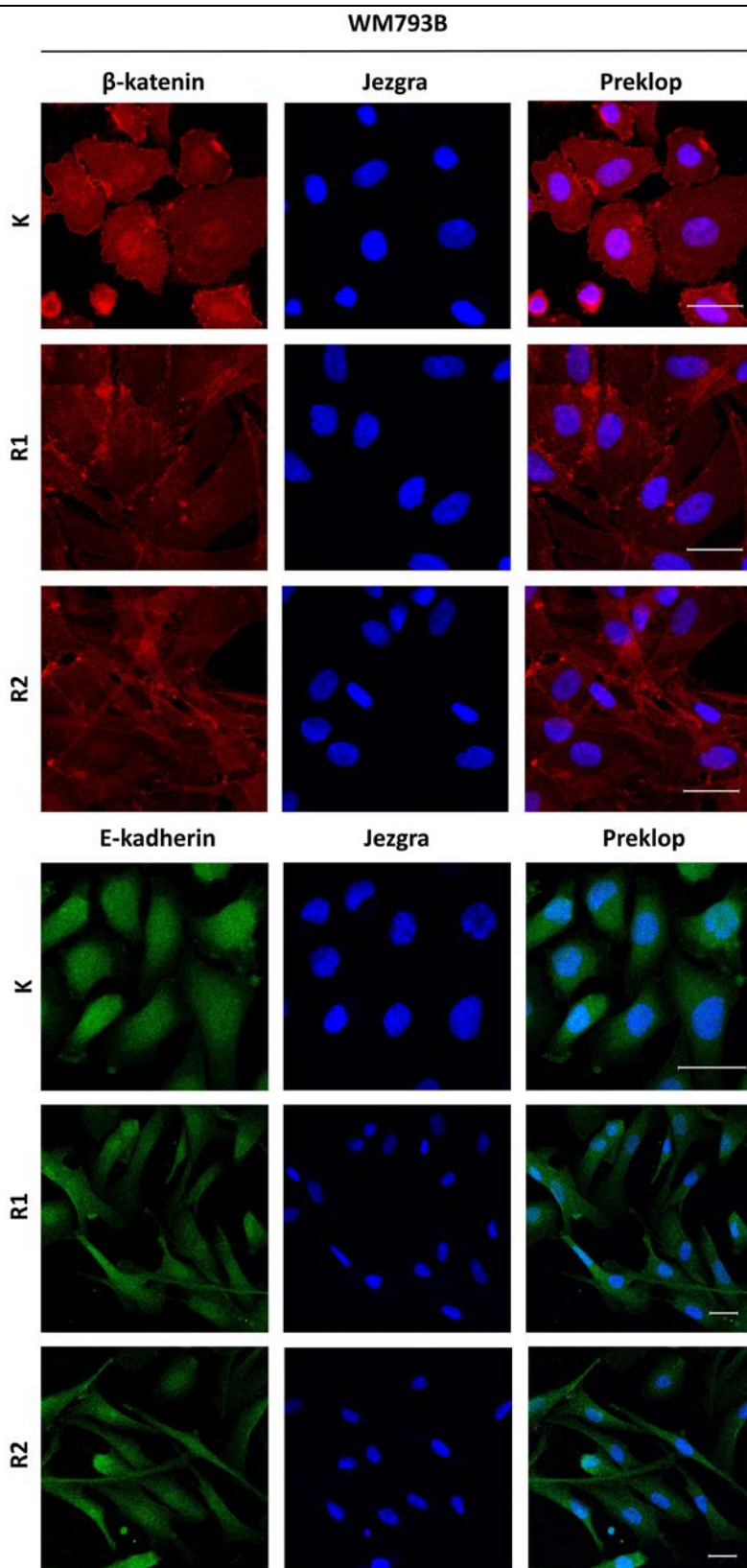
Pojavom otpornosti na vemurafenib markeri β -katenin, N-kadherin i vimentin ne pokazuju razliku u ekspresiji na proteinskoj razini niti u staničnoj liniji WM793B niti u liniji A375M. Jedina primjetna razlika vrlo je jako povećanje ekspresije fibronektina u staničnoj liniji melanoma WM793B koja je uzgajana u vemurafenibu u razdoblju od 10 mjeseci. Iako se čini

da u staničnoj liniji A375M pojavom otpornosti na vemurafenib dolazi do smanjenja ekspresije fibronektina, ponavljanjem eksperimenata nismo dobili isti rezultat. Ekspresija fibronektina u linijama A375M (K i R) malo varira, ali nema neke uočene ponavljajuće razlike.

Ivana Bobić, mag. chem., eksperimentalni dio diplomskog rada pod nazivom „Ispitivanje fenotipa stanica humanog melanoma nakon tretmana vemurafenibom“ izradila je u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Maje Herak Bosnar te mojim neposrednim voditeljstvom. Rad je obranjen na Kemijskom odsjeku PMF-a 2019. godine. Ivana je izvela preliminarne eksperimente koji nisu prikazani u mojoj disertaciji. Jedini zajednički rezultat moje doktorske disertacije i njenog diplomskog rada jest dio **Slike 28** koji se odnosi na unutarstaničnu lokalizaciju E-kadherina.

Unutarstaničnu lokalizaciju biljega EMT-a, β -katenina i E-kadherina, odredili smo metodom imunocitokemije. E-kadherin transmembranski je glikoprotein koji je u kontaktu s E-kadherinima susjednih stanica te s njima stvara homodimere. Gubitak E-kadherina važan je korak EMT-a koji dovodi do promjene morfologije stanice te agresivnog i invazivnog fenotipa. Gubitkom E-kadherina oslobađa se β -katenin koji odlazi u jezgru te aktivira transkripcijski faktor Tcf/Lef koji nadzire program EMT. Unutarstanična lokalizacija β -katenina i E-kadherina u staničnoj liniji WM793B, parentalnoj (K) i otpornoj na vemurafenib (R1 i R2), prikazana je na **Slici 28**.

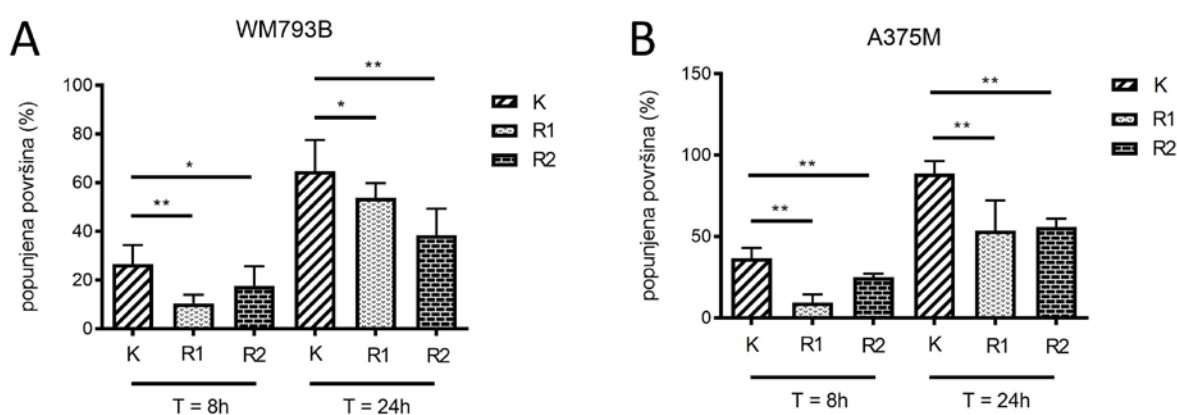
Dobiveni rezultati pokazuju da pojavom otpornosti na vemurafenib ne dolazi do translokacije β -katenina u jezgru. Dapače, pojavom otpornosti na vemurafenib, β -katenin je manje zastupljen u jezgri nego što je bio u parentalnoj liniji. Iako je zastupljen unutar cijele stanice, vidi se značajna lokalizacija na membrani stanica. E-kadherin jednoliko je lokaliziran u stanicama osjetljivim i otpornim na vemurafenib.



Slika 28. Unutarstanična lokalizacija biljega EMT-a određena metodom imunocitokemije. Za detekciju β -katenina korišteno je protutijelo protu- β -katenin, za vizualizaciju E-kadherina korišteno je protutijelo protu-E-kadherin dok je jezgra vizualizirana fluorescentnom bojom DAPI koja se veže za DNA. Ljestvica veličine, prikazana u kutu desno na preklopu, iznosi 30 μ m. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

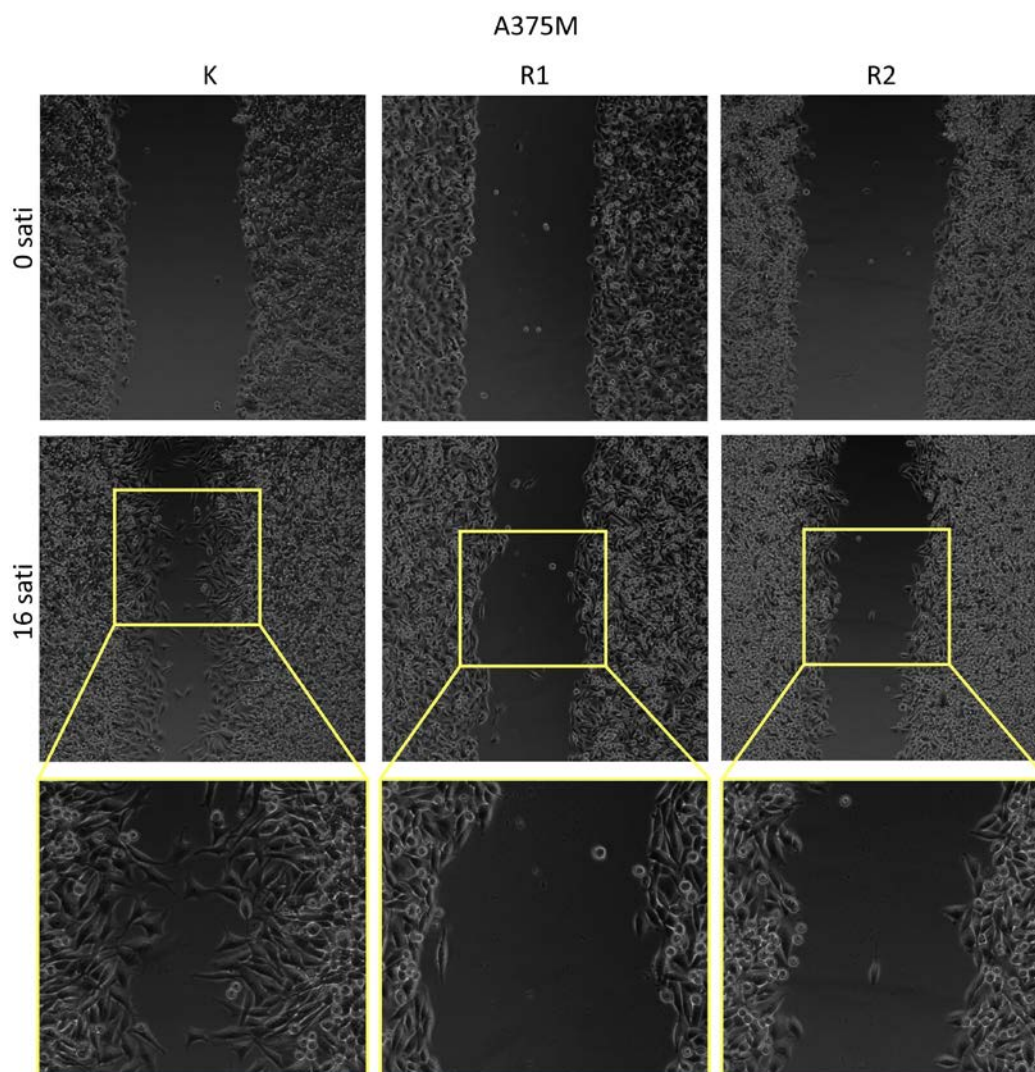
4.2.3. Istraživanje utjecaja pojave otpornosti na vemurafenib na migraciju stanica u kulturi

Promjene u migracijskoj sposobnosti važna su karakteristika procesa EMT-a. Kako bismo provjerili je li pojavom otpornosti na vemurafenib došlo do promjene u migraciji stanica, koristili smo metodu „cijeljenja rane“ (engl. *wound healing*) te metodu migracije koja se bazira na principu Boydenove komorice. U metodi „cijeljenja rane“, vrhom nastavka za pipete zagrebali smo konfluentne stanice u bunariću tako da smo ih odvojili od površine (uzrokovali ranu). Stanice su snimljene u trenutku nastanka rane te 8 i 24 sata poslije toga, a rezultati su prikazani kao popunjenost površine u odnosu na prvi sat (**Slika 29**).



Slika 29. Migracije stanica melanoma WM793B (A) i A375M (B) određene metodom „cijeljenja rane“ (engl. *wound healing assay/scratch assay*). Parentalne stanične linije (K) i podlinije otporne na vemurafenib (R1 i R2) snimljene su u trenutku uzrokovanja rane te 8 i 24 sata nakon toga. Rezultati su prikazani kao popunjenost površine u odnosu na nulti sat. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija 12 mjerenja po svakom uzorku i vremenskoj točki. Za statističku usporedbu otpornih podlinija (R1 i R2) s parentalnim linijama (K) korišten je Mann Whitney test u programu *GraphPad Prism 7.04*. Eksperimenti su ponovljeni na tri biološke replike.

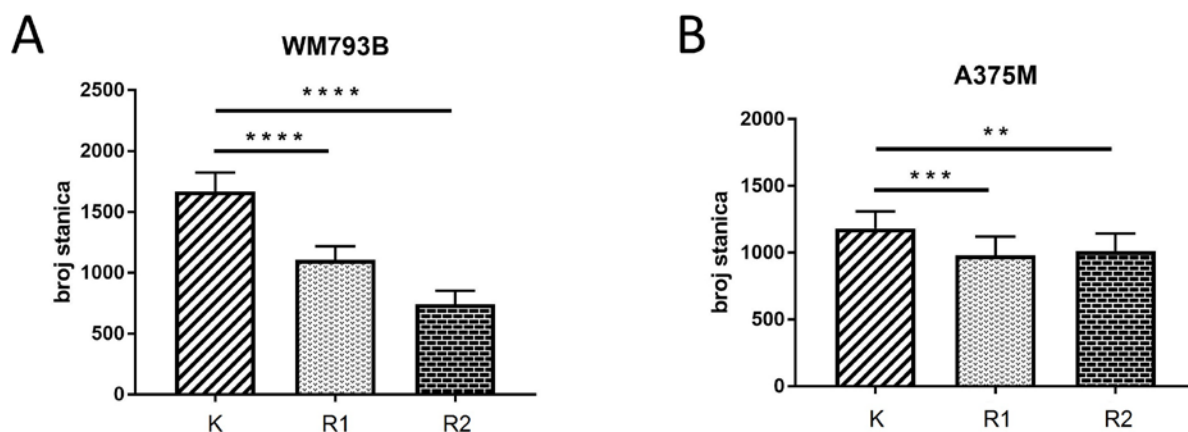
Dobiveni rezultati pokazuju da obje stanične podlinije otporne na vemurafenib imaju manju sposobnost migracije u odnosu na parentalne stanice osjetljive na vemurafenib. Jedan eksperiment smo napravili tako da smo, umjesto da snimimo ranu samo u tri vremenske točke (0, 8 i 24 sata), snimali u periodu od 24 sata po jednu snimku svakih 20 min. To nam je omogućilo dodatne informacije o kretanju stanica, a mikroskopijski prikaz migracije stanične linije A375M prikazan je na **Slici 30**.



Slika 30. Mikroskopijski prikaz migracije stanične linije A375M. Kod prikaza zatvaranja rane vidljivo je da kontrolne stanice (K) zatvaraju ranu pojedinačnom migracijom dok stanice podlinija otpornih na vemurafenib (R1 i R2) pokazuju kolektivnu migraciju.

Kontinuirano snimanje nam je pokazalo da stanična linija A375M osjetljiva na vemurafenib zatvara ranu pojedinačnom migracijom, dok kod stanica otpornih na vemurafenib primijećujemo kolektivnu migraciju.

Migracija stanica melanoma A375M i WM793B određena metodom Boydenovih komorica prikazana je na **Slici 31**. Stanice smo nasadili u gornju komoricu te odredili broj stanica koji je prešao kroz membranu u donju komoricu u periodu od sat vremena. Kao i kod metode „cijeljenja rane“ i kod metode Boydenovih komorica primijetili smo smanjenu migraciju pojavom otpornosti na vemurafenib u obje stanične linije.



Slika 31. Migracije stanica melanoma WM793B (A) i A375M (B) određene metodom Boydenovih komorica (engl. *Boyden chamber assay*). Kontrolne stanične linije (K) i podlinije otporne na vemurafenib (R1 i R2) snimljene su sat vremena nakon nasadivanja u gornju komoricu. Rezultati su prikazani kao broj stanica koje prođu kroz membranu iz gornje u donju komoricu. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija šest mjerenja po svakom uzorku. Za statističku usporedbu otpornih podlinija (R1 i R2) s parentalnim linijama (K) korišten je Mann-Whitney test u programu *GraphPad Prism 7.04*. Eksperimenti su ponovljeni na tri biološke replike.

4.2.4. Određivanje signalnih puteva uključenih u pojavu otpornosti na vemurafenib

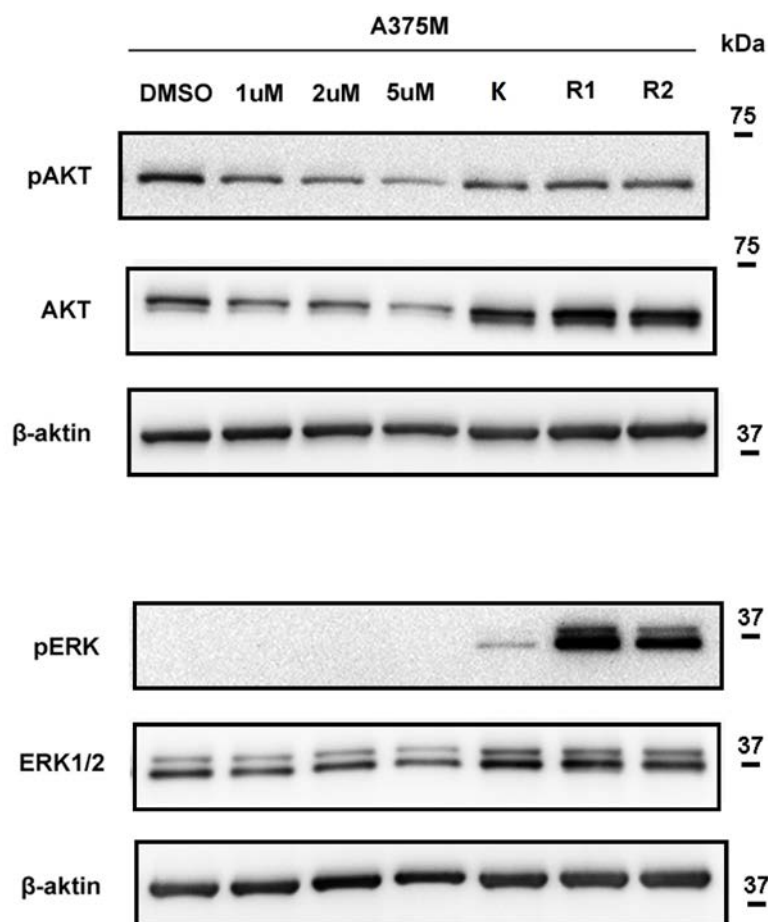
Kao što je pisano u poglavlju 2.1.4, najčešći mehanizam otpornosti na ciljanu terapiju u melanomima reaktivacija je signalnog puta MAPK koja se događa u oko 80% tumora otpornih na inhibitore proteina BRAF. Osim signalnog puta MAPK, drugi najčešće aktivirani signalni put u melanomima otpornim na ciljanu terapiju je PI3K/AKT. Kako bismo provjerili uključenost ta dva signalna puta u mehanizam pojave otpornosti na vemurafenib u našim staničnim linijama, provjerili smo ekspresiju fosforiliranog i nefosforiliranog oblika proteina pAKT/AKT i pERK/ERK u parentalnim staničnim linijama, linijama otpornim na vemurafenib te parentalnim linijama nakon kratkotrajnog tretmana vemurafenibom u koncentracijama od 1, 2 i 5 μM tijekom 24 sata. Rezultati za staničnu liniju WM793B prikazani su na **Slici 32**, a za staničnu liniju A375M na **Slici 33**. Fosforilirani oblik proteina (pAKT ili pERK) pokazuje aktivaciju uzvodne kaskade signalnog puta (PI3K/AKT ili MAPK). Povećanje omjera pAKT/AKT ili pERK/ERK u stanicama otpornim na vemurafenib u odnosu na parentalne stanice upućuje na aktivaciju pojedinog signalnog puta.

Kratkotrajni tretman stanica WM793B vemurafenibom u koncentracijama od 1, 2 i 5 μM tijekom 24 sata pokazuje značajnu aktivaciju signalnog puta PI3K/AKT (**Slika 32**). Dolazi do povećane ekspresije fosforiliranog oblika proteina AKT (pAKT). U otpornim stanicama (R1 i R2) također možemo primijetiti aktivaciju istog signalnog puta, iako ne tako

jasno kao pri kratkotrajnom tretmanu. Međutim, ako pogledamo omjer pAKT/AKT u otpornim stanicama u odnosu na parentalne, jasno je da je omjer veći u otpornim stanicama. Nadalje, možemo vidjeti da dolazi do smanjenja ekspresije fosforiliranog oblika proteina ERK, tj. smanjenja omjera pERK/ERK i kod kratkotrajnog tretmana vemurafenibom, kao i kod stanica koje su razvile otpornost na vemurafenib u odnosu na parentalne stanice. Možemo zaključiti da tretman vemurafenibom inhibira BRAF čime se zaustavlja prijenos signala do proteina ERK, ali ne dolazi do ponovne reaktivacije signalnog puta nakon stjecanja otpornosti na vemurafenib.

Slika 32. Uključenost signalnog puta PI3K/AKT i MAPK u pojavu otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom u staničnoj liniji WM793B. Prikazan je kratkotrajni tretman parentalne stanične linije tretirane vemurafenibom u koncentracijama od 1, 2 i 5 μM tijekom 24 sata (**1 μM** , **2 μM** , **5 μM**), a kao kontrola napravljen je i tretman otapalom u kojemu je vemurafenib otopljen (**DMSO**). Zatim su nanoseni uzorci parentalne linije (**K**) te podlinija otpornih na vemurafenib (**R1** – tretman vemurafenibom tijekom 4 mjeseca i **R2** – tretman vemurafenibom tijekom 10 mjeseci). Provjerena je ekspresija proteina AKT, pAKT, ERK i pERK. Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

Pojavom otpornosti stanica A375M na vemurafenib dolazi do jake reaktivacije signalnog puta MAPK (Slika 33). U otpornim stanicama (R1 i R2) dolazi do velikog povećanja ekspresije fosforiliranog oblika proteina ERK (pERK) u odnosu na parentalne stanice (K). Kratkotrajnim tretmanom vemurafenibom u koncentracijama od 1, 2 i 5 μM tijekom 24 sata pokazali smo da se ekspresija proteina pERK, veoma slaba u parentalnim stanicama, dodatno smanji do te mjere da nismo bili u mogućnosti detektirati signal. To nam pokazuje učinkovitost vemurafeniba koji inhibira signalnu kaskadu uzvodno od proteina ERK. Na istoj slici možemo primijetiti da je omjer proteina pAKT/AKT nepromijenjen u parentalnim i otpornim stanicama, kao i kod kratkotrajnog tretmana vemurafenibom. To nam pokazuje da signalni put PI3K/AKT nije uključen u mehanizam otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom u staničnoj liniji A375M.



Slika 33. Uključenost signalnog puta PI3K/AKT i MAPK u pojavu otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom u staničnoj liniji A375M. Prikazan je kratkotrajni tretman parentalne stanične linije tretirane vemurafenibom u koncentracijama od 1, 2 i 5 μM tijekom 24 sata (1 μM , 2 μM , 5 μM), a kao kontrola napravljen je i tretman otapalom u kojemu je vemurafenib otopljen (DMSO). Zatim su naneseni uzorci parentalne linije (K) te podlinija otpornih na vemurafenib (R1 – tretman vemurafenibom tijekom 4 mjeseci i R2 – tretman vemurafenibom tijekom 10 mjeseci). Provjeren je ekspresija proteina AKT, pAKT, ERK i

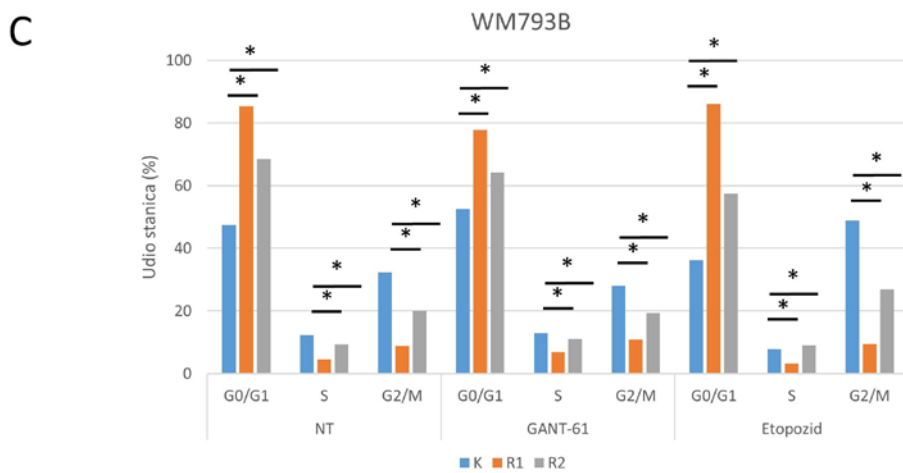
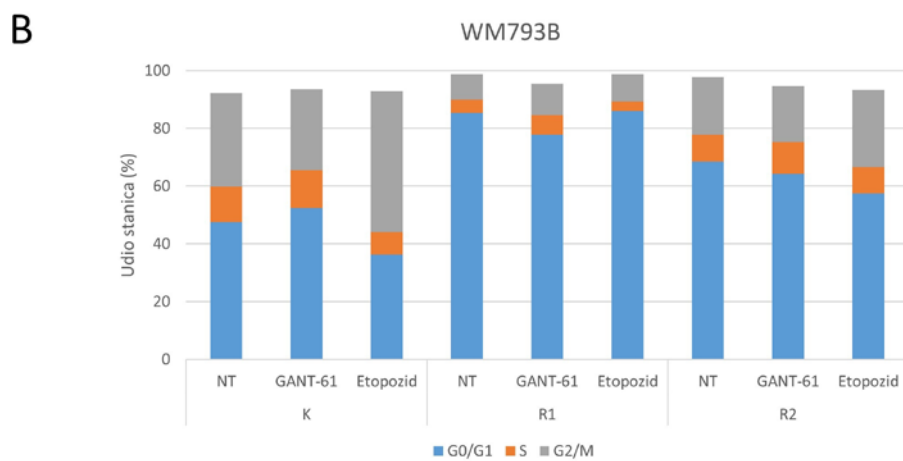
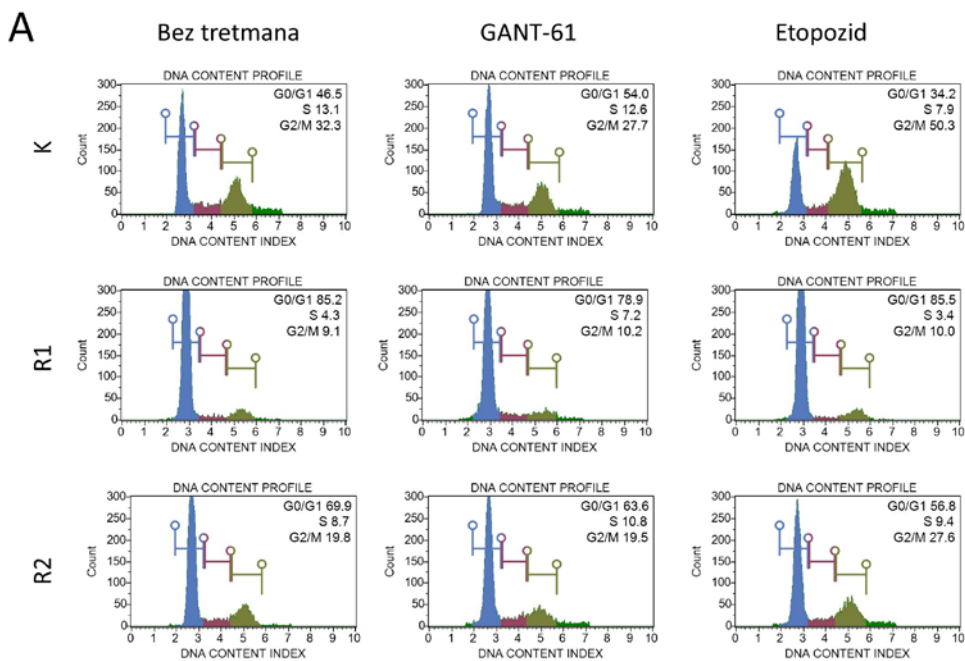
pERK. Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

4.2.5. Utjecaj pojave otpornosti na vemurafenib na faze staničnog ciklusa

Regulacija staničnog ciklusa usko je vezana uz popravak genetičkog materijala i sprječavanje nekontrolirane stanične diobe. Važna karakteristika tumorskih stanica poremećaj je u regulaciji staničnog ciklusa zbog mutacija u genima koji su uključeni u njegovu kontrolu. Vemurafenib blokira signalni put MAPK i uzrokuje zastoj staničnog ciklusa u fazi G0/G1, ali stanice otporne na vemurafenib uspijevaju pronaći alternativni mehanizam preživljenja usprkos inhibiciji signalnog puta MAPK [126]. Kako bismo provjerili utjecaj pojave otpornosti na ovaj lijek na faze staničnog ciklusa, mjerili smo razliku u raspodjeli stanica po fazama staničnog ciklusa u parentalnim staničnim linijama i stanicama otpornim na vemurafenib. Eksperimente smo proveli na staničnim linijama osjetljivim (K) i otpornim (R1 i R2) na vemurafenib, i to netretiranima, tretiranima inhibitorom GANT-61, ili tretiranima etopozidom. GANT-61 je inhibitor proteina GLI1/2 koji zaustavlja stanični ciklus u fazi G0/G1. Etopozid je protutumorski lijek širokog spektra koji uzrokuje dvolančane lomove DNA te zaustavlja stanični ciklus u fazi G2/M. Stanični ciklus analizirali smo na uređaju *Muse Cell Analyzer*.

Stanice WM793B otporne na vemurafenib pokazale su veliku otpornosti na tretman etopozidom i na tretman inhibitorom GANT-61 tijekom 24 sata (**Slika 34**). GANT-61 niti u kontrolnim stanicama nije uzrokovao veliki zastoj u fazi G0/G1 (iako ima razlike u odnosu na tretirane), ali je zato etopozid u kontrolnim stanicama uzrokovao veliki zastoj u fazi G2/M.

WM793B – 24h

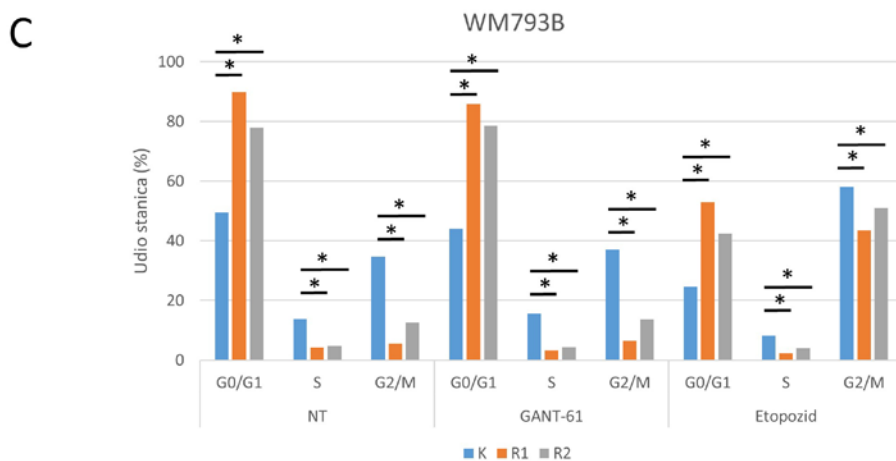
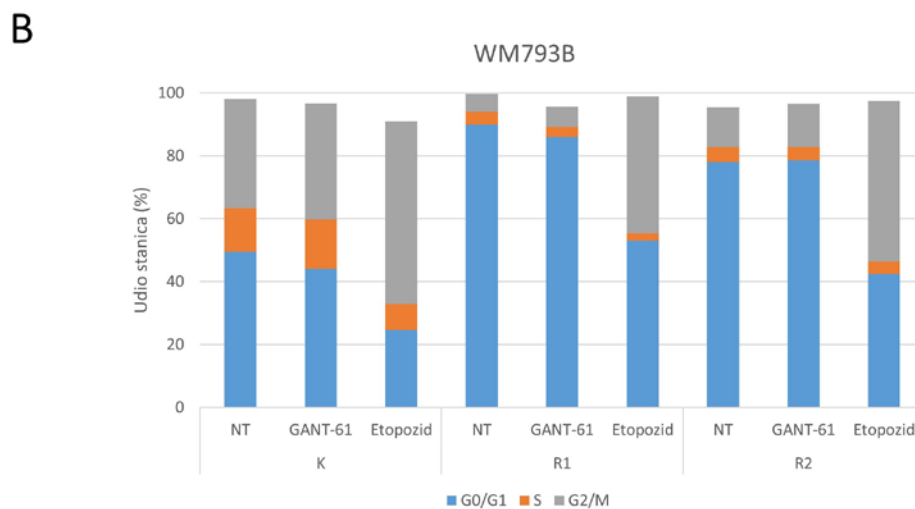
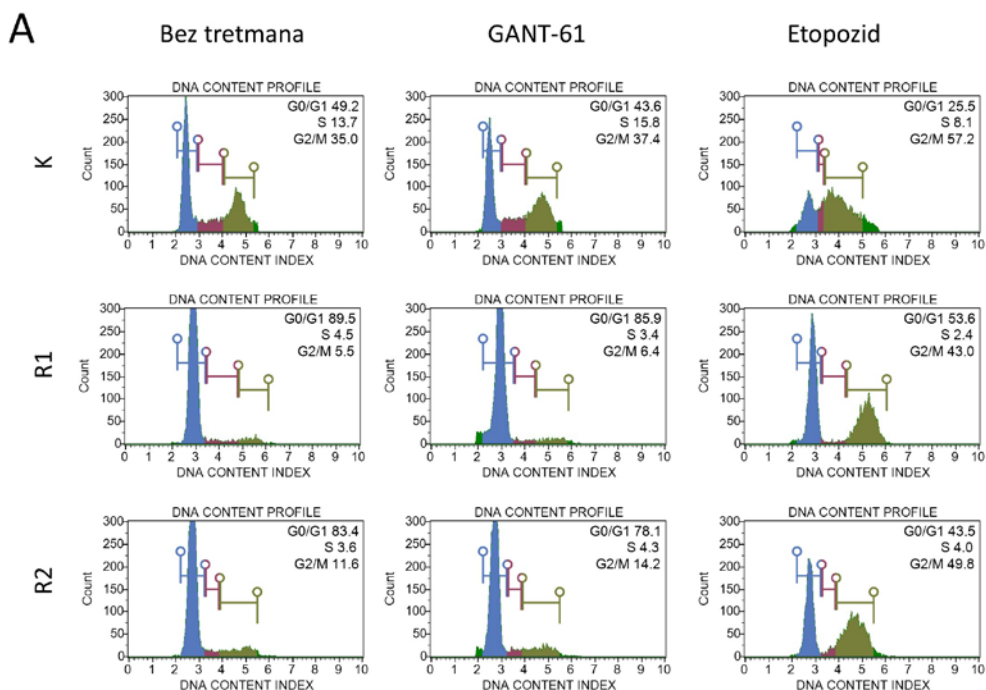


-Opis slike je na idućoj stranici-

Slika 34. Utjecaj pojave otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B na stanični ciklus. Raspodjela kontrolnih parentalnih stanica WM793B (**K**) te odgovarajućih staničnih podlinija otpornih na vemurafenib (**R1 i R2**) po fazama staničnog ciklusa analizirana je protočnom citometrijom. Eksperiment je proveden na netretiranim stanicama (**NT**) te nakon tretmana s **GANT-61** ili **etopozidom** tijekom 24 sata. Statistička analiza napravljena je u programu *MedCalc* uz pomoć testa One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer.

Zbog velike otpornosti rezistentnih stanica na tretman etopozidom ili inhibitorom GANT-61 u vremenskom razdoblju od 24 sata, proveli smo isti eksperiment uz tretman od 48 sati (**Slika 35**). Produženim tretmanom u otpornim stanicama vidimo prepoznatljiv profil i zastoje u fazi G2/M pri tretmanu s etopozidom, dok GANT-61 ne pokazuje nikakav utjecaj na faze staničnog ciklusa. Ipak, tretman etopozidom tijekom 48 sati nije pogodan za kontrolnu staničnu liniju WM793B koja ne pokazuje pravilnu raspodjelu po fazama staničnog ciklusa, već veliko nakupljanje stanica u fazi G2/M, dok je faza S gotovo odsutna, zbog čega je teško odrediti granice među fazama.

WM793B – 48h

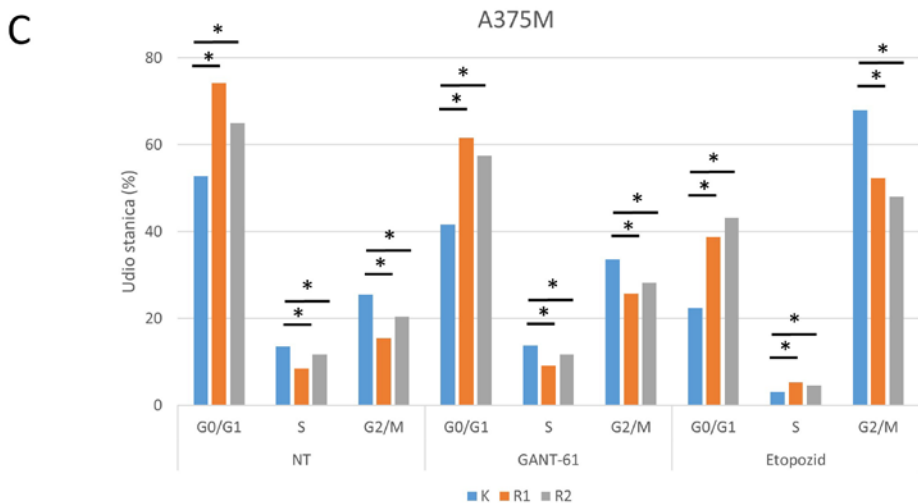
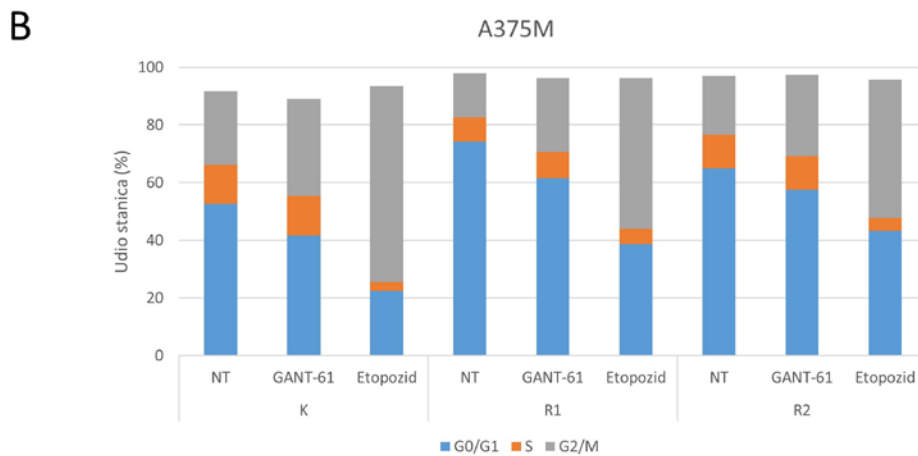
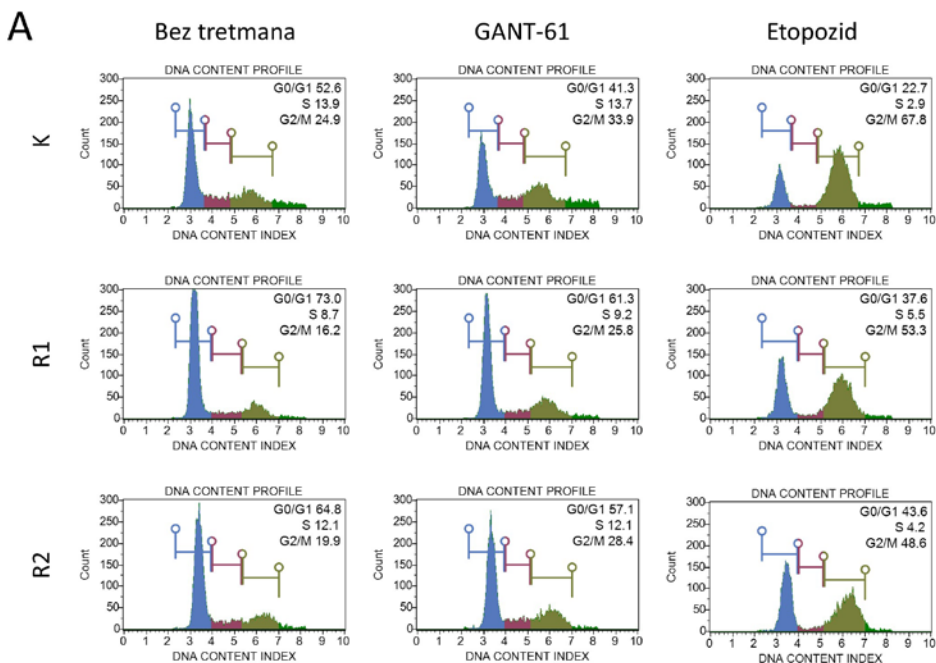


- Opis slike je na idućoj stranici -

Slika 35. Utjecaj pojave otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B na stanični ciklus. Raspodjela kontrolnih parentalnih stanica WM793B (K) te odgovarajućih staničnih podlinija otpornih na vemurafenib (R1 i R2) po fazama staničnog ciklusa analizirana je protočnom citometrijom. Eksperiment je proveden na netretiranim stanicama (NT) te nakon tretmana s **GANT-61** ili **etopozidom** tijekom 48 sati. Statistička analiza je provedena u programu *MedCalc* testom One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer.

Za razliku od stanične linije WM793B, za staničnu liniju A375M tretman s inhibitorom GANT-61 ili etopozidom tijekom 24 sata bio je prikladan za svaku podliniju. Raspodjelu kontrolnih parentalnih stanica A375M (K) te odgovarajućih staničnih podlinija otpornih na vemurafenib (R1 i R2) po fazama staničnog ciklusa nakon tretmana s inhibitorom GANT-61 ili etopozidom tijekom 24 sata možemo vidjeti na **Slici 36**. Tretman etopozidom uzrokuje veliki zastoj u fazi G2/M za svaku podliniju, dok tretman inhibitorom GANT-61 ne uzrokuje zastoj u fazi G0/G1, iako ima razlike u raspodjeli po fazama u odnosu na netretirane stanice.

A375M – 24h



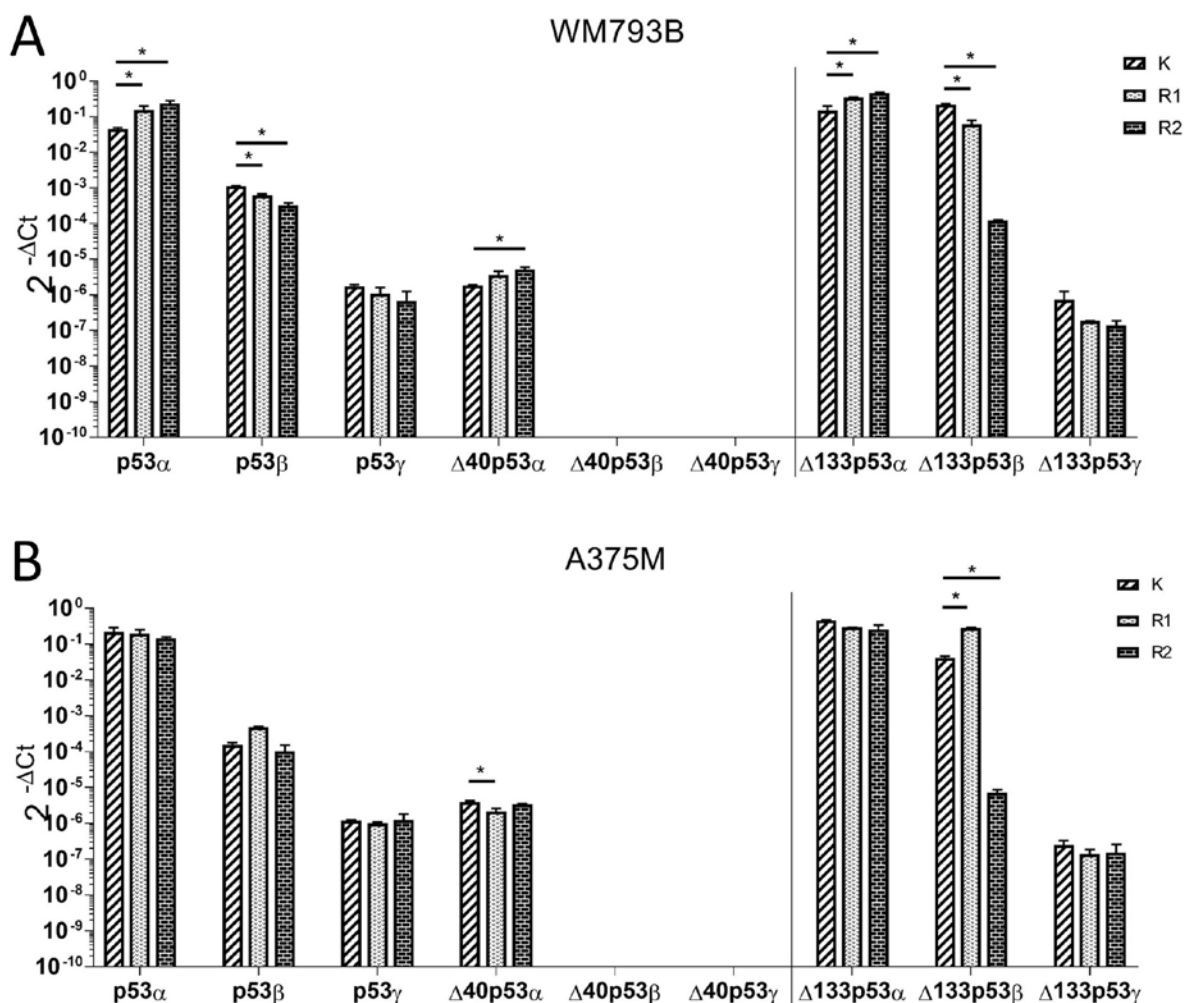
-Opis slike je na idućoj stranici-

Slika 36. Utjecaj pojave otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji A375M na stanični ciklus. Raspodjela kontrolnih parentalnih stanica A375M (**K**) te odgovarajućih staničnih podlinija otpornih na vemurafenib (**R1 i R2**) po fazama staničnog ciklusa analizirana je protočnom citometrijom. Eksperiment je proveden na netretiranim stanicama (**NT**) te nakon tretmana s inhibitorom **GANT-61** ili **etopozidom** tijekom 24 sata. Statistička analiza je napravljena u programu *MedCalc* uz pomoć testa One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer.

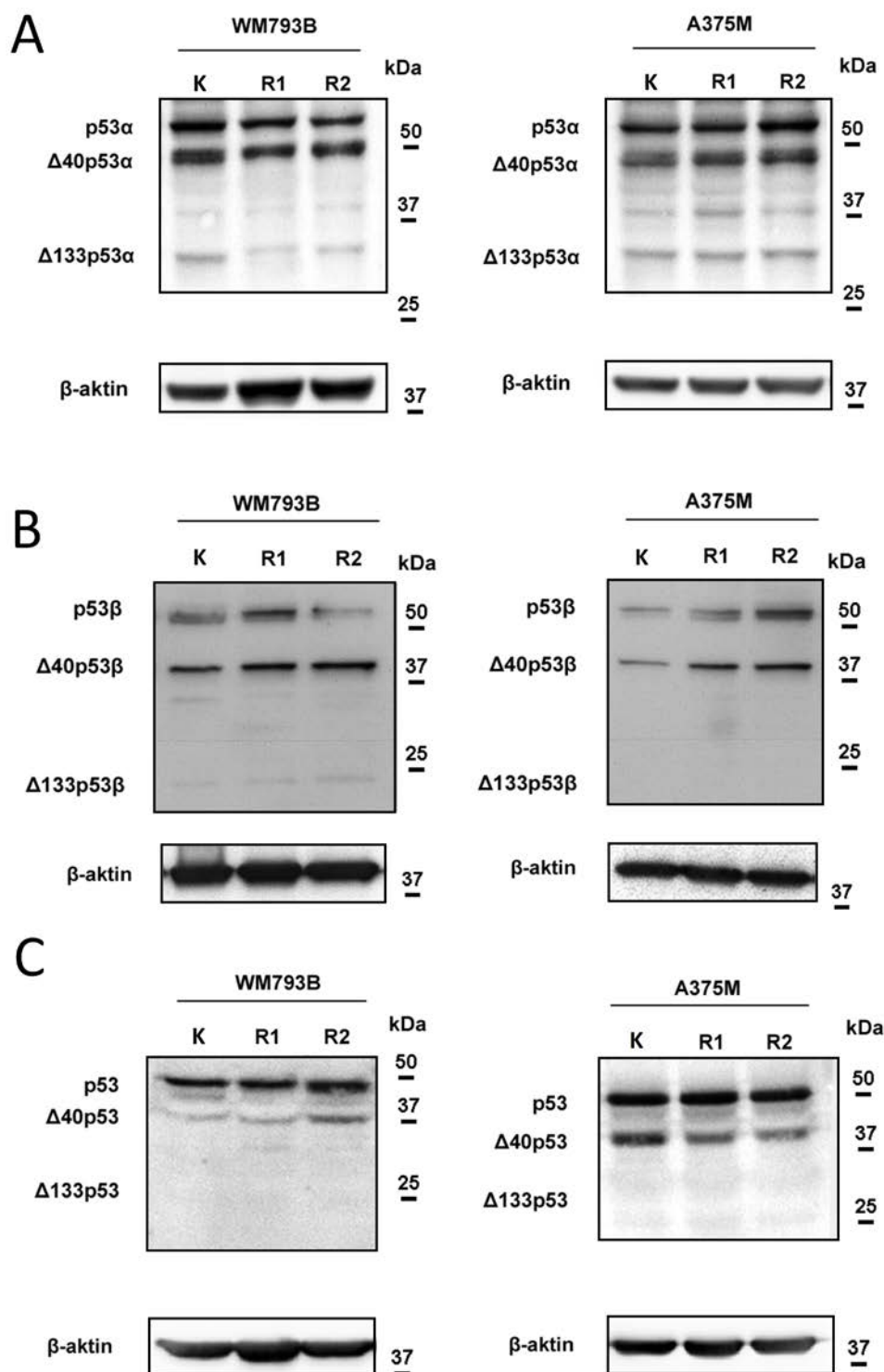
4.2.6. Genska i proteinska ekspresija članova porodica p53, NME i GLI

Ekspresiju na genskoj i proteinskoj razini članova porodica p53, NME i GLI provjerili smo metodama qPCR-a i western blota kako bismo ispitali njihovu uključenost u proces nastanka otpornosti na ciljanu terapiju vemurafenibom.

Slika 37 prikazuje ekspresiju gena *TP53* u parentalnim linijama WM793B (A) i A375M (B) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib. Iako statistička analiza pokazuje značajnu razliku u genskoj ekspresiji većine izoformi između parentalnih (K) i otpornih (R) linija, u sve tri biološke replike zajednička je jedino razlika u ekspresiji izoforme $\Delta 133p53\beta$ koja je smanjeno eksprimirana u liniji R2 u odnosu na R1 i K u obje stanične linije – A375M i WM793B. Na **Slici 38** vidimo ekspresiju izoformi proteina p53 u staničnim linijama melanoma WM793B i A375M, osjetljivim i otpornim na vemurafenib. Ekspresija na proteinskoj razini, kao i na razini gena, provjerena je na tri biološke replike. Iako ekspresija pojedinih izoformi malo varira, nisu uočene razlike koje se ponavljaju u svim biološkim replikama.

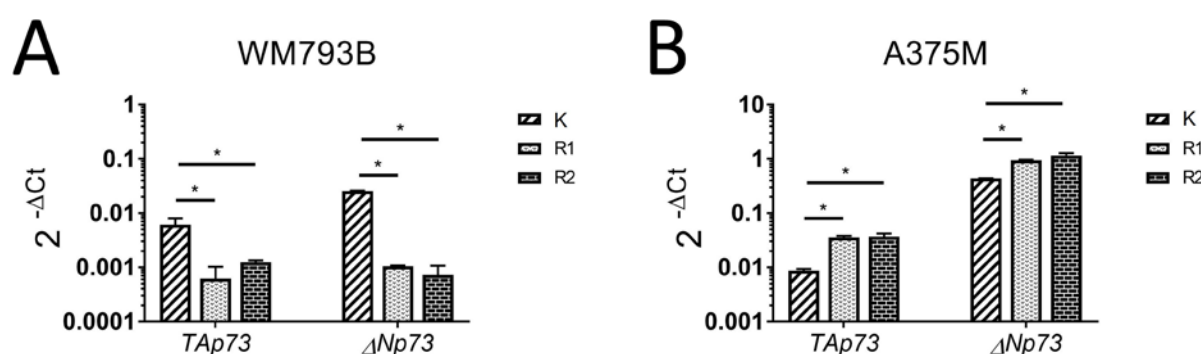


Slika 37. Ekspresija gena *TP53* u staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B). Prikazana je ekspresija gena u kontrolnim parentalnim linijama (K) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (R1 i R2). Ekspresija je analizirana metodom ugniježđenog qPCR-a (engl. *nested-qPCR*) koja uključuje reakciju preamplifikacije dugih (p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ) te kratkih (Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ) izoformi prije same analize qPCR. Iako su prikazane na istom grafu, kratke i duge izoforme nisu usporedive stoga su i odijeljene pregradom. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija pojedine izoforme normalizirana prema ukupnoj ekspresiji gena *TP53*. Statistička analiza je napravljena u programu *MedCalc* testom One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, a prikazan je reprezentativni uzorak.

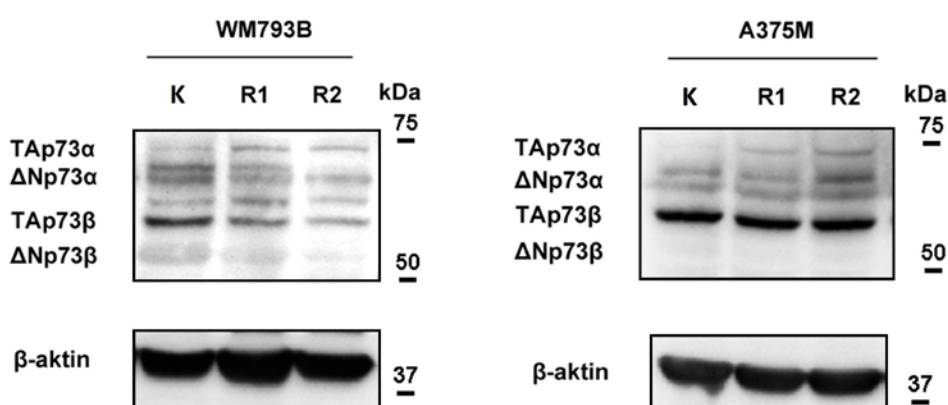


Slika 38. Ekspresija izoformi proteina p53 u staničnim linijama melanoma WM793B i A375M. Naneseni su uzorci kontrolnih parentalnih linija (**K**) te podlinija otpornih na vemurafenib (**R1** – tretman vemurafenibom tijekom 4 mjeseca i **R2** – tretman vemurafenibom tijekom 10 mjeseci). Za ekspresiju α -izoformi proteina p53 koristili smo protutijelo TSR α (**A**), za ekspresiju izoformi β protutijelo KJC8 (**B**), a ekspresiju svih izoformi provjerili smo korištenjem protutijela SAPU (**C**). Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

Ekspresija gena *TP73* prikazana je na **Slici 39**. U podlinijama stanične linije WM793B otpornim na vemurafenib ekspresija izoformi TAp73 i Δ Np73 gena *TP73* je smanjena, dok je u podlinijama stanične linije A375M otpornim na vemurafenib ekspresija TAp73 i Δ Np73 izoformi gena *TP73* povećana. Dobiveni rezultati ekspresije na proteinskoj razini (**Slika 40**) potvrđuju taj rezultat. Vidimo smanjenje ekspresije izoforme TAp73 β u otpornim stanicama WM793B u odnosu na kontrolne, kao i povećanje ekspresije izoforme TAp73 α u otpornim stanicama A375M u odnosu na kontrolne. Također, ekspresija Δ Np73 α i β smanjuje se u otpornim stanicama WM793B. U A375M našli smo samo ekspresiju Δ Np73 α , koja se povećala u otpornim stanicama.

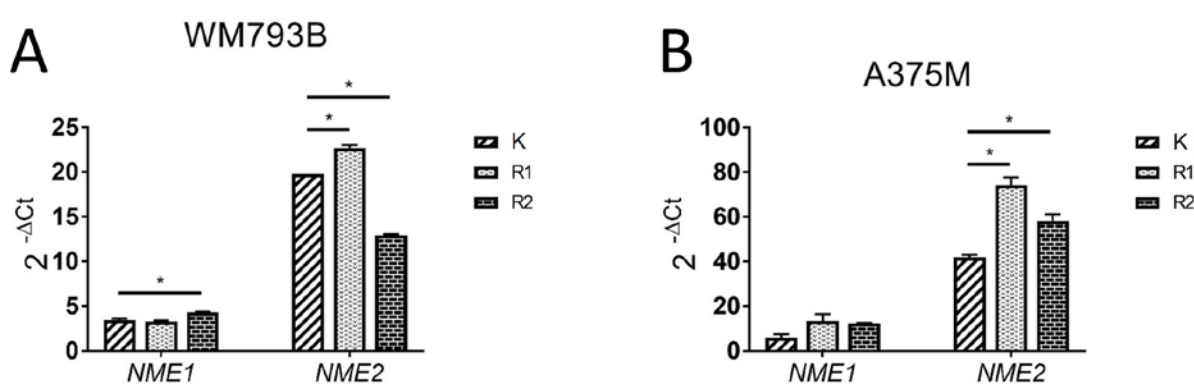


Slika 39. Ekspresija gena *TP73* u staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B). Prikazana je ekspresija gena u kontrolnim parentalnim linijama (**K**) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (**R1** i **R2**). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija pojedinog gena normalizirana prema referentnim genima *TBP* i *GUSB*. Statistička analiza provedena je u programu *MedCalc* koristeći test One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

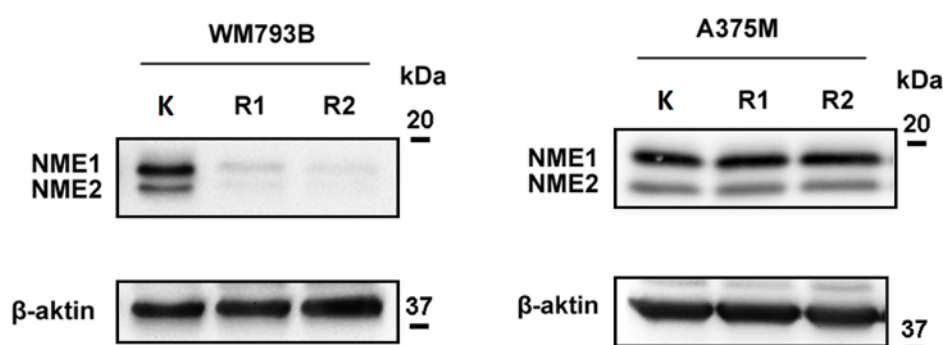


Slika 40. Ekspresija izoformi proteina p73 u staničnim linijama melanoma WM793B i A375M. Naneseni su uzorci kontrolnih parentalnih linija (**K**) te podlinija otpornih na vemurafenib (**R1** – tretman vemurafenibom tijekom 4 mjeseca i **R2** – tretman vemurafenibom tijekom 10 mjeseci). Za provjeru ekspresije izoformi proteina p73 korišteno je protutijelo EP436Y. Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

Ekspresija gena *NME1* i *NME2* u parentalnim linijama WM793B (A) i A375M (B) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (R1 i R2) prikazana je na **Slici 41**. Stanice A375M otporne na vemurafenib pokazuju povećanje ekspresije gena *NME2*, dok u WM793B vidimo najprije povećanje ekspresije gena *NME2* (R1), a dugotrajnim tretmanom (R2) dolazi do smanjenja ekspresije. U ekspresiji gena *NME1* nema razlike nakon tretmana vemurafenibom. Te rezultate ne potvrđuju eksperimenti ekspresije proteina NME1 i NME2 (prikazani na **Slici 42**). U staničnoj liniji A375M tretman vemurafenibom nema utjecaja na ekspresiju proteina, dok u WM793B dolazi do jakog smanjenja ekspresije oba proteina, NME1 i NME2, i nakon kraćeg (R1) i dužeg (R2) tretmana vemurafenibom.

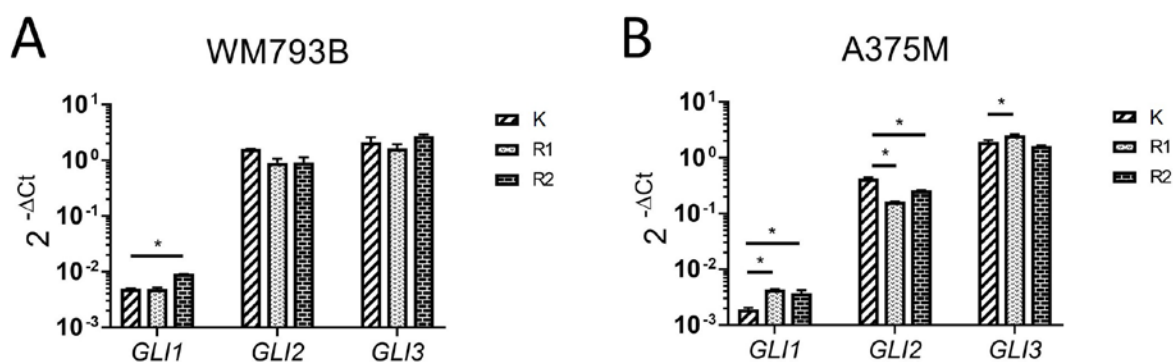


Slika 41. Ekspresija gena *NME1* i *NME2* u staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B). Prikazana je ekspresija gena u kontrolnim parentalnim linijama (K) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (R1 i R2). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija pojedinog gena normalizirana prema referentnim genima *TBP* i *GUSB*. Statistička analiza je napravljena u programu *MedCalc* koristeći test One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

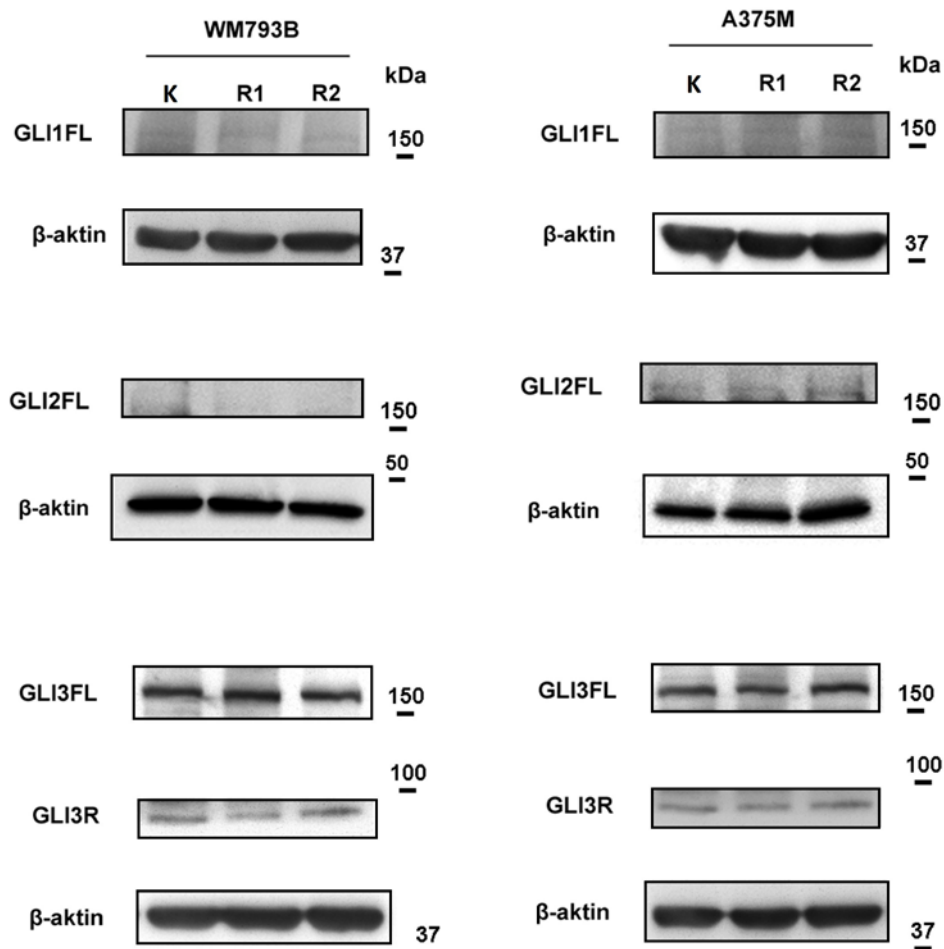


Slika 42. Ekspresija proteina porodice NME u staničnim linijama melanoma WM793B i A375M. Naneseni su uzorci kontrolnih parentalnih linija (K) te podlinija otpornih na vemurafenib (R1 – tretman vemurafenibom tijekom 4 mjeseca i R2 – tretman vemurafenibom tijekom 10 mjeseci). Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β-aktin. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

Ekspresija gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u kontrolnim parentalnim linijama WM793B (A) i A375M (B) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (R1 i R2) prikazana je na **Slici 43**. Razlika u genskoj ekspresiji porodice GLI u staničnoj liniji WM793B nakon tretmana vemurafenibom statistički je značajna, ali veoma mala za *GLI1*, dok kod *GLI2* i *GLI3* nema nikakve promjene. U staničnoj liniji A375M našli smo povećanje ekspresije *GLI1* i *GLI3*, dok vidimo smanjenje ekspresije *GLI2*. Ekspresija proteina GLI1, GLI2 i GLI3 u staničnim linijama melanoma WM793B i A375M, parentalnim i otpornim na vemurafenib (R1 i R2) prikazana je na **Slici 44**. Ekspresija proteina GLI1 i GLI2 veoma je slaba u obje stanične linije, dok je ekspresija proteina GLI3 jača pa tako osim izoforme GLI3FL možemo vidjeti i represorsku izoformu GLI3R. Nismo primijetili razliku u ekspresiji proteina porodice GLI nakon tretmana vemurafenibom.



Slika 43. Ekspresija gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u staničnim linijama WM793B (A) i A375M (B). Prikazana je ekspresija gena u kontrolnim parentalnim linijama (K) u usporedbi s odgovarajućim podlinijama otpornim na vemurafenib (R1 i R2). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija pojedinog gena normalizirana prema referentnim genima *TBP* i *GUSB*. Statistička analiza je napravljena u programu *MedCalc* koristeći test One-way ANOVA s post-hoc metodom Tukey Kramer. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.



Slika 44. Ekspresija proteina porodice GLI u staničnim linijama melanoma WM793B i A375M. Naneseni su uzorci kontrolnih parentalnih linija (**K**) te podlinija otpornih na vemurafenib (**R1** – tretman vemurafenibom tijekom 4 mjeseca i **R2** – tretman vemurafenibom tijekom 10 mjeseci). Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

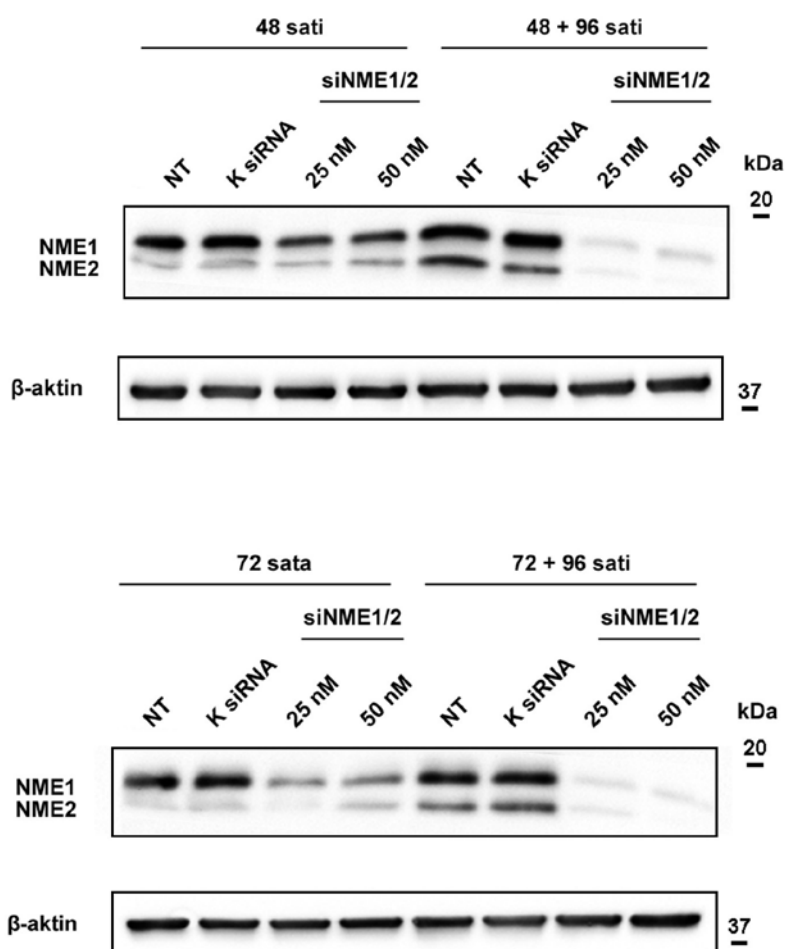
4.2.7. Utjecaj utišavanja proteina NME1 i NME2 na otpornost stanica WM793B na vemurafenib

U prethodnom poglavlju na **Slici 42** prikazana je smanjena ekspresija proteina NME1 i NME2 u podlinijama stanične linije WM793B otpornim na vemurafenib (R1 i R2) u odnosu na kontrolnu parentalnu liniju (K) te smo stoga željeli utvrditi hoće li utišavanje proteina NME1 i NME2 u parentalnim stanicama primarnog melanoma WM793B utjecati na pojavu otpornosti na vemurafenib. Provjerili smo uspješnost kombiniranog utišavanja oba proteina tijekom 48h i 72h, a također i u dužem vremenskom periodu od 6 dana (48 + 96 sati) i 7 dana (72 + 96 sati) koliko treba za očitavanje testa MTT (**Slika 45**).

Pojedinačnim utišavanjem proteina NME1 i NME2 različitim koncentracijama siRNA (12,5 i 25 nM) nismo primijetili razliku u uspješnosti utišavanja (rezultati nisu prikazani), pa

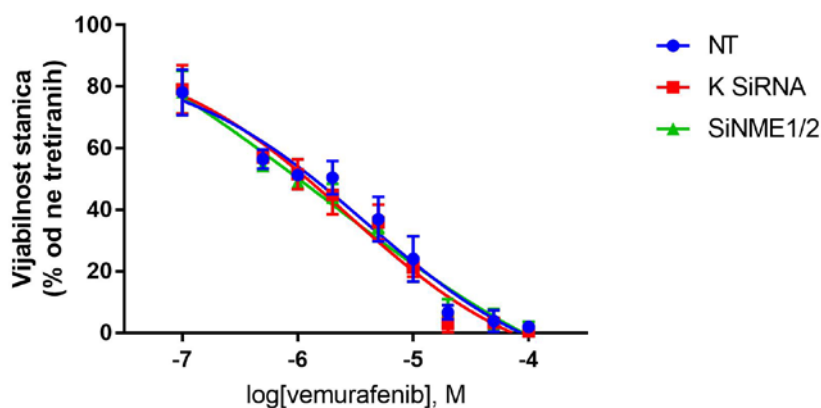
smo odlučili za kombinirano utišavanje oba proteina koristiti ukupne koncentracije siRNA od 25 nM (12,5 nM siNME1 + 12,5 nM siNME2) i 50 nM (25 nM siNME1 + 25 nM siNME2). Budući da je kombinirano utišavanje oba proteina bilo jednako uspješno pri obje korištene koncentracije siRNA, odlučili smo za test MTT koristiti manju koncentraciju od 25 nM.

Značajno utišavanje ekspresije proteina (približno 100%-tno utišavanje) vidimo u oba vremenska razdoblja od 6 dana (48 + 96 sati) i 7 dana (72 + 96 sati). Budući da su oba vremenska razdoblja pokazivala zadovoljavajuće utišavanje ekspresije, odlučili smo se za razdoblje od 6 dana (48 sati za nasađivanje i 48 + 96 sati za očitavanje MTT-a).



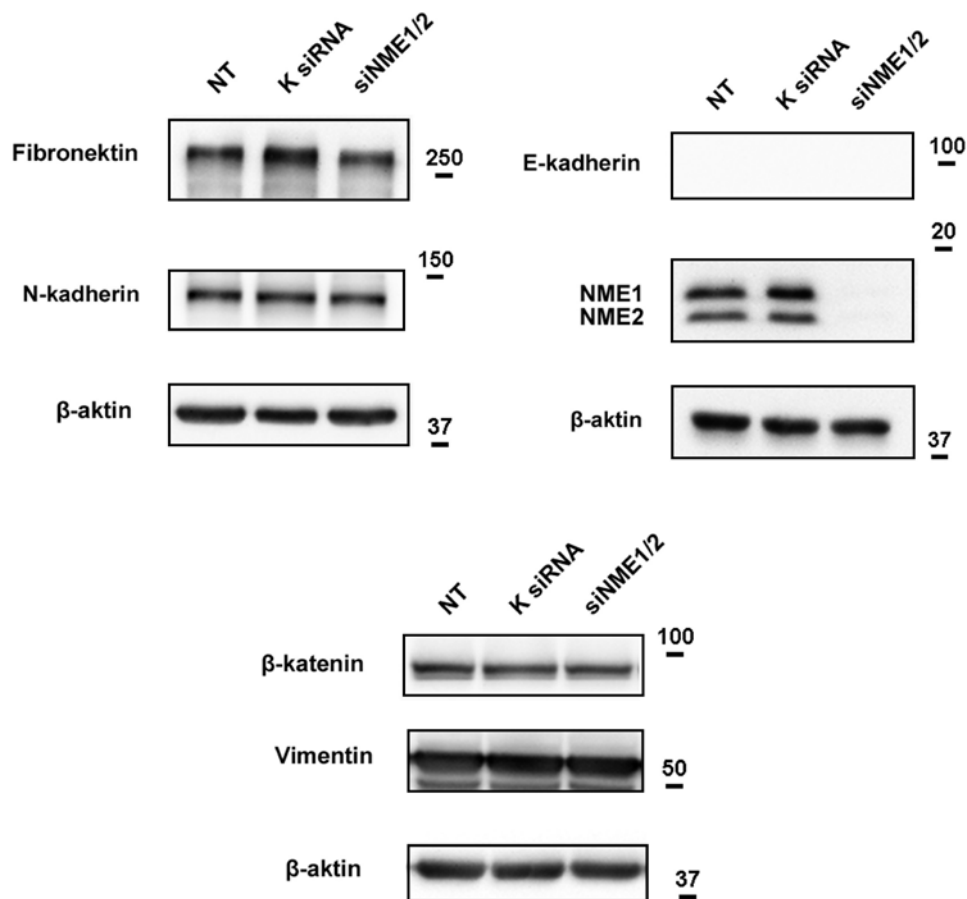
Slika 45. Utišavanje ekspresije proteina NME1 i NME2 korištenjem malih interferirajućih molekula RNA (siRNA) u staničnoj liniji WM793B. Utišavanje je provedeno kombinacijom dvije siRNA za proteine NME1 i NME2 (siNME1/2) ukupne koncentracije siRNA od 25 nM i 50 nM. Provjerena je uspješnost utišavanja u trenutku nasađivanja stanica za test MTT (48 sati i 72 sata) te u trenutku očitavanja testa MTT (48+96 sati i 72+96 sati). Na gel su nanoseni i netretirani uzorci (NT) te uzorci utišani kontrolnom siRNA (K siRNA). Kao kontrola nanošenja uzoraka korišten je β -aktin.

Vijabilnost stanica WM793B pri rastućim koncentracijama vemurafeniba prikazana je na **Slici 46**. Stanice pokazuju istu vijabilnost nakon utišavanja proteina NME1 i NME2 kao i kontrolne stanice bez tretmana te stanice nakon utišavanja kontrolnom siRNA. Možemo zaključiti da utišavanje proteina NME1 i NME2 ne utječe na pojavu otpornosti na vemurafenib u vremenskom razdoblju od šest dana.



Slika 46. Vijabilnost stanica WM793B pri rastućim koncentracijama vemurafeniba. Prikazana je vijabilnost netretiranih stanica (NT), stanica nakon utišavanja kontrolnom siRNA (K siRNA) te stanica nakon utišavanja proteina NME1 i NME2 (siNME1/2). Prikazane su srednje vrijednosti tri biološke replike sa standardnom devijacijom. Svaka biološka replika je napravljena u triplicatima.

Provjerili smo utjecaj utišavanja proteina NME1 i NME2 na ekspresiju biljega EMT-a. Izolirali smo proteine netretiranih stanica (NT), proteine stanica nakon utišavanja kontrolnom siRNA (K siRNA) te proteine stanica nakon utišavanja proteina NME1 i NME2 (siNME1/2) ukupnom koncentracijom siRNA od 25 nM. Stanice su skupljene šest dana nakon utišavanja, a ekspresija biljega EMT-a nakon utišavanja prikazana je na **Slici 47**. Nismo primijetili utjecaj utišavanja proteina NME1 i NME2 na ekspresiju biljega EMT-a – fibronektina, N-kadherina, E-kadherina, vimentina i β -katenina.



Slika 47. Ekspresija biljega EMT-a u staničnoj liniji WM793B nakon utišavanja proteina NME1 i NME2. Ekspresiju smo provjerili u netretiranim stanicama (NT), stanicama nakon utišavanja kontrolnom siRNA (K siRNA) te stanicama nakon utišavanja proteina NME1 i NME2 (siNME1/2).

5. RASPRAVA

5.1. Interakcije proteina p53 u melanomu čovjeka

Protein p53 transkripcijski je faktor koji se veže na promotorske regije stotina različitih gena i na taj način regulira njihovu ekspresiju. Jedan je od ključnih proteina u biologiji tumora koji reagira na različite signale stresa tako da sudjeluje u zaustavljanju staničnog ciklusa, popravku oštećenja DNA ili, ako popravak nije moguć, potiče apoptozu i senescenciju [43]. U normalnim stanicama razina ekspresije p53 vrlo je niska zahvaljujući djelovanju proteina MDM2 koji ubikvitinira protein p53 te, kao posljedica toga, dolazi do njegove proteasomske degradacije. Uslijed stresa, kao što je oštećenje DNA ili aktivacija onkogena, dolazi do aktivacije proteina p53 [127]. Budući da je važan tumorski supresor, njegova inaktivacija jedna je od značajki tumora. Najčešći je uzrok inaktivacije mutacija proteina p53 te je pokazano da je mutiran u otprilike 50% svih tumora. Takva inaktivacija u melanomima vrlo je rijetka. Iako različite studije pokazuju razinu mutacije proteina p53 od 0% do 30%, smatra se da je protein p53 mutiran u manje od 10% melanoma [4,128–130]. Najčešće navedeni razlozi inaktivacije proteina p53 u melanomima su pojačana degradacija proteina p53 kao posljedica povećane ekspresije ubikvitinske ligaze MDM2, inaktivacija proteinom MDM4, djelovanje proteina iASPP kao funkcionalnog antagonista proteina p53 te mutacija u proteinu p14^{CDKN2A} koja dovodi do pojačane razgradnje p53 pomoću njegovog negativnog regulatora MDM2 [8,127].

Mehanizmu inaktivacije proteina p53 u melanomima mogu pridonijeti i neke proteinske interakcije, a istraživačka grupa u kojoj sam izradila doktorsku disertaciju zainteresirana je za istraživanje interakcija proteina p53 s drugim članovima porodice p53 te porodica NME i GLI. S navedenim proteinima dosada su pokazane izravne ili regulacijske interakcije koje su detaljno opisane u literaturnom pregledu (poglavlja 2.2.3, 2.3.3 i 2.4.4).

Istraživanje interakcija proteina p53 s članovima navedenih proteinskih porodica u melanomu proveli smo na dvije stanične linije koje eksprimiraju divlji tip proteina p53: staničnoj liniji primarnog melanoma, WM793B i staničnoj liniji metastatskog melanoma, A375M. Interakcije divljeg tipa proteina p53 s članovima porodica p53, NME i GLI analizirali smo metodom koimunoprecipitacije i metodom FRET/FLIM. Budući da su mnoge izoforme navedenih proteinskih porodica u stanici vrlo slabo eksprimirane, najprije smo analizirali interakcije među egzogenim proteinima metodom koimunoprecipitacije nakon

prolazne transfekcije stanica. Dodatna prednost prolazne transfekcije stanica je to što smo jedan proteinski partner obilježili privjeskom FLAG pa smo ga jednostavno mogli izdvojiti iz proteinskog lizata koristeći protu-FLAG protutijelo. Zatim smo pokušali potvrditi interakcije pronađene na egzogenim proteinima, metodom koimunoprecipitacije endogenih proteina, koristeći protutijela za određeni protein ili skupinu izoformi. Budući da porodica p53 ima tri člana od kojih svaki ima mnoštvo izoformi koje se razlikuju po N-kraju ili C-kraju, nije moguće koristiti protutijelo specifično samo za jednu izoformu, već postoje protutijela za određenu skupinu izoformi.

Ranija istraživanja pokazala su da interakcije proteina p53 utječu na sudbinu stanice te da mnoge izoforme porodice p53 mogu modulirati stanični odgovor proteina p53 u ovisnosti o vrsti stanica i tkiva [44]. Upravo zbog toga važan dio našeg istraživanja predstavljaju interakcije proteina p53 s drugim članovima porodice p53. Naši rezultati pokazali su interakcije egzogenog proteina p53 nakon prolazne transfekcije stanica A375M (**Slika 12**) s tri izoforme proteina p73 - TAp73 α , TAp73 β i Δ Np73 α te izoformom proteina p53 - Δ 133p53 α . S izoformom Δ Np73 β interakcija nije pokazana. Direktne interakcije divljeg tipa proteina p53 s izoformama Δ Np73 već su otprije poznate u literaturi te je pokazano da takve interakcije inhibiraju transkripcijsku aktivnost proteina p53 i sposobnost poticanja apoptoze [73,74]. U prijašnjim istraživanjima pokazane su interakcije između TAp73 i mutiranog p53, ali ne i divljeg tipa proteina p53 [131–133]. Ipak, treba napomenuti da se ti rezultati ne odnose na interakcije u melanomskim linijama, već uglavnom na interakcije nakon prolazne transfekcije u stanicama H1299 koje nemaju eksprimiran protein p53 zbog djelomične homozigotne delecije gena *TP53*. Interakcija divljeg tipa proteina p53 s izoformom proteina p53 - Δ 133p53 α , potvrđena je na stanicama osteosarkoma U2OS [71]. Budući da smo pokazali interakcije divljeg tipa proteina p53 s izoformama proteina p73 (TAp73 α , TAp73 β i Δ Np73 α) i p53 (Δ 133p53 α) koje do sada nisu bile pokazane na stanicama melanoma, pruža se mogućnost daljnjeg istraživanja njihovog utjecaja na aktivnost proteina p53.

Zahvaljujući rezultatima interakcija egzogenih proteina, naš fokus istraživanja interakcija endogenih proteina bio je na izoformama proteina p73 (**Slika 17**). U metodi koimunoprecipitacije koristili smo protutijela koja prepoznaju sve izoforme proteina p73 (ER-15 i GC-15) te protutijela koja prepoznaju samo izoforme TAp73 (E-4 i A300-126A). Imunoprecipitaciju smo napravili na netretiranim stanicama i nakon tretmana etopozidom čiju koncentraciju smo odredili nakon testa MTT (**Slika 16**). Tretman kemoterapeuticima uzrokuje povećanu ekspresiju izoformi proteina p53 i p73 što je dobro poznata činjenica u znanstvenoj literaturi [134]. Stoga smo izlagali stanice etopozidu što je omogućilo da imunoprecipitiramo

veću količinu i više različitih izoformi. Primijetili smo interakcije s proteinom p53 nakon precipitacije svih izoformi p73, kao i nakon precipitacije samo izoformi TAp73 (što je uočljivije u slučaju kada smo koristili protutijelo E-4) i u slučaju netretiranih stanica i nakon tretmana etopozidom. S obzirom na to da protutijelo prepoznaje skupinu izoformi, a ne svaku pojedinačnu izoformu, možemo tvrditi samo da smo na endogenim proteinima pokazali interakcije s jednom ili više izoformi TAp73.

Važna uloga proteina NME1, a u posljednje vrijeme i NME2, u sprječavanju metastaziranja melanoma [10,11], kao i pokazane direktne interakcije proteina p53 i NME1/2 u drugim tumorskim stanicama [9], potaknule su nas na proučavanje interakcija proteina p53 s proteinima NME1 i NME2 u melanomskim staničnim linijama. Za protein NME1 pokazano je da suzbija melanomagenezu izazvanu UV zračenjem. Naime, NME1 potiče popravak oštećenja DNA uzrokovanog UV zračenjem, vjerojatno zahvaljujući svojoj aktivnosti 3'-5' egzonukleaze [12,13]. Naši rezultati koimunoprecipitacije egzogenog proteina p53 s proteinima NME1, odnosno NME2, nakon prolazne transfekcije stanica A375M (**Slika 13**) pokazuju da navedeni proteini ne tvore komplekse. Međutim, postojanje interakcija između proteina NME1 i p53, kao i proteina NME2 i p53 pokazalo je istraživanje H. Junga i suradnika. Interakcije proteina p53 i NME1 pokazali su u staničnim linijama 293T (bubrežne stanice embrija), HeLa (stanice raka grlića maternice) i HepG2 (stanice tumora jetre), dok su interakcije proteina p53 i NME2 pokazali u stanicama 293T. Također, pokazali su da je interakcija proteina p53 i NME1 najvjerojatnije posljedica stvaranja disulfidnih mostova budući da nakon mutacije aminokiselina Cys176 u proteinu p53 ili Cys145 u proteinu NME1 ne dolazi do interakcije [9]. Budući da navedeni autori u svom istraživanju nisu koristili stanične linije melanoma, odlučili smo ispitati postojanje navedenih interakcija i na endogenim proteinima u melanomskim stanicama. Interakcije endogenog proteina p53 s proteinima NME1 i NME2 nisu pokazane niti u staničnoj liniji WM793B, niti u liniji A375M (**Slika 18**), baš kao i u slučaju interakcija na egzogenim proteinima. Budući da direktne interakcije nismo uspjeli utvrditi u stanicama melanoma, rad H. Junga i suradnika ostaje jedini do sada poznati literaturni izvor koji pokazuje direktnu interakciju tih proteina [9]. Naši rezultati pokazuju da protein p53 ne stupa u direktne interakcije s proteinima NME1 i NME2 u melanomima. Moguće je, međutim, da proteinske interakcije divljeg tipa proteina p53 s proteinima NME1 i NME2 ovise o tipu tumora.

Signalni put HH-GLI ima važnu ulogu u melanomagenezi. Naime, pokazano je da je aktivan signalni put HH-GLI potreban za rast i razvoj melanoma te da signalni put MAPK regulira transkripcijsku aktivnost proteina GLI1 [14]. Također, pojačana ekspresija GLI2

povezana je s invazijom i metastaziranjem melanoma *in vitro* i *in vivo* [15]. Zbog uključenosti proteina GLI u melanomagenezu odlučili smo istražili njihove interakcije s divljim tipom proteina p53. Na **Slici 14** prikazani su rezultati ispitivanja interakcija egzogenog proteina p53 s proteinima GLI1, GLI2 i GLI3 nakon prolazne transfekcije stanica A375M. Interakcije proteina p53 nismo uspjeli utvrditi niti s jednim članom porodice GLI u stanicama melanoma. Budući da literaturni izvori navode postojanje funkcionalnih interakcija proteina p53 s proteinima porodice GLI, ali ne i postojanje direktnih interakcija (opisano u poglavlju 2.4.4), odustali smo od daljnjih istraživanja interakcija p53-GLI.

Na kraju, kako bismo neovisno ispitali interakcije detektirane imunoprecipitacijom, koristili smo metodu FRET/FLIM. FRET (engl. *Förster Resonance Energy Transfer*) je proces u kojemu dolazi do neradijativnog prijenosa energije preko sprezanja dipol-dipol s molekule donora na molekulu akceptora. Iako donor i akceptor mogu biti sintetičke boje, kao što su cijanini koji su našli veliku primjenu u biotehnologiji, u *in vivo* istraživanjima koriste se fluorescentni proteini koji se u fuziji s proteinom od interesa eksprimiraju direktno u stanici. U staničnoj biologiji FRET se najčešće koristi za ispitivanje proteinskih interakcija, zatim za testiranje proteolitičkih reakcija u kojima dolazi do razdvajanja dva kraja proteina ili za praćenje konformacijskih promjena unutar proteina. U prvom slučaju jedan proteinski partner obilježen je molekulom donora, a drugi proteinski partner obilježen je molekulom akceptora, dok je u druga dva slučaja isti protein obilježen i donorom i akceptorom [120]. Pojavu FRET-a ne možemo direktno mjeriti. Ono što pratimo i mjerimo je promjena u fotofizikalnim svojstvima donora ili akceptora. Jedna od metoda kojom možemo pratiti FRET je FLIM (engl. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) kojom mjerimo razliku u vremenu života donora koje se, u interakciji s akceptorom, skraćuje. Prednost tehnike FRET/FLIM u mjerenju proteinskih interakcija, u usporedbi s klasičnim biokemijskim metodama poput koimunoprecipitacije, jest to što je vrlo specifična i osjetljiva, omogućuje praćenje interakcija *in vivo* te praćenje lokalizacije interakcija. Pregledom literature primijetili smo da navedenu tehniku nitko nije koristio za praćenje proteinskih interakcija proteina p53. Ono što je do sada istraženo tehnikom FRET/FLIM jest kinetika oligomerizacije proteina p53 *in vitro* na proteinima obilježenim različitim fluorescentnim bojama [135]. FRET je, također, korišten za praćenje posttranslacijskih modifikacija (fosforilacija, acetilacija, ubikvitinacija) proteina p53 fuzioniranog s molekulom GFP [136] te za praćenje višestrukih konformacija proteina p53 [137], oboje *in vitro*.

Naša grupa pratila je oligomerizaciju proteina NME1 i NME2 korištenjem metode FRET/FLIM te njihovu lokalizaciju nakon oštećenja DNA uzrokovanu γ -zračenjem [122]. U

navedenom istraživanju razvili smo i uhodali metodu FRET/FLIM za praćenje proteinskih interakcija u tumorskim stanicama čovjeka te smo proteine NME1 i NME2 mogli koristiti kao pozitivnu kontrolu za praćenje interakcija proteina p53. Naime, proteini NME1 i NME2 podjedinice su heksamernog enzima nukleozid-difosfatske kinaze te za njih pouzdano znamo da moraju stupiti u interakciju. Odlučili smo kao FRET-par koristiti molekulu EGFP kao donor te molekulu mCherry kao akceptor. EGFP/mCherry čine „dobar FRET-par“ zbog relativno dugačkog vremena života donora (2,4 ns) i velikog preklapanja između emisijskog spektra donora i pobudnog spektra akceptora [121]. Primijetili smo da položaj fluorescentnih proteina (molekula donora i akceptora) može utjecati na udio molekula donora koje pokazuju FRET efekt (FRET-populacija, D_F) kod interakcija proteina NME1 i NME2 (**Slika 19**). Interakcije smo promatrali u citoplazmi stanice budući da se proteini NME1 i NME2 uglavnom nalaze u citoplazmi. Općenito su veću FRET-populaciju davali parovi kojima su i molekula EGFP i molekula mCherry bile na N-krajevima proteina. Stoga smo i kod istraživanja interakcija proteina p53 s proteinima p53 β , TAp73 α te Δ Np73 α fuzionirali molekulu EGFP ili na N-kraj proteina p53 (EGFP-p53 α) ili C-kraj (p53 α -EGFP) dok je drugi proteinski partner imao fuzioniran privjesak mCherry na N-kraju proteina. Interakcije smo promatrali u staničnoj jezgri budući da su svi proteinski partneri uglavnom tamo lokalizirani. Primijetili smo da veću FRET-efikasnost daju proteinski partneri na kojima je EGFP fuzioniran s N-krajem proteina p53 (**Slika 20**). U slučaju kada je EGFP fuzioniran s C-krajem proteina p53, efikasnost FRET-parova p53 α /p53 β te p53 α / Δ Np73 α jednaka je negativnoj kontroli. Kao negativnu kontrolu koristili smo molekulu donora i akceptora, EGFP i mCherry bez fuzioniranih proteinskih partnera. FRET-populacija negativne kontrole iznosi oko 0,05. U usporedbi s proteinima NME1 i NME2, proteinski partneri p53 α /p53 β , p53 α / Δ Np73 α te p53 α /TAp73 α ne daju tako visoke vrijednosti FRET-populacije. Međutim, vrijednosti su statistički značajne u odnosu na kontrolu te ukazuju na postojanje interakcija.

Zaključno, metodom FRET/FLIM pokazali smo postojanje interakcija proteina p53 s proteinima p53 β , TAp73 α te Δ Np73 α u staničnoj liniji A375M. Primijetili smo da položaj privjeska EGFP na proteinu p53 utječe na interakcije s proteinima p53 β i Δ Np73 α te možemo predložiti da se za daljnje eksperimente ispitivanja interakcija koristi protein p53 s fuzioniranim privjeskom EGFP na njegovom N-kraju (EGFP-p53 α). Interakcije proteina p53 s proteinima TAp73 α i Δ Np73 α pokazali smo i metodom koimunoprecipitacije. Također, interakcije proteina p53 koje smo pokazali u ovom radu koristeći koimunoprecipitaciju ili metodu FRET/FLIM, prethodno su pokazane su metodom koimunoprecipitacije koristeći

protutijelo protu-53 (DO1), što je objavljeno u doktorskoj disertaciji dr. sc. Nikoline Hanžić [123].

Koristeći metodu snimanja živih stanica, snimili smo stanice koje eksprimiraju fluorescentno obilježene proteinske partnere p53 α /p53 β , p53 α / Δ Np73 α , p53 α /TAp73 α te sam protein p53 u vremenskom periodu od 24 sata (**Slika 21**) kako bismo ispitali njihovu lokalizaciju. Zbog citotoksičnog efekta same transfekcije, kao i zbog nakupljanja velike količine egzogenih proteina koji se ne stignu tako brzo razgraditi, stanice nije bilo moguće snimati u periodu dužem od 24 sata. Čak i unutar 24-satnog perioda opazili smo da stanice pojačano umiru. Navedeni proteinski partneri kolokaliziraju u staničnoj jezgri uz djelomičnu translokaciju u citoplazmu. Primijetili smo translokaciju svih promatranih proteinskih partnera u citoplazmu iako na **Slici 21** nije vidljiva citoplazmatska translokacija izoforme Δ Np73 α . Poznato je da proteini p53 i p73 sadrže i područje za smještaj u jezgri (NLS, engl. *Nuclear Localization Signal*) i područje za izlazak iz jezgre (NES, engl. *Nuclear Export Signal*). Iako se prvotno smatralo da je relokalizacija u citoplazmu potrebna za uspješnu degradaciju proteina p53 i p73, kasnije se pokazalo da je proteasom u jezgri također sposoban razgraditi navedene proteine [138,139]. Ipak, glavno mjesto degradacije proteina p53 ostaje citoplazma u kojoj protein p53 nastaje i degradira se u uvjetima bez stresa. U odgovoru na stres, dramatično se smanjuje ubikvitinacija proteina p53 u citoplazmi, protein importin- α 3 prepoznaje područje NLS-a na proteinu p53 te dolazi do njegove translokacije u jezgri [140]. Pokazano je da tetramerizacija proteina p53 maskira NES i samim time zarobljava (stabilizira lokalizaciju) proteina p53 u jezgri [141]. Budući da smo lokalizaciju proteina p53 i p73 u citoplazmi vidjeli uglavnom u uvjetima vrlo velike prekomjerne ekspresije (u stanicama koje su pokazivale jači fluorescentni signal), možemo pretpostaviti da su proteini u citoplazmi bili predodređeni za razgradnju.

5.2. Karakterizacija stanica melanoma otpornih na vemurafenib

Melanom je izrazito agresivan tip tumora kože koji nastaje iz melanocita. Iako relativno rijedak, odgovoran je za veliku većinu smrtnih slučajeva povezanih uz tumore kože [1]. Veliki napredak u liječenju melanoma bilo je otkriće ciljane terapije koja se temelji na inhibitorima signalnog puta MAPK te otkriće imunoterapije koja se temelji na inhibitorima imunoloških kontrolnih točaka. Razvoj ciljane terapije, detaljno opisan u preglednom članku I. Kozar i suradnika, započeo je odobravanjem inhibitora proteina BRAF (BRAFi), vemurafeniba (Zelboraf, PLX4032) 2011. godine. Nedugo nakon toga odobreni su inhibitori dabrafenib i enkorafenib. Iako su BRAFi u početku pokazivali izvrsne rezultate vezane uz smanjenje i povlačenje tumora, dugoročan uspjeh nije bio moguć zbog brze pojave otpornosti tumora na terapiju. Usporedno s razvojem BRAFi tekao je i razvoj inhibitora proteina MEK (MEKi). Prvi odobreni MEKi bio je trametinib 2013. godine, zatim su slijedili kobimetinib i binimetinib. Kombinirana terapija BRAFi/MEKi pokazivala je prednosti u odnosu na monoterapiju BRAFi, no pojava otpornosti i u tom slučaju predstavljala je veliki problem [2]. Iako su najčešći mehanizmi pojave otpornosti na terapiju otkriveni, stanice tumora uvijek mogu pronaći drugačiji put za preživljenje te je daljnje istraživanje i bolje razumijevanje pojave otpornosti ključno za pronalaženje novih terapijskih meta. Iz tog razloga razvili smo i okarakterizirali dvije stanične linije melanoma, WM793B i A375M, otporne na vemurafenib.

Kako bismo potvrdili pojavu otpornosti na vemurafenib koristili smo test MTT gdje smo usporedili vijabilnost parentalnih stanica (K) s vijabilnošću potencijalno otpornih stanica (R1 i R2) kod obje stanične linije (WM793B i A375M) tijekom tretmana vemurafenibom rastućih koncentracija. Pojava otpornosti dokazana je dva mjeseca nakon početka tretmana vemurafenibom (**Slika 23 A i B**). Stanice WM793B pojavom otpornosti na vemurafenib pokazale su povećanje vrijednosti IC₅₀ od 11,7 puta (sa $6,78 \times 10^{-7}$ M na $7,95 \times 10^{-6}$ M), dok su stanice A375M pojavom otpornosti na vemurafenib pokazale povećanje vrijednosti IC₅₀ od 69,1 puta (s $5,65 \times 10^{-8}$ M na $3,91 \times 10^{-6}$ M). Tako velike razlike u vrijednosti IC₅₀ od 1-2 reda veličine između otpornih i parentalnih stanica pokazuju da je do pojave otpornosti na vemurafenib došlo već dva mjeseca nakon početka tretmana. Tijekom daljnjih eksperimenata otporne stanice smo uzgajali u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom. Produženim uzgojem u mediju s vemurafenibom dobili smo dvije otporne podlinije – R1 koju smo uzgajali u mediju s vemurafenibom 2 do 7 mjeseci te R2 koju smo uzgajali u mediju s vemurafenibom 7 do 12 mjeseci. Konačna koncentracija vemurafeniba u kojoj smo uzgajali otporne stanice WM793B (R1 i R2) bila je 4 μ M, dok je za stanice A375M R1 konačna koncentracija vemurafeniba u kojoj su uzgajane bila 1 μ M, a za stanice A375M R2 2 μ M. Sve

daljnje eksperimente proveli smo na parentalnim te na obje podlinije otpornih stanica kako bismo ustvrdili dolazi li produženim tretmanom vemurafenibom do dodatnih promjena. Stoga, kako bismo provjerili ima li promjena u osjetljivosti na vemurafenib tijekom duže selekcije, ponovili smo test MTT (**Slika 23 C i D**). U ponovljenom testu MTT stanice otporne na vemurafenib pokazale su veće preživljenje od kontrolnih parentalnih stanica pri manjim koncentracijama lijeka. Graf ovisnosti preživljenja otpornih stanica o koncentraciji vemurafeniba poprima oblik zvona s maksimumom (najvećim preživljenjem) upravo oko koncentracije uz koju su otporne stanice uzgajane. Navedeno je vidljivo kod obje stanične linije, a naročito kod A375M. Zvonoliki oblik krivulje pokazuje nam da otporne stanice bez vemurafeniba imaju manje preživljenje od otpornih stanica pri koncentraciji vemurafeniba uz koju su uzgajane. To nam daje naslutiti da stanice razviju neku vrstu ovisnosti o vemurafenibu. Budući da ovisnost preživljenja o koncentraciji vemurafeniba daje zvonoliku umjesto sigmoidalnu krivulju, očitavanje vrijednosti IC50 je otežano. No, čak i s takvim podacima vidimo da su pojavom otpornosti na vemurafenib vrijednosti IC50 povećane, tako da nam stanična linija WM793B daje 7,5 puta veću vrijednost IC50 kod linije R1 u usporedbi s kontrolom i 5,1 puta veću vrijednost IC50 kod linije R2 u usporedbi s kontrolom ($IC_{50}(K) = 3,03 \times 10^{-6} \text{ M}$, $IC_{50}(R1) = 2,27 \times 10^{-5} \text{ M}$, $IC_{50}(R2) = 1,55 \times 10^{-5} \text{ M}$). Stanična linija A375M daje 5,0 puta veću vrijednost IC50 kod linije R1 u usporedbi s kontrolom i 16,5 puta veću vrijednost IC50 kod linije R2 u usporedbi s kontrolom ($IC_{50}(K) = 8,41 \times 10^{-7} \text{ M}$, $IC_{50}(R1) = 4,21 \times 10^{-6} \text{ M}$, $IC_{50}(R2) = 1,38 \times 10^{-5} \text{ M}$). Smanjenje vrijednosti IC50 nakon duže izloženosti vemurafenibu vjerojatno je rezultat promjene krivulje u zvonoliku. Ipak, i najmanja razlika u vrijednostima IC50 između otpornih i osjetljivih linija je peterostruka. U literaturi nalazimo radove u kojima je opisana razlika još manja ili je čak i nema, a stanice su ipak okarakterizirane kao otporne zbog drugih svojstava poput povećanja fosforilacije ERK-a ili promjene fenotipa iz epitelnog u izduženi i vretenasti oblik [142]. „Zvonolika“ ovisnost vijabilnosti stanica melanoma o koncentraciji vemurafeniba već je ranije opisana u literaturi. Naime, Das Thakur i suradnici primijetili su takvu ovisnost na melanomima koji ekspresiraju onkoprotein BRAF^{V600E} u miševima. Miševima s BRAF-mutiranim melanomom tretirali su vemurafenibom dok nisu dobili melanome otporne na vemurafenib, a primarne stanice tih melanoma pokazivale su najveće preživljenje pri koncentraciji kojom su tretirane. Uklanjanje vemurafeniba iz tekuće hranjive podloge rezultiralo je značajnim smanjenjem proliferacije i promjenom morfologije stanica. Opažanja su potvrdili i *in vivo* gdje je pokazano da ukidanjem tretmana vemurafenibom miševima s melanomima otpornim na vemurafenib dolazi do jasne regresije melanoma unutar 10 dana. Autori smatraju da stanice otporne na

vemurafenib razviju ovisnost o lijeku te da se kontinuiranim tretmanom vemurafenibom omogućuje nesmetan rast stanica otpornih na vemurafenib. Diskontinuirani tretman vemurafenibom omogućio bi da se u odsutnosti lijeka uklone stanice otporne na vemurafenib zbog njihove smanjene proliferacije u odsutnosti vemurafeniba, a ponovnim vraćanjem lijeka odstranile bi se preostale stanice osjetljive na vemurafenib [143]. Iako diskontinuirani tretman inhibitorima BRAF-a još uvijek nije primijenjen u kliničkim istraživanjima, nailazimo na sličnu ideju koja bi trebala spriječiti pojavu otpornosti na BRAFi, a to je sekvencijalno liječenje ciljanom terapijom i imunoterapijom. U pacijenata kojima je terapija mijenjana nakon pozitivnog odgovora na početnu terapiju dolazi do boljeg ishoda u smislu ukupnog preživljenja u odnosu na pacijente kojima je terapija mijenjana zbog progresije bolesti. Time je u kliničkim istraživanjima potvrđeno pozitivno djelovanje prelaska s ciljane terapije na imunoterapiju, ali ostaje nejasno može li izbor početne terapije utjecati na ukupno preživljenje pacijenata [144].

Parentalne stanice primarnog melanoma, WM793B, nakon višemjesečnog tretmana vemurafenibom promijenile su fenotip te su iz epitelne prešle u vretenastu i izduženu morfologiju, što je karakteristika mezenhimalnih stanica. Za razliku od primarnog melanoma, stanice metastatskog melanoma, A375M nisu pokazale tako jasno vidljivu promjenu morfologije. Parentalne, kao i otporne stanične podlinije pokazuju karakteristike mezenhimalnih stanica (**Slika 22**). Promjenu fenotipa, koju smo zapazili na svjetlosnom mikroskopu, dodatno smo istražili bojenjem citoskeleta faloidinom koji se specifično veže za F-aktin (**Slika 24** i **Slika 25**). Kod parentalnih stanica WM793B uočili smo gusti kortikalni aktin koji nije vidljiv u otpornim stanicama. Pojava otpornosti stanica WM793B na vemurafenib rezultirala je velikim brojem stresnih vlakana (kontraktilnih snopova aktina) koja naglašavaju izduženi i vretenasti oblik stanica. U stanicama A375M nema velike razlike u citoskeletu parentalnih i otpornih podlinija te obje pokazuju mezenhimalni fenotip. Promjena fenotipa stanica iz epitelnog u mezenhimalni oblik s velikim brojem stresnih vlakana, uobičajeni je događaj nakon pojave otpornosti melanoma na lijekove. Tako su S. A. Misek i suradnici promijetili povećanje broja stresnih vlakana pojavom otpornosti na vemurafenib u linijama melanoma UACC62, M229 i M238 [145], dok su vretenasti i izduženi oblik stanica, kao i velik broj stresnih vlakana primijetili E. Dratkiewicz i suradnici pojavom otpornosti na vemurafenib u stanicama melanoma A375 i WM9 [142]. Međutim, navedena promjena staničnog fenotipa pojavom otpornosti na lijekove nije svojstvena samo melanomima, već je zabilježena na raznim drugim stanicama tumora [146,147]. U tako očitu promjenu fenotipa

možu biti uključeni razni signalni putevi, no, zajednička karakteristika stanica koje dobiju izduženi, vretenasti oblik pojavom otpornosti na lijek jest uključenost procesa EMT-a.

EMT je proces u kojemu epitelne stanice gube svoje originalne karakteristike i dobivaju mezenhimalni fenotip. Iako je važan u razvojnim procesima i zacjeljivanju rana, uključen je i u metastaziranje tumora. Ekspresija mezenhimalnih proteina povećava invazivnost, pokretljivost i metastatski potencijal tumora. U navedeni proces uključen je velik broj signalnih puteva, a neki od važnijih su MAPK, PI3K/AKT i Wnt [148]. Jedno od glavnih obilježja procesa EMT-a gubitak je ekspresije E-kadherina. Melanomske stanice WM793B i A375M ne pokazuju ekspresiju E-kadherina na proteinskoj razini (**Slika 27** i **Slika 47**). S druge strane, metodom imunocitokemije dobili smo slabo pozitivno obojenje koristeći protutijelo protu-E-kadherin (**Slika 28**). Međutim, obojenje je ravnomjerno raspoređeno po cijeloj stanici, a ne specifično na membrani gdje bismo ga primarno očekivali. Iz zapaženog možemo zaključiti da postoji velika mogućnost da je dobiveni signal nespecifičan i da ne odgovara stvarnom signalu E-kadherina u našim stanicama. Nadalje, metodom western blota nismo primijetili povećanje ekspresije mezenhimalnih proteina N-kadherina i vimentina, ali smo zato primijetili značajno povećanje ekspresije fibronektina pojavom otpornosti u liniji WM793B. Također, nema razlike niti u razini ekspresije β -katenina. Budući da se gubitkom E-kadherina β -katenin oslobađa i odlazi u jezgru, provjerili smo njegovu lokalizaciju imunocitokemijom. Naši rezultati pokazuju da je razina ekspresije β -katenina u jezgri veća kod parentalnih WM793B nego kod otpornih stanica. Takva lokalizacija β -katenina nije očekivana budući da pretpostavljamo da bi stanice trebale, barem djelomično, proći proces EMT-a. Nadalje, provjerili smo ekspresiju transkripcijskih faktora *SNAIL*, *SLUG* i *TWIST* metodom qPCR-a (**Slika 26**). *SNAIL*, *SLUG* i *TWIST* represori su E-kadherina i stoga je povećana transkripcija tih faktora povezana sa smanjenom ekspresijom E-kadherina i povećanom ekspresijom N-kadherina. U staničnoj liniji WM793B primijetili smo smanjenje ekspresije sva tri gena pojavom otpornosti na vemurafenib, dok je u staničnoj liniji A375M došlo do povećanja ekspresije gena *SLUG*. Naši rezultati ne daju jednoznačnu sliku promjena povezanih uz proces EMT-a, međutim, to je sasvim razumljivo jer je EMT vrlo kompleksan proces u koji su uključeni mnogi signalni putevi te je nemoguće očekivati da dođe do promjena svih promatranih biljega procesa EMT-a. Između ostalog, stanice koje smo koristili su tumorske stanice u kojima se možda već dogodio, barem djelomičan, proces EMT-a. Navedeno je ponajviše očekivano u stanicama metastatskog melanoma, A375M budući da se proces EMT-a može događati u bilo kojem koraku metastaziranja. Gubitak E-kadherina i povećanje N-kadherina značajno su povezani s razvojem metastaza u melanomu [149], a

ekspresija E-kadherina u našim melanomskim linijama nije pokazana na proteinskoj nazini. Također, ustanovljeno je da djelomični proces EMT-a generira cirkulirajuće tumorske stanice i tumorske matične stanice te utječe na otpornost stanica na protutumorske lijekove [124]. Između ostalog, nastankom metastaza u udaljenim tkivima stanice mogu proći kroz obrnuti proces – MET. Zbog svih nabrojanih razloga ne možemo očekivati da melanomske stanice pojavom otpornosti na vemurafenib pokažu jednoznačna svojstva procesa EMT-a.

Pojava otpornosti stanica tumora na terapiju povezana je s promjenama u migraciji stanica. Iz tog smo razloga migraciju stanica melanoma nakon pojave otpornosti na vemurafenib provjerili pomoću dvije metode, metode „cijeljenja rane“ i metode koja se temelji na principu Boydenovih komorica. U metodi „cijeljenja rane“ vrhom nastavka za pipete zagreballi smo konfluentne stanice u bunariću tako da smo odvojili stanice od površine i uzrokovali ranu. Stanice primarnog melanoma, WM793B, manje su migratorne od stanica metastatskog melanoma, A375M što se može vidjeti na **Slici 29**. U obje stanične linije pojavom otpornosti na vemurafenib primijetili smo smanjenje migracijske sposobnosti u odnosu na parentalne stanice. Druga metoda korištena za ispitivanje migracija otpornih stanica je sustav Boydenovih komorica. Stanice su stavljene u gornju komoricu bez FBS-a, a kreću se u donju komoricu gdje je stavljen FBS kao kemoatraktant. Kako bi došle do donje komorice stanice trebaju proći kroz membranu koja ima pore veličine 8 μm . Kod sustava Boydenovih komorica, kao i kod metode „cijeljenja rane“, primijetili smo bržu migraciju parentalnih stanica u odnosu na otporne stanice kod obje stanične linije (**Slika 31**). Ta razlika znatno je veća kod stanica primarnog melanoma, WM793B, u odnosu na stanice metastatskog melanoma, A375M. Treba napomenuti da su korištene metode za određivanje migracije stanica različite i zahtijevaju različito preuređivanje staničnog citoskeleta. Također, kod metode „cijeljenja rane“ treba uzeti u obzir i proliferaciju stanica budući da metoda traje 24 sata. Međutim, kod metode Boydenovih komorica proliferacija se ne treba uzimati u obzir jer metoda traje znatno kraće (u našem slučaju sat vremena). Budući da su obje metode pokazale smanjenu migraciju pojavom otpornosti stanica WM793B i A375M na vemurafenib, može se zaključiti da proliferacija nije imala tako velikog utjecaja u metodi „cijeljenja rane“. Dobiveni rezultati su iznenađujući jer su u suprotnosti s literaturnim izvorima. Naime, dosadašnja istraživanja pokazala su da pojavom otpornosti na vemurafenib dolazi do povećanja migracijske sposobnosti u primarnim linijama melanoma izvedenim iz kliničkih uzoraka, kao i u staničnim linijama melanoma A375 (primarni melanom) i WM9 (metastatski melanom) [142,150]. Također, i u drugim vrsta tumora nailazimo na povećanu migracijsku sposobnost

stanica otpornih na terapiju. Tako, na primjer, stanice tumora jajnika pokazuju povećanu migraciju nakon pojave otpornosti na kemoterapeutike [151,152].

Primjenom video mikroskopije zapazili smo razlike u migraciji otpornih i parentalnih stanica A375M koje nije bilo moguće zapaziti metodom „cijeljenja rane“ i metodom Boydenovih komorica (**Slika 30**). Naši rezultati pokazuju da parentalne stanice popunjavaju ranu migracijom pojedinačnih stanica. Svaka stanica migrira u svom smjeru i svojom brzinom te brzo popune nastalu ranu. Otporne stanice, s druge strane, popunjavaju ranu kolektivnom migracijom. Ona se temelji na komunikaciji između stanica koje migriraju. Smjer svake stanice ovisi o njezinim susjedima te se jasno vidi fronta migrirajućih stanica. Pokazano je da je intravazija nakupina epitelnih stanica kolektivnom migracijom jedan od načina prodiranja u krvne žile koji nije posredovan EMT-om [30]. Naime, metastaziranje kao posljedica migracije pojedinačnih stanica zahtijeva neke preinake EMT-a, dok metastaziranje kolektivnom migracijom ne zahtijeva takve preinake. Kolektivna invazija započinje nakupinom stanica koje tvore mikrometastaze te se smještaju u udaljenim organima gdje nastaju metastaze [153]. Međutim, kao i kod EMT-a, promjena iz pojedinačne u kolektivnu migraciju može biti reverzibilna. Važno je napomenuti uključenost E-kadherina u proces kolektivne migracije. Naime, on igra važnu ulogu u navedenom procesu budući da kolektivna migracija podrazumijeva da stanice ostvaruju međusobni kontakt te da najčešće nisu prošle kroz proces EMT-a [154,155]. Budući da nismo uspjeli detektirati E-kadherin u stanicama A375M koje su pojavom otpornosti na vemurafenib pokazale promjene u migraciji, daljnjim istraživanjima planiramo preispitati ekspresiju E-kadherina kako bismo otkrili je li neophodan za kolektivnu migraciju u melanomima.

Kako bismo provjerili koji signalni putevi su uključeni u pojavu otpornosti na vemurafenib najprije smo odredili aktivaciju signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT. Ranija istraživanja pokazala su da je reaktivacija signalnog puta MAPK najčešći mehanizam otpornosti na ciljanu terapiju u melanomima, dok je aktivacija signalnog puta PI3K/AKT drugi najčešći razlog pojave otpornosti [2]. Moguću uključenost signalnog puta MAPK u pojavu otpornosti na vemurafenib provjerili smo ispitivanjem ekspresije proteina pERK i ERK, dok smo za signalni put PI3K/AKT provjerili relativnu razinu ekspresije proteina pAKT i AKT. Povećanje ekspresije fosforiliranih oblika proteina (pERK ili pAKT) ukazalo bi na aktivaciju uzvodne kaskade signalnog puta MAPK, odnosno PI3K/AKT.

Naši rezultati pokazuju da kratkotrajni tretman vemurafenibom stanica WM793B dovodi do značajne aktivacije signalnog puta PI3K/AKT što se očituje povećanom ekspresijom fosforiliranog oblika proteina pAKT (**Slika 32**). U otpornim stanicama (R1 i R2)

također smo uočili aktivaciju signalnog puta PI3K/AKT. Iako ekspresija proteina pAKT nije tako snažna kao kod kratkotrajnog tretmana, vidljivo je da je omjer pAKT/AKT veći u otpornim stanicama u odnosu na parentalne. Nadalje, uočili smo da kod kratkotrajnog tretmana vemurafenibom dolazi do smanjenja ekspresije fosforiliranog oblika proteina ERK (ili smanjenja omjera pERK/ERK) u odnosu na parentalne stanice, kao što je to slučaj i kod stanica otpornih na vemurafenib. Iz toga možemo zaključiti da tretman vemurafenibom inhibira mutirani protein BRAF čime se zaustavlja prijenos signala do proteina ERK, ali ne dolazi do reaktivacije signalnog puta MAPK nakon stjecanja otpornosti na vemurafenib. Naš je zaključak da mehanizmu otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B pridonosi aktivacija signalnog puta PI3K/AKT.

Pojavom otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji metastatskog melanoma A375M dolazi do jake reaktivacije signalnog puta MAPK (**Slika 33**). U otpornim stanicama (R1 i R2) dolazi do znatnog povećanja ekspresije fosforiliranog oblika proteina ERK (pERK) u odnosu na parentalne stanice (K). Primijetili smo da se nakon kratkotrajnog tretmana vemurafenibom ekspresija proteina pERK, ionako slaba u parentalnim stanicama, dodatno smanji do te mjere da nismo bili u mogućnosti detektirati signal. To nam pokazuje učinkovitost vemurafeniba koji inhibira signalnu kaskadu uzvodno od proteina ERK. Također, primijetili smo da je omjer proteina pAKT/AKT nepromijenjen u parentalnim i otpornim stanicama, kao i kod kratkotrajnog tretmana vemurafenibom. Zaključak je da pojavom otpornosti na vemurafenib u stanicama metastatskog melanoma A375M dolazi do reaktivacije signalnog puta MAPK dok signalni put PI3K/AKT nije uključen u mehanizam otpornosti na vemurafenib.

Regulacija staničnog ciklusa usko je vezana uz popravak genetičkog materijala i sprječavanje nekontrolirane stanične diobe. Stoga smo odlučili provjeriti utjecaj pojave otpornosti na vemurafenib na raspodjelu stanica po fazama staničnog ciklusa. Osim netretiranih stanica otpornih i osjetljivih na vemurafenib, koristili smo i stanice tretirane etopozidom ili inhibitorom GANT-61. Inhibitori proteina BRAF^{V600E}, kao što je vemurafenib, blokiraju signalni put MAPK i uzrokuju zastoj staničnog ciklusa u fazi G0/G1 što vodi do apoptoze u melanomima. U melanomima otpornima na vemurafenib ne dolazi do zastoja u fazi G0/G1 [156]. Etopozid je protutumorski lijek širokog djelovanja koji uzrokuje zastoj staničnog ciklusa u fazi G2/M [157], dok je GANT-61 inhibitor proteina GLI1/2 koji zaustavlja stanični ciklus u fazi G0/G1 [158].

Uočili smo da nakon 24-satnog tretmana etopozidom kod parentalnih stanica WM793B dolazi do zastoja staničnog ciklusa u fazi G2/M, dok kod otpornih stanica nema zastoja (**Slika 34**). Također, našli smo da se većina stanica otpornih na vemurafenib nalazi u

fazi G0/G1. Tijekom našeg istraživanja primijetili smo smanjenu proliferaciju stanica otpornih na vemurafenib u usporedbi sa stanicama osjetljivim na vemurafenib. Navedeno vrijedi za obje otporne stanične linije, iako je kod stanica WM793B puno uočljivije. Stanice WM793B pokazuju otpornost na tretman kako etopozidom tako i inhibitorom GANT-61 u obje linije (R1 i R2) otporne na vemurafenib 24 sata nakon tretmana. Usporeni stanični ciklus jedan je od mehanizama otpornosti na terapiju [159], a kako bismo istražili je li otpornost posljedica usporenog staničnog ciklusa, odlučili smo cijeli eksperiment ponoviti uz tretman od 48 sati (**Slika 35**). Nakon produženog tretmana vidimo očekivano djelovanje etopozida s velikim zastojem staničnog ciklusa u fazi G2/M iz čega možemo zaključiti da se stanice otporne na vemurafenib sporije proliferiraju od stanica osjetljivih na vemurafenib. Za stanice osjetljive na vemurafenib tretman od 48 sati je predug te dobivamo neobičan profil raspodjele po fazama ciklusa iz kojega je teško odrediti granice pojedinog ciklusa. Stanice A375M otporne na vemurafenib pokazuju, baš kao i u slučaju stanica WM793B, veći zastoj u fazi G0/G1 u odnosu na stanice osjetljive na vemurafenib (**Slika 36**). Također, u stanicama otpornim na vemurafenib, primijetili smo i veću otpornost na tretmane etopozidom i inhibitorom GANT-61, što bi moglo sugerirati da se otporne stanice A375M slabije proliferiraju od osjetljivih stanica.

Nedavno istraživanje M. Webster i suradnika bacilo je novo svjetlo na ulogu divljeg tipa proteina p53 u melanomima. Naime, pokazali su da Wnt5A, nekanonski Wnt ligand, stabilizira vrijeme poluživota proteina p53 i koristi ga da bi potaknuo fenotip s usporenim staničnim ciklusom nakon stresa (poput oštećenja DNA, ciljane terapije ili starenja). Pokazano je da određeni podskup stanica melanoma osjetljivih na ciljanu terapiju može prijeći u stanje s usporenim staničnim ciklusom i na taj način biti otporan na ciljanu terapiju. Inhibicija divljeg tipa proteina p53 mogla bi blokirati fenotip s usporenim staničnim ciklusom i senzitivirati melanomske stanice na inhibitore BRAF/MEK [159]. Ovaj rad daje zanimljivu pretpostavku za naša daljnja istraživanja budući da povezuje fenotip s usporenim staničnim ciklusom (kojeg primijećujemo u otpornim linijama WM793B) s divljim tipom proteina p53, koji je u fokusu našeg istraživanja.

Kako bismo provjerili uključenost porodica p53, NME i GLI u pojavu otpornosti na vemurafenib, analizirali smo njihovu ekspresiju na proteinskoj i genskoj razini. Analizom ekspresije gena *TP53* našli smo značajno smanjenje ekspresije izoforme $\Delta 133p53\beta$ pojavom otpornosti na vemurafenib u podlinijama R2 stanica WM793B i A375M (**Slika 37**). Izoforma $\Delta 133p53\beta$ povezana je s invazijom tumora, povećanjem potencijala matičnih stanica raka i općenito lošim ishodom [59,160]. Navedeno je potvrdilo i naše prijašnje istraživanje gdje smo

povezali visoku ekspresiju izoformi p53 α i Δ 133p53 β na razini mRNA u kliničkim uzorcima melanoma sa smanjenim preživljenjem pacijenata [161]. Međutim, u našim stanicama melanoma pojavom otpornosti na vemurafenib dolazi do smanjenja ekspresije izoforme Δ 133p53 β na razini mRNA. Budući da je povećana ekspresija izoforme Δ 133p53 β povezana s invazijom stanica tumora dojke [160], moguća je poveznica smanjene ekspresije navedene izoforme sa smanjenom migracijom otpornih stanica WM793B i A375M. S druge strane, analiza ekspresije izoformi proteina p53 nije slijedila rezultate dobivene analizom genske ekspresije (**Slika 38**). Ipak, nedosljednosti između ekspresije gena i proteina nisu neobične budući da posttranslacijske modifikacije igraju važnu ulogu u preinaci proteina. Kod izoformi skupine α nema razlike u ekspresiji nakon pojave otpornosti na vemurafenib, dok kod izoforme skupine β , kao i kod svih izoformi razina ekspresije varira, ali nismo primijetili ponavljajuće obrasce. Možemo zaključiti da pojavom otpornosti na vemurafenib u staničnim linijama WM793B i A375M ne vidimo razliku u ekspresiji izoformi proteina p53, dok smanjena ekspresija mRNA izoforme Δ 133p53 β predstavlja zanimljivu metu za daljnja istraživanja.

Mutacijska inaktivacija gena *TP73* u tumorima vrlo je rijetka. Umjesto toga brojne studije ukazuju na njegovu prekomjernu ekspresiju u tumorima, posebice Δ Np73 [63]. U ovom radu analizirali smo ekspresiju dvije skupine izoformi p73 relevantnih u tumoru, TAp73 i Δ Np73. Analiza ekspresije gena *TP73* pokazuje povećanu ekspresiju izoformi Δ Np73 u odnosu na izoforme TAp73 u parentalnim linijama (**Slika 39**) što je očekivano, ali u suprotnosti s našim prijašnjim istraživanjem [161]. Također, ekspresija izoformi TAp73 i Δ Np73 gena *TP73* veća je u metastatskoj liniji, A375M u usporedbi s primarnim melanomom, WM793B. U podlinijama stanica primarnog melanoma WM793B otpornih na vemurafenib ekspresija izoformi TAp73 i Δ Np73 gena *TP73* je smanjena, dok je u podlinijama stanica A375M otpornih na vemurafenib povećana. Rezultati ekspresije na proteinskoj razini dobiveni metodom western blota potvrđuju taj rezultat (**Slika 40**). Primijetili smo smanjenje ekspresije izoformi TAp73 β te Δ Np73 α i Δ Np73 β pojavom otpornosti stanica WM793B na vemurafenib, kao i povećanje ekspresije izoforme TAp73 α i Δ Np73 α pojavom otpornosti stanica A375M na vemurafenib. Dobiveni rezultati potvrđuju našu pretpostavku da su članovi porodice p53 uključeni u pojavu otpornosti na vemurafenib, a daljnim istraživanjima trebali bi utvrditi jesu li uzrok ili pak posljedica te pojave.

Supresori metastaziranja su proteini koji inhibiraju metastatski potencijal stanica tumora bez utjecaja na rast primarnog tumora [162]. Do danas je poznato tridesetak supresora metastaziranja, a prvi otkriveni bio je NME1 [89]. Pokazano je da NME1 inhibira metastatsku

aktivnost kada je prekomjerno eksprimiran u staničnim linijama melanoma i tumora dojke nakon čega su uslijedila brojna istraživanja koja povezuju smanjenu ekspresiju proteina NME1 s agresivnim svojstvima različitih vrsta tumora [163]. Njegova uloga u melanomu temeljito je istražena te je pokazano snažno djelovanje supresora metastaziranja u staničnim linijama, kao i u melanomima *in vivo* [10]. Međutim, najnovija istraživanja ukazuju na veliku kompleksnost tumora i postojanje različitih subpopulacija stanica koje mogu imati drugačije karakteristike. Tako je nedavno istraživanje pokazalo novu funkciju proteina NME1, potpuno različitu od njegove uloge supresora metastaziranja. Otkriveno je da je NME1 zaslužan za rast melanoma koji pokazuju agresivni fenotip tumorskih matičnih stanica [99]. No, također, ista istraživačka grupa ukazala je na postojanje subpopulacije stanica s izrazito smanjenom ekspresijom NME1 (NME1^{LOW}) u ljudskim stanicama melanoma koja pokazuje iznimni potencijal metastaziranja *in vivo* što je potvrdilo ulogu proteina NME1 kao supresora metastaziranja [98]. Naše istraživanje pokazalo je drastično smanjenje ekspresije proteina NME1 i NME2 pojavom otpornosti na vemurafenib u stanicama WM793B (**Slika 42**). U staničnoj liniji A375M pojavom otpornosti na vemurafenib razina ekspresije proteina NME1 i NME2 ostala je nepromijenjena. S druge strane, razina ekspresije gena *NME1* i *NME2* nije koherentna s rezultatima proteinske ekspresije. No, kako smo ranije ustvrdili, neusklađenosti između ekspresije gena i proteina nisu neuobičajene. Tako u staničnoj liniji WM793B vidimo da je dugoročnim tretmanom vemurafenibom došlo do smanjenja ekspresije gena *NME2* u podliniji R2, dok je u podliniji R1 došlo do povećanja njegove ekspresije (**Slika 41**). U staničnoj liniji A375M primijetili smo povećanje ekspresije gena *NME2* u obje podlinije, R1 i R2. Do sada u literaturi nismo naišli na istraživanje proteina porodice NME u staničnim linijama melanoma otpornim na ciljanu terapiju. Međutim, djelovanje proteina NME1 kao supresora metastaziranja u melanomu dobro je poznata činjenica, dok se genu *NME2* aktivnost supresora metastaziranja u melanomima pripisala tek nedavno [10]. Smanjena ekspresija proteina NME1 i NME2 pojavom otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B stoga nije iznenađujuća budući da su navedene stanice promijenile fenotip i postale izdužene mezenhimalne stanice (**Slika 22**) te, vrlo vjerojatno, povećale svoj metastatski potencijal. Odlučili smo istražiti povezanost smanjene ekspresije proteina NME1 i NME2 u otpornim stanicama WM793B s pojavom otpornosti na vemurafenib. Stoga smo utišali oba proteina u kontrolnoj staničnoj liniji WM793B te provjerili utjecaj na otpornost na vemurafenib i ekspresiju biljega EMT-a. Iako se utišavanje oba proteina pokazalo iznimno uspješnim (**Slika 45**), utjecaj utišavanja na pojavu otpornosti na vemurafenib nije primijećen (**Slika 46**). Naime, i kontrolne stanice, kao i stanice s utišanom ekspresijom proteina NME1 i

NME2 pokazuju istu vijabilnost pri rastućim koncentracijama vemurafeniba, tj. istu vrijednost IC50. Također, pokazali smo da utišavanje navedenih proteina nema utjecaja na razinu ekspresije fibronektina, N-kadherina, E-kadherina, vimentina i β -katenina (**Slika 47**). Ipak, treba napomenuti da je vremenski period od utišavanja do očitavanja testa MTT, kao i do provjere ekspresije biljega EMT-a bio šest dana što je ipak vrlo kratko vremensko razdoblje. Stoga postoji mogućnost da bismo primijetili utjecaj utišavanja u provedenim eksperimentima da je utišavanje provedeno u dužem vremenskom periodu. Ipak, tu smo ograničeni i samom metodom prolaznog utišavanja koja pokazuje efekt 5 do 7 dana nakon utišavanja. Naši rezultati ukazuju na to da smanjena ekspresija proteina NME1 i NME2 nije uzrok već je posljedica pojave otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B.

Istraživanje Faião-Flores i suradnika pokazalo je da stanične linije melanoma otporne na vemurafenib imaju povećanu razinu proteina GLI1 i GLI2 u usporedbi s parentalnim linijama. Navedeno su pokazali i na kliničkim uzorcima melanoma. Otkrili su da utišavanje proteina GLI1 i GLI2 vraća osjetljivost stanicama otpornim na vemurafenib te da tretman otpornih stanica s Gant61 (inhibitorom proteina GLI1 i GLI2) vodi do smanjene invazije stanica melanoma [16]. Naši rezultati ne pokazuju razliku u ekspresiji proteina porodice GLI nakon pojave otpornosti na vemurafenib u stanicama melanoma (**Slika 44**). Treba, međutim, naglasiti kako je razina ekspresije proteina GLI1 i GLI2 relativno niska u melanomskim linijama WM793B i A375M. No, moguće je da problem predstavljaju i protutijela koja smo upotrebljavali i koja prepoznaju velik broj nespecifičnih pruga, a signal naših proteina je veoma slab. Nažalost, na tržištu trenutno ne postoje bolja protutijela za proteine GLI i GLI2. S druge strane, protutijelo za protein GLI3 vrlo je specifično te, osim punog oblika proteina GLI3 – GLI3FL, vidimo i represorsku izoformu, GLI3R. Na genskoj razini pojavom otpornosti na vemurafenib vidimo da dolazi do povećanja ekspresije gena *GLI1* u liniji WM793B te *GLI1* i *GLI3* u liniji A375M te smanjenja ekspresije *GLI2* u liniji A375M (**Slika 43**). Razlika nije tako znatna, ali je statistički značajna i lakša za potvrditi kvantitativnom metodom qPCR nego semikvantitativnom metodom western blota. Također, naše prijašnje istraživanje povezano je povećanu ekspresiju *GLI1* u kliničkim uzorcima melanoma sa smanjenim preživljenjem pacijenata [161].

Najvažnije rezultate dobivene karakterizacijom stanica melanoma WM793B i A375M otpornih na vemurafenib možemo sumirati u ovom odjeljku. Stanice WM793B pojavom otpornosti promijenile su fenotip u izduženi i vretenasti oblik te je došlo do povećane ekspresije fibronektina za koji je pokazano da pospješuje malignu transformaciju i migraciju stanica melanoma [149]. Zanimljivo je da su otporne stanice pokazale najveće preživljenje uz

koncentraciju vemurafeniba uz koju su uzgajane. Pojavom otpornosti na vemurafenib došlo je do smanjenja migracijske sposobnosti obje stanične linije, WM793B i A375M, a dobiveni rezultati u suprotnosti su s literaturnim izvorima koji pokazuju da pojavom otpornosti tumora na terapiju dolazi do povećanja njihove migracijske sposobnosti [142,150]. Pojava otpornosti stanica WM793B dovela je do aktivacije signalnog puta PI3K/AKT, dok je pojava otpornosti stanica A375M reaktivirala signalni put MAPK. Prema literaturnim podacima to su dva najčešće aktivirana signalna puta kao posljedica pojave otpornosti na terapiju BRAFi [2]. Uključenost porodica p53, NME i GLI u pojavu otpornosti na vemurafenib istražena je provjerom ekspresije na genskoj i proteinskoj razini članova navedenih proteinskih porodica. U najznačajnije promjene spada smanjenje genske ekspresije izoforme $\Delta 133p53\beta$ koju smo, u našem prijašnjem radu, povezali sa smanjenim preživljenjem pacijenata [161]. Zatim, značajno je smanjenje ekspresije izoformi p73 na genskoj i proteinskoj razini pojavom otpornosti u stanicama WM793B te povećanje ekspresije izoformi p73 u otpornim stanicama A375M. U otpornim stanicama WM793B dolazi do drastičnog smanjenja ekspresije proteina NME1 i NME2 čiju povezanost s pojavom otpornosti smo detaljnije istražili. Naši rezultati pokazali su da smanjena ekspresija proteina NME1 i NME2 nije uzrok već posljedica pojave otpornosti na vemurafenib u staničnoj liniji WM793B. Ovim radom pokazali smo da su članovi porodica p53 i NME povezani s pojavom otpornosti na vemurafenib. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se detaljnije razjasnila njihova povezanost, pogotovo kod porodice proteina p53. Time se otvara mogućnost za otkrivanje novih terapijskih meta koje bi pomogle senzibilizirati melanom na ciljanu terapiju.

6. ZAKLJUČAK

Proučavanjem interakcija divljeg tipa proteina p53 s članovima porodica p53, NME i GLI u stanicama melanoma došli smo do sljedećih zaključaka:

- Interakcije egzogenog proteina p53 pokazali smo s egzogenim izoformama proteina p53 ($\Delta 133p53\alpha$) i p73 (TAp73 α , TAp73 β i $\Delta Np73\alpha$). Na endogenoj razini pokazali smo interakcije proteina p53 s jednom ili više izoformi TAp73.
- Interakcije proteina p53 nismo pokazali s članovima porodice NME niti na egzogenoj niti endogenoj razini.
- Interakcije proteina p53 nismo pokazali s članovima porodice GLI na egzogenoj razini.
- Interakcije proteina p53 s proteinima p53 β , $\Delta Np73\alpha$ te TAp73 α u staničnoj jezgri pokazali smo metodom FRET/FLIM te smo potvrdili kolokalizaciju navedenih proteinskih partnera u jezgri uz povremenu translokaciju u citoplazmu.

Pojavu otpornosti stanica melanoma WM793B i A375M na vemurafenib okarakterizirali smo idućim eksperimentima te smo došli do navedenih zaključaka:

- Mehanizam otpornosti potvrdili smo testom MTT.
- Pojavom otpornosti na vemurafenib stanice WM793B razvile su vretenasti fenotip s mnoštvom stresnih vlakana te je došlo do promjene ekspresije biljega EMT-a.
- Otporne stanice melanoma WM793B i A375M pokazale su smanjenu migraciju u odnosu na parentalne.
- U staničnoj liniji WM793B došlo je do aktivacije signalnog puta PI3K/AKT, a u staničnoj liniji A375M signalnog puta MAPK kao mehanizma pojave otpornosti.
- Pojavom otpornosti u stanicama WM793B došlo je do usporavanja staničnog ciklusa.
- Uočili smo razliku u genskoj i/ili proteinskoj ekspresiji porodica p53 i NME kao posljedicu pojave otpornosti na vemurafenib u obje melanomske linije te smo time potvrdili našu hipotezu o uključenosti navedenih proteinskih porodica u mehanizam otpornosti.
- Iako su otporne stanice WM793B pokazale značajno smanjenje ekspresije proteina NME1 i NME2 u usporedbi s parentalnim, utišavanje navedenih proteina u parentalnoj

liniji WM793B nije utjecalo na pojavu otpornosti na vemurafenib te nije dovelo do promjene ekspresije biljega EMT-a.

7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

| | |
|--------|--|
| BCA | Bikinkonična kiselina |
| BD | Bazno područje (engl. <i>Basic Domain</i>) |
| BRAF | serinska/treoninska proteinska kinaza (engl. <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma homolog B</i>) |
| cDNA | Komplementarna DNA |
| coIP | Koimunoprecipitacija (engl. <i>coimmunoprecipitation</i>) |
| DBD | DNA-vezno područje (engl. <i>DNA-Binding Domain</i>) |
| D_F | FRET-populacija, tj. postotak donorskih molekula u kojima dolazi do FRET-a uz prisutnost akceptora |
| EGFP | Poboljšani zeleni fluorescentni protein (engl. <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>) |
| EMT | Epitelno-mezenhimalna pretvorba (engl. engl. <i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>) |
| ERK | Proteinska kinaza (engl. <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>) |
| FDA | Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>) |
| FLIM | Mikroskopijsko oslikavanje vremena života fluorescencije (engl. <i>Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy</i>) |
| FRET | Rezonantni prijenos energije po Försteru (engl. <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>) |
| GLI | Transkripcijski faktor prvotno pronađen u stanicama ljudskog glioblastoma (engl. <i>Glioma-Associated Oncogene</i>) |
| GOI | Gen od interesa |
| GRB2 | Adaptorski protein uključen u prijenos signala (engl. <i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>) |
| HH-GLI | Signalni put Hedgehog-GLI |
| HHIP | Protein koji stupa u interakciju s HH |
| HRP | Peroksidaza iz hrena (engl. <i>Horseradish Peroxidase</i>) |
| iASSP | Protein koji inhibira aktivnost p53 (engl. <i>Inhibitor of Apoptosis Stimulating Protein of p53</i>) |
| MAPK | Proteinska kinaza aktivirana mitogenom (engl. <i>Mitogen-Activated Protein</i> |

| | |
|------|--|
| | <i>Kinase)</i> |
| MEK | Proteinska kinaza, akronim dolazi od naziva MAPK/ERK Kinaza |
| MET | Mezenhimalno-epitelna pretvorba (engl. <i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>) |
| MIF | (engl. <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>) |
| NDP | Nukleozid difosfat |
| NDPK | Nukleozid-difosfatska kinaza (engl. <i>Nucleoside-Diphosphate Kinases</i>) |
| NLS | Signal za smještaj u jezgru (engl. <i>Nuclear Localization Signal</i>) |
| Nm23 | Drugi naziv za protein NME/NDPK (engl. <i>Non-metastatic clone 23</i>) |
| NTP | Nukleozid trifosfat |
| OD | Oligomerizacijsko područje (engl. <i>Oligomerization Domain</i>) |
| PAGE | Poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>) |
| PBS | Fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate Buffer Saline</i>) |
| PRD | Područje bogato prolinom (eng. <i>Proline-Rich Domain</i>) |
| PTCH | Transmembranski receptor <i>Patched</i> |
| PUMA | Proapoptotski protein čiju ekspresiju regulira protein p53 (engl. <i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>) |
| qPCR | Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>) |
| RAF | Kinaza koja pripada porodici serinskih treoninskih proteinskih kinaza, akronim dolazi od engl. <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i> |
| RAS | Protein koji pripada malim GTPazama, naziv je skraćena od engl. <i>Rat Sarcoma</i> |
| RTK | Receptor tirozinske kinaze |
| SAM | Sterilno područje alfa (engl. <i>Sterile Alpha Motif</i>) |
| SMO | Transmembranski receptor spregnut s G-proteinom <i>Smoothed</i> |
| SOS | Faktor razmjene nukleotida guanina (engl. <i>Son of Sevenless</i>) |
| SUFU | Supresor transkripcijskih faktora GLI (engl. <i>Suppressor of Fused</i>) |
| TAD | Transaktivacijsko područje (eng. <i>Transactivation Domain</i>) |

8. LITERATURNI IZVORI

1. Bandarchi, B.; Ma, L.; Navab, R.; Seth, A.; Rasty, G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol. Res. Pract.* **2010**, *2010*, 1–8.
2. Kozar, I.; Margue, C.; Rothengatter, S.; Haan, C.; Kreis, S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2019**, *1871*, 313–322.
3. Stark, M.S.; Bonazzi, V.F.; Boyle, G.M.; Palmer, J.M.; Symmons, J.; Lanagan, C.M.; Schmidt, C.W.; Herington, A.C.; Ballotti, R.; Pollock, P.M.; et al. miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17753–17763.
4. Weiss, J.; Heine, M.; Arden, K.C.; Körner, B.; Pilch, H.; Herbst, R.A.; Jung, E.G. Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res.* **1995**, *139*, 137–54.
5. Box, N.F.; Terzian, T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2008**, *21*, 525–533.
6. Gembarska, A.; Luciani, F.; Fedele, C.; Russell, E.A.; Dewaele, M.; Villar, S.; Zwolinska, A.; Haupt, S.; De Lange, J.; Yip, D.; et al. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1239–1247.
7. Stott, F.J.; Bates, S.; James, M.C.; McConnell, B.B.; Starborg, M.; Brookes, S.; Palmero, I.; Ryan, K.; Hara, E.; Vousden, K.H.; et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14 ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* **1998**, *17*, 5001–5014.
8. Lu, M.; Breysens, H.; Salter, V.; Zhong, S.; Hu, Y.; Baer, C.; Ratnayaka, I.; Sullivan, A.; Brown, N.R.; Endicott, J.; et al. Restoring p53 Function in Human Melanoma Cells by Inhibiting MDM2 and Cyclin B1/CDK1-Phosphorylated Nuclear iASPP. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 618–633.
9. Jung, H.; Seong, H.-A.; Ha, H. NM23-H1 tumor suppressor and its interacting partner STRAP activate p53 function. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35293–307.
10. Pamidimukkala, N.; Puts, G.S.; Kathryn Leonard, M.; Snyder, D.; Dabernat, S.; De Fabo, E.C.; Noonan, F.P.; Slominski, A.; Merlino, G.; Kaetzel, D.M. Nme1 and Nme2 genes exert metastasis-suppressor activities in a genetically engineered mouse model of

- UV-induced melanoma. *Br. J. Cancer* **2020**, *124*, 161–165.
11. Jarrett, S.G.; Novak, M.; Harris, N.; Merlino, G.; Slominski, A.; Kaetzel, D.M. NM23 deficiency promotes metastasis in a UV radiation-induced mouse model of human melanoma. *Clin. Exp. Metastasis* **2013**, *30*, 25–36.
 12. Jarrett, S.G.; Novak, M.; Dabernat, S.; Daniel, J.-Y.; Mellon, I.; Zhang, Q.; Harris, N.; Ciesielski, M.J.; Fenstermaker, R.A.; Kovacic, D.; et al. Metastasis suppressor NM23-H1 promotes repair of UV-induced DNA damage and suppresses UV-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 133–43.
 13. Zhang, Q.; McCorkle, J.R.; Novak, M.; Yang, M.; Kaetzel, D.M. Metastasis suppressor function of NM23-H1 requires its 3'-5' exonuclease activity. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 40–50.
 14. Stecca, B.; Mas, C.; Clement, V.; Zbinden, M.; Correa, R.; Piguet, V.; Beermann, F.; Ruiz I Altaba, A. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 5895–5900.
 15. Alexaki, V.I.; Javelaud, D.; Van Kempen, L.C.L.; Mohammad, K.S.; Dennler, S.; Luciani, F.; Hoek, K.S.; Jurez, P.; Goydos, J.S.; Fournier, P.J.; et al. GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, *102*, 1148–1159.
 16. Faião-Flores, F.; Alves-Fernandes, D.K.; Pennacchi, P.C.; Sandri, S.; Vicente, A.L.S.A.; Scapulatempo-Neto, C.; Vazquez, V.L.; Reis, R.M.; Chauhan, J.; Goding, C.R.; et al. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene* **2017**, *36*, 1849–1861.
 17. Costin, G.-E.; Hearing, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **2007**, *21*, 976–994.
 18. Mort, R.L.; Jackson, I.J.; Elizabeth Patton, E. The melanocyte lineage in development and disease. *Dev.* **2015**, *142*, 620–632.
 19. Mayor, R.; Theveneau, E. The neural crest. *Dev.* **2012**, *140*, 2247–2251.
 20. Garbe, C.; Leiter, U. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer-the role of sunlight. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *624*, 89–103.
 21. *Croatia Source: Globocan 2018*;
 22. Cancer burden statistics and trends across Europe | ECIS Available online: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/> (accessed on Nov 8, 2020).
 23. Types of Skin Cancer - Mole Patrol | Bulk Bill Skin Check Perth Available online:

-
- <https://molepatrol.com.au/blog/types-of-skin-cancer/> (accessed on Sep 8, 2020).
24. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954.
 25. Ascierto, P.A.; Kirkwood, J.M.; Grob, J.-J.; Simeone, E.; Grimaldi, A.M.; Maio, M.; Palmieri, G.; Testori, A.; Marincola, F.M.; Mozzillo, N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 1–9.
 26. Keshet, Y.; Seger, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *661*, 3–38.
 27. Chang, L.; Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **2001**, *410*, 37–40.
 28. Guo, Y.; Pan, W.; Liu, S.; Shen, Z.; Xu, Y.; Hu, L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 1997.
 29. Haling, J.R.; Sudhamsu, J.; Yen, I.; Sideris, S.; Sandoval, W.; Phung, W.; Bravo, B.J.; Giannetti, A.M.; Peck, A.; Masselot, A.; et al. Structure of the BRAF-MEK Complex Reveals a Kinase Activity Independent Role for BRAF in MAPK Signaling. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 402–413.
 30. Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2018**, *13*, 395–412.
 31. Heerboth, S.; Housman, G.; Leary, M.; Longacre, M.; Byler, S.; Lapinska, K.; Willbanks, A.; Sarkar, S. EMT and tumor metastasis. *Clin. Transl. Med.* **2015**, *4*, 6.
 32. Wirtz, D.; Konstantopoulos, K.; Searson, P.C. The physics of cancer: The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 512–522.
 33. Domingues, B.; Lopes, J.; Soares, P.; Populo, H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* **2018**, *7*, 35–49.
 34. Bhatia, S.; Tykodi, S.S.; Thompson, J.A. Treatment of metastatic melanoma: An overview. *Oncology* **2009**, *23*, 488–496.
 35. Targeted Cancer Therapies Fact Sheet - National Cancer Institute Available online: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet> (accessed on Mar 31, 2020).
 36. Bedard, P.L.; Hyman, D.M.; Davids, M.S.; Siu, L.L. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *Lancet* **2020**, *395*, 1078–1088.

-
37. Irvine, M.; Stewart, A.; Pedersen, B.; Boyd, S.; Kefford, R.; Rizos, H. Oncogenic PI3K/AKT promotes the step-wise evolution of combination BRAF/MEK inhibitor resistance in melanoma. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 72.
 38. Zuo, Q.; Liu, J.; Huang, L.; Qin, Y.; Hawley, T.; Seo, C.; Merlino, G.; Yu, Y. AXL/AKT axis mediated-resistance to BRAF inhibitor depends on PTEN status in melanoma. *Oncogene* **2018**, *37*, 3275–3289.
 39. Moriceau, G.; Hugo, W.; Hong, A.; Shi, H.; Kong, X.; Yu, C.C.; Koya, R.C.; Samatar, A.A.; Khanlou, N.; Braun, J.; et al. Tunable-Combinatorial Mechanisms of Acquired Resistance Limit the Efficacy of BRAF/MEK Cotargeting but Result in Melanoma Drug Addiction. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 240–256.
 40. Krayem, M.; Journe, F.; Wiedig, M.; Morandini, R.; Najem, A.; Salès, F.; Van Kempen, L.C.; Sibille, C.; Awada, A.; Marine, J.C.; et al. P53 Reactivation by PRIMA-1Met (APR-246) sensitises V600E/KBRAF melanoma to vemurafenib. *Eur. J. Cancer* **2016**, *55*, 98–110.
 41. Lane, D.P.; Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells [19]. *Nature* **1979**, *278*, 261–263.
 42. Linzer, D.I.H.; Levine, A.J. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **1979**, *17*, 43–52.
 43. Murray-Zmijewski, F.; Lane, D.P.; Bourdon, J.-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 962–972.
 44. Joruz, S.M.; Bourdon, J.C. P53 isoforms: Key regulators of the cell fate decision. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*.
 45. Pavletich, N.P.; Chambers, K.A.; Pabo, C.O. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* **1993**, *7*, 2556–2564.
 46. Meek, D.W.; Anderson, C.W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*.
 47. Harms, K.L.; Chen, X. The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 890–897.
 48. Mills, A.A.; Zheng, B.; Wang, X.J.; Vogel, H.; Roop, D.R.; Bradley, A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **1999**, *398*, 708–713.

49. Pozniak, C.D.; Radinovic, S.; Yang, A.; McKeon, F.; Kaplan, D.R.; Miller, F.D. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* (80-.). **2000**, *289*, 304–306.
50. Yang, A.; Walker, N.; Bronson, R.; Kaghad, M.; Oosterwegel, M.; Bonnin, J.; Vagner, C.; Bonnet, H.; Dikkes, P.; Sharpe, A.; et al. p73-Deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **2000**, *404*, 99–103.
51. Wilhelm, M.T.; Rufini, A.; Wetzel, M.K.; Tsuchihara, K.; Inoue, S.; Tomasini, R.; Itie-Youten, A.; Wakeham, A.; Arsenian-Henriksson, M.; Melino, G.; et al. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for Δ Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 549–560.
52. Tomasini, R.; Tsuchihara, K.; Wilhelm, M.; Fujitani, M.; Rufini, A.; Cheung, C.C.; Khan, F.; Itie-Youten, A.; Wakeham, A.; Tsao, M.S.; et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2677–2691.
53. Donehower, L.A.; Harvey, M.; Slagle, B.L.; McArthur, M.J.; Montgomery, C.A.; Butel, J.S.; Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **1992**, *356*, 215–221.
54. Armstrong, J.F.; Kaufman, M.H.; Harrison, D.J.; Clarke, A.R. High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 931–936.
55. Marcel, V.; Perrier, S.; Aoubala, M.; Ageorges, S.; Groves, M.J.; Diot, A.; Fernandes, K.; Tauro, S.; Bourdon, J.-C. Δ 160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Δ 133p53 transcript. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 4463–4468.
56. Hofstetter, G.; Berger, A.; Berger, R.; Zorić, A.; Braicu, E.I.; Reimer, D.; Fiegl, H.; Marth, C.; Zeimet, A.G.; Ulmer, H.; et al. The N-terminally truncated p53 isoform Δ 40p53 influences prognosis in mucinous ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2012**, *22*, 372–379.
57. Hofstetter, G.; Berger, A.; Schuster, E.; Wolf, A.; Hager, G.; Vergote, I.; Cadron, I.; Sehouli, J.; Braicu, E.I.; Mahner, S.; et al. Δ 133p53 is an independent prognostic marker in p53 mutant advanced serous ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1593–1599.
58. Avery-Kiejda, K.A.; Morten, B.; Wong-Brown, M.W.; Mathe, A.; Scott, R.J. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 586–596.

59. Arsic, N.; Gadea, G.; Lagerqvist, E.L.; Busson, M.; Cahuzac, N.; Brock, C.; Hollande, F.; Gire, V.; Pannequin, J.; Roux, P. The p53 isoform $\Delta 133p53\beta$ promotes cancer stem cell potential. *Stem cell reports* **2015**, *4*, 531–40.
60. Campbell, H.; Fleming, N.; Roth, I.; Mehta, S.; Wiles, A.; Williams, G.; Vennin, C.; Arsic, N.; Parkin, A.; Pajic, M.; et al. $\Delta 133p53$ isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signaling. *Nat. Commun.* **2018**, *9*.
61. Palmieri, G.; Ombra, M.N.; Colombino, M.; Casula, M.; Sini, M.C.; Manca, A.; Paliogiannis, P.; Ascierto, P.A.; Cossu, A. Multiple molecular pathways in melanomagenesis: Characterization of therapeutic targets. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 1–16.
62. Palmieri, G.; Capone, M.; Ascierto, M.L.; Gentilcore, G.; Stroncek, D.F.; Casula, M.; Sini, M.C.; Palla, M.; Mozzillo, N.; Ascierto, P.A. Main roads to melanoma. *J. Transl. Med.* **2009**, *7*, 86.
63. Concin, N.; Becker, K.; Slade, N.; Erster, S.; Mueller-Holzner, E.; Ulmer, H.; Daxenbichler, G.; Zeimet, A.; Zeillinger, R.; Marth, C.; et al. Transdominant $\Delta TAp73$ Isoforms Are Frequently Up-regulated in Ovarian Cancer. Evidence for Their Role as Epigenetic p53 Inhibitors in Vivo. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2449–2460.
64. Fillippovich, I.; Sorokina, N.; Gatei, M.; Haupt, Y.; Hobson, K.; Moallem, E.; Spring, K.; Mould, M.; Mcguckin, M.A.; Lavin, M.F.; et al. Transactivation-deficient p73 α (p73 Δ exon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene* **2001**, *20*, 514–522.
65. Moll, U.M.; Slade, N. P63 and P73: Roles in Development and Tumor Formation. *Mol. Cancer Res.* **2004**, *2*, 371–86.
66. Zorić, A.; Horvat, A.; Slade, N. Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 522–529.
67. Billant, O.; Léon, A.; Le Guellec, S.; Friocourt, G.; Blondel, M.; Voisset, C. The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: A family affair. *Oncotarget* **2016**, *7*, 69549–69564.
68. Marcel, V.; Fernandes, K.; Terrier, O.; Lane, D.P.; Bourdon, J.C. Modulation of p53 β and p53 γ expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1377–1387.
69. Hafsi, H.; Santos-Silva, D.; Courtois-Cox, S.; Hainaut, P. Effects of $\Delta 40p53$, an isoform of p53 lacking the N-terminus, on transactivation capacity of the tumor suppressor protein p53. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 134.
70. Avery-Kiejda, K.A.; Xu, D.Z.; Adams, L.J.; Scott, R.J.; Vojtesek, B.; Lane, D.P.;

- Hersey, P. Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1659–1668.
71. Aoubala, M.; Murray-Zmijewski, F.; Khoury, M.P.; Fernandes, K.; Perrier, S.; Bernard, H.; Prats, A.C.; Lane, D.P.; Bourdon, J.C. P53 directly transactivates $\Delta 133p53\alpha$, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 248–258.
72. Stiewe, T.; Zimmermann, S.; Frilling, A.; Esche, H.; Pützer, B.M. Transactivation-deficient $\Delta TA-p73$ Acts as an Oncogene. *Cancer Res.* **2002**, *62*.
73. Zaika, A.I.; Slade, N.; Erster, S.H.; Sansome, C.; Joseph, T.W.; Pearl, M.; Chalas, E.; Moll, U.M. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 765–80.
74. Stiewe, T.; Theseling, C.C.; Pützer, B.M. Transactivation-deficient $\Delta TA-p73$ inhibits p53 by direct competition for DNA binding. Implications for tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14177–14185.
75. Grob, T.J.; Novak, U.; Maise, C.; Barcaroli, D.; Lüthi, A.U.; Pirnia, F.; Hügli, B.; Graber, H.U.; De Laurenzi, V.; Fey, M.F.; et al. Human $\Delta Np73$ regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* **2001**, *8*, 1213–1223.
76. Matin, R.N.; Chikh, A.; Chong, S.L.P.; Mesher, D.; Graf, M.; Sanza, P.; Senatore, V.; Scatolini, M.; Moretti, F.; Leigh, I.M.; et al. P63 Is an Alternative P53 Repressor in Melanoma That Confers Chemoresistance and a Poor Prognosis. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 581–603.
77. Melino, G.; De Laurenzi, V.; Vousden, K.H. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 605–615.
78. Agarwal, R.P.; Robison, B.; Parks, R.E. Nucleoside diphosphokinase from human erythrocytes. *Methods Enzymol.* **1978**, *51*, 376–86.
79. Lascu, I.; Gonin, P. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, *32*, 237–246.
80. Boissan, M.; Dabernat, S.; Peuchant, E.; Schlattner, U.; Lascu, I.; Lacombe, M.L. The mammalian Nm23/NDPK family: From metastasis control to cilia movement. *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, *329*, 51–62.
81. Bosnar, M.H.; De Gunzburg, J.; Bago, R.; Brečević, L.; Weber, I.; Pavelić, J. Subcellular localization of A and B Nm23/NDPK subunits. *Exp. Cell Res.* **2004**, *298*, 275–284.

82. Lacombe, M.L.; Tokarska-Schlattner, M.; Boissan, M.; Schlattner, U. The mitochondrial nucleoside diphosphate kinase (NDPK-D/NME4), a moonlighting protein for cell homeostasis. *Lab. Investig.* **2018**, *98*, 582–588.
83. Chen, C.W.; Wang, H.L.; Huang, C.W.; Huang, C.Y.; Lim, W.K.; Chen Tu, I.; Koorapati, A.; Hsieh, S.T.; Kan, H.W.; Tzeng, S.R.; et al. Two separate functions of NME3 critical for cell survival underlie a neurodegenerative disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 566–574.
84. Lacombe, M.L.; Milon, L.; Munier, A.; Mehus, J.G.; Lambeth, D.O. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, *32*, 247–58.
85. Gillesl, A.; Presecans, E.; Vonicas, A.; Lascusli, I.; Gilles, A.M.; Presecan, E.; Vonica, A.; Lascu, I. Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 8784–8789.
86. Ćetković, H.; Perina, D.; Harcet, M.; Mikoč, A.; Herak Bosnar, M. Nme family of proteins—clues from simple animals. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **2015**, *388*, 133–142.
87. Herak Bosnar, M.; Radić, M.; Ćetković, H. A young researcher's guide to NME/Nm23/NDP Kinase. *Period. Biol.* **2018**, *120*, 3–9.
88. Desvignes, T.; Pontarotti, P.; Fauvel, C.; Bobe, J. Nme protein family evolutionary history, a vertebrate perspective. *BMC Evol. Biol.* **2009**, *9*, 256.
89. Steeg, P.S.; Bevilacqua, G.; Kopper, L.; Thorgeirsson, U.P.; Talmadge, J.E.; Liotta, L.A.; Sobel, M.E. Evidence for a Novel Gene Associated With Low Tumor Metastatic Potential. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1988**, *80*, 200–204.
90. Hurst, D.R.; Welch, D.R. Metastasis suppressor genes at the interface between the environment and tumor cell growth. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2011**, *286*, 107–80.
91. Hartsough, M.T.; Steeg, P.S. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, *32*, 301–8.
92. Palmieri, D.; Horak, C.E.; Lee, J.-H.; Halverson, D.O.; Steeg, P.S. Translational approaches using metastasis suppressor genes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2006**, *38*, 151–61.
93. Boissan, M.; Wendum, D.; Arnaud-Dabernat, S.; Munier, A.; Debray, M.; Lascu, I.; Daniel, J.Y.; Lacombe, M.L. Increased lung metastasis in transgenic NM23-null/SV40 mice with hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 836–845.
94. Boissan, M.; Wever, O. De; Lizarraga, F.; Wendum, D.; Poincloux, R.; Chignard, N.;

- Desbois-Mouthon, C.; Dufour, S.; Nawrocki-Raby, B.; Birembaut, P.; et al. Implication of Metastasis Suppressor NM23-H1 in Maintaining Adherens Junctions and Limiting the Invasive Potential of Human Cancer Cells. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7710–7722.
95. Boissan, M.; Schlattner, U.; Lacombe, M.L. The NDPK/NME superfamily: State of the art. *Lab. Investig.* **2018**, *98*, 164–174.
96. Tan, C.Y.; Chang, C.L. NDPKA is not just a metastasis suppressor-be aware of its metastasis-promoting role in neuroblastoma. *Lab. Investig.* **2018**, *98*, 219–227.
97. Li, Y.; Tong, Y.; Wong, Y.H. Regulatory functions of Nm23-H2 in tumorigenesis: insights from biochemical to clinical perspectives. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2015**, *388*, 243–56.
98. Snyder, D.; Wang, Y.; Kaetzel, D.M. A rare subpopulation of melanoma cells with low expression of metastasis suppressor NME1 is highly metastatic in vivo. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1971.
99. Wang, Y.; Kathryn Leonard, M.; Snyder, D.E.; Fisher, M.L.; Eckert, R.L.; Kaetzel, D.M. NME1 drives expansion of melanoma cells with enhanced tumor growth and metastatic properties. *Mol. Cancer Res.* **2019**, *17*, 1665–1674.
100. Webb, P.A.; Perisic, O.; Mendola, C.E.; Backer, J.M.; Williams, R.L. The crystal structure of a human nucleoside diphosphate kinase, NM23-H2. *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 574–587.
101. Jung, H.; Seong, H.-A.; Ha, H. Direct interaction between NM23-H1 and macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for alleviation of MIF-mediated suppression of p53 activity. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 32669–79.
102. Polanski, R.; Maguire, M.; Nield, P.C.; Jenkins, R.E.; Park, B.K.; Krawczynska, K.; Devling, T.; Ray-Sinha, A.; Rubbi, C.P.; Vlatkovic, N.; et al. MDM2 interacts with NME2 (non-metastatic cells 2, protein) and suppresses the ability of NME2 to negatively regulate cell motility. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1133–1142.
103. Sabol, M.; Trnski, D.; Musani, V.; Ozretić, P.; Levanat, S. Role of GLI transcription factors in pathogenesis and their potential as new therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2562–2599.
104. Varjosalo, M.; Taipale, J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2454–2472.
105. Kavran, J.M.; Ward, M.D.; Oladosu, O.O.; Mulepati, S.; Leahy, D.J. All mammalian hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*,

- 24584–24590.
106. Chuang, P.T.; McMahon, A.P. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **1999**, *397*, 617–21.
 107. Corbit, K.C.; Aanstad, P.; Singla, V.; Norman, A.R.; Stainier, D.Y.R.; Reiter, J.F. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **2005**, *437*, 1018–1021.
 108. Stecca, B.; Pandolfi, S. Hedgehog-Gli signaling in basal cell carcinoma and other skin cancers: prospects for therapy. *Res. Rep. Biol.* **2015**, *6*, 55–71.
 109. Pietrobono, S.; Gagliardi, S.; Stecca, B. Non-canonical hedgehog signaling pathway in cancer: Activation of GLI transcription factors beyond smoothed. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 1–20.
 110. Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 634–642.
 111. Carpenter, R.L.; Lo, H.W. Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer. *Discov. Med.* **2012**, *13*, 105–113.
 112. Speek, M.; Njunkova, O.; Pata, I.; Valdre, E.; Kogerman, P. A potential role of alternative splicing in the regulation of the transcriptional activity of human GLI2 in gonadal tissues. *BMC Mol. Biol.* **2006**, *7*, 13.
 113. Stecca, B.; Ruiz I Altaba, A. A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J.* **2009**, *28*, 663–676.
 114. Abe, Y.; Oda-Sato, E.; Tobiume, K.; Kawauchi, K.; Taya, Y.; Okamoto, K.; Oren, M.; Tanaka, N. Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 4838–4843.
 115. Kang, H.N.; Oh, S.C.; Kim, J.S.; Yoo, Y.A. Abrogation of Gli3 expression suppresses the growth of colon cancer cells via activation of p53. *Exp. Cell Res.* **2012**, *318*, 539–549.
 116. Yoon, J.W.; Lamm, M.; Iannaccone, S.; Higashiyama, N.; Leong, K.F.; Iannaccone, P.; Walterhouse, D. P53 Modulates The Activity Of The GLI1 Oncogene Through Interactions With The Shared Coactivator TAF9 HHS Public Access. *DNA Repair* **2015**, *34*, 9–17.
 117. Katzen, F. Gateway[®] recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin. Drug Discov.* **2007**, *2*, 571–589.
 118. Margineanu, A.; Chan, J.J.; Kelly, D.J.; Warren, S.C.; Flatters, D.; Kumar, S.; Katan, M.; Dunsby, C.W.; French, P.M.W. Screening for protein-protein interactions using Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence lifetime imaging

- microscopy (FLIM). *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28186.
119. Yasuda, R. Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2006**, *16*, 551–561.
120. Ishikawa-Ankerhold, H.C.; Ankerhold, R.; Drummen, G.P.C. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* **2012**, *17*, 4047–132.
121. Bajar, B.T.; Wang, E.S.; Zhang, S.; Lin, M.Z.; Chu, J. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel)*. **2016**, *16*.
122. Radić, M.; Šoštar, M.; Weber, I.; Četković, H.; Slade, N.; Herak Bosnar, M. The Subcellular Localization and Oligomerization Preferences of NME1/NME2 upon Radiation-Induced DNA Damage. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2363.
123. Hanžić, N. *Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Sveučilište u Dubrovniku Institut Ruđer Bošković Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti*;
124. Saitoh, M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J. Biochem.* **2018**, *164*, 257–264.
125. Yu, Q.; Zhang, K.; Wang, X.; Liu, X.; Zhang, Z. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2010**, *29*, 1–9.
126. Toress-Collado, A.X.; Nazarian, R.; Jazirehi, A.R.; Torres-Collado, A.X.; Nazarian, R.; Jazirehi, A.R. Rescue of cell cycle progression in BRAFV600E inhibitor-resistant human melanoma by a chromatin modifier. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1–19.
127. Michael, D.; Oren, M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 53–59.
128. Papp, T.; Jafari, M.; Schiffmann, D. Lack of p53 mutations and loss of heterozygosity in non-cultured human melanocytic lesions. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1996**, *122*, 541–548.
129. Ragnarsson-Olding, B.K.; Karsberg, S.; Platz, A.; Ringborg, U.K. Mutations in the TP53 gene in human malignant melanomas derived from sun-exposed skin and unexposed mucosal membranes. *Melanoma Res.* **2002**, *12*, 453–463.
130. Houben, R.; Hesbacher, S.; Schmid, C.P.; Kauczok, C.S.; Flohr, U.; Haferkamp, S.; Müller, C.S.L.; Schrama, D.; Wischhusen, J.; Becker, J.C. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter

-
- gene assays. *PLoS One* **2011**, *6*.
131. Di Como, C.J.; Gaiddon, C.; Prives, C. p73 Function Is Inhibited by Tumor-Derived p53 Mutants in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1438–1449.
132. Gaiddon, C.; Lokshin, M.; Ahn, J.; Zhang, T.; Prives, C. A Subset of Tumor-Derived Mutant Forms of p53 Down-Regulate p63 and p73 through a Direct Interaction with the p53 Core Domain. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 1874–1887.
133. Strano, S.; Munarriz, E.; Rossi, M.; Cristofanelli, B.; Shaul, Y.; Castagnoli, L.; Levine, A.J.; Sacchi, A.; Cesareni, G.; Oren, M.; et al. Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29503–29512.
134. Irwin, M.S.; Kondo, K.; Marin, M.C.; Cheng, L.S.; Hahn, W.C.; Kaelin, W.G. Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 403–410.
135. Chung, H.S.; Meng, F.; Kim, J.Y.; McHale, K.; Gopich, I. V.; Louis, J.M. Oligomerization of the tetramerization domain of p53 probed by two- and three-color single-molecule FRET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 6812–6821.
136. Dudek, J.M.; Horton, R.A. TR-FRET biochemical assays for detecting posttranslational modifications of p53. *J. Biomol. Screen.* **2010**, *15*, 569–575.
137. Huang, F.; Rajagopalan, S.; Settanni, G.; Marsh, R.J.; Armoogum, D.A.; Nicolaou, N.; Bain, A.J.; Lerner, E.; Haas, E.; Ying, L.; et al. Multiple conformations of full-length p53 detected with single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 20758–20763.
138. Marine, J.C. P53 stabilization: The importance of nuclear import. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 191–192.
139. Inoue, T.; Stuart, J.; Leno, R.; Maki, C.G. Nuclear import and export signals in control of the p53-related protein p73. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15053–15060.
140. Marchenko, N.D.; Hanel, W.; Li, D.; Becker, K.; Reich, N.; Moll, U.M. Stress-mediated nuclear stabilization of p53 is regulated by ubiquitination and importin- α 3 binding. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 255–267.
141. Stommel, J.M.; Marchenko, N.D.; Jimenez, G.S.; Moll, U.M.; Hope, T.J.; Wahl, G.M. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: Regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1660–1672.
142. Dratkiewicz, E.; Simiczyjew, A.; Pietraszek-Gremplewicz, K.; Mazurkiewicz, J.; Nowak, D. Characterization of melanoma cell lines resistant to vemurafenib and

- evaluation of their responsiveness to EGFR-and MET-inhibitor treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*.
143. Das Thakur, M.; Salangsang, F.; Landman, A.S.; Sellers, W.R.; Pryer, N.K.; Levesque, M.P.; Dummer, R.; McMahon, M.; Stuart, D.D. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* **2013**, *494*, 251–255.
144. Grätz, V.; Zillikens, D.; Busch, H.; Langan, E.A.; Terheyden, P. Sequential Treatment With Targeted and Immune Checkpoint Therapy in Patients With BRAF Positive Metastatic Melanoma: The Importance of Timing? *Front. Med.* **2019**, *6*, 257.
145. Misek, S.A.; Appleton, K.M.; Dexheimer, T.S.; Lisabeth, E.M.; Lo, R.S.; Larsen, S.D.; Gallo, K.A.; Neubig, R.R. Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene* **2020**, *39*, 1466–1483.
146. Huang, D.; Duan, H.; Huang, H.; Tong, X.; Han, Y.; Ru, G.; Qu, L.; Shou, C.; Zhao, Z. Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–12.
147. Ding, L.; Wang, C.; Cui, Y.; Han, X.; Zhou, Y.; Bai, J.; Li, R. S-phase kinase-Associated protein 2 is involved in epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-resistant osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 1841–1852.
148. Pearlman, R.L.; Montes De Oca, M.K.; Chandra Pal, H.; Afaq, F. Potential Therapeutic Targets of Epithelial-Mesenchymal Transition in Melanoma HHS Public Access. *Cancer Lett* **2017**, *501*, 125–140.
149. Li, F.Z.; Dhillon, A.S.; Anderson, R.L.; McArthur, G.; Ferrao, P.T. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 31.
150. Molnár, E.; Garay, T.; Donia, M.; Baranyi, M.; Rittler, D.; Berger, W.; Tímár, J.; Grusch, M.; Hegedűs, B. Long-term vemurafenib exposure induced alterations of cell phenotypes in melanoma: Increased cell migration and its association with EGFR expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
151. Henry, C.E.; Llamosas, E.; Djordjevic, A.; Hacker, N.F.; Ford, C.E. Migration and invasion is inhibited by silencing ROR1 and ROR2 in chemoresistant ovarian cancer. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e226–e226.
152. Huang, H.K.; Lin, Y.H.; Chang, H.A.; Lai, Y.S.; Chen, Y.C.; Huang, S.C.; Chou, C.Y.; Chiu, W.T. Chemoresistant ovarian cancer enhances its migration abilities by increasing store-operated Ca²⁺ entry-mediated turnover of focal adhesions. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 36.

-
153. Yang, Y.; Zheng, H.; Zhan, Y.; Fan, S. An emerging tumor invasion mechanism about the collective cell migration. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 5301–5312.
154. Cheung, K.J.; Gabrielson, E.; Werb, Z.; Ewald, A.J. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell* **2013**, *155*, 1639–1651.
155. Li, L.; Hartley, R.; Reiss, B.; Sun, Y.; Pu, J.; Wu, D.; Lin, F.; Hoang, T.; Yamada, S.; Jiang, J.; et al. E-cadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 2779–2789.
156. Toress-Collado, A.X.; Nazarian, R.; Jazirehi, A.R. Rescue of cell cycle progression in BRAFV600E inhibitor-resistant human melanoma by a chromatin modifier. *Tumor Biol.* **2017**, 1–19.
157. Nam, C.; Doi, K.; Nakayama, H. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. *Histol. Histopathol.* **2010**, *25*, 485–493.
158. Bacelar Sacramento de Araújo, T.; de Oliveira Siquara da Rocha, L.; Torres Andion Vidal, M.; Cerqueira Coelho, P.L.; Galvão dos Reis, M.; Solano de Freitas Souza, B.; Botelho Pereira Soares, M.; Almeida Pereira, T.; Della Coletta, R.; Pereira Bezerra, D.; et al. GANT61 Reduces Hedgehog Molecule (GLI1) Expression and Promotes Apoptosis in Metastatic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6076.
159. Webster, M.R.; Fane, M.E.; Alicea, G.M.; Basu, S.; Kossenkov, A. V.; Marino, G.E.; Douglass, S.M.; Kaur, A.; Ecker, B.L.; Gnanapradeepan, K.; et al. Paradoxical Role for Wild-Type p53 in Driving Therapy Resistance in Melanoma. *Mol. Cell* **2020**, *77*, 633–644.e5.
160. Gadea, G.; Arsic, N.; Fernandes, K.; Diot, A.; Jorruiz, S.M.; Abdallah, S.; Meuray, V.; Vinot, S.; Anguille, C.; Remenyi, J.; et al. TP53 drives invasion through expression of its $\Delta 133p53\beta$ variant. *Elife* **2016**, *5*.
161. Ozretić, P.; Hanžić, N.; Proust, B.; Sabol, M.; Trnski, D.; Radić, M.; Musani, V.; Ciribilli, Y.; Milas, I.; Puljiz, Z.; et al. Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell lines. *Sci. RepoRtS* / **2019**, *9*, 12470.
162. Smith, S.C.; Theodorescu, D. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 253–264.
163. Marino, N.; Nakayama, J.; Collins, J.W.; Steeg, P.S. Insights into the biology and prevention of tumor metastasis provided by the Nm23 metastasis suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, *31*, 593–603.

9. ŽIVOTOPIS

Martina Radić rođena je 17.07.1990. u Virovitici. Osnovnu i srednju školu završila je u Slatini nakon čega upisuje studij Kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij Analitičke kemije i Biokemije završava diplomskim radom pod nazivom „*Ionizacija negativnih iona nano-elektoraspršenjem uzrokovana umiješavanjem estera, aldehida i ketona u tok pokretne faze*“. Rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Maria Cindrića i dr.sc. Ite Gruić Sovulj te neposrednim voditeljstvom dr.sc. Amele Hozić. Dobitnica je Erasmus+ stipendije za mobilnost studenata te nakon diplome odlazi na tromjesečni boravak na Institut za Molekularnu Biologiju Slovačke akademije znanosti u Bratislavi. Nakon kratkog boravka u farmaceutskoj industriji PLIVA TEVA, zapošljava se na Institutu Ruđer Bošković kao doktorand Hrvatske zaklade za znanost pod mentorstvom dr.sc. Maje Herak Bosnar. Radi na projektu ProNetMel čiji je voditelj dr.sc. Neda Slade te kasnije i projektu NEMO6 čiji je voditelj dr.sc. Maja Herak Bosnar. Tijekom izrade doktorata dobila je stipendiju Francuske vlade za kratkoročni studijski boravak na znanstvenom institutu u Montpellieru (*Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier*) te je preko bilateralne suradnje s Francuskom, Cogito, provela 3 tjedna na sveučilištu u Grenobleu (*Université Grenoble Alpes*). Držala je vježbe studentima iz kolegija Osnove Biokemije i Viši praktikum biokemije na PMF-u te bila neposredni voditelj u izradi tri diplomska rada. Dobitnica je stipendije Europskog mikroskopijskog društva i Hrvatskog mikroskopijskog društva za sudjelovanje na međunarodnom kongresu iz mikroskopije (*13th Multinational Congress on Microscopy*) 2017. godine te stipendije Federacije Europskih biokemijskih društava (FEBS) za sudjelovanje na FEBS kongresu i Forumu mladih znanstvenika (*45th FEBS Congress / 20th FEBS Young Scientists' Forum*) koji se trebao održati 2020. godine, a prebačen je na 2021. godinu. Sudjelovala je u organizaciji dvije međunarodne konferencije. Koautorica je 4 znanstvena rada navedena pod Publikacije. Tijekom cijelog visokoškolskog obrazovanja sudjeluje u popularizaciji znanosti, a 2013. godine, zajedno s drugim kolegama, dobiva Posebnu Rektorovu nagradu za organizaciju Otvorenog dana Kemijskog odsjeka PMF-a.

Publikacije

1. **Radić, M.**; Šoštar, M.; Weber, I.; Četković, H.; Slade, N.; Herak Bosnar, M. The Subcellular Localization and Oligomerization Preferences of NME1/NME2 upon Radiation-Induced DNA Damage. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2363.
2. Ozretić, P.; Hanžić, N.; Proust, B.; Sabol, M.; Trnski, D.; **Radić, M.**; Musani, V.; Ciribilli, Y.; Milas, I.; Puljiz, Z.; et al. Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell lines. *Sci. ReporTS* | **2019**, *9*, 12470.
3. Herak Bosnar, M.; **Radić, M.**; Četković, H. A young researcher's guide to NME/Nm23/NDP Kinase. *Period. Biol.* **2018**, *120*, 3–9.
4. Nišavić, M.; Hozić, A.; Hameršak, Z.; **Radić, M.**; Butorac, A.; Duvnjak, M.; Cindrić, M. High-Efficiency Microflow and Nanoflow Negative Electrospray Ionization of Peptides Induced by Gas-Phase Proton Transfer Reactions. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 4847–4854.