

Uloga proteina NME1 i NME2 u proliferaciji i aktivnosti signalnih puteva stanične linije melanoma čovjeka WM793B

Dužević, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:560384>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marko Dužević

**Uloga proteina NME1 i NME2 u proliferaciji i
aktivnosti signalnih puteva stanične linije
melanoma čovjeka WM793B**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Ignacije Vlašić i izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček.

Prije svega, zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za proteinsku dinamiku Instituta Ruđer Bošković koji su mi svojim iskustvom i savjetima pomogli u eksperimentalnom radu.

Posebno se zahvaljujem svojoj brižnoj mentorici dr.sc. Ignaciji Vlašić na bezuvjetnom stpljenju i žrtvi kako bi ovaj rad učinili cjelovitim. Bez njezine ideje i vođenja, ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem se i svojoj drugoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Gordani Maravić Vlahoviček na pomoći i savjetima prilikom objavljivanja rada.

Hvala svim mojim prijateljima iz Zeta Fi Sigme, prijateljicama s Vrapča, a posebno Luciji, Džaji, Tei i Zrinji koji su svojim društvom obogatili moj studij i život.

Konačno, najviše se zahvaljujm svojoj obitelji: majci Sanji, ocu Zoranu, Babici, Martić, Fiki i našem Dedi bez kojih najvjerojatnije ne bih ni upisao ovaj studij, a definitivno ga ne bih mogao završiti!

I na kraju, hvala dragome Bogu koji je moj studij pratio blagoslovom i davao mi snagu na ovome putu!

SADRŽAJ

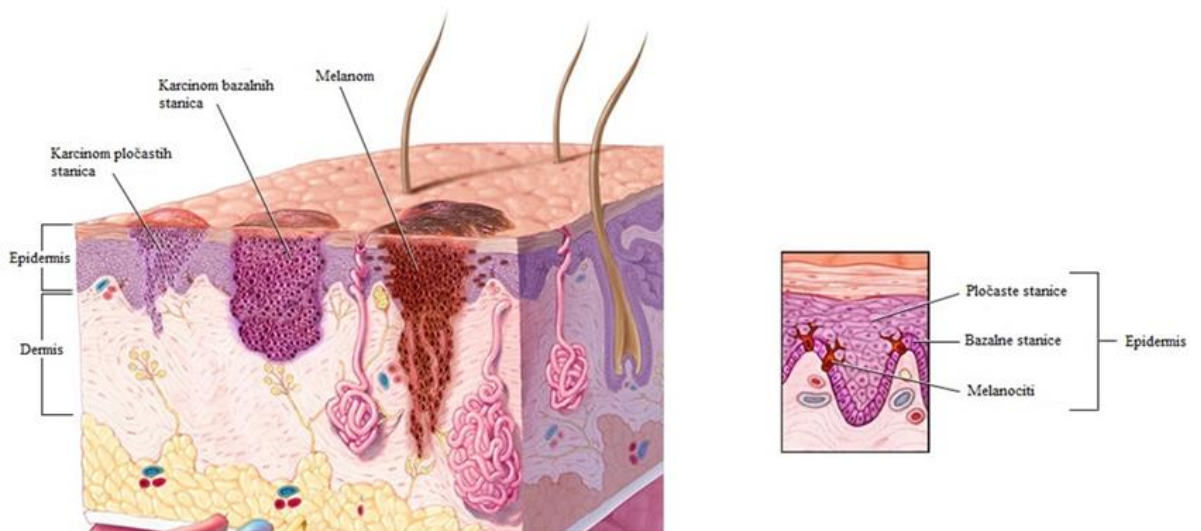
1. UVOD.....	1
1.1 Melanom čovjeka.....	1
1.1.1 Uloga signalnog puta MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)	2
1.1.2 Uloga proteina BRAF.....	3
1.1.3 Liječenje ciljanom terapijom vemurafenibom	4
1.1.4 Mehanizmi otpornosti na ciljanu terapiju.....	6
1.2 Porodica proteina NME/NDPK/Nm23	7
1.2.1 Uloga proteina NME1 u regulaciji signalnog puta MAPK	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1 Materijali.....	11
3.1.1 Kemikalije	11
3.1.2 Otopine, puferi.....	11
3.1.3 Komercijalno dostupni kompleti kemikalija	13
3.1.4 Standardi, biljezi veličine i boje	13
3.1.5 Primarna i sekundarna protutijela.....	14
3.1.6 Stanične linije	14
3.1.7 Hranjive podloge i mediji.....	15
3.1.8 Uređaji i potrošni materijal.....	15
3.2 Metode rada sa staničnim linijama	17
3.2.1 Uzgoj stanica	17
3.2.2 Brojanje stanica	18
3.2.3 Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim molekulama RNA	19
3.2.4 Test MTT.....	20
3.2.5 Određivanje proliferacije.....	21
3.3 Priprema proteinskih lizata za Western blot	21
3.3.1 Izdvajanje proteina iz stanica	21

3.4	Analiza proteina metodom Western blot	23
3.4.1	Priprema uzoraka za elektroforezu proteina uSDS-poliakrilamidnom gelu.....	23
3.4.2	Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu.....	25
3.4.3	Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu	25
3.4.4	Bojanje membrane i blokiranje	26
3.4.5	Inkubacija membrane u otopini primarnog i sekundarnog protutijela	26
3.4.6	Vizualizacija proteina od interesa na nitroceluloznoj membrani	26
4.	REZULTATI	28
4.1	Provjera ekspresije proteina NME1 i NME2 metodom Western blot	28
4.1.1	Provjera ekspresije proteina NME1 i NME2 u parentalnoj liniji i podlinijama otpornim na vemurafenib WM793B	28
4.1.2	Provjera ekspresije proteina NME1 i NME2 u parentalnoj liniji WM793B nakon utišavanja gena <i>NME1</i> i <i>NME2</i>	29
4.2	Određivanje proliferacije stanične linije WM793B.....	30
4.2.1	Određivanje proliferacije parentalne linije i podlinijama otpornim na vemurafenib WM793B	31
	31	
4.2.2	Određivanje proliferacije u parentalnoj liniji WM793B nakon utišavanja gena <i>NME1</i> i <i>NME2</i>	31
4.3	Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT	32
4.3.1	Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnoj liniji i podlinijama otpornim na vemurafenib WM793B	33
4.3.2	Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnoj liniji WM793B nakon utišavanja gena <i>NME1</i> i <i>NME2</i>	34
5.	RASPRAVA.....	35
6.	ZAKLJUČCI	39
7.	POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	40
8.	LITERATURA	44
9.	SAŽETAK	50
10.	SUMMARY	51

1. UVOD

1.1 Melanom čovjeka

Melanom je najopasniji tip tumora kože koji nastaje iz melanocita, stanica koje su smještene u bazalnim slojevima epidermisa kože uključene u biosintezu melanina. Uz melanome, postoje i drugi tipovi tumora kože u koje se ne ubrajaju melanomi (NMSC od engl. *non-melanoma skin cancer*) i uključuju karcinom pločastih stanica (planocelularni, SCC od engl. *squamous cell carcinoma*) i karcinom bazalnih stanica (bazocelularni, BSC od engl. *basal cell carcinoma*) koji nastaju iz keratinocita (Gordon i sur., 2013) (Slika 1). Iako tumori kože koji nisu melanomi češće nastaju, oni su manje agresivni i rijetko stvaraju metastaze. Za razliku od njih, melanomi imaju visok metastatski potencijal te se sekundarni tumori i metastaze uočavaju u plućima, jetri i mozgu pa se zato bolest naziva i metastatski melanom. Iako pojavnost melanoma nije izrazito visoka, on se razvija u metastatsku bolest i time spada u jedan od najagresivnijih tumora kože s najvišom stopom smrtnosti (Domingues i sur., 2018). Prema bazi podataka GLOBOCAN (Globalnog opservatorija za rak, GCO), 2020. godine je u Hrvatskoj evidentirano ukupno 26 092 novooboljelih i 14 326 umrlih od različitih tipova tumora, od čega je od melanoma novooboljelo 706 i umrlo 236 pacijenata što upućuje da je učestalost pojavljivanja melanoma 2,7%, a smrtnosti 1,6% u odnosu na ostale tumore (<https://gco.iarc.fr/>).



Slika 1. Presjek kože i epiderme s prikazom tipova tumora kože. Razlikujemo karcinom pločastih stanica, koji nastaje iz pločastih stanica epiderme, karcinom bazalnih stanica, koji se razvija iz stanica bazalne membrane, te melanom, koji nastaje iz

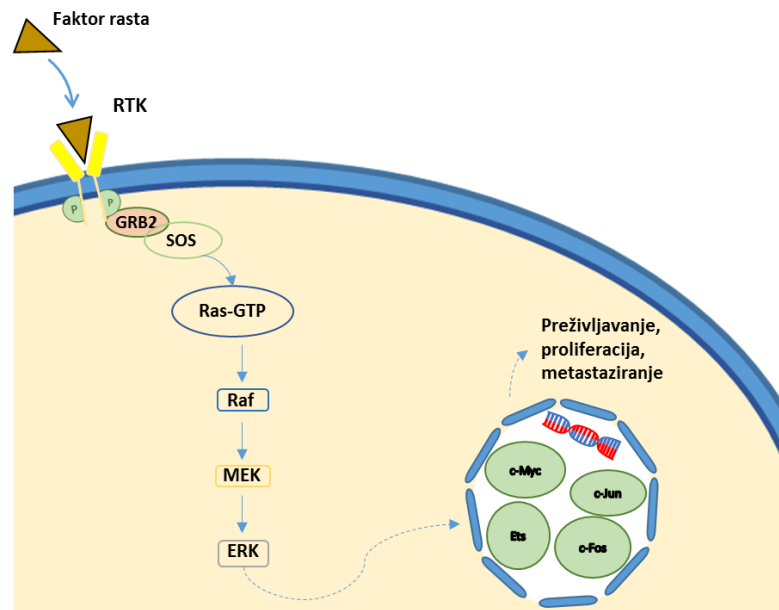
melanocita, stanica koje sintetiziraju zaštitni pigment melanin (slika preuzeta i prilagođena s <https://www.mayoclinic.org>)

Ovisno o karakteristikama tumora, kao što su patohistološki tip, lokalizacija i stadij melanoma, razlikuje se i terapijski protokol (Domingues i sur., 2018; Herceg i sur., 2016). Liječenje primarnog melanoma zasniva se na kirurškom liječenju, no ukoliko kirurško odstranjivanje nije moguće može se primjeniti i radioterapija. Kemoterapija je dugi niz godina bila zlatni standard za liječenje pacijenata sa uznapredovanim melanomom u kasnom stadiju, no liječenje metastatske bolesti je u zadnjih nekoliko godina doživjelo znatne promjene. Shodno tome, u slučaju metastatskog melanoma se primjenjuje sistemska terapija koja ovisi o rezultatima genskog testiranja i uključuje imunoterapiju (nivolumab ili pembrolizumab) i/ili ciljanu terapiju (vemurafenib ili dabrafenib) (Domingues i sur., 2018; Herceg i sur., 2016). Genska testiranja ključna su za otkrivanje genetičkih mutacija od kojih su mnoge uočene u komponentama/proteinima signalnog puta proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPK od engl. *mitogen-activated protein kinase*) (Guo i sur., 2020).

1.1.1 Uloga signalnog puta MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)

Signalni put MAPK ovisan je o kinazama i uključuje kaskadni prijenos signala od receptora na površini stanice do DNA u jezgri te time regulira niz staničnih procesa koji uključuju proliferaciju, diferencijaciju, stanični ciklus, apoptozu i odgovor na stres (Slika 2) (Robinson i Cobb, 1997). Aktivacija puta i prijenos signala započinje vezanjem liganda (npr. faktori rasta) na receptorsku tirozinsku kinazu (RTK od engl. *Receptor Tyrosine Kinase*) koja se nalazi na membrani stanice što uzrokuje konformacijsku promjenu receptora, njegovu dimerizaciju i aktivaciju. Na aktivirani receptor veže se protein Grb2 (engl. *growth factor receptor-binding protein 2*) koji ulazi u interakciju s faktorom razmjene nukleotida guanina, proteinom SOS (engl. *Son of Sevenless*). Stvoreni kompleks receptor-Grb2-SOS uzrokuje aktivaciju proteina SOS koji potiče uklanjanje molekule GDP s proteina RAS (engl. *rat sarcoma virus homologue*) koji zatim veže molekulu GTP i aktivira se. Slijedi prijenos signala u kojem aktivirani RAS veže i potiče translokaciju te aktivaciju kinaze RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) (Marais i sur., 1997). Aktivirana kinaza RAF zatim fosforilira i aktivira kinazu MEK (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*), koja zatim fosforilira i aktivira kinazu ERK (engl. *extracellular signal- regulated kinase*), poznatu kao i MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*). Fosforilirana kinaza ERK regulira aktivnost mnogih transkripcijskih faktora, uključujući proto-onkogene c-Fos, c-Jun, c-Myc, i time utječe na

ekspresiju gena u jezgri čiji proteinski produkti potiču normalnu staničnu proliferaciju i preživljenje (Slika 2) (Chan i sur., 2017; Kim and Cohen, 2016; Dhillon i sur., 2007).

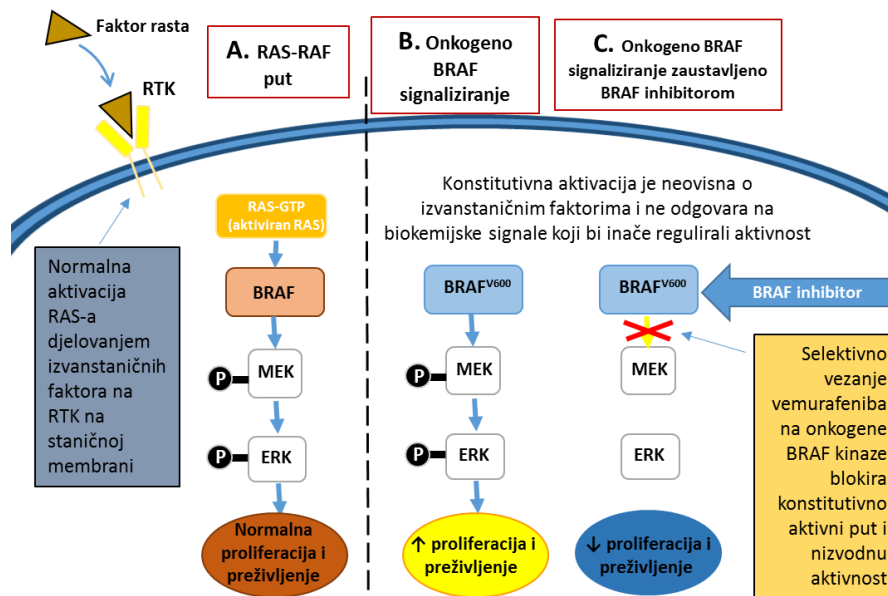


Slika 2. Prikaz regulacije signalnog puta MAPK poznatog kao i RAS-RAF-MEK-ERK ključnog za staničnu proliferaciju i preživljenje (model preuzet i prilagođen prema Govender i Chetty, 2012)

1.1.2 Uloga proteina BRAF

BRAF je serinska/treoninska proteinska kinaza koja sudjeluje u prijenosu signala u signalnom putu MAPK (Robinson i Cobb, 1997). Mutacije u komponentama signalnog puta MAPK uočene su u melanomima, pa se tako mutacije u genu *BRAF* javljaju u oko 60% svih melanoma pri čemu je najčešća točkasta mutacija transverzije nukleotida timina u adenin na mjestu 1799 koja uzrokuje supstituciju valina glutaminskom kiselinom na kodonu 600 što rezultira stvaranjem mutiranog proteina BRAF p.V600E (Davies i sur., 2002). Ujedno BRAF p.V600E čini oko 90% svih mutacija u genu *BRAF* (Ascierto i sur., 2012) i takva mutacija je aktivirajuća mutacija jer mutirani protein BRAF p.V600E pokazuje pojačanu kinaznu aktivnost (Slika 3B) u usporedbi sa divljim tipom (wt od engl. *wild-type*) proteina BRAF (Slika 3A) (Davies i sur., 2002). Takav onkogeni protein BRAF p.V600E potiče neprestani prijenos signala prema nizvodnim proteinima, efektorima MEK i ERK, i aktivaciju signalnog puta MAPK neovisno o ligandima i uzvodnoj komponenti, proteinu Ras te uzrokuje pojačanu proliferaciju,

rast, diferencijaciju i preživljenje stanica melanoma (Slika 3B) (Kim i Cohen, 2016; Ascierto i sur., 2012).

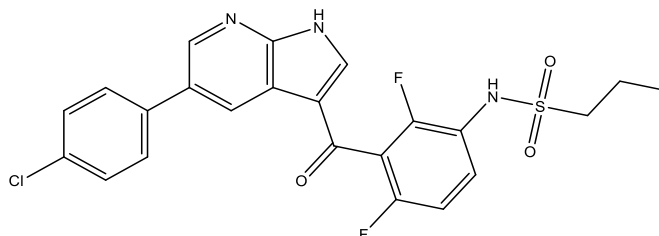


Slika 3. Prikaz različitih signalnih puteva MAPK ovisno o mutacijskom statusu proteina BRAF koji može biti neizmjenjen u stanicama s divljom tipom proteina BRAF (A) ili pojačano aktivan u stanicama s mutiranim proteinom BRAF p.V600E (B). Signalni put MAPK može se zaustaviti u stanicama s mutiranim proteinom BRAF p.V600E ukoliko se stanice tretiraju inhibitorima mutiranog proteina BRAF (C) (model preuzet i prilagođen prema Ascierto i sur., 2012)

1.1.3 Liječenje ciljanom terapijom vemurafenibom

Vemurafenib je ciljani inhibitor kojeg je u kolovozu 2011. odobrila američka Agencija za hranu i lijekove (FDA od engl. *U.S. Food and Drug Administration*) za liječenje uznapredovalog, metastatskog melanoma u kojem je utvrđena prisutnost mutacije BRAF p.V600E (Slika 4) (Fisher i Larkin, 2012; Sharma i sur., 2012; Heikal i sur., 2011; Flaherty i sur., 2010). Vemurafenib, poznat i kao PLX4032, je snažan inhibitor jer se selektivno veže na mjesto vezanja molekule ATP u mutiranom proteinu BRAF p.V600E i time inhibira njegovu aktivnost. Rezultat djelovanja vemurafeniba je zaustavljanje prijenosa signala puta MAPK i smanjena aktivacija proteina ERK što uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa, smanjenu proliferaciju i indukciju stanične smrti u stanicama melanoma s mutiranim BRAF p.V600E (Slika 3C) (Sondergaard i sur., 2010; Lee i sur., 2010). Međutim, vemurafenib može potaknuti

nastanak tumora u stanicama s divljim tipom proteina BRAF i mutiranim proteinom Ras uzrokujući pojačanu aktivnost signalnog puta MAPK u modelu laboratorijskog miša (Hatzivassiliou i sur., 2010; Poulidakos i sur., 2010).

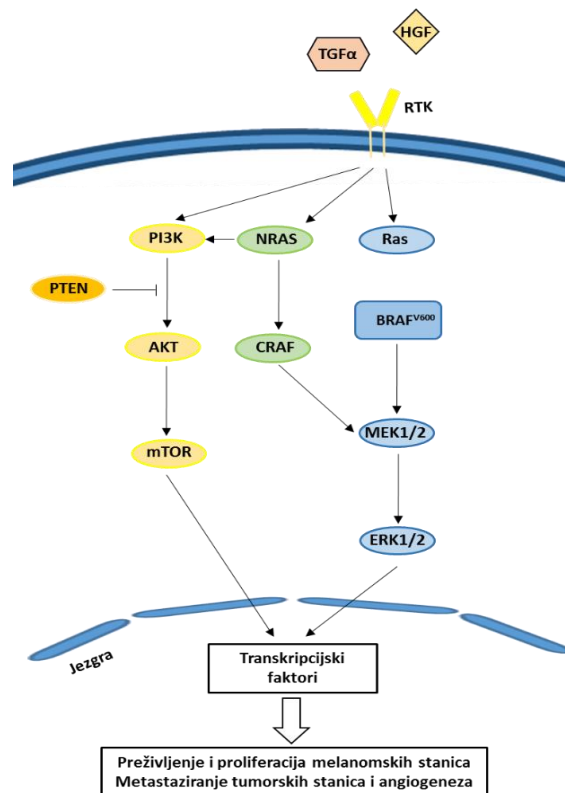


Slika 4. Prikaz strukture vemurafeniba, inhibitora mutiranog proteina BRAF p.V600E (preuzeto i prilagođeno s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Vemurafenib je prvi BRAF inhibitor koji je provjeren u kliničkom istraživanju, faze III kao što je studija BRIM-3. Navedena studija započela je 2010. i praćena je 4 godine te je uključivala nasumično odabane pacijente oboljele od prethodno netretiranog, neoperabilnog ili metastatskog melanoma s mutacijom BRAF p.V600E. Pacijenti su bili podvrgnuti tretmanu vemurafenibom ili dakarbazinom, kemoterapiji koja je do tada bila zlatni standard u liječenju melanoma. Rezultati studije pokazali su da su klinički parametri stope odgovora, kao što je sveukupno preživljenje (OS od engl. *overall survival*) ili preživljenje bez progresije bolesti (PFS od engl. *progression-free survival*), bili jači za vemurafenib u usporedbi s dakarbazinom. Vemurafenib je produžio preživljenje pacijenata (13.6 mjeseci) u odnosu na dakarbazin (9.7 mjeseci) i uzrokovao povlačenje i regresiju tumora. Zanimljivo je da je pozitivan učinak terapije vemurafenibom na preživljenje pacijenata bio posebno izražen u grupi pacijenata s nepovoljnijim prognostičkim čimbenicima kao što je starija životna dob (≥ 65 godina starosti) ili jači teret bolesti (≥ 3 metastatska mjesta). Međutim, u više od 75% pacijenata liječenih vemurafenibom uočena je progresija bolesti (Chapman i sur., 2017; McArthur i sur., 2014; Chapman i sur., 2011), najvjerojatnije kao posljedica otpornosti na monoterapiju vemurafenibom uzrokovanu reaktivacijom signalnog puta MAPK. Shodno tome, trenutna ciljana terapija je usmjerena na združenu inhibiciju BRAF i MEK kako bi se postigla potpunija inhibicija signalnog puta MAPK. U skladu s tim, 2013. godine je prvi MEK inhibitor, poznat kao trametinib, dobio odobrenje od FDA. Iako združena terapija inhibitorima BRAF i MEK, kao što je terapija dabrafeniba s trametinibom ili vemurafeniba s kobimetinibom produljuje preživljenje pacijenata bez progresije bolesti u odnosu na monoterapiju, otpornost tumora na ciljanu terapiju javlja se već nekoliko mjeseci od početka tretmana (Kozar i sur., 2019).

1.1.4 Mehanizmi otpornosti na ciljanu terapiju

Iako se monoterapija vemurafenibom pokazala vrlo efikasnom u liječenju melanoma s mutacijom BRAF p.V600E, otprilike 1 na 10 liječenih pacijenata ne pokazuje terapijski odgovor zbog primarne (intrinzične) otpornosti na lijek (Flaherty i sur., 2010). Drugi, velik problem jest pojava stečene otpornosti koju većina pacijenata razvija već nekoliko mjeseci nakon početka liječenja (Chan i sur., 2017; Wagle i sur., 2011; Flaherty i sur., 2010). Naime, pokazano je da otpornost na ciljanu terapiju nastupa uslijed: a) reaktivacije signalnog puta MAPK zbog sekundarnih mutacija, amplifikacija ili aktivacija nekih od komponenti signalnog puta; b) zaobilaznja onkogenog puta MAPK zbog aktiviranja alternativnih signalnih puteva; ili c) dosad neokarakteriziranih procesa (Slika 5) (Chan i sur., 2017).



Slika 5. Prikaz mehanizama otpornosti na inhibitore mutiranog proteina BRAF p.V600E. Do otpornosti dolazi uslijed reaktivacije signalnog puta MAPK zbog sekundarnih mutacija (npr. NRAS) ili zaobilaznja onkogenog puta MAPK aktiviranjem alternativnih signalnih puteva (npr. PI3K/AKT) (model je preuzet i prilagođen prema Chan i sur., 2017)

S obzirom da vemurafenib direktno inhibira mutirani protein BRAF i tako onemogućava prijenos nizvodnih signala u kaskadi BRAF-MEK-ERK, da bi došlo do ponovne reaktivacije

tog puta, potrebno je zaobići kinazu BRAF. Upravo mutiran uzvodni aktivator proteina BRAF, protein NRAS može aktivirati dvije izoforme kinaze RAF (ARAF i/ili CRAF) i na taj način reaktivirati signalni put MAPK. Protein NRAS mutiran je u skoro 30% melanoma i uz reaktivaciju signalnog puta MAPK može uzrokovati i aktivaciju alternativnog signalnog puta PI3K/AKT/mTOR (Slika 5) (Chan i sur., 2017; Wang i Qi, 2013; Yadav i sur., 2012; Wagle i sur., 2011; Nazarian i sur., 2010).

Drugi molekularni mehanizam otpornosti stanica melanoma na vemurafenib je aktivacija alternativnih signalnih puteva koji su uključeni u regulaciju proliferacije, staničnog rasta, diferencijacije i tumorigenezu. Najznačajniji alternativni put je već spomenuti PI3K/AKT koji, poput puta MAPK, uključuje kaskadni prijenos signala kojeg aktiviraju RTK kada se na njih vežu ligandi kao što su faktori rasta. Tako aktivirane RTK potiču vezanje kinaze PI3K koja fosforilira fosfatidilinozitol bifosfat (PIP2) prevodeći ga u fosfatidilinozitol trifosfat (PIP3). Nastali produkt potiče lokalizaciju kinaze AKT na staničnu membranu koja se zatim fosforilira i aktivira djelovanjem kinaza PDK1 (engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) i mTORC2 (engl. *mTOR complex 2*). Aktivirana kinaza AKT inhibira protein TSC1/2 (engl. *tuberous sclerosis complex 1 and 2*), što uzrokuje nakupljanje kompleksa Rheb-GTP koji aktivira serinsku/treoninsku kinazu mTORC1, koja, poput kinaze ERK, potiče staničnu proliferaciju, stanični rast, pokretljivost i preživljenje stanica (Chan i sur., 2017). Aktivnost signalnog puta PI3K/AKT negativno je regulirana fosfatazom PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*) koja pretvara PIP3 u PIP2 i time sprječava fosforilaciju i aktivaciju kinaze AKT. Shodno tome fosfataza PTEN ima tumor supresorsku ulogu i gubitak njezine funkcije može dovesti do različitih tipova tumora, uključujući i melanom (Chan i sur., 2017; Lim i sur., 2017).

Jedan od glavnih razloga pojačane aktivnosti signalnih puteva je prekomjerna ekspresija RTK kao što su PDGFR β , IGFR1, EGFR i c-Met koja može biti praćena i povećanim izlučivanjem pripadajućih faktora rasta kao što su HGF, TGF, IGF1 što za posljedicu ima pojačanu proliferaciju, rast i metastaziranje stanica melanoma neovisno o tipu otpornosti (Slika 5) (Chan i sur., 2017).

1.2 Porodica proteina NME/NDPK/Nm23

Nukleozid-difosfatske kinaze, poznate kao i NME, NDPK ili Nm23, evolucijski su očuvani proteini koje posjeduju niz bioloških funkcija (Bosnar i sur., 2009, Boissan i sur., 2009,

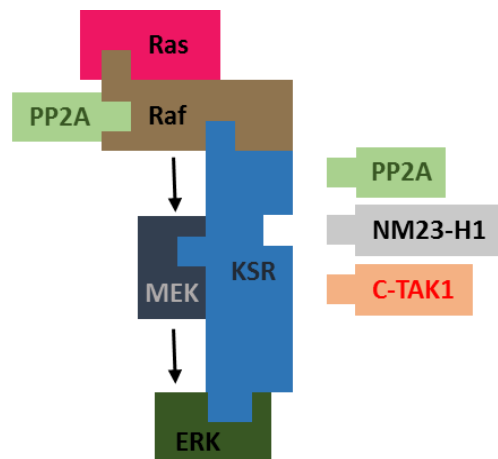
Bilitou i sur., 2009) od kojih jedna uključuje metabolizam nukleotida. Pa tako, NDPK svojom kinaznom aktivnosti kataliziraju prijenos terminalnog fosfata između nukleozid-difosfata (NDP od engl. *nucleoside diphosphate*) i nukleozid-trifosfata (NTP od engl. *nucleoside triphosphate*) u svrhu stvaranja NTP. Shodno tome, proteini NDPK su „housekeeping“ proteini jer održavaju razinu različitih NDP i NTP u stanici. Do danas je u sisavaca poznato deset gena *NME* čiji produkti se prema filogenetskoj analizi mogu podijeliti u dvije skupine. Prva skupna uključuje gene koji kodiraju proteine sa enzimatskom/NDPK katalitičkom aktivnosti (*NME1-NME4*), dok drugu skupinu čine geni koji kodiraju proteine kojima nije potvrđena NDPK aktivnost (Desvignes i sur., 2009).

Do sada je u biologiji tumora najdetaljnije istražena uloga proteina NME1 i NME2. Protein NME1 kodiran je genom *NME1*, poznat još kao i NM23-H1, koji je otkriven 1988. godine kao prvi supresor metastaziranja (Steeg i sur., 1988). Nekoliko godina kasnije otkriven je i gen *NME2* (Stahl i sur., 1991), koji kodira protein NME2 i, uz protein NME1, je protein iz porodice proteina NME s potvrđenom aktivnosti supresora metastaziranja (Lacombe i sur., 2000). Proteini NME1 i NME2 zapravo su podjedinice proteina NDPK, poznate još kao i NDPK A i NDPK B, koje stvaraju funkcionalan i enzimatski aktivan protein kada se nalaze u obliku homo- ili heteroheksamera (Ćetković i sur., 2015; Gilles i sur., 1991). Uz održavanje razine nukleotida u stanici, proteini NME1 i NME2 reguliraju transkripciju, djeluju kao histidinske proteinske kinaze i DNaze, posjeduju 3'-5' egzonukleaznu aktivnost te ulaze u interakciju s nizom proteinskih partnera. Shodno tome, proteini NME1 i NME2 su uključeni u niz staničnih procesa poput proliferacije, diferencijacije i razvoja, adhezije, migracije i metastaziranja, popravka DNA, molekularnog transporta i apoptoze (Radić i sur., 2020; Boissan i sur., 2018; Ćetković i sur., 2015).

1.2.1 Uloga proteina NME1 u regulaciji signalnog puta MAPK

Uočeno je da protein NME1 može regulirati signalni put MAPK uključen u proliferaciju i preživljenje stanica (Mátyási i sur., 2020; Takács-Vellai 2014). Regulacija se odvija putem proteina KSR (engl. *kinase suppressor of Ras*) koji djeluje kao „skela“ komponentama signalnog puta MAPK u prijenosu signala na taj način da spaja tri kinaze RAF, MEK i ERK i tako doprinosi fosforilacijskoj kaskadi signalnog puta MAPK (Slika 6) (Shaul i Seger, 2007; Razidlo i sur., 2004). Kaskadni prijenos signala puta MAPK započinje vezanjem liganda na RTK i aktivacijom proteina RAS (opisano detaljnije u poglavlju 1.1.1.) pri čemu je protein KSR smješten uz staničnu membranu, dok je u nestimuliranim, mirujućim stanicama protein KSR

smješten u citoplazmi. Poznato je da nekoliko proteina regulira lokalizaciju, a time i aktivaciju proteina KSR koje ovise o fosforilacijskom statusu ključnog aminokiselinskog ostatka serina na poziciji 392 proteina KSR. U mirujućim je stanicama aminokiselinski ostatak serina (p-Ser392) fosforiliran i kao takav veže protein 14-3-3 koji zadržava protein KSR u citoplazmi (Müller i sur., 2001). Međutim, pod utjecajem faktora rasta i aktivacijom proteina RAS, aminokiselinski ostatak Ser392 se defosforilira što dovodi do relokalizacije proteina KSR uz staničnu membranu gdje potiče kaskadni prijenos signala komponenti puta MAPK. Defosforilacija proteina KSR ovisi o fosfatazi PP2A koja uzrokuje aktivaciju proteina KSR, dok fosforilacija proteina KSR i njegova inaktivacija ovisi o histidinskoj kinaznoj aktivnosti proteina NME1 i kinazi cTAK1 (engl. *Cdc25C-associated kinase 1*) (Slika 6) (Mátyási i sur., 2020; Takács-Vellai 2014; Ory i sur., 2003; Hartsough i sur., 2002; Müller i sur., 2001). Shodno tome, pojačana ekspresija NME1 u stanicama tumora dojke uzrokuje smanjenu aktivnost signalnog puta MAPK (Hartsough i sur., 2002) dok utišavanje ekspresije proteina NME1 u stanicama tumora jetre uzrokuje pojačanu aktivnost puta MAPK (Boissian i sur., 2010) što upućuje da NME1 inhibira signalni put MAPK putem fosforilacije i inaktivacije proteina KSR. Zanimljivo je da utišavanje ekspresije proteina NME1 u stanicama tumora jetre i crijeva uzrokuje aktivaciju pro-onkogenog signalnog puta PI3K/AKT, koji regulira proliferaciju, preživljenje, migraciju i invaziju tumorskih stanica (Boissian i sur., 2010).



Slika 6. Prikaz uloge proteina KSR u signalnom putu MAPK i njegova regulacija (model preuzet i prilagođen prema Takács-Vellai 2014)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je istražiti važnost nukleozid-difosfatnih kinaza *NME1* i *NME2* u regulaciji glavnih signalnih puteva te utvrditi razliku u njihovoj ekspresiji između parentalne linije i staničnih podlinija WM793B melanoma čovjeka otpornih na vemurafenib. Pokusi su provedeni sa svrhom boljeg razumijevanja njihove uloge te ispitivanja terapijskog potencijala. Pri tome su korištene standardne metode molekularne biologije poput metoda Western blot, testa MTT te utišavanja ekspresije korištenjem vrlo specifičnih malih interferirajućih RNA koje ciljaju gene *NME1* i *NME2*. Testom MTT ispitana je proliferacija stanica dok je metodom Western blot analizirana ekspresija proteina biljega proliferacije i biljega aktivnosti signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Naziv (formula ili naziv kemijskog spoja, proizvođač, zemlja podrijetla)

akrilamid (Sigma-Aldrich, SAD), amonijev persulfat (APS od engl. *ammonium persulfate*, $[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$ Sigma-Aldrich SAD), bisakrilamid (Sigma-Aldrich, SAD), bromfenolno plavilo (Sigma-Aldrich, SAD), deionizirana voda (qH_2O , pripravljena korištenjem uređaja Milli Q), destilirana voda (deH_2O), dimetil-sulfoksid (DMSO, $[\text{CH}_3]_2\text{SO}$, Kemika, Hrvatska), ditiotreitrol (DTT, Sigma-Aldrich, SAD), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Kemika, Hrvatska), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA od engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, Kemika, Hrvatska), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF od engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma-Aldrich, SAD), formaldehid (CH_2O , Kemika, Hrvatska), glicin (Kemika, Hrvatska), kalijev klorid (KCl, Kemika, Hrvatska), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4 , Kemika, Hrvatska), L-glutamin (Sigma-Aldrich, SAD), metanol (CH_3OH , Kemika, Hrvatska), MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid, Chemicon, SAD), naftolno plavilo (Kemika, Hrvatska), natrijev dodecil-sulfat (SDS od engl. *sodium dodecyl sulphate*, Sigma-Aldrich, SAD), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4 , Kemika, Hrvatska), natrijev klorid (NaCl, Kemika, Hrvatska), natrijev piruvat ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$, Gibco, SAD), obrano mlijeko u prahu (Dukat, Hrvatska), octena kiselina (CH_3COOH , Kemika, Hrvatska), penicilin (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, SAD), serum fetusa goveda (FBS od engl. *fetal bovine serum*, Gibco, SAD), streptomycin (Gibco, SAD), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin, Sigma-Aldrich, SAD), tripsin (Sigma-Aldrich, SAD), Tris-baza (tris[hidroksimetil]aminometan, Sigma-Aldrich, SAD), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD), Tween-20 (Sigma-Aldrich, SAD), vemurafenib (PLX4032, Selleck Chemicals, SAD), voda bez ribonukleaze (engl. *RNase-free water*)

3.1.2 Otopine, puferi

Naziv otopine ili pufera (sastav, pH, proizvođač i zemlja podrijetla)

Fosfatni pufer (PBS od engl. *phosphate buffer saline*; pH 7,4; $8 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$, $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$, $1,44 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, deH_2O)

Otopina tripsina za odvajanje stanica od podloge (0,25 % (w/v) tripsin, 1 mM EDTA)
Otopina tripanskog plavila za brojanje stanica (0.03 % (w/v) tripansko plavilo, 1 mM PMSF, 1 mg mL ⁻¹ BSA, sterilna qH ₂ O)
6× vrući pufer za izolaciju proteina (HLB od engl. <i>hot lysis buffer</i> ; 0,5 M Tris- HCl, 18 % (w/v) SDS, 45 % (v/v) glicerol, 0,3 (w/v) bromfenolno plavilo, 18 % (v/v) 2-merkaptoetanol)
Matična otopina akrilamida i bisakrilamida (AAS od engl. <i>acrylamide/bisacrylamide stock</i> ; 29,2 % (w/v) akrilamid, 0,8 % (w/v) bisakrilamid)
Pufer za pripremu poliakrilamidnog gela za sabijanje (pH 6,8; 1 M Tris, deH ₂ O)
Pufer za pripremu poliakrilamidnog gela za razdvajanje (pH 8,8; 1,5 M Tris, deH ₂ O)
10× pufer za elektroforezu (RB od engl. <i>running buffer</i> ; 0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1 % (w/v) SDS, deH ₂ O)
4× pufer za nanošenje uzoraka na gel (LB od engl. <i>Laemmli buffer</i> ; 0,2 M Tris-HCl, 0,4 M DTT, 8 % (w/v) SDS, 40 % (w/v) glicerol, 0,001 % (w/v) bromfenolno plavilo)
10× pufer za prijenos proteina (TB od engl. <i>transfer buffer</i> ; 184 mM Tris, 140 mM glicin, deH ₂ O)
1× pufer za prijenos proteina (10 % (v/v) 10×TB, 20 % (v/v) metanol, 70 % (v/v) deH ₂ O)
Otopina za bojanje membrane (1 g L ⁻¹ naftalnog plavila, 10 % (v/v) metanol, 2 % (v/v) octena kiselina, deH ₂ O)
Otopina za odbojavanje membrane (40 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) octena kiselina, deH ₂ O)
10× pufer za ispiranje membrane (TBST od engl. <i>Tris buffered saline+Tween-20</i> ; 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,1 % (v/v) Tween-20, deH ₂ O)
Pufer za blokiranje membrane (5 % (w/v) obrano mlijeko u prahu otopljeno u puferu 1× TBST)

3.1.3 Komercijalno dostupni kompleti kemikalija

Kompleti (puni naziv, sastav, proizvođač, zemlja podrijetla)
Inhibitori proteaza (Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Švicarska)
Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD)
Komercijalni kompleti za detekciju proteina kemiluminiscencijom (Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer, Nizozemska; SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate, Thermo Fisher Scientific, SAD); SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific, SAD)
Male interferirajuće molekule RNA koje ciljaju <i>NME1</i> (ON-TARGETplus SMARTpool Human <i>NME1</i> , Dharmacon, SAD)
Male interferirajuće molekule RNA koje ciljaju <i>NME2</i> (ON-TARGETplus SMARTpool Human <i>NME2</i> , Dharmacon, SAD)
Male interferirajuće molekule RNA koje ne ciljaju mRNA (ON-TARGETplus control siRNA, Non-Targeting siRNA#1, Dharmacon, SAD)
Transfekcijski reagens (DharmaFECT™ 4 Transfection Reagent, Dharmacon, SAD)

3.1.4 Standardi, biljezi veličine i boje

Standardi i biljezi (puni naziv, proizvođač, zemlja podrijetla)
Standard za određivanje koncentracije proteina otopine proteina albumina iz goveđeg seruma (BSA od engl. <i>bovine serum albumin</i> , korišten u koncentracijama od 125, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Biljezi za određivanje molekularne mase proteina u rasponu od 10 do 250 kDa (Precision Plus Protein Standards Dual Color, BioRad, SAD)

3.1.5 Primarna i sekundarna protutijela

Naziv primarnog protutijela	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač	Zemlja podrijetla
pAkt (Ser473)	kunić	1:1 000	Cell Signaling Technology	SAD
Akt (pan)	miš	1:1 000	Cell Signaling Technology	SAD
β-aktin	miš	1:10 000	Proteintech	SAD
Fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	kunić	1:1 000	Cell Signaling Technology	SAD
Erk	kunić	1:1 000	Santa Cruz Biotechnology	SAD
PCNA	kunić	1:1 000	Cell Signaling Technology	SAD
NME1 NME2	kunić	1:3 000	Proizvedeno u suradnji I. Lascu, M. Herak Bosnar i S. Volarević	Hrvatska

Naziv sekundarnog protutijela	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač	Zemlja podrijetla
Anti-rabbit (HRP-linked)	koza	1:5 000	Cell Signaling Technology	SAD
Anti-mouse (HRP-linked)	konj	1:5 000	Cell Signaling Technology	SAD

3.1.6 Stanične linije

- Stanična linija WM793B, stanice primarnog humanog melanoma (dostupna u bazi American Type Culture Collection ATCC® CRL_2806™)

- Stanične podlinije WM793B_VR1 i WB793B_VR2 otporne na vemurafenib razvijene su *in vitro* u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković i dobivene su višemjesečnom rastom stanične linije WM793B u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom konačne koncentracije 4 μM , pri čemu je podlinija WM793B_VR1 rasla osam, a podlinija WB793B_VR2 11 mjeseci

3.1.7 Hranjive podloge i mediji

Podloga (naziv, sastav, zemlja proizvodnje)
Kompletirana tekuća hranjiva podloga – RPMI-komp (RPMI 1640 od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , Lonza, Belgija; 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijevog piruvata, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ penicilin, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomicina)
Tekuća hranjiva podloga bez antibiotika – RPMI-P/S (RPMI 1640 od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , Lonza, Belgija; 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijevog piruvata)
Tekuća hranjiva podloga s vemurafenibom – RPMI+VR (RPMI 1640 od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , Lonza, Belgija; 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijevog piruvata, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ penicilin, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomicina, 4 μM vemurafenib)
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.1.8 Uređaji i potrošni materijal

Uređaj (puni naziv, specifikacija, proizvođač, zemlja podrijetla)
Centrifuga (<i>Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital</i> , MSE, Ujedinjeno Kraljevstvo)
Centrifuga (tip <i>5414 R</i> , Eppendorf, Njemačka)
Inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija)
Invertni mikroskop (<i>Wilovert S</i> , Hund Wetzlar, Njemačka)
Kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija)

Kružna miješalica (<i>Gyro-rocker SSL3 Stuart</i> [®] , Cole-Parmer Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
Laserski pretražni konfokalni mikroskop (<i>Leica SP8 X FLIM</i> , Leica, Njemačka)
Magnetska miješalica (MSH Basic, Ika, Njemačka)
Spektrofotometar za mikrotitarske pločice (ELISA Multiscan, MS Labsystems, Finska)
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 mikrotitarske pločice (tip 715, Asal, Italija)
Ultrazvučna sonda (<i>Labsonic</i> [®] M, promjera 1 mm, Montreal Biotech, Kanada)
Uređaj za napajanje (<i>Power Pac Basic Power Supply</i> , BioRad, SAD)
Uređaj za vizualizaciju i fotografiranje (<i>Alliance 4.7</i> , Uvitec, Ujedinjeno Kraljevstvo)
Uređaj za vizualizaciju i fotografiranje (<i>Alliance Q9 Advanced</i> , Uvitec, Ujedinjeno Kraljevstvo)
Vaga (tip <i>PM 4000</i> , Mettler Toledo, SAD)
Vodena kupelj za mikrotitarske pločice (tip 1083, GFL, Njemačka)
Zibalica (<i>PMR-30 Rocker-Shaker</i> , Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Naziv potrošnog materijala (specifikacija, proizvođač, zemlja podrijetla)
Petrijeve zdjelice Falcon [®] (promjer 60 mm i 100 mm, Corning Incorporated, SAD)
Plastične epruvete Falcon [®] (volumen 15 Ml, Corning Incorporated, SAD)
Mikrotitarske pločice Falcon [®] (96 bunarića, Corning Incorporated, SAD)

Pločice za kulturu stanica (6 ili 24 bunarića, Corning Incorporated, SAD)

Komorica za brojanje stanica Neubauer (površina 0,0025 mm², Blaubrand Brand, Njemačka)

Nitrocelulozna membrana za prijenos proteina Protran BA 85 (veličina pora 0,2 µm, Whatman™, GE Healthcare Ujedinjeno Kraljevstvo)

3.2 Metode rada sa staničnim linijama

U ovom radu koristi se stanična linija WM793B koja je dobivena ljubaznošću dr. sc. Danielea Bergamaschija (Blizar Institute, London, UK). Stanice linije WM793B su porijeklom iz primarnog melanoma čovjeka i u ovom radu nazivaju se parentalne. Također se u radu koriste i dvije podlinije razvijene u laboratorijskim uvjetima *in vitro*, a dobivene su višemjesečnim izlaganjem stanica parentalne linije WM793B u tekućoj hranjivoj podlozi s vemurafenibom konačne koncentracije 4 µM (podloga RPMI+VR). Pri tome, podlinija WM793B_VR1 izlagana je osam, a podlinija WB793B_VR2 11 mjeseci. Otpornost staničnih podlinija na vemurafenib provjerena je testom MTT, kao i koncentracija vemurafeniba pri kojoj 50% stanica umire (IC₅₀ od engl. *half-maximal inhibitory concentration*). Za podlinije WM793B_VR1 i WM793B_VR2 izračunate IC₅₀ vrijednosti iznose $17,94 \times 10^{-6}$ M i $24,11 \times 10^{-6}$ M, dok za parentalnu liniju iznosi $2,616 \times 10^{-6}$ M što potvrđuje jaču otpornost podlinija na vemurafenib u odnosu na parentalnu liniju.

Rad sa svim staničnim linijama provodi se u kabinetu za rad sa sterilnim uvjetima s laminarnim strujanjem zraka uz upotrebu sterilnog pribora, sterilnim otopinama, puferima i hranjivim medijima.

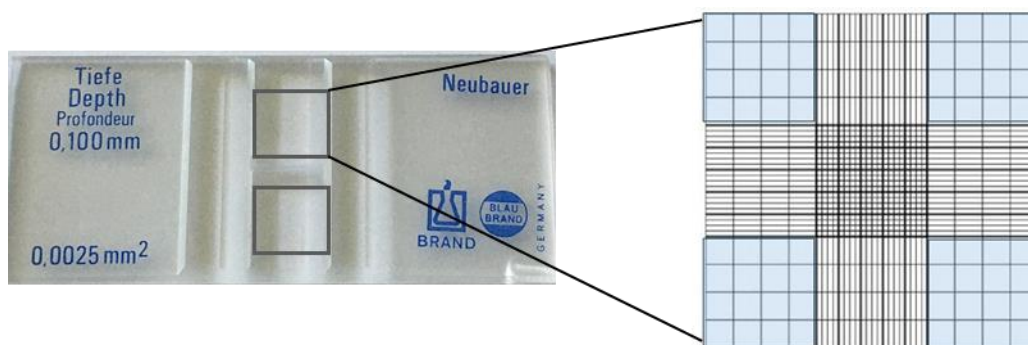
3.2.1 Uzgoj stanica

Sve sterilne otopine, puferi i hranjivi mediji čuvaju se na +4°C te ih je prije rada na stanicama potrebno ugrijati u vodenoj kupelji na +37°C. Stanice parentalne linije i podlinija otpornih na vemurafenib su adherentne i rastu u jednom sloju pričvršćene na podlogu te im je potrebno dva do tri puta tjedno promijeniti tekući hranjivi medij. Tekući hranjivi medij potreban za rast stanica parentalne linije WM793B je kompletirani RPMI (RPMI-komp), a za stanice podlinija otpornih na vemurafenib WM793B_VR je kompletirani RPMI u koji je dodan

vemurafenib krajnje koncentracije 4 μM (RPMI+VR). Popunjenost stanica na podlozi provjerava se invertnim mikroskopom i ukoliko stanice dostignu popunjenost Petrijeve zdjelice više od konfluentnosti (>80% popunjenosti) potrebno ih je rasaditi. Prije rasađivanja, stanicama se odstrani tekući hranjivi medij i stanice se isperu s 2 ili 5 mL otopine PBS-a ovisno o veličini Petrijeve zdjelice u kojoj rastu (60 ili 100 mm). Zatim se na isprane stanice doda 0,5 ili 1,5 mL tripsina te se zdjelica vrati u inkubator u trajanju od 3 min odnosno dok se stanice pod utjecajem tripsina ne odvoje od podloge. Kad su se odvojile od podloge, stanice se dobro resuspendiraju u 3 ili 5 mL tekućeg hranjivog medija, što inaktivira djelovanje tripsina. Ukoliko se stanice samo održavaju u kulturi, u zdjelici se ostavi oko 1/10 volumena resuspendiranih stanica i doda 4 ili 8 mL tekućeg hranjivog medija. Stanice se zatim vrate u inkubator uz oznaku nove pasaže (+1). Međutim, ukoliko se koriste za pokus, resuspendirane stanice se prebace u staklenu sterilnu epruvetu i izbroje.

3.2.2 Brojanje stanica

Ukupan broj stanica u suspenziji određuje se pomoću komorice za brojanje stanica, točnije Neubauerove komorice (Slika 7). Neubauerova komorica sadrži pokrovno stakalce koje treba čvrsto prijanjati za podlogu komorice kako bi se gornji i donji utor komorice mogao napuniti uzorkom za brojanje. Uzorak za brojanje sadrži pet puta razrijeđenu staničnu suspenziju u otopini tripanskog plavila i priprema se miješanjem 20 μL resuspendiranih stanica i 80 μL otopine tripanskog plavila. Otopina tripanskog plavila prodire kroz membrane mrtvih stanica i boja ih plavo, dok žive stanice, zbog aktivnih staničnih pumpi, ostaju nebojene. Na taj način postiže se kontrast koji omogućuje brojanje živih stanica invertnim mikroskopom. Na Slici 7 se nalazi model Neubauerove komorice s plavo označena 4 kvadranta unutar kojih se izbroje žive stanice (ukupno 64 kvadratića).



Slika 7. Model Neubauerove komorice za brojanje stanica (preuzet i prilagođen s <https://www.researchgate.net>)

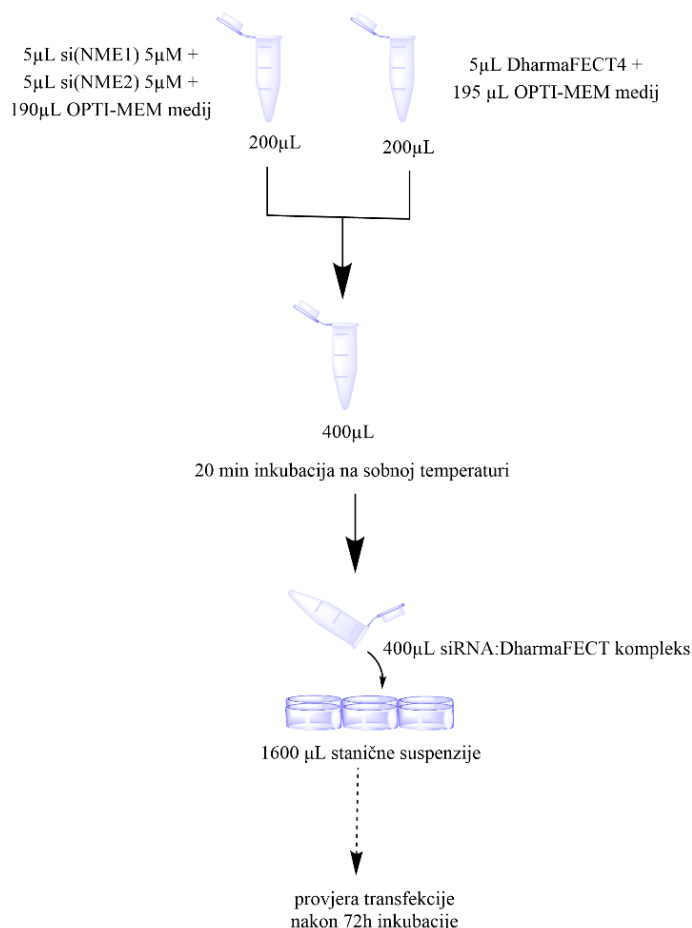
Broj stanica u jednom mililitru izračunava se prema formuli:

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

(broj izbrojanih kvadranata = 4; faktor razrjeđenja = 5).

3.2.3 Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim molekulama RNA

Prolaznu transfekciju stanica parentalne linije WM793B malim interferirajućim molekulama RNA (siRNA od engl. *small interfering RNA*) proveli smo kako bi utišali ekspresiju gena *NME1* i *NME2*, odnosno onemogućili translaciju njihovih glasničkih RNA (mRNA). Za utišavanje gena koristili smo dvije komercijalno pripravljene smjese siRNA proizvođača Dharmacon, koje se sastoje od četiri individualne siRNA koje ciljaju različite sekvence mRNA *NME1* (si(*NME1*)) ili *NME2* (si(*NME2*)). Transfekciju stanica sa siRNA proveli smo metodom direktnog utišavanja pri čemu je stanice potrebno nasaditi 24 h prije transfekcije. Shodno tome, na pločicu za kulturu stanica od 6 bunarića nasadili smo 3×10^5 stanica po bunariću u tekućoj hranjivoj podlozi bez antibiotika (RPMI-P/S). Sljedeći dan smo proveli postupak transfekcije prema uputama proizvođača Dharmacon. Ukratko, za svaki uzorak pripreme se dvije mikroeprevete od 1,5 mL pri čemu jedna sadrži smjesu siRNA željene krajnje koncentracije u tekućem mediju OPTI-MEM, a druga sadrži smjesu transfekcijskog reagensa DharmaFECT4 u tekućem mediju OPTI-MEM. Nakon 5 min, sadržaj mikroepreveta se spoji i transfekcijska smjesa se blago promiješa bez uvođenja mjehurića. Nakon 20 min transfekcijska smjesa se rasporedi po adherentnim stanicama koje su dan prije nasadene na pločicu za kulturu stanica. Postupak transfekcije uključuje i dvije negativne kontrole, odnosno stanice koje nisu transfecirane (CTRL) i stanice koje su transfecirane sa kontrolnom siRNA (siRNA(-)) (Slika 8).



Slika 8. Prikaz sheme transfekcije nacrtan pomoću programa ChemDraw

Krajnja koncentracija siRNA u smjesi iznosila je 25 nM pri čemu je omjer siRNA(*NME1*):siRNA(*NME2*) bio 1:1. Stanice smo skupili 72 h nakon transfekcije, izdvojili proteine (poglavlje 3.3.) i provjerili učinkovitost utišavanja metodom Western blot (poglavlje 3.4.). Smjese malih interferirajućih siRNA dugoročno se čuvaju na -20°C.

3.2.4 Test MTT

Test MTT je kolorimetrijska metoda za mjerenje metaboličke aktivnosti živih stanica. U živim, metabolički aktivnim stanicama NAD(P)H-ovisne stanične oksidoreduktaze reduciraju žuto obojenu tetrazolijevu sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u plavo-ljubičasto obojene kristale netopljivog formazana. Netopivi formazan se otapa dodatkom DMSO i apsorbancija nastale otopine izmjeri se na spektrofotometru pri 570 nm. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je intenzitetu obojenja nastalog formazana i broju živih, metabolički aktivnih stanica. Shodno tome, test MTT pogodna je metoda za određivanje proliferacije stanica. MTT je osjetljiv na svjetlost i zato se test MTT provodi u zamračenom prostoru.

3.2.5 Određivanje proliferacije

Testom MTT pratili smo proliferaciju stanica parentalne linije WM793B i podlinija otpornih na vemurafenib WM793B_VR1 i WM793B_VR2, te proliferaciju stanica linije WM793B nakon transfekcije s malim interferirajućim siRNA koje ciljaju *NME1* i *NME2* (si(*NME1/NME2*), zatim stanica koje su transfecirane kontrolnom siRNA (si(-)) i stanica koje nisu transfecirane (CTRL).

Optimalan broj stanica za nasađivanje je 2000 stanica po bunariću mikrotitarske pločice sa 96 bunarića. S obzirom da smo pratili proliferaciju kroz vrijeme, stanice smo nasadili na 4 različite mikrotitarske pločice sa 96 bunarića jer svaka pločica predstavlja jedan vremenski period od vremena nasađivanja (0, 24 h, 48 h i 72 h). Stanice se nasađuju u bunariće mikrotitarskih pločica u ukupnom volumenu od 100 μ L, dok se u rubne bunariće pločice stanice ne nasađuju i doda se samo tekući hranjivi medij. Pločice se zatim spremaju u inkubator na 37°C. Nakon 16 h, iz inkubatora se uzme jedna mikrotitarska pločica (označava nulti dan, 0) i iz bunarića se ukloni tekući hranjivi medij te doda po 40 μ L otopine MTT. Mikrotitarska pločica se u trajanju od 3 h vrati u inkubator. Nakon inkubacije se u svaki od bunarića doda 170 μ L DMSO i pločica se potom, u trajanju od 15 min pri 600 rpm, stavi na tresilicu za mikrotitarske pločice. Kada su svi kristali formazana otopljeni izmjeri se apsorbancija otopina pri 570 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice. Iz rubnih bunarića očita se apsorbancija otopine MTT i DMSO koja čini slijepu probu. Isti postupak ponavlja se za svaku narednu pločicu 24, 48 i 72 h od prve pločice odnosno od nultog dana (0). Ovisno o stanicama, test MTT je ponovljen u dva ili tri biološka replikata provedena u tehničkom triplikatu ili peteroplikatu.

3.3 Priprema proteinskih lizata za Western blot

3.3.1 Izdvajanje proteina iz stanica

U ovome diplomskom radu korištene su dvije metode izdvajanja proteina iz stanica.

U prvom postupku stanicama, koje su rasle određeno vrijeme na pločici za kulturu stanica od 6 bunarića ili na Petrijevim zdjelicama od 60 mm ili 100 mm, odstrani se medij i isperu se s 1-3 mL pufera PBS. Stanice se odvoje od podloge dodatkom tripsina (200 μ L po bunariću ili 0,5-1 mL po podlozi), ostave u inkubatoru 1-3 min i nakon odvajanja resuspendiraju u tekućem hranjivom mediju. Suspenzija stanica prebaci se u staklene epruvete volumena 5 mL koje se potom centrifugiraju 5 min pri 1200 \times g na 4°C. Supernatant se odbacuje, a ovisno o gustoći, talozi se resuspendiraju u 50 do 100 μ L pufera za lizu stanica s dodanim inhibitorima

proteaza. Sadržaj stanica se prebaci u označenu mikroeprijetu volumena 1.5 mL i sonicira. Sonikacija omogućava oslobađanje staničnog sadržaja i lizu stanica pomoću zvučnih valova visoke frekvencije. Sonikacija se provodi ultrazvučnom sondom promjera 1 mm i ponavlja se dva puta za svaki uzorak po 10 s pri amplitudi od 80 Hz uz razmak od 5 s. S obzirom da se prilikom sonikacije uzoraka razvija toplina koja može denaturirati proteine, svi postupci sonikacije trebaju se provoditi na ledu. U ovako dobivenim uzorcima staničnih lizata potrebno je provjeriti ukupnu koncentraciju proteina korištenjem komercijalnog kompleta metodom BCA (poglavlje 3.3.2.). Ovom metodom izdvajanja proteina iz stanica analizirani su proteini PCNA, NME1 i NME2.

Drugi postupak izdvajanja proteina provodi se na stanicama koje su nasadene 5×10^4 stanica po bunariću na pločicu za kulturu stanica od 24 bunarića. Ovaj postupak uključuje izdvajanje proteina pomoću vrućeg pufera za izolaciju proteina kojeg je potrebno razrijediti 6 puta jer se priprema iz koncentriranog $6 \times$ vrućeg pufera za izolaciju proteina. Dakle, 72 h nakon nasadivanja stanica na pločicu, stanice se isperu s 50 μ L pufera PBS te se na njih doda razrijeđen vrući pufer ($1 \times$ HLB pufer) koji je prethodno potrebno zagrijati 5 min na 95°C . Sadržaj staničnog lizata se promiješa, prebaci u prethodno označenu mikroeprijetu volumena 1,5 mL i zagrije 5 min na 95°C . Uzorci se zatim soniciraju, po prethodno opisanom protokolu, a sam postupak provodi se na ledu. U ovako dobivenim uzorcima staničnih lizata ne provjerava se ukupna koncentracija proteina korištenjem komercijalnih kompleta, već se volumen od 25 μ L direktno nanosi na gel (vidi poglavlje 3.4.1.). Ovom metodom izdvajanja proteina iz stanica analizirani su proteini pERK, ERK, pAKT i AKT.

Uzorci staničnih lizata dobiveni navedenim postupcima mogu se koristiti za analizu proteina metodom Western blot ili dugoročno čuvati na -80°C .

3.3.2. Određivanje koncentracije staničnih proteina metodom BCA

Koncentracija proteina iz staničnih lizata određuje se komercijalnim kompletom za određivanje koncentracije proteina (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Postupak se provodi na mikrotitarskoj pločici sa 96 bunarića na koju se otpipetira 20 μ L otopine standarda albumina iz govedeg seruma (BSA od engl. *bovine serum albumine*) različitih koncentracija (125, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 20 μ L deH₂O slijepe probe, 20 μ L PBS kao negativne kontrole koncentracije proteina i duplikat svakog razrijeđenog uzoraka staničnog lizata (2 μ L staničnog lizata i 18 μ L deH₂O po bunariću). Zatim se u svaki od bunarića doda po 200 μ L

reagensa za određivanje koncentracije proteina s bicinkoniničnom kiselinom (BCA od engl. *bicinchoninic acid*). Reagens BCA priprema se prema uputama proizvođača u kojem se BCA otopina A s BCA otopinom B miješa u omjeru 50:1. Mikrotitarska pločica se zatim inkubira 30 min na 37°C. Nakon inkubacije pločica se stavi u spektrofotometar za mikrotitarske pločice koji očitava apsorbanciju pri 570 nm. Koncentracija ukupnih proteina u uzorku staničnog lizata izračuna se iz jednadžbe baždarnog pravca koji se dobiva iz apsorbancija otopina standarda BSA (prethodno normaliziranih prema slijepoj probi) u ovisnosti o koncentraciji. Dobivena koncentracija ukupnih proteina odnosi se na razrijeđen uzorak i zato ju je potrebno uvećati 10 puta.

3.4 Analiza proteina metodom Western blot

3.4.1 Priprema uzoraka za elektroforezu proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu

Prije provođenja elektroforeze, potrebno je pripremiti uzorke proteina, gel i pufer za elektroforezu. Volumen uzorka proteina izračuna se prema prethodno određenoj koncentraciji ukupnih proteina u uzorku kako bi u jažici na gelu bilo 30 µg proteina. U označenu mikroeprevetu od 1,5 mL potrebno je uz uzorak proteina dodati i tri puta manji volumen 4× pufera za nanošenje uzoraka na gel (4×LB) (konačni udio 25% (v/v)), koji sadrži boju i time osigurava vizualno praćenje elektroforeze. Mikroepreveta se zatim zagrije na termobloku 5 min na 96°C radi denaturacije proteina i centrifugira 5 min na 5000 × g kako bi se spustili uzorci. Uzorci se nakon toga mogu direktno nanijeti na gel ili spremi na +4°C ili -20°C te koristiti sljedeći dan.

Za provedbu diskontinuirane elektroforeze potrebno je pripremiti poliakrilamidni gel u dva dijela, gornji dio koji se sastoji od gela za sabijanje uzoraka i donji dio koji se sastoji od gela za razdvajanje uzoraka. Gel za sabijanje je 5%-tni poliakrilamidni gel i njegova koncentracija je uvijek ista kod svih elektroforeza, dok se koncentracija gela za razdvajanje odabire ovisno o veličini analiziranog proteina (Tablica 1).

Tablica 1. Sastav smijese gelova za sabijanje i razdvajanje potrebih za analizu proteina

Vrsta gela i postotak	Sastav / mL	Analizirani proteini
Gel za sabijanje (5 %)	2,7 deH ₂ O, 0,6 AAS, 0,5 Tris puffer (pH 6,8), 0,04 10% SDS, 0,04 10% APS, 0,004 TEMED	pERK, ERK, pAKT, AKT, PCNA, NME1, NME2, β-aktin
Gel za razdvajanje (10 %)	4,0 deH ₂ O, 3,3 AAS, 2,5 Tris puffer (pH 8,8), 0,1 10% SDS, 0,1 10% APS, 0,004 TEMED	pERK, ERK, pAKT, AKT, β-aktin
Gel za razdvajanje (12 %)	3,3 deH ₂ O, 4,0 AAS, 2,5 Tris puffer (pH 8,8), 0,1 10% SDS, 0,1 10% APS, 0,004 TEMED	PCNA, NME1, NME2, β-aktin

Gelovi za razdvajanje višeg postotka poliakrilamida koriste za analizu proteina manje molekulske mase, dok se gelovi nižeg postotka poliakrilamida koriste za analizu proteina veće molekulske mase. Za potrebe ovog diplomskog rada, korišteni su 10%-tni i 12%-tni poliakrilamidni gelovi za razdvajanje ovisno o analiziranim proteinima (Tablica 1).

Za pripremu gelova koristi se deblje stakalce za elektroforezu s razmakom od 1,5 mm i tanje, pokrovno stakalce. Stakalca se pričvrste plastičnim hvataljkama i učvrste držačima na postolje za izlivanje gelova. Između stakalca se prvo ulijeva smjesa za gel za razdvajanje do dvije trećine visine pokrovnog stakalca. Zatim se na rub nepolimeriziranog gela dolije deH₂O i gel ostavi barem 45 min dok ne polimerizira. Nakon polimerizacije, voda se odlije i potom se između stakalca ulije smjesa za gel za sabijanje do vrha pokrovnog stakalca. U nepolimerizirani gel za sabijanje umetne se češljic s 10 jažica koje omogućavaju oblikovanje mjesta u koje će se nanijeti uzorci proteinskih lizata.

Nakon polimerizacije gelova, ukloni se češljic s jažicama, a stakalca se postave u sustav za vertikalnu elektroforezu u koji se ulije 1× puffer za elektroforezu (1×RB) koji se priprema razrjeđivanjem 10× pufera za elektroforezu (10×RB) s deH₂O.

3.4.2 Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu

Pripremljeni poliakrilamidni gelovi sadrže natrijev dodecil sulfat (SDS od engl. *sodium dodecyl sulphate*), anionski deterdžent koji odmatava i denaturira oligomerne proteine pri čemu nastaju kompleksi koji se sastoje od SDS-a i polipeptidnih lanca. Nastali kompleksi imaju naboj koji ovisi o naboju SDS-a i tijekom elektroforeze migriraju prema anodi brzinom koja ovisi o molekularnoj masi polipeptidnog lanca. U skladu s tim, brže migriraju proteini manje molekularne mase, a proteini veće mase migriraju sporije.

Prije nanošenja uzoraka na gel, potrebno je prema ranije određenoj koncentraciji izračunati volumen proteinskog lizata koji treba dodati kako bi u jažici bilo 30 µg proteina. Zatim se u mikroepruvetu od 1,5 mL uz volumen lizata dodaje tri puta manji volumen 4× pufera za nanošenje uzoraka na gel koji, zbog boje koju sadrži, omogućava praćenje donje fronte elektroforeze. Slijedi zagrijavanje mikroepruvete na termobloku 5 min na 96°C nakon čega se uzorci nanose na gel. U prvu jažicu gela nanosi se 1,5 µL biljega za određivanje molekularne mase proteina, a u ostale jažice nanose se pripremljeni uzorci. Nakon nanošenja uzoraka, sustav za vertikalnu elektroforezu se spoji na uređaj za napajanje, započne se elektroforeza koja se provodi 30 min pri konstantnom naponu od 90 V, kako bi uzorci ušli u sabijajući gel, te pri konstantnom naponu od 110 V oko 90 min odnosno dok fronta ne dođe do dna gela što omogućava da se proteini iz uzoraka pravilno razdvoje na gelu.

3.4.3 Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu

Nakon elektroforeze slijedi prijenos razdvojenih proteina iz uzoraka na nitroceluloznu membranu. Pri tome se odvoje stakalca, izvadi se gel i ukloni se sabijajući dio gela. Za prijenos proteina primjenili smo tehniku mokrog transfera, pri čemu je prethodno potrebno gel uravnotežiti u 1× puferu za prijenos proteina. U tu svrhu se u kadici koja je napunjena s 1× puferom za prijenos proteina priprema sendvič za prijenos (engl. „*transfer sandwich*“). Sendvič se sastoji od nosača između kojih se redom umetne spužvica, 2 lista filter papira, gel, nitrocelulozna membrana, 2 lista filter papira i spužvica. Mjehuriće koji mogu nastati između membrane i gela potrebno je ukloniti malim valjkom. Nosač se zatvori i sendvič za prijenos se smjesti okomito u sustav za prijenos. U sustav za prijenos umetne se zamrznuta vrećica za hlađenje i magnet te se sustav do vrha napuni 1× puferom za prijenos proteina i položi na magnetski mješač. Prijenos proteina provodi se 1,5 sat pri konstantnoj jačini struje od 200 mA.

3.4.4 Bojanje membrane i blokiranje

Nakon prijenosa, membrana se izvadi iz sendviča za prijenos, smjesti se u kadicu s otopinom za bojanje membrane naftolnim plavilom i na zibalicu 30 s. Bojanje membrane omogućava vizualizaciju ukupnih proteina i provjeru uspješnosti prijenosa proteina. Membrana se zatim premjesti u otopinu za odbojavanje membrane i na zibalicu 1 min kako bi na membrani ostali obojeni samo proteini. Postupak je potrebno ponoviti. S obzirom da otopina za odbojavanje sadrži octenu kiselinu, membranu je potrebno isprati 2 puta po 5 min u 1× puferu za ispiranje membrane. Membranu je zatim potrebno fotografirati i time služi kao kontrola nanošenja uzoraka ukupnih proteina.

Slijedi blokiranje membrane u otopini za blokiranje koja se sastoji od 5%-tnog mlijeka u prahu u 1× puferu za ispiranje membrane. Postupak blokiranja se provodi 30 min na zibatici kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na membranu.

3.4.5 Inkubacija membrane u otopini primarnog i sekundarnog protutijela

Nakon blokiranja, membrane se inkubiraju u otopini primarnog protutijela koje se pripremaju s otopinom za blokiranje. Razrijeđenja primarnih protutijela mogu se razlikovati i ovise o analiziranom protein (tablica poglavlje 3.1.5.). Razrijeđena otopina primarnog protutijela nanosi se na membranu u kadici koja se smjesti preko noći na zibalicu na +4°C. Sljedeći dan membrane se ispiru od suviška otopine primarnog protutijela 3 puta u trajanju od 7 min s 1× puferom za ispiranje membrane. Nakon ispiranja, na membranu u kadici nanosi se razrijeđena otopina sekundarnog protutijela (tablica poglavlje 3.1.5.) i slijedi inkubacija u trajanju od 1 h pri sobnoj uz upotrebu njihalice radi osiguravanja konstantne prekrivenosti membrane protutijelom.

3.4.6 Vizualizacija proteina od interesa na nitroceluloznoj membrani

Nakon uklanjanja sekundarnog protutijela, membrana se ispire 3 puta u trajanju po 7 min s 1× puferom za ispiranje membrane te se zatim na membranu doda oko 800 µL otopine komerijalnog kompleta za detekciju proteina kemiluminiscencijom. Otopina za detekciju se nakon 1 min odstrani sa membrane. S obzirom da sekundarno protutijelo sadrži peroksidazu iz hrena (HRP od engl. *horseradish peroxidase*), dodatkom kemiluminiscentnog supstrata za peroksidazu - luminola, kojeg peroksidaza razgrađuje u prisutnosti peroksida dolazi do nastanka kemiluminiscentnog signala koji se vizualizira i fotografira uređajem Uvitec *Alliance*. Ovisno o intenzitetu signala, mogu se koristiti različiti komercijalni kompleti za detekciju

proteina kao što su Western Lightning® Plus-ECL, koji se koristi češće, ili SuperSignal™ West Pico i Fento koji se koriste u različitom omjeru ukoliko je intenzitet signala slab. Svaki se komercijalni komplet sastoji od dva sustrata koji sadrže luminol i peroksid i koji se mješaju u omjeru 1:1. Postupak vizualizacije odvija se u mraku.

4. REZULTATI

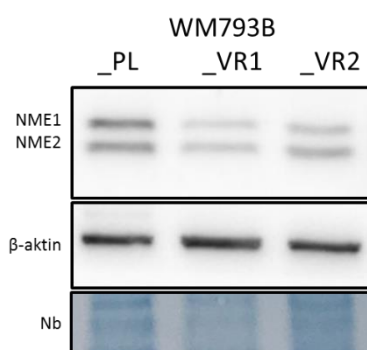
U sklopu ovog diplomskog rada provjerena je uloga proteina NME1 i NME2 u proliferaciji i aktivnosti signalnih puteva u staničnoj liniji melanoma čovjeka WM793B. Stanične linije korištene u ovom diplomskom su parentalna linija WM793B i podlinije otporne na vemurafenib WM793B_VR1 i _VR2 kojima je proliferacija provjerena testom MTT i ekspresijom proteina PCNA, dok je aktivnost signalnih puteva provjerena ekspresijom proteina biljega puta MAPK (pERK i ERK) i puta PI3K/AKT (pAKT i AKT). Ekspresija navedenih proteina provjerena je metodom Western blot. Provjerena je i proliferacija i aktivnost signalnih puteva stanične linije WM793B nakon utišavanja gena *NME1* i *NME2*. Utišavanje gena *NME1* i *NME2* provedeno je transfekcijom parentalne stanične linije WM793B malim interferirajućim RNA krajnje koncentracije 25 nM u trajanju od 72 h. Uspješnost utišavanja gena *NME1* i *NME2* provjerena je ekspresijom proteina NME1 i NME2 metodom Western blot.

4.1 Provjera ekspresije proteina NME1 i NME2 metodom Western blot

Ekspresija proteina NME1 i NME2 provjerena je metodom Western blot. Metoda je provedena na proteinskim lizatima parentalne linije WM793B i podlinija otpornih na vemurafenib (WM793B_VR1/_VR2) (poglavlje 4.1.1.). Ujedno, ekspresija proteina NME1 i NME2 provjerena je metodom Western blot nakon utišavanja gena *NME1* i *NME2* (poglavlje 4.1.2.) u parentalnoj liniji WM793B.

4.1.1 Provjera ekspresije proteina NME1 i NME2 u parentalnoj liniji i podlinijama otpornim na vemurafenib WM793B

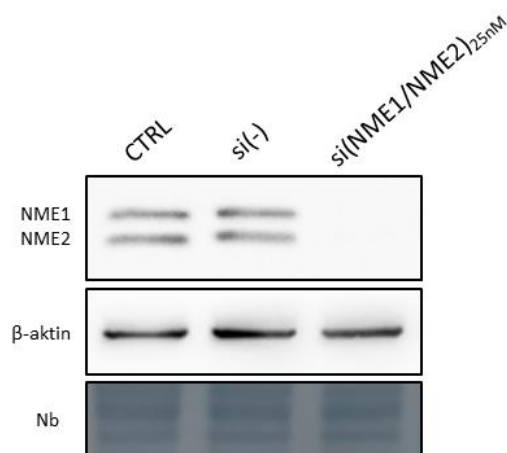
Rezultati ekspresije proteina NME1 i NME2 u parentalnoj liniji i podlinijama otpornim na vemurafenib WM793B_VR1 i WM793B_VR2 prikazani su na slici 9. Rezultati ukazuju da stanice podlinija otpornih na vemurafenib (VR1 i VR2) imaju nižu razinu proteina NME1 i NME2 u odnosu na stanice parentalne linije (PL) WM793B (Slika 9). Iako postoji razlika u obojenju membrane naftolnim plavilom ukupnih proteina između pojedinih uzoraka, vrpce koje pripadaju β -aktinu između pojedinih uzoraka su usporedive jačine što ukazuje na podjednaku količinu proteina između uzoraka.



Slika 9. Analiza ekspresije proteina NME1 i NME2 u parentalnoj liniji (WM793B_PL) i podlinijama otpornim na vemurafenib (WM793B_VR1 i _VR2) metodom Western blot. Kao kontrola nanošenja jednake količine uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija proteina β -aktin i prikaz membrane obojene naftolnim plavilom (Nb). Pokus je ponovljen tri puta.

4.1.2 Provjera ekspresije proteina NME1 i NME2 u parentalnoj liniji WM793B nakon utišavanja gena *NME1* i *NME2*

S obzirom da je u stanicama podlinija otpornih na vemurafenib WM793B_VR uočeno manje proteina NME1 i NME2, sljedeće se pristupilo utišavanju gena *NME1* i *NME2* u parentalnoj liniji kako bi se odredilo na koji način proteini NME1 i NME2 utječu na obilježja stanične linije WM793B. U skladu s tim, potrebno je provjeriti učinak utišavanja ekspresije gena *NME1* i *NME2* nakon transfekcije stanica WM793B malim interferirajućim RNA krajnje koncentracije od 25 nM u trajanju od 72 h. Uspješnost utišavanja provjerena je ekspresijom proteina NME1 i NME2 metodom Western blot i rezultati su prikazani na slici 10. Rezultati ukazuju na učinkovito utišavanje *NME1* i *NME2* u stanicama parentalne linije WM793B ukoliko se stanice transfeciraju s krajnjom koncentracijom malih interferirajućih siRNA od 25 nM u trajanju transfekcije od 72 h.



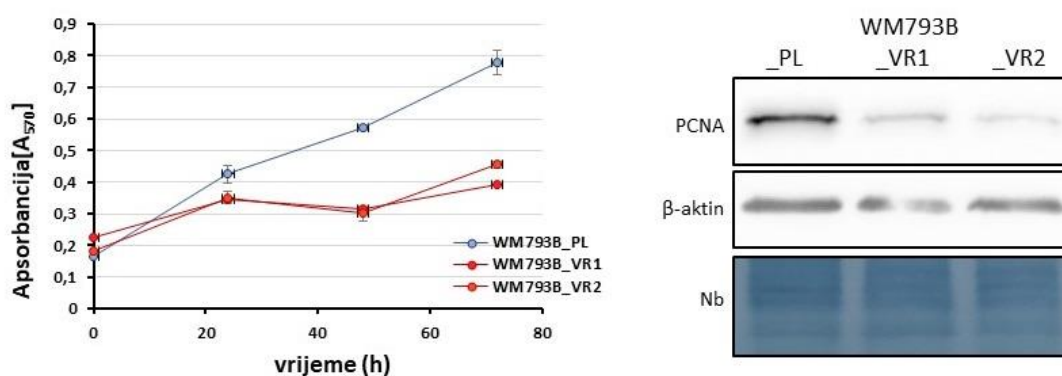
Slika 10. Analiza ekspresije proteina NME1 i NME2 nakon transfekcije stanica WM793B, u trajanju od 72 h smjesom malih interferirajućih siRNA ukupne koncentracije od 25 nM koje ciljaju oba proteina NME1 i NME2 (si(NME1/NME2)). Negativne kontrole utišavanja uključivale su netretirane stanice (CTRL) ili stanice transfecirane s kontrolnom siRNA (si(-)). Kao kontrola nanošenja jednake količine uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija proteina β -aktin i prikaz membrane obojene naftolnim plavilom (Nb). Pokus je ponovljen najmanje tri puta.

4.2 Određivanje proliferacije stanične linije WM793B

Proliferacija stanica provjerena je pomoću dvije metode. Prva metoda uključivala je test MTT za koji su prethodno pripremljene pločice s pojedinim biološkim replikatom. Svaka pločica označavala je jednu vremensku točku od vremena nasađivanja stanica (0h, 24h, 48h, 72h). Nakon određenog vremenskog perioda od vremena nasađivanja stanica, zaustavljen je rast stanica pri čemu je izmjerena apsorbancija koja je proporcionalna broju stanica. Drugi način mjerenja proliferacije uključivao je provjeru ekspresije proteina PCNA metodom Western blot. Protein PCNA ima važnu ulogu u različitim staničnim procesima kao što su replikacija DNA, metabolizam nukleinskih kiselina, popravak molekule DNA, kontrola staničnog ciklusa, sastavljanje kromatina i transkripcija RNA. Njegova uloga najviše je istražena u kontekstu replikacije DNA te se često koristi kao biljeg proliferacije stanica u dijagnostičke svrhe (Juríková i sur., 2016). Iz tog razloga je ekspresija proteina PCNA poslužila kao provjera sposobnosti proliferacije stanica.

4.2.1 Određivanje proliferacije parentalne linije i podlinijama otpornim na vemurafenib WM793B

Rezultati dobiveni određivanjem proliferacije stanica parentalne linije (PL) i podlinija otpornih na vemurafenib prikazani su na slici 11. Iz rezultata prikazanih na slici 11 je uočljivo da stanice parentalne linije (PL) brže proliferiraju i pokazuje gotovo linearan rast broja stanica s vremenom u usporedbi sa stanicama podlinija otpornih na vemurafenib (VR1 i VR2) (Slika 11A). U skladu s tim rezultatom su i rezultati dobiveni metodom Western blot i ukazuju da stanice parentalne linije (PL) imaju jaču ekspresiju proteina PCNA u usporedbi ekspresijom proteina PCNA u stanicama podlinija otpornih na vemurafenib (VR1 i VR2) (Slika 11B).

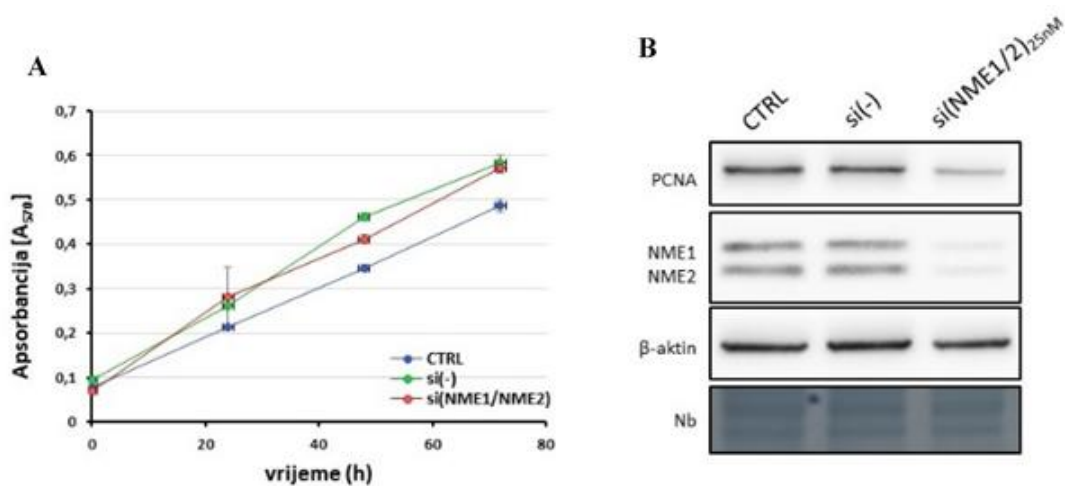


Slika 11. Analiza proliferacije određena je testom MTT (A) i provjerom ekspresije biljega proliferacije proteina PCNA metodom Western blot (B). Rezultati testa MTT prikazuju srednje vrijednosti tri biološka replikata sa pripadajućim standardnim devijacijama pri čemu je svaki biološki replikat napravljen u tehničkom peteroplikatu (A). Kontrola nanošenja jednake količine uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija proteina β-aktin i prikaz membrane obojene naftolnim plavilom (Nb). Pokus je ponovljen najmanje tri puta (B).

4.2.2 Određivanje proliferacije u parentalnoj liniji WM793B nakon utišavanja gena NME1 i NME2

Rezultati dobiveni određivanjem proliferacije nakon utišavanja gena *NME1* i *NME2* u parentalnoj liniji WM793B prikazani su na slici 12. Proliferacija je analizirana u stanicama WM793B u kojima je utišana ekspresija gena *NME1* i *NME2* (si(*NME1/NME2*)) te kontrolnim stanicama koje su netransfecirane (CTRL) ili transfecirane s kontrolnom siRNA (si(-)). Iz rezultata je uočljivo da utišavanje ekspresije gena *NME1* i *NME2* ne utječe na proliferaciju

stanica mjerenu testom MTT (Slika 12A). Međutim, utišavanje gena *NME1* i *NME2* smanjuje ekspresiju proteina PCNA u stanicama linije WM793B (Slika 12B).



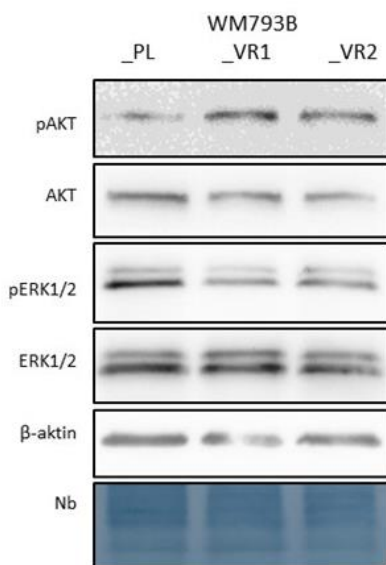
Slika 12. Analiza proliferacije testom MTT (A) i provjerom ekspresije biljega proliferacije proteina PCNA metodom Western blot (B). Rezultati testa MTT prikazuju srednje vrijednosti dva biološka replikata sa pripadajućim standardnim devijacijama pri čemu je svaki biološki replikat napravljen je u tehničkom triplikatu (A). Kao kontrola nanošenja jednake količine uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija proteina β-aktin i prikaz membrane obojene naftolnim plavilom (Nb). Pokus je ponovljen najmanje tri puta (B).

4.3 Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT

S obzirom da smo uočili razliku u proliferaciji između stanica parentalne linije i podlinija otpornih na vemurafenib kao i smanjenu ekspresiju proteina PCNA u stanicama s utišanim *NME1* i *NME2* u usporedbi sa kontrolnim stanicama WM793B, sljedeći cilj bio je odrediti aktivnost signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u svim ispitivanim stanicama. Aktivnost signalnih puteva ispitana je provjerom ekspresije fosforiliranog proteina pAKT i ukupnog proteina AKT koji služe kao biljeg provjere aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT, te ekspresije fosforiliranih proteina pERK1/2 i ukupnih proteina ERK1/2 koji služe kao biljeg provjere aktivnosti signalnog puta MAPK. Ekspresija proteina provjeravana je metodom Western blot.

4.3.1 Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnoj liniji i podlinijama otpornim na vemurafenib WM793B

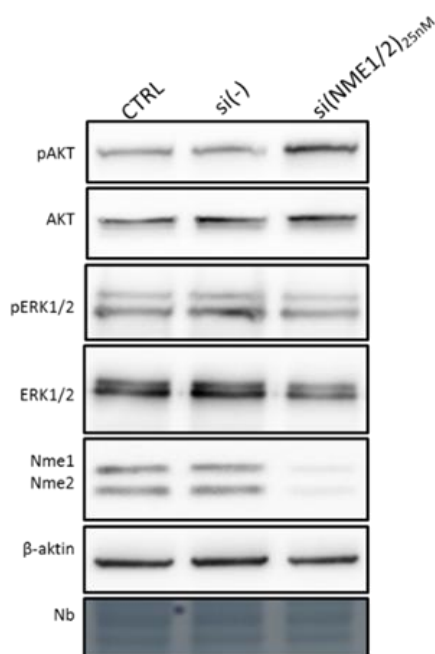
Rezultati ekspresije proteina biljega aktivnosti signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnoj i podlinijama otpornim na vemurafenib prikazani su na slici 13. Iz rezultata na slici 13 vidljiva je pojačana ekspresija fosforiliranog proteina pAKT u stanicama podlinija otpornih na vemurafenib u odnosu na stanice parentalne linije WM793B, dok je razina proteina AKT ostala nepromijenjena. Na osnovu pojačane ekspresije pAKT rezultati ukazuju na pojačanu aktivnost PI3K/AKT signalnog puta u stanicama podlinija otpornih na vemurafenib (VR1 i VR2) u odnosu na stanice parentalne linije (PL) WM793B (Slika 13). Međutim, ekspresija pERK je smanjena u stanicama podlinija otpornih na vemurafenib u odnosu na parentalne linije te se može zaključiti da je aktivnost signalnog puta MAPK smanjena u stanicama podlinijama otpornim na vemurafenib (VR1 i VR2) u odnosu na stanice parentalne linije (PL) WM793B.



Slika 13. Analiza ekspresije proteina pAKT i AKT, biljega aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT i proteina pERK1/2 i ERK1/2, biljega aktivnosti signalnog puta MAPK u parentalnoj liniji (WM793B_PL) i podlinijama otpornim na vemurafenib (WM793B_VR1/_VR2) metodom Western blot. Kao kontrola nanošenja jednake količine uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija proteina β -aktin i prikaz membrane obojene naftolnim plavilom (Nb). Pokus je ponovljen najmanje tri puta.

4.3.2 Provjera aktivnosti glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnoj liniji WM793B nakon utišavanja gena *NME1* i *NME2*

Rezultati ekspresije proteina biljega aktivnosti signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u parentalnoj liniji nakon utišavanja gena *NME1* i *NME2* prikazani su na slici 14. Iz rezultata na slici 14 vidljiva je pojačana ekspresija fosforiliranog proteina pAKT u stanicama s utišanim *NME1* i *NME2* (*si(NME1/2)*) u usporedbi s kontrolnim stanicama (CTRL i *si(-)*) dok je razina proteina AKT ostala nepromijenjena. Također, rezultati ukazuju na nepromijenjenu razinu fosforiliranog proteina pERK1/2 i proteina ERK1/2 između stanica s utišanom ekspresijom *NME1* i *NME2* (*si(NME1/2)*) i kontrolnih stanica (CTRL i *si(-)*) (Slika 14).



Slika 14. Analiza ekspresije proteina pAKT i AKT, biljega aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT i proteina pERK1/2 i ERK1/2, biljega aktivnosti signalnog puta MAPK u kontrolnim stanicama koje su ili bile netransfecirane (CTRL) ili transfecirane sa kontrolnom siRNA (si(-)) te u stanicama u kojima je utišana ekspresija gena NME1 i NME2 (si(NME1/2)) metodom Western blot. Kao kontrola nanošenja jednake količine uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija proteina β-aktin i prikaz membrane obojene naftolnim plavilom (Nb). Pokus je ponovljen najmanje dva puta.

5. RASPRAVA

Melanom je najagresivniji tip tumora kože koji, zbog svoje visoke učestalosti metastaziranja, spada u tumore s najvišom stopom smrtnosti (Domingues i sur., 2018). Jedan od glavnih razloga pojačane proliferacije i metastatskog potencijala stanica melanoma je izmijenjena aktivnost signalnog puta MAPK uzrokovana mutacijama u pojedinim komponentama tog puta. Shodno tome, mutacije u genu *BRAF* javljaju se u oko 60% pacijenata s ovom bolešću, pri čemu se posebno ističe aktivirajuća točkasta mutacija koja uzrokuje supstituciju valina glutaminskom kiselinom na kodonu 600 i stvaranje onkogene kinaze BRAF p.V600E (Davies i sur., 2002). Takva kinaza BRAF p.V600E poprima trajno aktivnu konformaciju koja neprekidno potiče prijenos signala i aktivaciju nizvodnih komponenti signalnog puta proteinske kinaze aktivirane mitogenom MAPK (poznat i kao put RAS-RAF-MEK-ERK). Nastalom hiperaktivacijom puta MAPK gubi se svaka mogućnost regulacije niza staničnih procesa na koje signalni put utječe i, posljedično tome, stanice počinju nekontrolirano proliferirati, rasti, diferencirati se i onkogeno transformirati (Kim i Cohen, 2016; Ascierto i sur., 2012).

Iako mutirana kinaza BRAF p.V600E potiče onkogenu transformaciju stanica ona se istaknula kao potencijalna terapijska meta. Ranija *in vitro* istraživanja su pokazala da specifična inhibicija mutiranog *BRAF* (V600E) rezultira smanjenom invazivnosti, rastom i proliferacijom stanica melanoma, kao i smanjenom aktivnosti puta MAPK isključivo u stanicama melanoma s tom mutacijom (Sumimoto i sur., 2004) što je dalo naslutiti da se BRAF p.V600E može terapijski ciljati. Prvi razvijeni inhibitor koji specifično cilja mutirani *BRAF* je vemurafenib za koji je pokazano da se selektivno veže na mutiranu kinazu BRAF p.V600E i time onemogućava nizvodni prijenos signala u putu MAPK. Ujedno, vemurafenib je prvi BRAF inhibitor koji je provjeren u kliničkom istraživanju i koji je zbog svoje djelotvornosti 2011. godine dobio odobrenje od FDA za liječenje uznapredovalog, metastatskog melanoma u kojem je utvrđena prisutnost mutacije BRAF p.V600E (Fisher i Larkin, 2012; Sharma i sur., 2012; Heikal i sur., 2011; Flaherty i sur., 2010). Međutim, iako monoterapija vemurafenibom pokazuje visoku efikasnost i selektivnost, u više od 75% liječenih pacijenata javlja se pojava otpornosti već nekoliko mjeseci nakon početka liječenja (Chapman i sur., 2017; McArthur i sur., 2014; Chapman i sur., 2011). Uz reaktivaciju signalnog puta MAPK, jedan od razloga pojave otpornosti na vemurafenib je aktivacija alternativnog signalnog puta PI3K/AKT koji, kao i signalni put MAPK, regulira staničnu proliferaciju, rast, diferencijaciju i tumorigenezu (Chan i sur., 2017). S obzirom da je razlog otpornosti na ciljanu terapiju aktivacija signalnih puteva

MAPK i/ili PI3K/AKT (Chan i sur., 2017; Lim i sur., 2017), od ključne je važnosti otkriti proteinske markere koji su uključeni u regulaciju tih puteva i istražiti ih kao potencijalne terapijske mete.

Cilj ovog diplomskog bilo je istražiti ulogu nukleozid-difosfatnih kinazi NME1 i NME2 u regulaciji glavnih signalnih puteva i time utjecaj na proliferaciju, kao i utvrditi njihovu ekspresiju u različitim stanicama melanoma ovisno o otpornosti na vemurafenib. Proteini NME1 i NME2 su nukleozid-difosfatne kinaze koje pokazuju funkciju supresora metastaziranja i uključeni su u stanične procese poput proliferacije (Radić i sur., 2020; Boissan i sur., 2018; Četković i sur., 2015; Bosnar i sur., 2009; Boissan i sur., 2009; Bilitou i sur., 2009; Stahl i sur., 1991; Steeg i sur., 1988). Međutim, iako funkcija proteina NME2 u regulaciji signalnih puteva nije poznata, pokazano je da NME1 negativno regulira aktivnost proteina KSR, koji djeluje kao „skela“ komponentama signalnog puta MAPK i time može utjecati na signalni put MAPK (Mátyási i sur., 2020; Takács-Vellai 2014; Shaul i Seger, 2007; Razidlo i sur., 2004). Kako bismo istražili ulogu NME1 i NME2 u stanicama melanoma čovjeka, prvo smo provjerili proteinsku ekspresiju metodom Western blot u staničnim linijama koje imaju mutaciju BRAF p.V600E. Stanične linije korištene u ovom diplomskom razlikuju se u otpornosti na vemurafenib pri čemu je stanična linija WM793B komercijalno dostupna i osjetljiva je na vemurafenib nazvana parentalna linija, dok su dvije stanične podlinije otporne na vemurafenib WM793B-VR razvijene u laboratoriju *in vitro*. Metodom Western blot, potvrdili smo da podlinije otporne na vemurafenib imaju manju ekspresiju proteina NME1 i NME2 u odnosu na parentalnu liniju. Smanjenu ekspresiju proteina NME u stanicama melanoma uočili su Snyder i suradnici. Naime, autori su uočili da subpopulacija stanica sa smanjenom ekspresijom proteina NME1 (označene NME1^{LOW}) pokazuje pojačanu invazivnost *in vitro* i pojačani metastatski potencijal *in vivo* (Snyder i sur., 2020). Ujedno, rezultati RNA sekvenciranja pokazali su da stanice sa smanjenom ekspresijom proteina NME1 imaju pojačanu ekspresiju receptorskih tirozinskih kinaza, kao što je EPHA4 (Snyder i sur., 2020) za koju je pokazano da utječe na otpornost na kemoterapiju u stanicama tumora ovarija (Kina i sur., 2018). Razvoj otpornosti na lijekove jedna je od karakteristika tumorskih matičnih stanica (CSC od engl. *cancer stem cells*). Tumorske matične stanice subpopulacija su stanica unutar tumora koja ima obilježja matičnih stanica, dakle imaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u više vrsta stanica unutar tumora. Neke od karakteristika tumorskih matičnih stanica su pojačana ekspresija proteina koji se nalaze na staničnoj površini (npr. CD133, CD44) i usporen stanični ciklus (Marzagalli i sur., 2019; Franco i sur., 2016). Shodno tome, Dratkiewicz i sur. su uočili da stanične linije A375 i

WM9 otporne na vemurafenib imaju povišenu razinu biljega tumorskih matičnih stanica CD44 i smanjenu proliferaciju u odnosu na parentalne linije (Dratkiewicz i sur., 2020). U ovom diplomskom radu proliferacija je mjerena metodom MTT, dok je metodom Western blot provjerena ekspresija proteina PCNA koji se često koristi kao biljeg proliferacije stanica u dijagnostičke svrhe (Juríková i sur., 2016). Utvrđeno je kako stanice podlinija otpornih na vemurafenib imaju smanjenu proliferaciju i ekspresiju proteina PCNA u odnosu na parentalne linije što je u skladu s rezultatom drugih autora (Dratkiewicz i sur. 2020).

Za utvrđivanje uloge proteina NME1 i NME2 u proliferaciji stanica i aktivnosti signalnih puteva, korištena je metoda utišavanja gena malim interferirajućim RNA (siRNA) koje uzrokuju post-transkripcijsko utišavanje ovisno o multiproteinskom kompleksu RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*). Kompleks RISC veže se na mRNA komplementarnog slijeda nukleotida, katalizira njegovu degradaciju svojom proteinskom komponentom Argonaut i time sprječava ekspresiju proteina od interesa (Alshaer i sur., 2021). Utišavanje ekspresije proteina NME snizilo je razinu proteina PCNA u staničnoj liniji WM793B, dok nije utjecalo na stopu proliferacije mjerenu testom MTT u trajanju od 72 h. U skladu s dobivenim rezultatima su i rezultati Wang i sur. koji su uočili da utišavanje ekspresije proteina NME1 ne utječe na proliferaciju stanica linija melanoma (WM9, WM278 i 451Lu) ukoliko rastu u uvjetima jednoslojne kulture. Međutim, utišavanje gena *NME1* je umjereno snizilo razinu proteina Ki67 u stanicama linije 451Lu (Wang i sur., 2019). Naime, protein Ki67 prisutan je u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1, S, G2, M), no odsutan je u fazi mirovanja stanice (G0) (Sun i Kaufman, 2018; Juríková i sur., 2016), pa se kao i PCNA, koristi kao biljeg proliferacije stanica (Juríková i sur., 2016). Na osnovu dobivenih rezultata i rezultata drugih autora za pretpostaviti je da proteini NME mogu utjecati na ekspresiju proteina biljega proliferacije. S obzirom da proliferacija stanica ovisi o aktivnosti signalnih puteva sljedeći cilj bio je odrediti aktivnost glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT metodom Western blot. Aktivnost signalnih puteva je određena provjerom ekspresije fosforiliranog (aktivnog) i nefosforiliranog (ukupnog) oblika proteina ERK i AKT. Utvrđeno je da je aktivnost puta MAPK pojačana u parentalnoj liniji u odnosu na podlinije otporne na vemurafenib. Iako je poznato da mutacija BRAF p.V600E uzrokuje konstitutivnu aktivaciju puta MAPK (Ascierto i sur., 2012) kontinuirano izlaganje vemurafenibu nije uzrokovalo reaktivaciju puta MAPK već aktivaciju alternativnog signalnog puta PI3K/AKT, u našim eksperimentalnim uvjetima. U prilog tome su i rezultati analize Western blot koji potvrđuju pojačanu aktivaciju signalnog puta PI3K/AKT u podlinijama otpornim na vemurafenib. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim koji ukazuju

da se uslijed inhibicije signalnog puta MAPK, otpornost na ciljanu terapiju može javiti i zbog aktivacije alternativnog signalnog puta, u većini slučajeva PI3K/AKT (Zuo et al. 2018; Chan i sur., 2017; Wang i Qi, 2013; Wagle i sur., 2011).

Krajnji cilj bio je utvrditi ima li utišavanje ekspresije gena *NME1* i *NME2* učinak na aktivnost glavnih signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT u stanicama linije WM793B. Analizom Western blot pokazano je kako utišavanje *NME1* i *NME2* nije imalo utjecaja na aktivnost signalnog puta MAPK što je suprotno očekivanom s obzirom da *NME1* negativno regulira protein KSR, a time i aktivnost signalnog puta MAPK. Međutim, utišavanje *NME1* i *NME2* uzrokovalo je pojačanu aktivnost signalnog puta PI3K/AKT što je u skladu sa rezultatima nekoliko grupa autora. Naprimjer, Boissan i suradnici uočili su da utišavanje gena *NME1* uzrokuje pojačanu aktivnost signalnog puta PI3K/AKT i smanjenu ekspresiju proteina PTEN u stanicama tumora jetre (Boissan i sur., 2010). Naime, PTEN je fosfataza koja negativno regulira signalni put PI3K/AKT na način da pretvara PIP3 u PIP2 i time sprječava fosforilaciju i aktivaciju kinaze AKT (Chan i sur., 2017; Lim i sur., 2017), pa prema tome, smanjena ekspresija PTEN koju su uočili Boissan i suradnici uzrokuje pojačanu aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT (Boissan i sur., 2010). Nadalje, Pennino i suradnici analizirali su mogućnost interakcije *NME1* i katalitičke podjedinice PI3K, p110 α te su uočili da protein *NME1* ulazi u interakciju s p110 α i na taj način negativno regulira fosforilaciju proteina AKT odnosno aktivnost signalnog puta PI3K/AKT. Shodno tome, autori su uočili da pojačana ekspresija *NME1* uzrokuje smanjenu fosforilaciju proteina AKT u tumorskim stanicama kože, dojke i bubrega (Pennino i sur., 2021) pa je za pretpostaviti da protein *NME1* negativno regulira signalni put PI3K/AKT što potvrđuju i rezultati dobiveni u ovom radu.

6. ZAKLJUČCI

Proučavanjem utjecaja *NME1* i *NME2* na proliferaciju i aktivnost glavnih signalnih puteva stanične linije melanoma čovjeka može se zaključiti sljedeće:

- Podlinije otporne na vemurafenib imaju smanjenu ekspresiju proteina *NME1* i *NME2* u usporedbi sa parentalnom linijom WM793B;
- Podlinije otporne na vemurafenib imaju smanjenu proliferaciju (mjerenu testom MTT) i sniženu ekspresiju proteina PCNA (biljega proliferacije) u usporedbi s parentalnom linijom WM793B;
- Podlinije otporne na vemurafenib imaju pojačanu ekspresiju pAKT u odnosu na parentalnu liniju što sugerira na pojačanu aktivnost signalnog puta PI3K/AKT u podlinijama otpornim na vemurafenib;
- Podlinije otporne na vemurafenib imaju smanjenu ekspresiju pERK1/2 u odnosu na parentalnu liniju što upućuje na smanjenu aktivnost signalnog puta MAPK u podlinijama otpornim na vemurafenib;
- Utišavanje gena *NME1* i *NME2* u parentalnoj staničnoj liniji smanjuje ekspresiju proteina PCNA (biljega proliferacije), no ne utječe na proliferaciju stanica (mjerenu testom MTT);
- Utišavanje gena *NME1* i *NME2* uzrokuje pojačanu ekspresiju pAKT u odnosu na kontrolne stanice što upućuje na pojačanu aktivnost signalnog puta PI3K/AKT nakon utišavanja *NME1* i *NME2*;
- Utišavanje gena *NME1* i *NME2* ne utječe na ekspresiju pERK1/2 i time na aktivnost signalnog puta MAPK.

7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AAS	(engl. acrylamide/bisacrylamide stock) matična otopina akrilamid/bisakrilamid
AKT	(engl. <i>Protein kinase B</i>) proteinska kinaza B
APS	(engl. ammonium persulfate) amonijev persulfat
ATCC	(engl. American Type Culture Collection) američka zbirka tipova kultura
BCA	(engl. <i>bicinchoninic acid</i>) bicinkoninična kiselina
BRAF	(engl. <i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>) B-tip RAF kinaze
BRIM-3	(engl. <i>BRAF Inhibitor in Melanoma 3</i>) BRAF inhibitor u melanomu 3
BSA	(engl. <i>bovine serum albumin</i>) albumin iz goveđeg seruma
BSC	(engl. <i>basal cell carcinoma</i>) bazocelularni karcinom
CSC	(engl. <i>cancer stem cells</i>) matične stanice raka
cTAK1	(engl. <i>Cdc25C-associated kinase 1</i>) Cdc25C-povezana kinaza 1
CTRL	(engl. <i>control</i>) kontrolna grupa stanica
deH₂O	(engl. <i>deionized water</i>) destilirana voda
DMSO	(engl. <i>dimethyl sulfoxide</i>) dimetil-sulfoksid
DNA	(engl. <i>deoxyribonucleic Acid</i>) deoksiribonukleinska kiselina
DTT	(engl. <i>dithiothreitol</i>) ditiotreitrol
EDTA	(engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) etilendiamintetraoctena kiselina
EGFR	(engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>) receptor epidermalnog faktora rasta
ERK	(engl. <i>extracellular signal- regulated kinase</i>) kinaza regulirana izvanstaničnim signalom
FBS	(engl. <i>fetal bovine serum</i>) serum fetusa goveda
FDA	(engl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>) američka Agencija za hranu i lijekove
GCO	(engl. <i>Global Cancer Observatory</i>) Globalni opservatorij za rak
GDP	(engl. <i>guanosine diphosphate</i>) gvanozin difosfat

Grb2	(engl. <i>growth factor receptor-binding protein</i>)
GST	glutation-S-transferaza
GTP	(engl. <i>guanosine triphosphate</i>) gvanozin trifosfat
HLB	(engl. <i>hot lysis buffer</i>) vrući puffer za lizu stanica
HRP	(engl. <i>horseradish peroxidase</i>) peroksidaza iz hrena
IC50	(engl. <i>half-maximal inhibitory concentration</i>) koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica
KSR	(engl. <i>kinase suppressor of Ras</i>) supresor kinaze Ras
LB	(engl. <i>Laemmli buffer</i>) pufer za nanošenje uzoraka na gel
MAPK	(engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) proteinska kinaza aktivirana mitogenom
MEK	(engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>) kinaza proteinske kinaze aktivirane mitogenom i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom
mTOR	(engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>) ciljna molekula rapamicina u sisavaca
mTORC1	(engl. <i>mTOR complex 1</i>) mTOR kompleks 1
mTORC2	(engl. <i>mTOR complex 2</i>) mTOR kompleks 2
MTT	(engl. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>) 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid
Nb	(engl. <i>naphthol blue</i>) naftol plavilo
NDP	(engl. <i>nucleoside diphosphate</i>) nukleozid-difosfat
NME/NDPK/Nm23	(engl. <i>nucleoside diphosphate kinase/non-metastatic clone 23</i>) nukleozid-difosfatska kinaza
NMSC	(engl. <i>non-melanoma skin cancer</i>) nemelanomski tumor kože
NRAS	(engl. <i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>) N homolog protoonkogenog štakorskog sarkoma
NTP	(engl. <i>nucleoside triphosphate</i>) nukleozid-trifosfat
OS	(engl. <i>overall survival</i>) ukupno preživljenje
PBS	(engl. <i>phosphate buffer saline</i>) fosfatni pufer
PCNA	(engl. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>) jezgrin antigen proliferirajućih stanica

PDK1	(engl. <i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>) proteinska kinaza 1 ovisna o 3-fosfoinozidu
PFS	(engl. <i>progression-free survival</i>) preživljenje bez progresije
PI(3,4,5)P3	(engl. <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>) fosfatidilinozitol trifosfat
PI(4,5)P2	(engl. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>) fosfatidilinozitol bifosfat
PI3K	(engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>) fosfatidilinozitol 3-kinaza
PL	(engl. <i>parental line</i>) parentalna linija
PLX4032	patentno ime vemurafeniba
PTEN	(engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>) homolog fosfataze i tenzina
qH2O	deionizirana voda pripravljena korištenjem uređaja Milli Q
RAF	(engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>) faktor rapidnog ubrzavanja fibrosarkoma
RAS	(engl. <i>rat sarcoma</i>) protoonkogen štakorskog sarkoma
rpm	(engl. <i>revolutions per min</i>) okretaji u min
RPMI 1640	(engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>) vrsta medija za uzgoj stanica
RPMI+VR	(engl. <i>Roswell Park Memorial Institute media + vemurafenib</i>) otopina medija za uzgoj stanica s vemurafenibom
RTK	(engl. <i>receptor tyrosine kinase</i>) receptorska tirozin kinaza
SCC	(engl. <i>squamous cell carcinoma</i>) planocelularni karcinom
SDS	(engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>) natrijev dodecil-sulfat
si(-)	oznaka za kontrolnu siRNA koja se ne veže na gen od interesa
siRNA	(engl. <i>small interfering RNA</i>) mala interferirajuća molekula RNA
SOS	(engl. <i>Son of Sevenless</i>) citoplazmatski protein koji je dobio ime prema produktu (Son of) gena Sevenless iz vinske mušice
TB	(engl. <i>transfer buffer</i>) pufer za prijenos proteina
TBST	(engl. <i>Tris buffered saline+Tween-20</i>) smjesa Tris-om puferirane fiziološke otopine i polisorbata 20 (Tween 20)
TEMED	(engl. <i>tetramethylethylenediamine</i>) N, N, N', N'- tetrametiletildiamin

TGF	(engl. <i>transforming growth faktor</i>) transformirajući faktor rasta
Tris	(engl. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>) tris(hidroksimetil)aminometan
VR1/2	(engl. <i>vemurfenib resistant line 1/2</i>) podlinija otporna na vemurafenib1/2
wt	(engl. <i>wild-type</i>) divlji tip

8. LITERATURA

- Alshaer W, Zureigat H, Al Karaki A, Al-Kadash A, Gharaibeh L, Hatmal MM, Aljabali AAA, Awidi A. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol*, 2021, 905, 174178.
- Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, Palmieri G, Testori A, Marincola FM, Mozzillo N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*, 2012, 10, 85.
- Automatic Object Counting In Neubauer Chambers, https://www.researchgate.net/figure/The-Neubauer-chamber-grid_fig1_256436846/, pristupljeno 10.7.2021.
- Bilitou A, Watson J, Gartner A, Ohnuma S. The NM23 family in development. *Mol Cell Biochem*, 2009, 329, 17-33.
- Boissan M, Dabernat S, Peuchant E, Schlattner U, Lascu I, Lacombe ML. The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol Cell Biochem*, 2009, 329, 51–62.
- Boissan M, De Wever O, Lizarraga F, Wendum D, Poincloux R, Chignard N, Desbois-Mouthon C, Dufour S, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Bracke M, Chavier P, Gespach C, Lacombe ML. Implication of metastasis suppressor NM23-H1 in maintaining adherens junctions and limiting the invasive potential of human cancer cells. *Cancer Res*, 2010, 70, 7710-22.
- Boissan M, Schlattner U, Lacombe ML. The NDPK/NME superfamily: state of the art. *Lab Invest*, 2018, 98, 164–174.
- Bosnar MH, Bago R, Cetković H. Subcellular localization of Nm23/NDPK A and B isoforms: a reflection of their biological function? *Mol Cell Biochem*, 2009, 329, 63-71.
- Cells involved in skin cancer, 2020., <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/skin-cancer/symptoms-causes/syc-20377605>, pristupljeno 13.7.2021.
- Chan XY, Singh A, Osman N, Piva TJ. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2017, 18, 1527.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li

J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New Engl J Med*, 2011, 364, 2507–2516.

- Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, Testori A, Lorigan PC, Dummer R, Sosman JA, Flaherty KT, Chang I, Coleman S, Caro I, Hauschild A, McArthur GA. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*, 2017, 28, 2581–2587.
- Ćetković H, Perina D, Harcet M, Mikoč A, Bosnar MH. NME family of proteins-clues from simple animals. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2015, 388, 133-42.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002, 417, 949-54.
- Desvignes T, Pontarotti P, Fauvel C, Bobe J. NME protein family evolutionary history, a vertebrate perspective. *BMC Evol Biol*, 2009, 9, 256.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 2007, 26, 3279-90.
- Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther*, 2018, 7, 35-49.
- 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, 113.
- Fisher R, Larkin J. Vemurafenib: a new treatment for BRAF-V600 mutated advanced melanoma. *Cancer Manag Res*, 2012, 4, 243-52.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 2010, 363, 809-19.

- Franco SS, Szczesna K, Iliou MS, Al-Qahtani M, Mobasheri A, Kobolák J, Dinnyés A. In vitro models of cancer stem cells and clinical applications. *BMC Cancer*, 2016, 16, 738.
- Gilles AM, 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, 8784-9.
- Gordon R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*, 2013, 29, 160-9.
- Govender D, Chetty R. Gene of the month: BRAF. *J Clin Pathol*, 2012, 65, 986-8.
- Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 2020, 19, 1997-2007.
- Hartsough MT, Morrison DK, Salerno M, Palmieri D, Ouatas T, Mair M, Patrick J, Steeg PS. Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras via a histidine protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 2002, 277, 32389-99.
- Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*, 2010, 464, 431-5.
- Heakal Y, Kester M, Savage S. Vemurafenib (PLX4032): an orally available inhibitor of mutated BRAF for the treatment of metastatic melanoma. *Ann Pharmacother*, 2011, 45, 1399-405.
- Herceg D, Buzina DŠ, Čeović R, Dotlić S, Ilić I, Orehovec SS, Herceg GH, Mijatović D, Šeparović R, Silovski T, Vrbanec D. Kliničke preporuke hrvatskog društva za internističku onkologiju hlz-a za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika/ca oboljelih od melanoma kože. *Liječnički vjesnik*, 2016, 138, 0-0.
- Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site, 2020., <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/191-croatia-fact-sheets.pdf>, pristupljeno 11.8.2021.
- Juríková M, Danihel L, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*, 2016, 118, 544-52.
- Kim A, Cohen MS. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11, 907-16.

- Kina S, Kinjo T, Liang F, Nakasone T, Yamamoto H, Arasaki A. Targeting EphA4 abrogates intrinsic resistance to chemotherapy in well-differentiated cervical cancer cell line. *Eur J Pharmacol*, 2018, 840, 70-78.
- 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.
- Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, 32, 247-58.
- Lee JT, Li L, Brafford PA, van den Eijnden M, Halloran MB, Sproesser K, Haass NK, Smalley KS, Tsai J, Bollag G, Herlyn M. PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene, selectively inhibits V600E-positive melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23, 820-7.
- Lim SY, Menzies AM, Rizos H. Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Cancer*, 2017, 123, 2118-2129.
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 1997, 272, 4378-83.
- Marzagalli M, Raimondi M, Fontana F, Montagnani Marelli M, Moretti RM, Limonta P. Cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma: Possible therapeutic implications. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59, 221-235.
- Mátyási B, Farkas Z, Kopper L, Sebestyén A, Boissan M, Mehta A, Takács-Vellai K. The Function of NM23-H1/NME1 and Its Homologs in Major Processes Linked to Metastasis. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26, 49-61.
- McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, Garbe C, Testori A, Maio M, Lorigan P, Lebbé C, Jouary T, Schadendorf D, O'Day SJ, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dréno B, Sosman JA, Flaherty KT, Yin M, Caro I, Cheng S, Trunzer K, Hauschild A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*, 2014, 15, 323-32.
- Müller J, Ory S, Copeland T, Piwnicka-Worms H, Morrison DK. C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell*, 2001, 8, 983-93.

- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, 2010, 468, 973-7.
- Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol*, 2003, 13, 1356-64.
- Pennino FP, Murakami M, Zollo M, Robertson ES. The metastasis suppressor protein NM23-H1 modulates the PI3K-AKT axis through interaction with the p110 α catalytic subunit. *Oncogenesis*, 2021, 10, 34.
- Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*, 2010, 464, 427-30.
- Radić M, Šoštar M, Weber I, Četković H, Slade N, Bosnar MH. The Subcellular Localization and Oligomerization Preferences of NME1/NME2 upon Radiation-Induced DNA Damage. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 2363.
- Razidlo GL, Kortum RL, Haferbier JL, Lewis RE. Phosphorylation regulates KSR1 stability, ERK activation, and cell proliferation. *J Biol Chem*, 2004, 279, 47808-14.
- Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9, 180-6.
- Sharma A, Shah SR, Illum H, Dowell J. Vemurafenib: targeted inhibition of mutated BRAF for treatment of advanced melanoma and its potential in other malignancies. *Drugs*, 2012, 72, 2207-22.
- Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773, 1213-26.
- Snyder D, Wang Y, Kaetzel DM. A rare subpopulation of melanoma cells with low expression of metastasis suppressor NME1 is highly metastatic in vivo. *Sci Rep*, 2020, 10, 1971.
- Søndergaard JN, Nazarian R, Wang Q, Guo D, Hsueh T, Mok S, Sazegar H, MacConaill LE, Barretina JG, Kehoe SM, Attar N, von Eeuw E, Zuckerman JE, Chmielowski B, Comin-Anduix B, Koya RC, Mischel PS, Lo RS, Ribas A. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J Transl Med*, 2010, 8, 39.

- Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res*, 1991, 51, 445-9.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 1988, 80, 200-4.
- Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, Yamagata S, Shimizu A, Taira K, Kawakami Y. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene*, 2004, 23, 6031-9.
- Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 2018, 127, 175-186.
- Takács-Vellai K. The metastasis suppressor Nm23 as a modulator of Ras/ERK signaling. *J Mol Signal*, 2014, 9, 4.
- Vemurafenib, PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/42611257>, pristupljeno 13.7.2021.
- Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, Kehoe SM, Johannessen CM, Macconail LE, Hahn WC, Meyerson M, Garraway LA. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*, 2011, 29, 3085-96.
- Wang AX, Qi XY. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. *IUBMB Life*, 2013, 65, 748-58.
- Wang Y, Leonard MK, Snyder DE, Fisher ML, Eckert RL, Kaetzel DM. NME1 Drives Expansion of Melanoma Cells with Enhanced Tumor Growth and Metastatic Properties. *Mol Cancer Res*, 2019, 17, 1665-1674.
- Yadav V, Zhang X, Liu J, Estrem S, Li S, Gong XQ, Buchanan S, Henry JR, Starling JJ, Peng SB. Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma. *J Biol Chem*, 2012, 287, 28087-98.
- 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.

9. SAŽETAK

Melanom je najagresivniji tip tumora kože koji najčešće nastaje zbog hiperaktivacije signalnog puta MAPK kao posljedice onkogenih mutacija u nekoj od komponenti toga puta. U oko 60% slučajeva mutacija BRAF p.V600E uzrokuje konstitutivno aktivnu kinazu za koju je razvijen specifičan i efikasan inhibitor vemurafenib. Međutim, u velikom broju pacijenata javlja se otpornost na ovaj lijek već nekoliko mjeseci nakon početka liječenja. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti ulogu nukleozid-difosfatnih kinazi NME1 i NME2 u regulaciji glavnih signalnih puteva i njihov utjecaj na proliferaciju u svrhu ispitivanja njihovog terapijskog potencijala. Koristeći metode Western blot analize i testa MTT utvrđena je smanjena ekspresija proteina NME u stanicama podlinija otpornih na vemurafenib za koje je uočeno da slabije proliferiraju u odnosu na parentalni soj stanica. Također, utišavanje gena *NME* komplementarnim siRNA nije utjecalo na proliferaciju stanica, no smanjilo je ekspresiju biljega proliferacije i negativno utjecalo na aktivnost signalnog puta PI3K/AKT. Dobiveni rezultati daju zanimljiv temelj za detaljnija istraživanja usmjerena na koji način proteini NME reguliraju signalni put PI3K/AKT kao i otkrivanje njihovog terapijskog potencijala u liječenju melanoma čovjeka.

10. SUMMARY

Melanoma is the most aggressive type of skin tumor that most often occurs due to hyperactivation of the MAPK signaling pathway as a consequence of oncogenic mutations in one of the components of that pathway. In about 60% of cases the presence of BRAF p.V600E mutation results in a constitutively active kinase for which a specific and effective inhibitor, vemurafenib, has been developed. However, several months from the beginning of the treatment the resistance to drug occurs in many melanoma patients. This thesis aimed to investigate the role of nucleoside diphosphate kinases NME1 and NME2 in the regulation of main signaling pathways and their impact on proliferation, with the goal to test their therapeutic potential. Using Western blot analysis and MTT assays we observed reduced expression of NME proteins in vemurafenib-resistant sublines that were shown to have reduced proliferation rate compared to the parental line. In addition, *NME* silencing with complementary siRNA had no effect on the cell proliferation, however it reduced the expression of a proliferation marker and negatively influenced the activity of the PI3K/AKT signaling pathway. The obtained results provide an interesting basis for more detailed research that is focused on how NME proteins regulate the PI3K/AKT pathway as well as on their therapeutic potential in melanoma treatment.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Uloga proteina NME1 i NME2 u proliferaciji i aktivnosti signalnih puteva stanične linije melanoma čovjeka WM793B

Marko Dužević

SAŽETAK

Melanom je najagresivniji tip tumora kože koji najčešće nastaje zbog hiperaktivacije signalnog puta MAPK kao posljedice onkogenih mutacija u nekoj od komponenti toga puta. U oko 60% slučajeva mutacija BRAF p.V600E uzrokuje konstitutivno aktivnu kinazu za koju je razvijen specifičan i efikasan inhibitor vemurafenib. Međutim, u velikom broju pacijenata javlja se otpornost na ovaj lijek već nekoliko mjeseci nakon početka liječenja. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti ulogu nukleozid-difosfatnih kinazi NME1 i NME2 u regulaciji glavnih signalnih puteva i njihov utjecaj na proliferaciju u svrhu ispitivanja njihovog terapijskog potencijala. Koristeći metode Western blot analize i testa MTT utvrđena je smanjena ekspresija proteina NME u stanicama podlinija otpornih na vemurafenib za koje je uočeno da slabije proliferiraju u odnosu na parentalni soj stanica. Također, utišavanje gena *NME* komplementarnim siRNA nije utjecalo na proliferaciju stanica, no smanjilo je ekspresiju biljega proliferacije i negativno utjecalo na aktivnost signalnog puta PI3K/AKT. Dobiveni rezultati daju zanimljiv temelj za detaljnija istraživanja usmjerena na koji način proteini NME reguliraju signalni put PI3K/AKT kao i otkrivanje njihovog terapijskog potencijala u liječenju melanoma čovjeka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 51 stranica, 14 grafičkih prikaza, 1 tablica i 64 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: NME1/2, melanom čovjeka, vemurafenib, signalni putevi, proliferacija

Mentori: **Dr. sc. Ignacija Vlašić**, *znanstveni suradnik Instituta Ruđer Bošković.*
Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sanja Dabelić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Neda Slade, *znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković.*

Rad prihvaćen: veljača 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The role of proteins NME1 and NME2 in proliferation and activity of signaling pathways in WM793B melanoma cell line

Marko Dužević

SUMMARY

Melanoma is the most aggressive type of skin tumor that most often occurs due to hyperactivation of the MAPK signaling pathway as a consequence of oncogenic mutations in one of the components of that pathway. In about 60% of cases the presence of BRAF p.V600E mutation results in a constitutively active kinase for which a specific and effective inhibitor, vemurafenib, has been developed. However, several months from the beginning of the treatment the resistance to drug occurs in many melanoma patients. This thesis aimed to investigate the role of nucleoside diphosphate kinases NME1 and NME2 in the regulation of main signaling pathways and their impact on proliferation, with the goal to test their therapeutic potential. Using Western blot analysis and MTT assays we observed reduced expression of NME proteins in vemurafenib-resistant sublines that were shown to have reduced proliferation rate compared to the parental line. In addition, NME silencing with complementary siRNA had no effect on the cell proliferation, however it reduced the expression of a proliferation marker and negatively influenced the activity of the PI3K/AKT signaling pathway. The obtained results provide an interesting basis for more detailed research that is focused on how NME proteins regulate the PI3K/AKT pathway as well as on their therapeutic potential in melanoma treatment.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 51 pages, 14 figures, 1 table and 64 references. Original is in Croatian language.

Keywords: NME1/2, melanoma, vemurafenib, signaling pathways, proliferation

Mentors: **Ignacija Vlašić, Ph.D.**, *Research associate*, Ruđer Bošković Institute
Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D., *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sanja Dabelić, Ph.D., *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Neda Slade, Ph.D., *Senior Scientist*, Ruđer Bošković Institute

The thesis was accepted: February 2022.

