

Uloga transkripcijskih faktora GLI u razvoju kožnog melanoma kod ljudi

Sladić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:477525>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Kristina Sladić

Uloga transkripcijskih faktora GLI u razvoju kožnog melanoma kod ljudi

Diplomski rad

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

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za nasljedni rak, na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom doc. dr. sc. Petra Ozretića i doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta „Utvrdjivanje novih pokazatelja stadija razvoja melnoma“; Gradski ured za zdravstvo Grada Zagreba (KLASA: 500-01/16-01/780 UR. BROJ: 251-03-02-16-2) ; Voditelj: prof. dr. sc. Sonja Levanat

Zahvale

Hvala mome mentoru, doc. dr. sc. Petru Ozreću, na nesebično prenešenom znanju, uloženom trudu, vremenu i strpljenju prilikom izrade ovog rada.

Hvala dragoj profesorici Jasmini Rokov Plavec na razumijevanju, savjetima i što je uskočila i pristala biti savjetodavni mentor.

Hvala prof. dr. sc. Sonji Levanat na pruženoj prilici izrade rada na Institutu. Također hvala doc. dr. sc. Maji Sabol i dr. sc. Diani Trnski na pomoći i savjetima prilikom izrade rada.

Hvala ekipi s faksa: Anji, Karli, Ivani, Blažu i Andražu što su bili prijatelji, a ne samo kolege. Hvala na svakom zajedničkom druženju, učenju, šetnjama, treninzima, izlascima i međusobnoj motivaciji. Učinili ste studentske dane nezaboravnima.

Veliko hvala mojim cimericama Matei, Valentini i Eni što su bile moj drugi dom i što su učinile studentski život ljepšim.

Posebno hvala mojim dragim prijateljicama Martini, Petri i Željki što su uvijek bile tu kada je trebalo, što su znale slušati i dati najbolje savjete.

Najveće hvala mojim roditeljima: mami Darmili i tati Josi te bratu Anti što su mi sve ovo omogućili i što su uvijek tu za mene. Hvala na svojoj pruženoj ljubavi, potpori i motivaciji.

Ovaj rad posvećujem Vama.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Tumor.....	2
2.2. Stanični ciklus.....	2
2.3. Građa kože i njezina funkcija	5
2.4. Melanin i melanociti.....	6
2.5. Melanom	6
2.5.1. Uzočnici i faktori rizika za razvoj melanoma.....	6
2.5.2. Mutacije u genima kod melanoma	7
2.5.3. Histološki tipovi melanoma.....	7
2.5.4. Klasifikacija melanoma.....	8
2.6. Signalni put Hedgehog-GLI	10
2.6.1. Proteini GLI	13
2.6.2. Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta HH-GLI	13
2.7. Povezanost signalnog puta HH-GLI i melanoma.....	14
2.8. Imunokemijske metode.....	16
2.8.1. Imunohistokemija i imunocitokemija	16
2.8.2. Imunofluorescencija	18
2.9. Protočna citometrija	18
2.9.1. Dijelovi i načelo rada protočnog citometra.....	18
2.9.2. Primjena protočne citometrije u svrhu određivanja staničnog ciklusa	19
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	20

3.1. Uzorci tkiva.....	20
3.2. Stanične linije	20
3.3. Kemikalije.....	20
3.4. Rad sa staničnim kulturama	20
3.4.1. Odmrzavanje stanica.....	21
3.4.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi.....	21
3.4.3. Nasađivanje stanica na pokrovnice u komorice sa šest bunarića.....	22
3.4.4. Tretmani stanica	22
3.4.5. Skidanje stanica za analizu na instrumentu MUSE Cell Analyzer (za određivanje staničnog ciklusa).....	22
3.4.6. Priprema stanica za očitavanje na instrumentu (MUSE Cell Analyzer)	23
3.5. Određivanje staničnog ciklusa metodom protočne citometrije	23
3.5.1. Računalna obrada i analiza očitanih podataka	23
3.6. Imunohistokemijsko bojanje (IHC).....	25
3.7. Imunocitokemijsko bojanje (ICC).....	28
3.8. Imunofluorescencija (IF).....	30
3.9. Mikroskopiranje.....	30
3.10. Računalna metoda kvantifikacije imunohistokemijskih rezultata.....	31
3.11. Statistička analiza rezultata	34
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u uzrocima tkiva primarnih melanoma	35
4.2. Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u humanim staničnim linijama melanoma	42
43	
4.3. Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 u stanici	43
4.4. Utjecaj aktivacije i inhibicije signalnog puta HH-GLI na stanični ciklus	49
§ 5. ZAKLJUČAK	59
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	60

§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	62
§ 8. DODATAK	LXV
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ULOGA TRANSKRIPCISKIH FAKTORA GLI U RAZVOJU KOŽNOG MELANOMA KOD LJUDI

Kristina Sladić

Ciljevi ovog diplomskog rada jesu povezati razinu ekspresije transkripcijskih faktora GLI1 i GLI3 sa stadijem razvoja primarnog melanoma kože kod ljudi te ispitati utjecaj inhibicije ili aktivacije signalnog puta Hedgehog-GLI na stanični ciklus. Na tkivnim preparatima tumora imunohistokemijskom metodom ispitana je i potvrđena pojačana ekspresija proteina GLI1 i GLI3. Pokazano je da je ekspresija oba proteina značajno viša u tumorima stadija T4 u odnosu na tumore *in situ* (Tis). Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 također je ispitana i potvrđena u humanim staničnim linijama LM6 i WM793B, kao modeli primarnog melanoma, te u staničnim linijama A375M i Mel224, modelima metastatskog melanoma. Imunofluorescencijom je određena lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 u citoplazmi i jezgri stanica navedenih staničnih linija. Dodatno je ispitan utjecaj inhibitora (GANT61) i aktivatora (SAG) signalnog puta na stanični ciklus spomenutih humanih staničnih linija. Stanične linije značajno reagiraju na tretman GANT-om, dok SAG nema značajan utjecaja na signalni put.

(64 stranice, 39 slika, 7 tablica, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

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

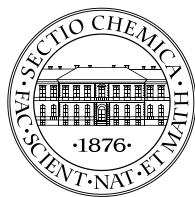
Ključne riječi: GLI1, GLI3, humani kožni melanom, imunofluorescencija, imunohistokemija, signalni put Hedgehog-GLI, stanični ciklus, TNM klasifikacija

Mentori: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec,
dr. sc. Petar Ozretić, nasl. doc., zn. sur., Institut Ruđer Bošković

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
 2. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 3. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič
- Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 26. veljače 2019. godine



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

THE ROLE OF THE GLI FAMILY OF TRANSCRIPTION FACTORS IN HUMAN SKIN MELANOMA DEVELOPMENT

Kristina Sladić

The goals of this diploma thesis are to connect the expression level of transcription factors GLI1 and GLI3 with the stage of human skin melanoma development and examine the effects of the Hedgehog-GLI signaling pathway inhibition and activation on the cell cycle. Immunohistochemical analysis of tumor tissue samples confirmed an increased expression of GLI1 and GLI3 proteins. It was shown that expression of both proteins was significantly higher in T4 stage tumors compared with *in situ* tumors (Tis). Expression of GLI1 and GLI3 proteins was also observed in LM6 and WM793B human primary melanoma cell lines and in A375M and Mel224, human metastatic melanoma cell lines. Localization of GLI1 and GLI3 proteins within the cytoplasm and cell nucleus of those cell lines was determined by immunofluorescence. The influence of pathway inhibitor (GANT61) and activator (SAG) on the cell cycle of those human cell lines was also tested. Cell lines are significantly responsive to GANT treatment, while SAG had no significant influence on the signaling pathway.

(64 pages, 39 figures, 7 tables, 43 references, original in Croatian)

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

Keywords: cell cycle, GLI1, GLI3, Hedgehog-GLI signaling pathway, human skin melanoma, immunofluorescence, immunohistochemistry, TNM classification

Mentors: Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. Petar Ozretić, Research Associate, Ruđer Bošković Institute

Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
 2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
 3. Dr. Ines Primožič, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: 26 February 2019

§ 1. UVOD

Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) je evolucijski visoko očuvan put prijenosa signala od stanične membrane do jezgre, važan za regulaciju embriogeneze i organogeneze te u odrasлом organizmu za održavanje matičnih stanica i regeneraciju tkiva.¹ Njegovo poremećeno funkcioniranje povezuje se s razvojnim malformacijama, a sve se više otkriva i njegova uloga u razvoju različitih tipova tumora.² Sukladno tome, u ovom diplomskom radu je istražena uloga signalnog puta HH-GLI u nastanku i progresiji najmalignijeg i najagresivnijeg oblika raka kože, melanoma. Melanom iako čini samo 10% svih slučajeva raka kože odgovoran je za preko 75% smrtnih slučajeva povezanih s rakom kože.³

Oko 90% melanoma nastaje zbog izloženosti ultraljubičastom zračenju i poznati su molekularni mehanizmi koji dovode do pojave raka kože, pri čemu je za melanom posebno važan signalni put Ras-Raf-MEK-ERK.⁴ Povezanost melanoma i signalnog puta HH-GLI pokazana je na interakciji signalnog puta Ras-Raf-MEK-ERK i proteina GLI1.⁵ Naime, glavni izvršitelji aktivnosti signalnog puta HH-GLI su članovi obitelji transkripcijskih faktora GLI (GLI1, GLI2 i GLI3) koji kontroliraju aktivaciju i inhibiciju transkripcije ciljnih gena. Ciljni geni signalnog puta HH-GLI povezani su s proliferacijom, blokiranjem apoptoze, angiogenezom i metastaziranjem.⁶

Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi povezanost razine ekspresije proteina članova obitelji transkripcijskih faktora GLI sa stadijem razvoja melanoma kože kod ljudi te ispitati utjecaj inhibicije ili aktivacije proteina GLI na razini staničnog ciklusa. Kao model korišteni su parafinski rezovi tkiva primarnog melanoma, stadija Tis (Tumor *in situ*) i T4, i trajne stanične linije melanoma (WM793B, LM6, A375M i Mel224). Za određivanje razine proteinske ekspresije korištene su tri imunokemijske metode: imunohistokemija, imunocitokemija i imunofluorescencija. Mikroskopske fotografije staničnih i tkivnih preparata digitalno su obrađene, a ekspresija proteina je određena računalno. Stanične linije tretirane su inhibitorom (GANT61) i aktivatorom (SAG) signalnog puta HH-GLI nakon čega su analizirane na instrumentu MUSE Cell Analyzer (Merck Millipore) u svrhu određivanja staničnog ciklusa.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Tumor

Tumor ili neoplazija se definira kao “nova masa” nastala nekontroliranim rastom i proliferacijom tumorskih stanica koje se mogu neograničeno dijeliti i imaju sposobnost invazije susjednog tkiva. Ukoliko tumorske stanice nisu invadirale susjedno tkivo onda se tumor definira kao benigni, dok se pojam rak odnosi na maligni tumor kod kojeg je prisutna invazija susjednih tkiva.⁷ Invazivnost je glavna karakteristika tumorskih stanica koja im omogućava širenje kroz krv i limfne čvorove do drugih mjesta u tijelu gdje tvore sekundarne tumore, tzv. metastaze. Osim što su invazivne i metastaziraju, postoji još nekoliko osnovnih karakteristika koje pokazuju stanice malignog tumora: samodostatnije su od ostalih stanica za rast i razvoj, neosjetljive su na antiproliferativne ekstracelularne signale, manje su sklone apoptozi, induciraju angiogenezu, defektne su u kontrolnim mehanizmima koji zaustavljaju diobu, genetski su nestabilne, proizvode telomerazu ili imaju neki drugi mehanizam stabilizacije telomera, itd.⁷

Geni čija promjena dovodi do nastanka tumora nazivaju se geni kritični za tumor, a najvažniji među njima su onkogeni i tumor-supresori. U normalnom obliku onkogeni se nazivaju proto-onkogenima koji promjenom i povećanom funkcijom doprinose razvoju tumora te se u tom kontekstu zapravo nazivaju onkogenima. Tumor-supresori su normalni geni koji sudjeluju u regulaciji normalnog rasta i razvoja, a njihova smanjena funkcija doprinosi razvoju tumora. Poznato je da za nastanak tumora nije dovoljna mutacija samo jednog jedinog gena.⁷

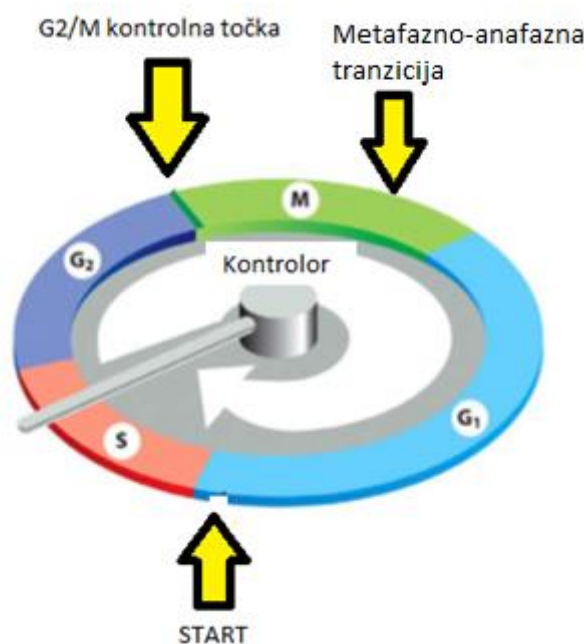
2.2. Stanični ciklus

Osnovna funkcija staničnog ciklusa je samoreprodukcija, odnosno nastanak dvije identične stanice kćeri iz jedne stanice majke.

Stanični ciklus kod eukariota možemo generalno podijeliti u dvije faze – interfaza i mitozu. Tijekom tih faza događaju se različiti procesi koji uključuju stanični rast, replikaciju DNA, raspodjelu udvostručenih kromosoma i na samom kraju podjelu stanica. Interfaza

obuhvaća stanični rast i replikaciju DNA, dok se u mitozu odvija podjela kromosoma i dijeljenje stanica. Najveći dio staničnog ciklusa zauzima upravo interfaza unutar koje se stanica priprema za diobu kroz tri faze: G1 faza, u kojoj je stanica metabolički aktivna i raste; S faza, unutar koje se replicira DNA; i G2 faza, u kojoj se nastavlja rast i sinteza potrebnih proteina za sljedeći dio ciklusa, mitozu. Također postoji i G0 faza unutar koje se stanice nalaze u stanju mirovanja, kada se stanice prestaju dijeliti, ali su metabolički aktivne i u tom stanju mirovanja ostaju sve dok ne prime signal za daljnju proliferaciju.⁸

Svaki korak u procesu je strogo reguliran na više načina. Postoje tri glavne kontrolne točke u staničnom ciklusu putem kojih se odvija regulacija na način da se provjerava da li je stanica spremna za ulazak u iduću fazu ciklusa. Prva kontrolna točka nalazi se na kraju G1 faze gdje se regulira ulazak stanice u S fazu. Ovdje su za kontrolu odgovorni ekstracelularni signali, tj. faktori rasta koji su signal za daljnu proliferaciju. Druge dvije kontrolne točke su G2/M (provjerava se je li sva DNA replicirana i je li okoliš povoljan) i metafazno-anafazna tranzicija (provjerava se jesu li svi kromosmi vezani za diobeno vreteno) (slika 2.1.). Prolazak kroz kontrolne točke staničnog ciklusa reguliraju ciklin ovisne kinaze (CDK). Njihova aktivnost raste i opada kroz ciklus, čime dovode do cikličkih promjena u fosforilaciji unutarstaničnih proteina koji iniciraju ili reguliraju glavne događaje staničnog ciklusa (npr. kondenzacija kromosoma, oblikovanje diobenog vretena). Ciklin ovisne kinaze reguliraju ciklini, koji se sintetiziraju i razgrađuju u svakom novom ciklusu dok je količina CDK stalna.⁸



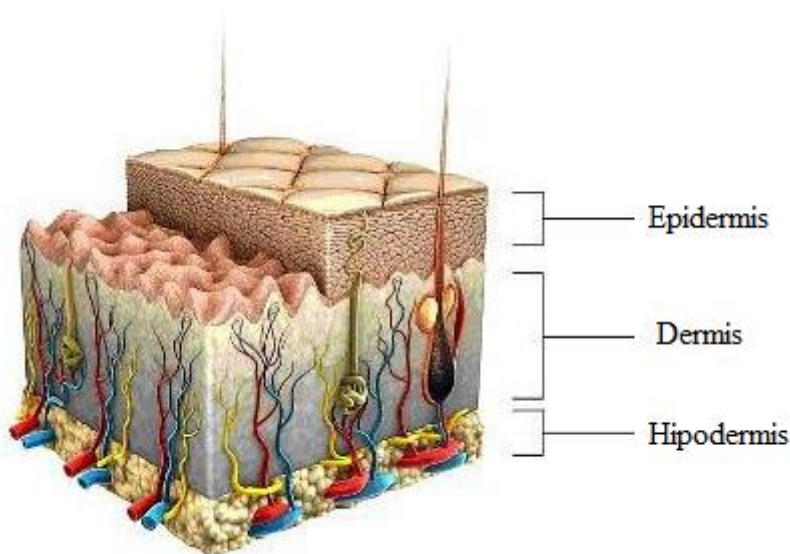
Slika 2.1. Faze staničnog ciklusa i njegove kontrolne točke (slika preuzeta i prilagođena).⁸ Dvije glavne faze staničnog ciklusa su interfaza, koju čine tri faze: G₁, S i G₂, i metafaza. Kontrole staničnog ciklusa nalaze se na kraju G₁ (ukoliko je okoliš povoljan stanice ulaze u diobu), na granici G₂/M (ukoliko je okoliš povoljan i DNA replicirana stanice ulaze u mitozu) i kao krajnja točka je metafazno-anafazna tranzicija (provjerava se jesu li svi kromosomi vezani za diobeno vreteno).

Kod normalnih stanica rast i kontrola diobe regulirana je vezanjem ekstracelularnih signalnih molekula na različite transmembranske receptore za rast. U odsutnosti tih signala normalne stanice se neće dijeliti, za razliku od tumorskih stanica koje nedostatak tih signala mogu nadomjestiti promjenama u genima. Obzirom da tumori imaju abnormalne stanične cikluse, inhibiranjem jedne ili više faza staničnog ciklusa može se odgoditi mitoz. Suprotno staničnom ciklusu je apoptoza. Apoptoza je programirana stanična smrt kojom se obnavlja tkivo i uklanjaju oštećene stanice. Kod tumora su poremećeni signalni putovi koji vode do apoptoze što rezultira time da se oštećene stanice, umjesto da budu uklonjene, nastave dijeliti čime raste broj abnormalnih stanica koje vode do nastanka tumora. Upravo su kemijski spojevi koji zaustavljaju diobu stanica ili potiču apoptozu pogodni antitumorski lijekovi.^{9,10}

2.3. Građa kože i njezina funkcija

Koža je najveći ljudski organ čija ukupna površina kod odraslog čovjeka prosječne visine iznosi oko 1,7 m², dok joj ukupna masa čini 18% ukupne tjelesne mase. Funkcije kože su mnogobrojne, ali kao najvažnija i osnovna funkcija smatra se fizička barijera prema okolini. U sklopu te funkcije koža sprječava gubitak vode i elektrolita iz organizma, dok s druge strane štiti organizam od raznih vanjskih utjecaja te mikroorganizama. Osim ove glavne funkcije, koža sudjeluje i u termoregulaciji, metabolizmu vitamina, minerala, CO₂.¹¹

U građi kože razlikujemo dva osnovna sloja: dermis i epidermis. Hipodermis (potkožno masno tkivo) se nalazi ispod dermisa i ne smatra se dijelom kože (slika 2.2.).¹²



Slika 2.2. Građa kože¹³

Dermis je unutarnji sloj kože debljine 1-2 mm. Sastoji se od dva sloja: tanjeg papilarnog i debljeg retikularnog. Dermis obuhvaća mrežu krvnih i limfnih žila, žlijezde lojnice i znojnice, receptore za hladnoću te folikul dlake.¹²

Epidermis je površinski sloj kože debljine 120 µm građen od nekoliko slojeva: površinski odnosno rožnati sloj, svijetli sloj, zrnati sloj, nazubljeni sloj i temeljni sloj unutar kojeg se nalaze melanociti, Markelove i Langerhansove stanice.¹²

2.4. Melanin i melanociti

Melanin je pigment koji proizvode melanociti, a nastaje iz aminokiseline tirozina. U sintezi melanina glavnu ulogu ima enzim tirozinaza koja tirozin pretvara u 3,4-dihidroksifenilalanin, nakon čega se on pretvara u dopakvinon. Nadalje se dopakvinon nizom reakcija prevodi u melanin. Postoji nekoliko vrsta melanina: eumelanin, feomelanin i neuromelanin.¹⁴

Glavna uloga melanina je zaštita organizma od UV-zračenja. Osim te uloge, melanin djeluje i kao antioksidans u borbi protiv slobodnih radikala.¹⁵ Melanociti se osim u epidermisu kože nalaze i u oku, folikulama dlaka, moždanim ovojnicama.

2.5. Melanom

Melanom je maligni tumor kože koji nastaje iz melanocita. Karakterizira ga sklonost limfogenom i/ili hematogenom metastaziranjem. Manifestira se kao mrlja tamnosmeđe do crne boje, iako može biti i bez pigmenta. Osim na koži gdje se najčešće javlja, u zadnje vrijeme česta je pojava i melanoma oka.¹⁵

Iako čini svega 10% svih oblika raka kože, melanom je odgovoran za 75% smrtnih slučajeva povezanih s rakom kože. Svaka dva sata jedna osoba umre od melanoma. U posljednjem desetljeću broj dijagnosticiranih melanoma se povećao za 53%. Istraživanja su pokazala da uglavnom oko 70% slučajeva melanoma nastaje iz nepromijenjene kože, dok preostalih 30% se može razviti iz atipičnih nevusa (madeža).¹⁶

2.5.1. Uzročnici i faktori rizika za razvoj melanoma

Na razvoj melanoma utječu kako okolišni tako i čimbenici samog domaćina. Kao glavni čimbenik iz okoliša smatra se ultraljubičasto (UV) zračenje koje uzrokuje oko 90% melanoma. Čimbenici domaćina su broj nevusa, boja i tip kože, obiteljsko nasljeđe kao i genske mutacije. Iako je razvoj melanoma u većini slučajeva *de novo*, manji broj melanoma se ipak razvija iz atipičnih nevusa, pa su tako osobe s povećanim brojem madeža sklonije melanomu.¹⁷ Osobe svijetle puti su također sklonije oboljenju nego tamnopute osobe, obzirom da je melanin kod osoba sa svijetlom puti prisutan u manjim količinama, a poznato je da melanin ima zaštitnu ulogu od UV-zračenja.¹⁴ Osobe kojima je već jednom dijagnosticiran melanom, ili imaju bazocelularni (BCC) ili planocelularni karcinom (SCC), imaju velike

šanse za ponovnim razvojem melanoma. Obiteljska povijest bolesti isto ima ulogu u razvoju melanoma. Naime, 1 od 10 oboljelih već ima dijagnostificiran melanom u obitelji.¹⁸

2.5.2. Mutacije u genima kod melanoma

Najučestalije mutacije kod melanoma javljaju se u genima *BRAF* i *NRAS*. Mutacije su pronađene u oko 90% slučajeva melanoma. Oba proteina sudjeluju u proliferacijskim signalnim putevima, a njihovom mutacijom dolazi do nekontroliranog dijeljenja stanica što pridonosi razvoju tumora.

Kod obiteljskog melanoma najčešće mutacije su pronađene u tumor-supresoru *CDKN2A* (ciklin-ovisan inhibitor kinaze 2A) i protoonkogenu *CDK4* (ciklin-ovisna kinaza 4). Mutacije u genu *CDKN2A* su češće (1/3 bolesnika s obiteljskim melanomom). Također su pronađene mutacije i u genu za tumorski protein p53 (*TP53*).¹⁹

2.5.3. Histološki tipovi melanoma

Obzirom na način rasta melanomskih stanica razlikujemo dvije faze: horizontalno (površinsko) i vertikalno širenje (u dubinu i visinu). Horizontalno širenje može se očitovati u epidermisu uzduž bazalne membrane (Melanom *in situ*) ili u površinskom dijelu papilarnog dermisa. Vertikalno širenje obuhvaća stvaranje tumorske mase u dermisu te takvi melanomi uglavnom metastaziraju. Postoje 4 osnovna histološka tipa melanoma²⁰ :

- Površinsko šireći melanom – ovaj oblik čini 70% svih slučajeva melanoma i najčešće se javlja kod mladih ljudi. Započinje rastom u epidermisu nakon čega probija bazalnu membranu i širi se u dermis. Najčešće ga nalazimo na trupu kod muškaraca, na nogama kod žena te ne predjelu vrata kod oba spola. Asimetričnog je oblika, a boja mu varira u kombinacijama od plave, crvene, crne, smeđe pa čak i bijele.
- Lentigo maligni melanom (LMM) – najčešće se javlja na koži oštećenoj suncem na području lica, ušiju, ruku i gornjeg dijela trupa. Prvo se lokalizira *in situ*, a nakon što postane invazivan onda se definira kao LMM.
- Akralni lentiginozni melanom (ALM) – također se prvo širi površinski prije daljnjeg dubljeg prodiranja. Najčešće se javlja kod ljudi tamnije kože, a uglavnom je lokaliziran ispod nokta, na dlanovima, prstima, petama i stopalima.

- Nodularni melanom (NM) – je najagresivniji oblik melanoma. Odmah započinje invaziju u dermis, bez prethodnog horizontalnog širenja. Uglavnom je crne boje, ali može biti i plave, bijele, sive, crvene, smeđe boje te u boji kože.²⁰

2.5.4. Klasifikacija melanoma

Nakon što je dijagnosticiran tip melanoma potrebno ga je klasificirati, što znači odrediti stupanj razvoja melanoma. Prvu klasifikaciju napravili su patolog Clark i suradnici 1969. godine. Obzirom da su uočili povezanost prognoze melanoma s fazom rasta i dubinom invazije u samu kožu, oni su melanom klasificirali u 5 stupnjeva (tablica 2.1.). Prvi stupanj predstavlja najbezopasniji tip melanoma i ima najbolju prognozu, tzv. melanom *in situ*, dok je stupanj V najopasniji.²¹

Tablica 2.1. Clarkova klasifikacija melanoma na temelju histoloških karakteristika kože zahvaćene melanomom

Stupanj	Histološke karakteristike
I	Tumor zahvaća samo epidermis (Melanom <i>in situ</i>)
II	Zahvaćen je papilarni dio dermisa
III	Zahvaćen je papilarni dermis, ali počinje prodirati i u retikularni dermis
IV	Tumor prodire u retikularni dermis
V	Zahvaćen je cijeli dermis, a počinje prodirati i u hipodermis

Alexander Breslow je godinu dana kasnije klasificirao tumor na temelju debljine melanoma (tablica 2.2.). Debljina melanoma izražava se u milimetrima, a mjeri se pomoću baždarnog okularnog mikroskopa. Mjeri se dio od gornjeg granularnog dijela epidermisa, okomito, do najdubljeg dijela dijela tumora.¹⁶

Tablica 2.2. Breslowa klasifikacija prema debljini melanoma

Stupanj	Maksimalna debljina melanoma / mm
I	tanji od 0,75
II	0,76 – 1,50
III	1,51 – 2,25
IV	2,26 – 3
V	deblji od 3

No, danas se najčešće koristi klasifikacija prema AJCC (American Joint Committee on Cancer) koja se temelji na opsežnoj studiji Balcha i sur., službeno prihvaćeno u siječnju 2010.²² U ovoj klasifikaciji se osim faktora debljine tumora kao dodatni faktori uzimaju i prisutnost ulceracija, mitotska aktivnost, mikrometastaze dokazane imunohistokemijski te razina laktat-dehidrogenaze (LDH). Ulceracija se definira kao odsutstvo netaknutog epidermisa iznad većeg dijela melanoma i ovaj oblik tumora ima najlošiju prognozu jer je najagresivniji. Mitotska aktivnost se definira kao broj mitoza po mm². Više od pet mitoza po kvadratnom milimetru ukazuje na lošiju prognozu.¹⁸ Stupnjevanje prema AJCC bazira se na TNM klasifikaciji gdje T predstavlja debljinu primarnog tumora, N predstavlja metastaze u regionalne limfne čvorove, a M predstavlja udaljene metastaze. Primarni melanom, koji je tema ovog istraživanja, ima stupnjeve N0 i M0 te se klasificira samo prema debljini (tablica 2.3.). U ovom istraživanju uspoređuju se Tis i T4 stadiji primarnog tumora, Tis kao najblaži, te T4 kao najuznapredovaliji oblik po AJCC.

Tablica 2.3. Prikaz T-klasifikacije primarnog melanoma prema AJCC²²

T stupnjevanje	Debljina tumora / mm	Ulceracija i mitotska aktivnost
Tis	-	Melanom in situ, nema invazije
T1	<1,00	a: bez ulceracije, br. mitoza < 1 mm ² Clark II/III b: s ulceracijom ili br. mitoza > 1mm ² Clark III/IV
T2	1,01 – 2,00	a: bez ulceracije b: s ulceracijom
T3	2,01 -4,00	a: bez ulceracije b: s ulceracijom
T4	>4,00	a: bez ulceracije b: s ulceracijom

2.6. Signalni put Hedgehog-GLI

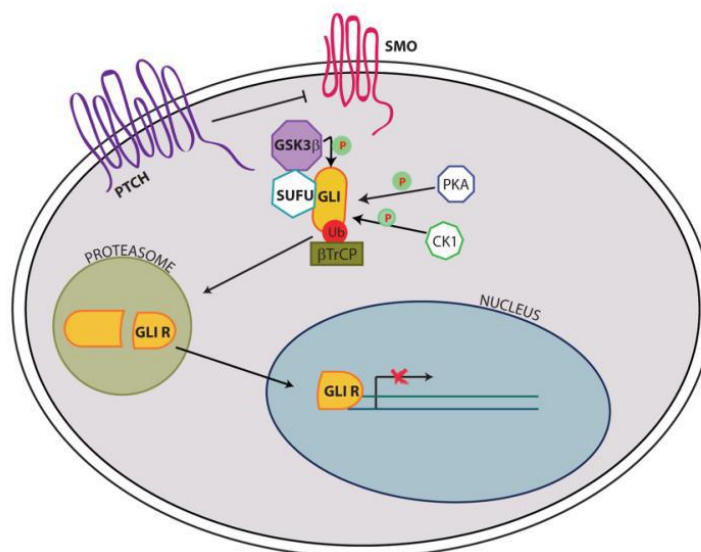
Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) je put prijenosa staničnih signala povezan s embrionalnim razvojem, proliferacijom i održavanjem matičnih stanica. Čvrsto je reguliran tijekom embrionalnog razvoja, gdje kontrolira diferencijaciju i razvoj tkiva i organa. Tkivo u kontekstu melanoma koje je pod kontrolom signalnog puta HH-GLI su progenitori neuralne cijevi, od kojih se razvijaju melanociti. U odraslom organizmu signalni put je uglavnom inaktivan, osim u populacijama matičnih stanica u raznim tkivima, uključujući mozak i kožu. Proteini ovog signalnog puta otkriveni su kod vinske mušice (*Drosophilla melanogaster*), odakle mu i potječe ime jer mutacija jednog od proteina uzrokuje nastanak šiljastih izraslina u ličinke vinske mušice zbog čega takve karakteristike deformirane jedinice izgledom podsjećaju na ježa (eng. *hedgehog*).^{23,24}

Signalni put HH-GLI (slika 2.3.) aktivira se vezanjem jednog od proteina Hedgehog (HH) na transmembranski receptor Patched (PTCH). Nastajanjem kompleksa receptor-ligand dolazi do translokacije koreceptora Smoothened (SMO) na staničnu površinu čime se potiče niz reakcija fosforilacije u staničnoj citoplazmi koje dovode do modulacije kompleksa proteina Supressor of Fused (SUFU) i transkripcijskog faktora GLI. SUFU se ubikvitinira i šalje na razgradnju čime se protein GLI oslobađa i odlazi u jezgru gdje djeluje kao

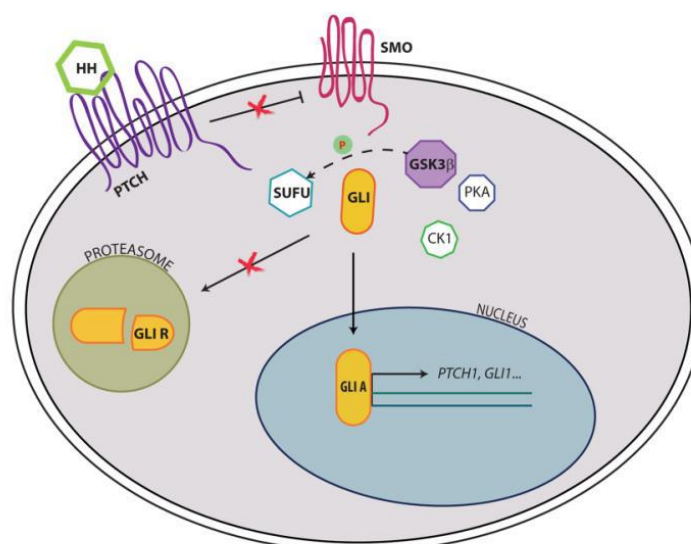
transkripcijski faktor. U ovaj proces je uključeno još nekoliko proteina: protein-kinaza A (PKA), glikogen-sintaza-kinaza 3 beta (GSK3B), kazein-kinaza 1 (CK1) i E3 ubikvitin-ligaza β TrCP. U odsutnosti fosforilacijskog signala SUFU sprječava ulazak proteina GLI u jezgru, a samim time i transkripciju ciljnih gena, regulirajući gene za proliferaciju, epitelno-mezenhimsku tranziciju, preživljenje i autoregulaciju signalnog puta.^{23,24}

Poremećena regulacija bilo koje komponente signalnog puta HH-GLI dovodi do njegove aberantne aktivacije što može rezultirati zloćudnom preobrazbom. Smatra se da ovaj signalni put sudjeluje u nastanku čak jedne trećine svih zloćudnih tumora.^{23,24} Dosad je otkrivena poremećena aktivnost signalnog puta HH-GLI kod tumora kože, mozga, crijeva, pluća, prostate, štitnjače i mnogih drugih.²⁵

INAKTIVAN



AKTIVAN



Slika 2.3. Prikaz signalnog puta HH-Gli.²⁴ Gornja slika prikazuje kako u odsustvu liganda receptor PTCH inhibira ko-receptor SMO čime se inaktivira signalni put. Proteini GLI su tada u kompleksu s proteinom SUFU koji sprječava njihovu translokaciju u jezgru. Dodatno GLI se obilježavaju za razgradnju/cijepanje na proteasomu čime nastaje transkripcijski represor koji inhibira ekspresiju ciljnih gena. Donja slika prikazuje aktivni signalni put gdje kaskada započinje vezanjem liganda HH za receptor PTCH. SMO više nije inhibiran te je omogućeno daljnje širenje signala koje dovodi do otpuštanja GLI iz kompleksa sa SUFU. GLI odlazi u jezgru gdje aktivira transkripciju ciljnih gena.

2.6.1. Proteini GLI

Proteini GLI su dobili ime prema glioblastomu iz kojeg su prvi put izolirani. Postoje tri GLI proteina kod kralješnjaka: GLI1, GLI2 i GLI3. C- terminalna regija kod sva tri proteina sadrži aktivacijsku domenu, dok N- terminalna regija kod GLI1 i GLI2 sadrži još i regulacijsku domenu. Sva tri GLI proteina su transkripcijski faktori s motivom cinkovog prsta. Specifična građa N- i C- kraja se odražava na njihovu funkciju, pa GLI1 djeluje isključivo kao aktivator transkripcije dok GLI2 i GLI3 mogu djelovati ili kao aktivatori ili kao inhibitori. Aktivnost proteina ovisi o premještanju iz citoplazme stanice u jezgu. Vezanjem liganda HH na receptor PTCH aktivira se kaskada reakcija koje rezultiraju aktivacijom GLI1 i sprječava se cijepanje GLI2 i GLI3 u represorski oblik. Regulacija aktivnosti može se odvijati na više razina (prekranje RNA, interakcija s drugim proteinima, posttranslacijsko procesiranje, mehanizam degradacije). Ulazak proteina u jezgu kao rezultat niza složenih reakcija signalnog puta HH-GLI aktivira transkripciju gena za proliferaciju i diferencijaciju (Ciklin D1, D2 i E, *MYCN*, *WNT*, *PDGFRA*, *IGF2*, *FOXM1*, *HES1*, *TGFB*), preživljenje stanice (*BCL2*), samoobnavljanje (*BM1*, *NANOG*), angiogenezu (*VEGF*), epitelno-mezenhimalnu tranziciju (*SNAIL1*, *SIP1*, *ELK1*, *MSX2*) i invazivnost (osteopontin) te autoregulaciju signalnog puta (*PTCH1* i *GLI1*). Aktivacija, inaktivacija i promjena ekspresije ovih gena može pridonijeti malignoj transformaciji stanica.^{23,24}

2.6.2. Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta HH-GLI

Šezdesetih godina prošlog stoljeća uočen je teratogeni efekt biljke *Veratrum californicum*, kada je primijećeno da uzrokuje ciklopiju kod potomstva ovaca koje su se hranile tom biljkom. Naknadno je otkriveno da je aktivna supstanca steroidni alkaloid ciklopamin, koji inhibira signalni put HH-GLI djelujući na razini koreceptora SMO, na način da se direktno veže za SMO i mijenja njegovu konformaciju. Iako se ciklopamin i dalje najčešće koristi za inhibiciju signalnog puta HH-GLI *in vitro*, razvijene su i druge male molekule kojima je cilj inhibicija ovog signalnog puta. Većina tih molekula su antagonisti koreceptora SMO, a među njima je njih sedam u postupku kliničkih ispitivanja za liječenje tumora.²⁴

Kao potencijalne mete za inhibiciju signalnog puta HH-GLI su i komponentne puta koje se nalaze nizvodno od koreceptora SMO, odnosno transkripcijski faktori GLI. Najpoznatije male molekule koje djeluju na razini proteina GLI su GANT58 i GANT61 (GLI antagonist).

Djeluju direktno blokirajući vezanje GLI1 i GLI2 na promotore ciljnih gena. *In vivo* ispitivanja su pokazala da imaju jače djelovanje od ciklopamina u nekoliko različitih staničnih tumorskih linija. Svi dosad poznati inhibitori transkripcijskih faktora GLI inhibiraju samo aktivnost GLI1 i GLI2, ali ne i aktivnost GLI3. Najveći problem u klinici predstavlja otpornost na inhibitore signalnog puta HH-GLI. Iako je jasno da je signalni put HH-GLI vrlo zanimljiva meta u kontekstu antitumorskih terapija, potrebna su daljnja istraživanja mehanizama njegove aktivacije u onim tumorima koji nisu ovisni o mutacijama njegovih komponentni. Samo detaljno poznavanje mehanizma koji dovodi do aktivacije transkripcijskih faktora GLI u svakom pojedinom tumoru omogućiti će izbor optimalnog inhibitora ili kombinacije inhibitora.²⁴

Osim antagonista, poznati su i agonisti signalnog puta HH-GLI. Agonisti su male molekule koje pospješuju aktivnost signalnog puta. Prirodni agonist je sam ligand HH, ali zbog skupoće njegove proizvodnje sintetizirane su male molekule koje imaju isti učinak na signalni put kao on. Prva takva mala molekula bila je SAG (Smoothened Agonist), koja aktivira signalni put direktnim vezanjem za koreceptor SMO. Uz SAG među poznatijim agonistima signalnog puta HH-GLI je i purmorfamin koji se također direktno veže na SMO.²⁴

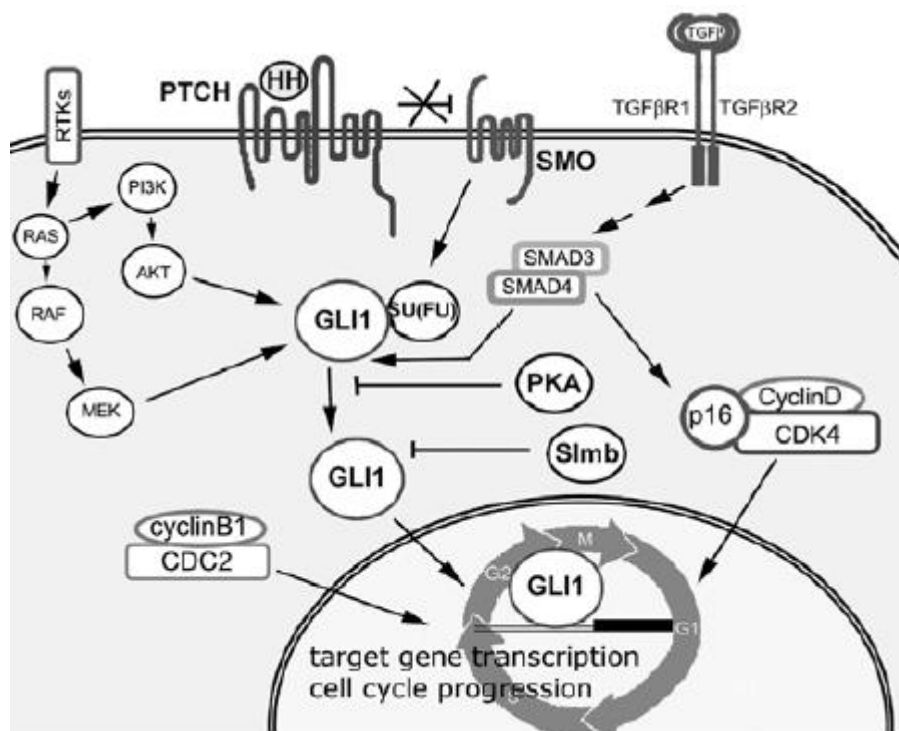
2.7. Povezanost signalnog puta HH-GLI i melanoma

Pokazano je kako je signalni put HH-GLI povezan s nastankom tumora kože, ali mehanizam djelovanja se razlikuje u melanomima i ostalim tipovima tumora kože koji najčešće nastaju zbog mutacija u genima *PTCH1* i *SMO*.²⁵ Istraživanja su pokazala da signalni put HH-GLI sudjeluje u normalnoj proliferaciji melanocita čovjeka u staničnoj kulturi. Također je pokazano da se razvoj ksenografta kod miševa može inhibirati ciklopaminom, posebice u RAS-ovisnim melanomima. U metastatskom melanomu je primijećena jača ekspresija proteina GLI1 i *PTCH1* u odnosu na primarni melanom.²⁶ Pokazana je i uloga proteina GLI2 kod melanoma: stanične linije melanoma koje imaju pojačanu ekspresiju proteina GLI2 lakše metastaziraju u kosti u odnosu na primarni melanom.²⁶ Signalni put HH-GLI je također aktivan i u melanosferama, a broj i veličina sfera se smanjuje djelovanjem inhibitora signalnog puta puta, ciklopaminom i GANT61.²⁷ Ostali inhibitori signalnog puta HH-GLI također pokazuju aktivnost u melanomu smanjujući rast melanoma *in vitro* i *in vivo*.^{28,29} Pojačana ekspresija komponentni tog signalnog puta korelirana je sa smrtnošću bolesnika kojima je dijagnosticiran melanom.²⁹

Osim kanonske aktivacije signalnog puta, proteini GLI se mogu aktivirati i nekanonoski. Poznati su molekularni mehanizmi koji dovode do pojave raka kože pri čemu je za melanom posebno važan signalni put Ras-Raf-MEK-ERK, što je u skladu s očekivanjem obzirom da je u oko 90% slučajeva melanoma otkrivena mutacija u genu *BRAF* ili *NRAS*.⁴

BRAF je član obitelji serin/treoninskih kinaza RAF, koju čine 3 kinaze: RAF, CRAF i BRAF. BRAF sudjeluje u regulaciji signalnog puta MAPK/ERK (RAS/RAF/MEK/ERK) na način da prenosi izvanstanične signale do jezgre aktivirajući transkripcijske faktore koji reguliraju stanične procese kao što su proliferacija, rast, diferencijacija i apoptoza. Osim aktivacije MAPK/ERK signalnog puta NRAS je također dio i signalnih puteva PI3K i RalGEF, koji se u slučaju mutacije isto mogu poremetiti. Poznato je da MAPK i PI3K mogu aktivirati taj nekanonski prijenos signala na razini transkripcijskih faktora GLI.

Upravo na interakcijama signalnog puta Ras-Raf-MEK-ERK i proteina GLI je prikazana povezanost melanoma i signalnog puta HH-GLI⁵ (slika 2.4.).



Slika 2.4. Kanonska i nekanonska aktivacija signalnog puta HH-Gli (slika preuzeta i prilagođena).³⁰ Vezanjem HH na receptor PTCH aktivira se kanonski prijenos signala. Kao primjer nekanonske aktivacije na razini transkripcijskih faktora GLI je aktivacija GLI putem RAS/RAF/MEK/ERK signalnog puta (interakcije GLI s komponentama tog signalnog puta).

2.8. Imunokemijske metode

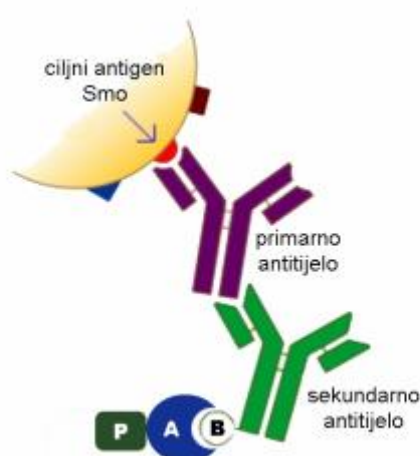
Imunokemijske metode imaju široku upotrebu u znanstveno-istraživačkim laboratorijima gdje se primarno koriste za detekciju, lokalizaciju i kvantifikaciju ekspresije proteina u stanicama i tkivima. Također se vrlo često koriste u kliničkoj patologiji za dijagnostiku i prognostiku tumorskih i drugih bolesti.³¹

2.8.1. Imunohistokemija i imunocitokemija

Imunohistokemija i imunocitokemija su imunokemijske metoda koje se temelje na stvaranju imunokompleksa antitijela i proteina (antigena) na koje to antitijelo reagira. Na tkivne antigene koji se mogu nalaziti na membrani stanica, u citoplazmi ili na membrani jezgre proizvode se specifična antitijela imunizacijom životinja (svinja, zec, koza, miš...). Kompleks antitijelo-antigen se vizualizira pomoću antitijela koja mogu biti obilježena

različitim biljezima kao što su fluorescentne boje, enzimi, radioaktivni izotopi itd. Promjena boje ili praćenje radioaktivnih izotopa omogućavaju vizualizaciju kompleksa u svrhu praćenja lokalizacije i ekspresije željenog proteina od interesa u određenom tkivu, odnosno u stanici. Obzirom na to imamo li izravno vezanje obilježenog antitijela na antigen ili ne, razlikujemo direktne, odnosno indirektne metode kod kojih je na antigen prvo vezano primarno antitijelo, a potom je na primarno antitijelo vezano obilježeno sekundarno antitijelo (slika 2.4.).

Antitijela mogu biti monoklonska ili poliklonska. Poliklonska antitijela proizvode različite stanice što kao rezultat daje imunokemijsku različitost te se zbog toga vežu na različite epitope na antigenu. Suprotno tome, monoklonska antitijela su od istog klona stanica i imunokemijski su identični te stoga reagiraju sa istim specifičnim epitopom na antigenu na koji su usmjerena.³²

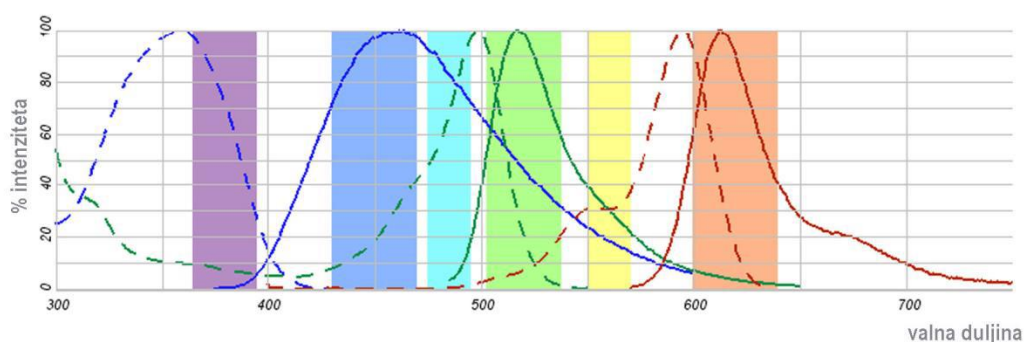


Slika 2.5. Princip imunohistokemijskog bojanja antitijelima.³³ Na antigen, odnosno ciljni protein od interesa SMO veže se primarno antitijelo specifično za taj protein. Na primarno antitijelo veže se sekundarno antitijelo specifično za Fc fragment primarnog antitijela. Sekundarno antitijelo je konjugirano s biotinom koji ima veliku specifičnost za glikoprotein avidin (A) koji je obilježen peroksidazom (P). Željeni protein se vizualizira dodatkom diamidobenzidina (DAB), supstrata peroksidaze koji nakon cijepanja stvara smeđi talog.

2.8.2. Imunofluorescencija

Imunofluorescencija je imunokemijska metoda kod koje se imunokompleks antigen-antitijelo detektira fluorescentno obilježenim sekundarnim antitijelom. Fluorescentne tvari koje se koriste najčešće su fluorescein, rodamin, Texas Red, DAPI itd. Njihovim vezanjem na antitijela ne dolazi do gubitka specifičnosti ni reaktivnosti antitijela.

Fluorescentna tvar (fluorofor) apsorbira zračenje određene valne duljine čime prelazi u pobuđeno elektronsko singletno stanje nakon čega se procesom emisije vraća nazad u osnovno stanje pri čemu emitira svjetlost određene boje. Na taj način se promjenom boje detektira imunokompleks. Ukoliko se fluorofor ireverzibilno ne uništi u pobuđenom stanju može se uzastopno pobuđivati i detektirati.



Slika 2.6. Pobudni (iscrtkane linije) i emisijski (pune linije) spektri fluoresceina (zeleno), Texas Red-a (crveno), DAPI-a (plavo).³⁴

2.9. Protočna citometrija

Protočna citometrija je kvantitativna metoda kojom se mogu analizirati različita svojstva stanica, ali i drugih bioloških čestica. Ima jako veliku primjenu u dijagnostici kao i praćenju terapija.

2.9.1. Dijelovi i načelo rada protočnog citometra

Protočni citometar ima 3 glavna dijela: protočni, optički i elektronički dio. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, suspenzija stanica i zračni pritisak. Dijelovi optičkog sustava su laser kao izvor zračenja, leće, filteri i osjetnici.^{35,36}

Protočni sustav tjera stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnim protokom (brzina protoka se može podešavati) kroz sustav uske kapilare kojim dolaze do optičkog dijela

gdje se izlažu laserskom svjetlu. Stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine je pokazatelj fizičkih osobina stanica. Dio svjetlosti koji se postranično rasprši odgovara staničnoj granuliranosti, odnosno kompleksnosti unutrašnje stanice, dok dio raspršen u smjeru izvora zračenja odgovara veličini stanice. Detektori za fluorescenciju očitavaju fluorescentni signal koji potječe od fluorokroma kojim su stanice prethodno obilježene. Za svaku valnu duljinu postoji odgovarajući detektor. Kao fluorokrom za određivanje faza staničnog ciklusa se najčešće koristi propidij-jodid.³⁵

2.9.2. *Primjena protočne citometrije u svrhu određivanja staničnog ciklusa*

Fluorescentni signal koji se detektira potječe od fluorokroma kojim se obilježavaju stanice. Fluorokromi u stanicama kompleksiraju s molekulama DNA, pa je samim time intenzitet fluorescencije proporcionalan količini DNA. Prema samoj količini DNA u stanicama i veličini stanice, moguće je razvrstati stanice po fazama staničnog ciklusa. Program koji je ugrađen u protočni citometar preračunava emitirane svjetlosne signale u histogram u kojem su prikazani intenziteti fluorescencije koji odgovaraju broju stanica u pojedinim fazama ciklusa. Na taj način možemo pratiti kako različiti faktori (kemijski i fizikalni agensi) utječu na stanični ciklus u odnosu na kontrolne stanice.³⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorci tkiva

Za potrebe ovog istraživanja eksperimenti su se provodili na arhivskim parafinskim tkivima primarnih melanoma kože stadija Tis i T4 (tablica 2.3.), prikupljenih tijekom kirurških operacija i ustupljenih od strane Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

3.2. Stanične linije

U ovom eksperimentu korištene su trajne stanične linije melanoma WM793B i LM6 kao model primarnog te A375M i Mel224 kao model metastatskog melanoma. Stanične linije su dobivene od dr. sc. Nede Slade, Laboratorij za proteinsku dinamiku, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

3.3. Kemikalije

Tris (SigmaAldrich)

Tween (SigmaAldrich, P 2287- 500 ml)

NaCl (Kemika, p.a.)

1M HCl (Kemika, p.a.)

Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O (Kemika, p.a.)

3.4. Rad sa staničnim kulturama

Prilikom rada sa staničnim kulturama bitno je da se sve odvija u sterilnim uvjetima. Sav potreban pribor i kemikalije (otopine, puferi i mediji) su sterilizirane. Rukovanje svime što je vezano uz stanične kulture odvija se u posebnom kabinetu za rad u sterilnim uvjetima sa laminarnim protokom zraka. Radna površina laminara briše se 70%-tnim alkoholom prije i nakon svake upotrebe, te sterilizira paljenjem UV svjetla kada nije u upotrebi.

3.4.1. Odmrzavanje stanica

Trajne stanične linije su bile pohranjene u mediju za zamrzavanje (50% FBS, 40% medij, 10% DMSO) u krio-ampulama u tekućem dušiku. Postupak odmrzavanja bitno je što brže napraviti kako u procesu ne bi došlo do fizičkog oštećenja stanica. U sterilnu staklenu epruvetu stavljeno je 5 mL medija u kojem stanice rastu. Za trajne stanične linije LM6, A375 i WM793B medij za rast je RPMI (Gibco) medij sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 1% L-glutamina i 1% natrijevog piruvata. Mediju za rast stanične linije Mel224 je uz sve ovo prethodno navedeno dodano još i 0,5% neesencijalnih aminokiselina. Ampula sa stanicama zagrijana je u ruci toliko dugo dok se zaleđena smjesa nije odvojila od stijenke ampule, a većina sadržaja još ostala zaleđena. Sadržaj je zatim brzo prebačen u staklenu epruvetu s medijem, te centrifugiran (5 min, 1200 g). Na taj način stanice su isprane od krioprotektanta DMSO (dimetilsulfoksid) i istaložene na dno epruvete. Odmah nakon centrifugiranja supernatant je dekantiran, a talog stanica resuspendiran u 5 mL medija i prenešen u plastičnu Petrijevu zdjelicu. Kako bi se sadržaj sa stanicama jednoliko rasporedio, bilo je potrebno protresti Petrijevu zdjelicu, nakon čega su stanice pohranjene u inkubator na temperaturu od 37°C i atmosferu s 5% CO₂.

3.4.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Stanične kulture koje su korištene u ovom eksperimentu rastu prihvaćene za podlogu. Promjena medija u takvim staničnim kulturama rađena je svaka tri dana na način da je pipetom pokupljen i zatim bačen sav stari medij, dok je novom čistom pipetom dodano 5 mL svježeg medija. Nakon što su narasle toliko da su gotovo prekrile podlogu (postale konfluentne), stanice su presađene na način da je prvo uklonjen sav medij nakon čega je na stanice dodano 5 mL fosfatnog pufera PBS (1,7 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 1mM Na₂HPO₄, pH 7,2). Petrijeva zdjelica je kratko proljuljana, nakon čega je PBS izvađen i bačen. Na taj način stanice su isprane od zaostalog seruma iz medija. Na stanice je dodan 1 mL tripsina (0,05% w/v + 1 mM EDTA), a prethodnim korakom ispiranja spriječena je moguća inaktivacija tripsina serumom. Stanice su ostavljene 5-10 minuta kako bi se tripsinizirale (odvojile od podloge). Nakon što su se odvojile, na stanice je dodano 5 mL svježeg medija (bilo je potrebno resuspendirati par puta propuhivanjem kroz pipetu), a potom je na čistu Petrijevu zdjelicu nasadeno 1 mL te otopine, te je nadopunjeno medijem do 5 mL.

3.4.3. Nasađivanje stanica na pokrovnice u komorice sa šest bunarića

Za potrebe imunofluorescencije i imunocitokemijskog bojanja bilo je potrebno nasaditi stanice na pokrovnice u komorice sa 6 bunarića. Pokrovnice su uzete pincetom, nakon čega su uronjene u alkohol i sterilizirane provlačenjem kroz plamen plamenika. U svaki bunarić je potom stavljena po jedna pokrovnica. Iz petrijevke sa kulturom stanica je uklonjen medij, a zatim je na stanice dodano 5 mL PBS-a, nakon čega je uslijedio korak tripsinizacije identičan onome opisan u prethodnom odlomku. Resuspendirane stanice su nasađene u bunariće s pokrovnicama na način da je u svaki bunarić dodano 500 μ L suspenzije stanica na što je još dodan 1,5 mL medija tako da je ukupan volumen u svakom bunariću bio 2 mL. Nakon svakog nasađivanja, ostatak stanica je presađen tako što je 1 mL resuspendirane otopine vraćen u Petrijevu zdjelicu te mu je dodano 5 mL medija. Nasađene stanice, kao i presađene, stavljene su u inkubator na 24 h kako bi se prihvatile za podlogu.

3.4.4. Tretmani stanica

$1,5 \times 10^5$ stanica je nasađeno na pokrovnice u komorice sa 6 bunarića, nakon čega su ostavljene u inkubatoru 24 h da se zalijepe. Idući dan su stanice tretirane spojevima: GANT61 (Selleckchem, S8075) u konačnim koncentracijama 10 μ M i 20 μ M, SAG (konačna koncentracija 10 μ M) i etopozidom (ETO) (Sigma-Aldrich, konačna koncentracija 1 μ M) kao pozitivnom kontrolom. Etopozid je alkaloidni citostatik koji vezanjem na protein tubulinsprječava stvaranje diobenog vretena te zaustavlja rast stanica u metafazi mitoze i G2 fazi staničnog ciklusa.³⁷ Tretirane stanice su ostavljene 24 h u inkubatoru, nakon čega su spremne za skidanje prije analize staničnog ciklusa na instrumentu MUSE Cell Analyzer (Merck Millipore).

3.4.5. Skidanje stanica za analizu na instrumentu MUSE Cell Analyzer (za određivanje staničnog ciklusa)

Iz bunarića na koje su nasađene tretirane stanice na pokrovnice prikupljen je sav supernatant i dodan u epruvetu od 15 mL. Stanice na pokrovnicama su isprane PBS-om te je PBS prikupljen i dodan supernatantu u epruveti, nakon čega su stanice još i tripsinizirane te su prikupljene i dodane u epruvetu sa supernatantom i PBS-om. Sve zajedno je stavljeno u centrifugu (5 min, 1200 g), nakon čega je supernatant otklonjen, a talog ispran s 1 mL PBS-a

te centrifugiran (5 min, 1200 g). Supernatant je ponovno otklonjen te je talog resuspendiran u rezidualnom PBS-u (ono što je ostalo na talogu nakon uklanjanja supernatanta). Tresući stanice na vortexu dodan je 1 mL kap po kap ledeno hladnog 70%-tnog etanola (Sigma Aldrich), nakon čega su stanice pohranjene preko noći na -20°C. Sljedeći korak je priprema stanica za očitavanje na instrumentu MUSE.

3.4.6. Priprema stanica za očitavanje na instrumentu (MUSE Cell Analyzer)

Od stanica pohranjenih u etanolu uzeto je 500 µL u mikroeprevetu volumena 1,5 mL i stavljeno na centrifugu (5 min, 1200 g), nakon čega je supernatant otklonjen, a talog ispran u 1mL-u PBS-a i centrifugiran (5 min, 1200 g). Supernatant je otklonjen, a na talog je dodano 100 µL MUSE CELL CYCLE reagensa (Millipore) te je ostavljeno u mraku pola sata na sobnoj temperturi. Nakon tih pola sata stanice su bile spremne za očitavanje. Očitavanje se obavljalo na način da se mikroepreveti odrezao poklopac, nakon čega se stavila u odgovarajući držač u MUSE instrumentu, te pokrenuo postupak očitavanja.

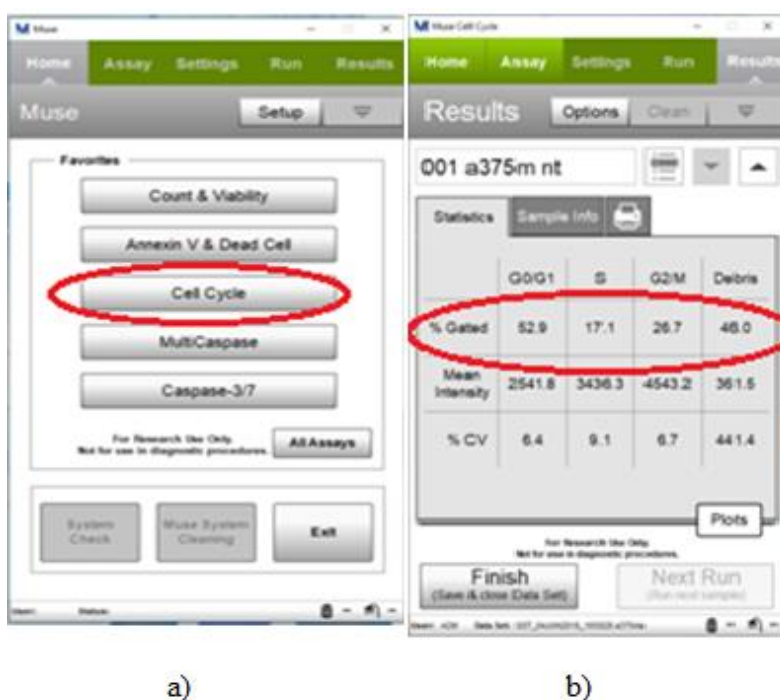
3.5. Određivanje staničnog ciklusa metodom protočne citometrije

Očitanje je rađeno na mini protočnom citometru MUSE *Cell Analyzer* (Millipore). Uzorci stanica za analizu na instrumentu MUSE su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.3.6. Za svaki uzorak očitavanje je ponovljeno dva puta. Svi očitani podaci spremaju se na računalo, koje je u sklopu instrumenta.

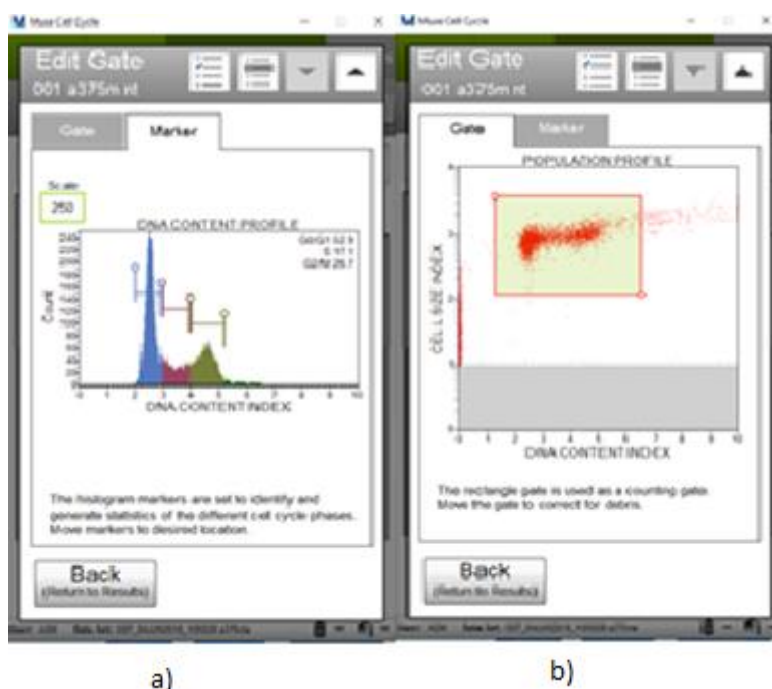
3.5.1. Računalna obrada i analiza očitanih podataka

Nakon što su obavljena očitavanja na instrumentu MUSE Cell Analyser, svi podaci su prikupljeni na računalo koje se nalazi u samom instrumentu. Podaci su obrađeni pomoću progama MUSE Analysis Software na sljedeći način: nakon što se otvori program odabran je željeni test, u ovom slučaju stanični ciklus (*Cell Cycle*) (slika 3.1.a), nakon čega je odabrana opcija *View Results* (jedina koja se može odabrati) za analizu mape s podacima prikupljenih tijekom analize na instrumentu. Dobiveni rezultati su prikazani kao postotak stanica u pojedinim fazama (slika 3.1.b) koji su dodatno doručeni odabirom funkcije *plots* (slika 3.1.b) gdje se nalaze histogram i dvoparametarski dijagram populacije stanica. Na histogramu imamo prikaz količine DNA u stanici (x-os) te broj stanica (y-os). Namjeste se pikovi (markeri) koji prikazuju granice pojedinih faza staničnog ciklusa. Pik s najmanjom količinom

DNA odgovara G1, srednji dio odgovara S fazi, a pik s najvećom količinom DNA odgovara G2/M obzirom da kako stanica prolazi kroz faze staničnog ciklusa, povećava se količina DNA unutar same stanice (udvostručenje DNA). Namjeste se pikovi (markeri) koji prikazuju granice pojedinih faza staničnog ciklusa (slika 3.2.a). Iz dvoparametarskog dijagrama populacije stanice je prikazan koji raspon stanica se mjerio (sve izvan crvenog pravokutnika je odbačeno, jer se radi o praznim stanicama ili agregatima) (slika 3.2.b). Dobiveni postotci su potom unešeni u Excel dokument u programskom paketu Office i grafički obrađeni.



Slika 3.1. Prikaz prozora *MUSE Analysis* softvera; a) prikaz početnog prozora programa u kojem se odabire željeni test; b) prikaz rezultata (postotak stanica u pojedinim fazama)



Slika 3.2. Prikaz prozora *MUSE Analysis* softvera; a) prikaz histograma s pikovima pojedinih faza staničnog ciklusa; b) prikaz dvoparametarskog dijagrama populacije stanica

3.6. Imunohistokemijsko bojanje (IHC)

Imunohistokemijsko bojanje je provedeno na 67 uzoraka tkiva primarnih melanoma uklopljenih u parafin. Za svaki uzorak pripremljena su minimalno dva prereza, jedan za kvantifikaciju proteina GLI1 i drugi za protein GLI3. Višak prereza je korišten kao negativna kontrola u svakom ciklusu bojanja. Korišten je protokol tvrtke Aviva Systems Biology i jedan ciklus imunohistokemijskog bojanja se odvija u dva dana.³⁸

1. DAN: Prvi korak je bio uklanjanje parafina iz tkivnih prereza na način da je u staklenu kadicu u kojoj se nalaze predmetna stakalca tkivnih prereza dodana otopina BioClear (BioGnost) tri puta po tri minute. BioClear je sredstvo na bazi ksilena (nepolarno otapalo) koje otapa parafin. Nakon deparafinizacije je uslijedila rehidracija uranjanjem stakalaca u niz vodenih otopina etanola, u kojima se postupno povećava udio vode. Prvo su stakalca bila uronjena 2 puta po tri minute u apsolutni etanol (Sigma Aldrich), pa 2 puta po minutu u 95%-

tni etanol i još 2 puta po minutu u 70%-tni etanol. Rehidrirani uzorci su potom isprani u destiliranoj vodi u trajanju od 1 minute. U međuvremenu je u mikrovalnoj pećnici zagrijana prethodno pripremljena otopina za renaturaciju proteina, tzv. Epitope Retrieval Buffer (0,01 M Natrijev citratni pufer, pH 6,0; sastav i priprema pufera je prikazana u tablici 3.1) do vrenja. Također, na zagrijavanje u mikrovalnu pećnicu je stavljena i posuda s vodom. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi u kadicu sa stakalcima je dodan zagrijani pufer, a kadica je stavljena u posudu sa zagrijanom vodom, kako bi se održala toplina. Uzorci su se u puferu inkubirali 20 minuta, nakon čega su ostavljeni 20 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se ohladili. Za vrijeme hlađenja dolazi do renaturacije proteina, odnosno dolazi do otkrivanja antigena koji su sakriveni prilikom fiksiranja tkiva u formaldehidu prije uklapanja u parafin. Nakon hlađenja stakalca su isprana puferom TBST (1x)(pripravljen je iz pufera TBST (10x); sastav i priprema je prikazana u tablici 3.2.) u trajanju od 1 minute, a potom kako bi spriječili, odnosno blokirali, aktivnost endogene peroksidaze u kadicu sa stakalcima je dodano 100 mL 3%vodikovog peroksida u metanolu (10 mL 30% H_2O_2 + 90 mL MetOH) u trajanju od 10 minuta. U sljedećem koraku su stakalca ponovo isprana 3 puta u TBST-u, a za to vrijeme je pripremljena vlažna komora na način da se u plastičnu kutiju s poklopcem stavi par ubrusa preko kojih se posloži filter papir i sve zajedno se namoči destiliranom vodom. Vlažna komora sprječava isušivanje uzoraka tijekom koraka inkubacije. Nakon zadnjeg ispiranja TBST-om, stakalca su ostavljena u kadici kako se preparati ne bi isušili te se jedno po jedno stakalce izvadi iz kadice, filter papirom pokupi se višak tekućine, a potom se svaki uzorak na stakalcu okruži PAP-PEN olovkom (Invitrogen). PAP-PEN olovka stvara hidrofobni trag oko uzorka koji sprječava otjecanje tekućine s prereza. Na uzorke je potom dodana kap do dvije (ovisno koliko je potrebno da se prekrije preparat) tekućine za blokiranje nespecifičnog vezanja antitijela (Protein Block Serum-Free, Dako) nakon čega su uzorci stavljeni na inkubaciju u vlažnu komoru u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije filter papirom se pokupi višak tekućine te je na svaki tkivni prerez dodano 60 μ L otopine primarnog antitijela. Primarna antitijela koja su korištena u ovom istraživanju su zečji anti-GLI1 IgG (Novus, NB600-600) i zečji anti-GLI3 IgG (Proteintech,19949-1-AP). Navedena antitijela je prije upotrebe bilo potrebno razrijediti u 2%-tnom BSA/TBST-u u odgovarajućem omjeru: anti- GLI1 IgG : 2% BSA/ TBST = 1 : 200 te anti- GLI3 IgG : 2% BSA/ TBST = 1 : 100. Oba antitijela su poliklonska. Kao negativna kontrola je uzeta jedna kopija prereza koji je bio u suvišku. Prilikom bojanja uzorka za negativnu kontrolu jedina razlika u postupku je

što je umjesto primarnog antitijela dodano 60 μ L 2% BSA/ TBST. Uzorci su, uključujući i negativnu kontrolu, potom ostavljeni u vlažnoj komori preko noći na +4°C kako bi se inkubirali.

2. DAN: Nakon inkubacije stakalca s uzorcima su isprana TBST-om 3 puta po minutu. Nakon trećeg ispiranja, filter papirom se pokupi višak tekućine te se na svaki preparat kapne univerzalno sekundarno antitijelo obilježeno biotinom (Biotinylated link, Dako LSAB + System-HRP K067511). Uzorci su potom inkubirani u vlažnoj komori u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su ponovo isprani TBST-om, ali samo jednom, filter papirom je uklonjen višak tekućine te je na uzorke dodana otopina konjugata streptavidina i peroksidaze iz hrena (Streptavidin-HRP, Dako LSAB + System-HRP K067511). Ponovo je uslijedila inkubacija u vlažnoj komori u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su stakalca isprana TBST-om 3 puta po minutu. Kao i u prethodnim koracima ponovo je filter papirom uklonjen višak tekućine, a na uzorke je dodano 50 μ L kromogena 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako, K346811) koji je svježe pripremljen u priloženom puferu (Dako LSAB + System-HRP K067511) neposredno prije korištenja (1 kap DAB-a na 1 mL priloženog pufera). DAB je supstrat peroksidaze pri čemu oksidacijom nastaje tamno smeđi talog na mjestu interakcije antitijela i proteina kojeg to antitijelo prepoznaje. Uslijedila je inkubacija u vlažnoj komori u trajanju od 7 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su stakalca isprana u destiliranoj vodi u trajanju od 5 minuta, a potom je u kadicu sa stakalcima dodan hematoksilin u trajanju od 10 sekundi. Hematoksilin boji jezgre stanica plavo do blijedo ljubičasto. Višak boje sa stakalaca je ispran u vodovodnoj vodi u trajanju od 5 minuta (prvo se natoči voda nekoliko puta u kadicu i ispere pa potom ostavi stajati). Slijedeći korak je bio dehidracija preparata. Stakalca su isprana nizom vodenih otopina etanola 2 puta po minutu sljedećim redoslijedom: 70%-tni EtOH, 95%-tni EtOH i na kraju apsolutni etanol. Nakon rehidracije stakalca su isprana u BioClear-u 3 puta po 3 minute, a potom je uslijedilo uklapanje s odgovarajućim sredstvom (Biomount). Stakalca se nakon trećeg ispiranja izvade na suhi papirnati ručnik, obrišu se tragovi PAP-PENA, koliko je to moguće, kapne se medij za uklapanje na preparat te se poklopi čistom pokrovnicom pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka. Uklopljeni preparati stavljeni su na sušenje.

Tablica 3.1. Sastav i priprava natrij-citratnog pufera (0,01 M, pH=6,0)

Komponenta	Masa ili volumen
dest. H ₂ O	900 ml
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ x 2H ₂ O	2,96g

*nakon što je Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O otopljen u vodi, čaša s otopinom je dodana na magnetsku miješalicu, te je u čašu uronjena prethodno kalibrirana elektroda nakon čega je dodavan HCl do pH=6,0

Tablica 3.2. Sastav i priprava TBST-a 10x *

Komponenta	Volumen / mL
Tris _{aq} (1 M)	100
NaCl _{aq} (5 M)	87,5
Tween**	5

*vodene otopine Tris-a i NaCl-a su dodane u čašu, potom je dodana voda do volumena od 1L, nakon čega je na magnetskoj miješalici dodan Tween

**Tween je dodan mikropipetom kap po kap

3.7. Imunocitokemijsko bojanje (ICC)

Za razliku od imunohistokemijskog bojanja gdje su kao uzorci korištena tkiva, postupci imunocitokemijskog bojanja provedeni su na uzorcima staničnih linija. Prije samog postupka bojanja koje se također odvija u dva dana, bilo je potrebno prethodno nasaditi stanice na pokrovnice u komorice sa 6 bunarića kao što je opisano u poglavlju 3.4.3. Svaka stanična linija nasadena je u 3 bunarića (negativna kontrola, GLI1, GLI3) dakle bojanje je provedeno na 24 uzorka.

1. DAN: Iz svakog bunarića komorice, u kojem su se nalazile pokrovnice sa stanicama, mikropipetom je izbačen medij, a potom su pokrovnice isprane 3 puta u PBS-u. Nakon toga kako bi fiksirali stanice na pokrovnice u svaki bunarić komorice je dodan 1ml 3,6%-tnog paraformaldehida u trajanju od 15 minuta. Treba paziti da se prilikom ispiranja i dodavanja otopina mikropipetom tekućina ispušta sa strane, a ne direktno po pokrovnica kako bi se izbjeglo ispiranje stanica s pokrovnica. Nakon fiksacije su pokrovnice opet isprane 3 puta u PBS-u nakon čega je dodan 1 mL metanola u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Uloga metanola je permeabilizacija stanične membrana čime se antitijelima omogućuje ulazak u stanicu. Nakon 15 minuta pokrovnice su ponovo isprane 3 puta u PBS-u, a potom prebačene u Falcon komorice sa 6 bunarića. U međuvremenu je u mikrovalnoj pećnici zagrijana prethodno pripremljena otopina za renaturaciju proteina (Epitope Retrieval buffer) (0,1 M natrij-citratni pufer, pH=6,0; tablica 3.1.) do vrenja. U svaki bunarić je dodan 1ml zagrijanog pufera u trajanju od 10 minuta nakon čega su ostavljeni još 20 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se ohladili. Za vrijeme hlađenja dolazi do renaturacije proteina, odnosno dolazi do otkrivanja antigena koji su sakriveni prilikom fiksiranja i uklapanja. Nakon toga pokrovnice su isprane jednom u PBS-u, a potom je u svaki bunarić dodan 1mL 3%-tnog vodikovog peroksida u metanolu (metanol : 30% H₂O₂=9 : 1) u trajanju od 10 minuta kako bi blokirali aktivnost endogene peroksidaze. U idućem koraku je uslijedilo ponovno ispiranje pokrovnica u PBS-u 3 puta, a potom kako bi se blokirale nespecifično vezanje antitijela je dodan Protein Block Serum-Free (Dako). Za svaku komoricu sa 6 bunarića se uzme komad parafilma na koji se kapne onoliko kapi seruma koliko ima pokrovnica, te se svaka pokrovnica izvrne na kap seruma i inkubiraju se pola sata. U sljedećem koraku na komad parafilma je nakapano 50 µL (volumen za 1 pokrovnicu) primarnog antitijela na koje se izvrnu pokrovnice. Primarna antitijela koja su korištena u ovom istraživanju su zečji anti-GLI1 IgG (Novus, NB600-600) i zečji anti-GLI3 IgG (Proteintech,19949-1-AP). Navedena antitijela je prije upotrebe bilo potrebno razrijediti u 2%-tnom BSA/ PBS-u u odgovarajućem omjeru: anti- GLI1 IgG : 2% BSA/ PBS = 1 : 200 te anti- GLI3 IgG : 2% BSA/ PBS = 1 : 100. Jedno i drugo antitijelo je poliklonsko. Prilikom bojanja uzorka za negativnu kontrolu jedina razlika u postupku je što je umjesto primarnog antitijela na stanice dodano 50 µL 2% BSA/ PBS-a. Stanice su potom inkubirane preko noći na +4°C.

2. DAN: Nakon inkubacije pokrovnice su isprane 3 puta u PBS-u, a potom je na komad parafilma nakapano univerzalno sekundarno antitijelo (Biotinylated link, Dako LSAB + System-HRP K067911) te su stanice inkubirane pola sata na sobnoj temperaturi (na svaku kap sekundarnog antitijela se izvrne jedna pokrovnica). Ponovo je uslijedilo ispiranje pokrovnica 3 puta u PBS-u nakon čega je na komad parafilma dodana otopina streptavidin-peroksidaze (Streptavidin-HRP, Dako LSAB + System-HRP K0679) na koju su izvrnute pokrovnice i inkubirane pola sata. Nakon pola sata pokrovnice su ponovo isprane u PBS-u tri puta, a na parafilm je nakapan kromogen DAB. Pokrovnice su izvrnute na DAB i inkubirane 7 minuta, a potom isprane u vodoovodnoj vodi u trajanju od 5 min. Nakon toga na parafilm je nakapan

hematoksilin na koji su izvrnute pokrovnice na 10 sec te potom isprane u vodovodnoj vodi u trajanju od 10 minuta. Zadnji korak je bio uklapanje. Na čistu predmetnicu dodana je kap sredstva za uklapanje Biomount na što je izvrnuta pokrovnica stanicama pritom pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka.

3.8. Imunofluorescencija (IF)

U ovom postupku su također kao uzorci korištene stanične linije. Kao i kod imunocitokemijskog bojanja stanice je bilo potrebno prethodno nasaditi na pokrovnice prema postupku prethodno opisanom u poglavlju 3.4.3. Prema protokolu bojanje se također odvija u dva dana.

1. DAN: Postupak je identičan onome opisanom u postupku imunocitokemijskog bojanja.

2. DAN: Nakon inkubacije uslijedilo je ispiranje pokrovnica PBS-om 3 puta. U idućem koraku je na komad parafilma nakapano 50 μ L sekundarnog antitijela obilježenog bojom Texas Red (fluorescira crveno) za detekciju proteina od interesa što čini glavnu razliku ovog protokola u odnosu na imunocitokemijsko bojanje gdje je za to korišten kromogen. Pokrovnice sa stanicama su izvrnute na kapljice sekundarnog antitijela, a potom inkubirane 1 sat u mraku (komorice sa 6 bunarića omotane folijom). Nakon inkubacije je uslijedilo uklapanje na predmetno stakalce pomoću sredstva za uklapanje Biomount (BioGnost) koji sadrži boju DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) koja služi za protubojenje jezgri. Nakon uklapanja, preparati su ostavljeni na sušenju u mraku (1 dan), nakon čega su fiskirani lakom za nokte.

3.9. Mikroskopiranje

Očitavanje je rađeno na svjetlosnom (Zavod za molekularnu biologiju) i konfokalnom (Zavod za molekularnu biologiju) mikroskopu.

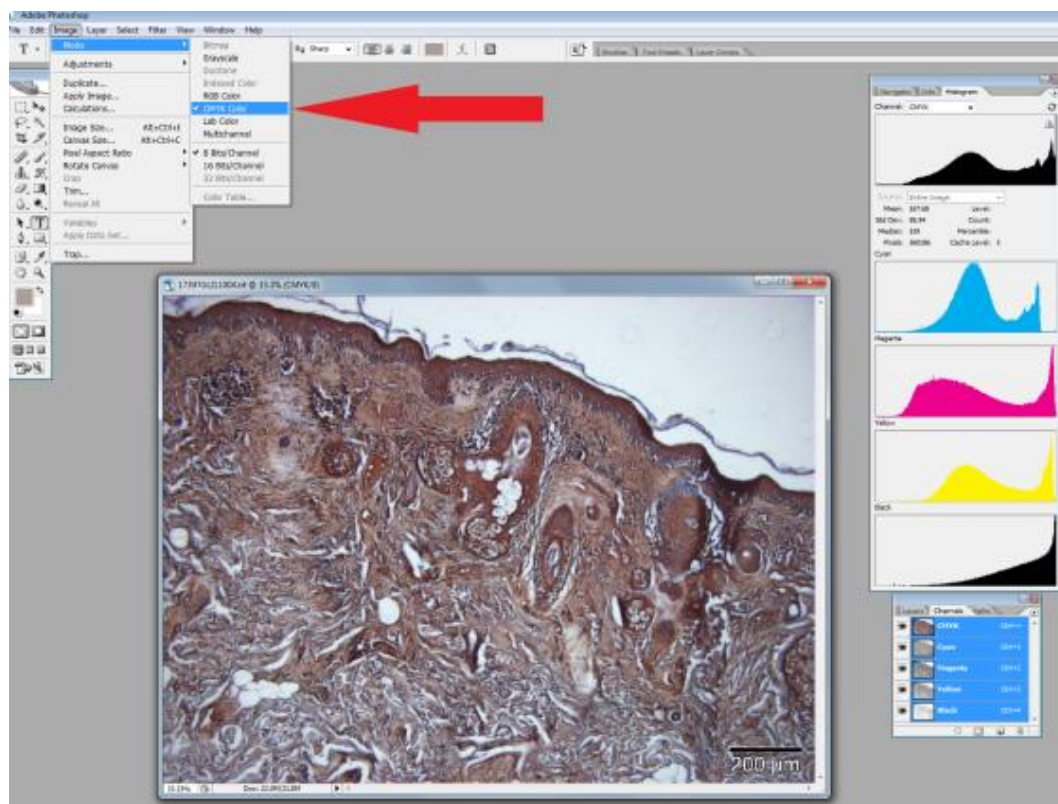
Marka korištenog konfokalnog mikroskopa je Leica TCS-SP2-AOBS (Microsystem, Njemačka) i ima objektiv 63 x 1,40 OI. Imunofluorescentne slike su analizirane softverom Leica Confocal.

3.10. Računalna metoda kvantifikacije imunohistokemijskih rezultata

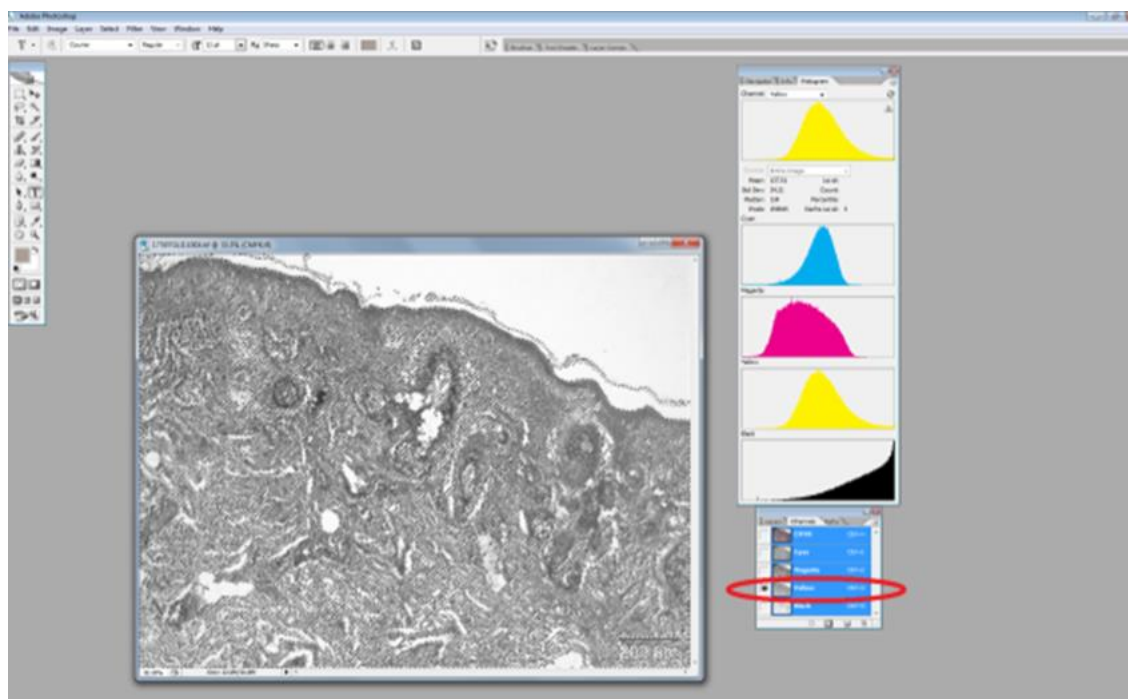
Kvantifikacija, tj. određivanje intenziteta imunohistokemijskog bojanja preparata provedena je računalnom analizom digitalnih fotografija u programu Adobe Photoshop CS2 9.0. Na svjetlosnom mikroskopu uslikane su digitalne fotografije svih uzoraka tkiva. Za sve slike histoloških preparata namijenjenih za mjerenje intenziteta obojenja korišteno je povećanje 100x. Intenzitet obojenja određen je metodom koju su predstavili Pham i sur. 2007. Spomenuta metoda koristi Cyan/Magenta/Yellow/Key (CMYK) model za automatsku računalnu procjenu intenziteta pozitivnog signala bojenja u žutom dijelu spektra. Prednost ove metode je da ne zahtijeva skupe i specijalizirane programe za kvantifikaciju rezultata imunohistokemijskog bojenja, a istovremeno pruža vrlo visoku korelaciju sa uobičajenim metodama procjene intenziteta obojenja od strane liječnika patologa.

Prilikom izvođenja ove metode učinjeni su sljedeći koraci:

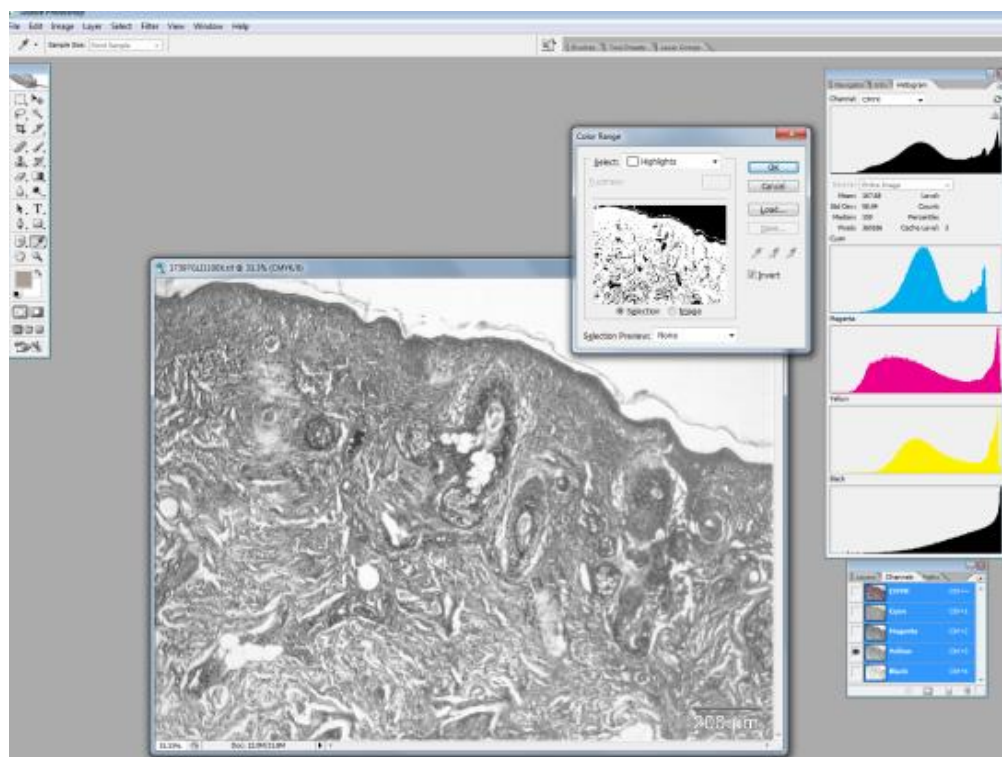
- Slika je pretvorena u CMYK oblik (eng. *Convert to CMYK*) (slika 3.3.)
- Odabran je žuti kanal (eng. *select yellow channel*) (slika 3.4.)
- Odabran je sav pozitivan signal na slici (eng. *select color range - highlights, inverted*) (slika 3.5.)
- Funkcijom Histogram očitao je prosječni intenzitet žutog signala (eng. *histogram – read average yellow intensity*) (slika 3.6.)



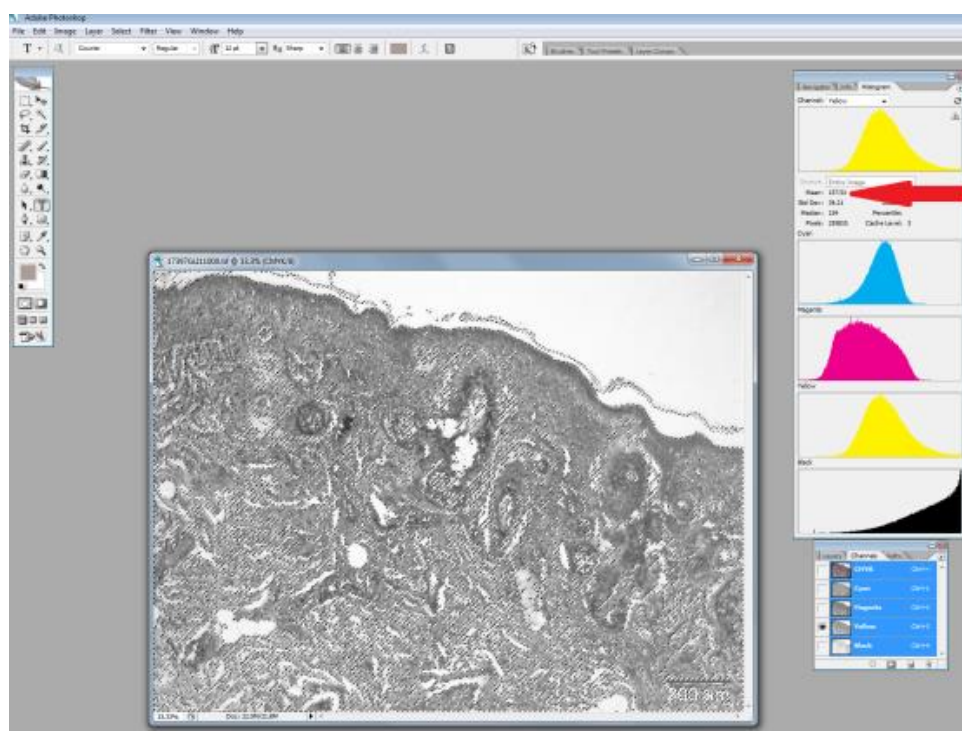
Slika 3.3. Prikaz prozora s analiziranom digitalnom fotografijom u programu Adobe Photoshop CS2 9.0. Odabrana je opcija prebacivanja u CMYK oblik.



Slika 3.4. Prikaz prozora s analiziranom digitalnom fotografijom u programu Adobe Photoshop CS2 9.0. Odabrana je opcija žuti kanal.



Slika 3.5. Prikaz prozora s analiziranom digitalnom fotografijom u programu Adobe Photoshop CS2 9.0. Odabrana je opcija sav pozitivan kanal na slici.



Slika 3.6. Prikaz prozora s analiziranom digitalnom fotografijom u programu Adobe Photoshop CS2 9.0. Prikaz očitane prosječnog intenziteta žutog signala.

Ovako očitani brojevi su upisani u Excel dokument u programskom paketu Office. Obzirom da histogram mjeri broj svijetlih piksela, a nas zanima broj tamnih, željena vrijednost intenziteta obojenja dobivena je oduzimanjem očitane srednje vrijednosti piksela od broja 255, jer je raspon za svaku boju u CMYK modu 0-255. Na primjeru prikazanom na slikama 3.1-3-4 dobiven je srednji broj piksela 137,51. Dakle, intezitet obojenja proteina GLI1 za ovu sliku (uzorak) iznosi $255-137,51=117,49$, pri čemu broj 255 označava maksimalni mogući broj bijelih piksela, kod potpunog nedostatka obojenja.

Da bi ovako dobivene rezultate prikazali u obliku semi-kvantitativne skale koja je uobičajena kada patolog procjenjuje intenzitet imunohistokemijskog bojanja (skala 0-3 / gdje 0 označava odsutnost, a 3 maksimalni intenzitet obojenja), dobivene vrijednosti intenziteta su kategorizirane u četiri skupine. Maksimalna izmjerena vrijednost srednjeg broja piksela za negativne kontrole (u našem slučaju 57,94) označena je kao gornja granica negativnog rezultata (skupina 0). Preostali raspon od navedene maksimalne vrijednosti za negativne kontrole do maksimalne vrijednosti izmjerene za svaki pojedini protein je podijeljen na tri jednaka dijela koji predstavljaju intenzitete bojanja (skupine) 1, 2 i 3. Intenzitet obojenja izmjeren za svaki preparat je kategoriziran u tako definirane četiri skupine, posebno za GLI1 i posebno za GLI3 protein.

3.11. Statistička analiza rezultata

Razlika u distribuciji kategorija imunohistokemijskog obojenja ovisno o tipu proteina ili T stadiju melanoma testirana jer pomoću hi-kvadrat testa. Normalnost distribucije postotaka stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa testirana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa. Razlika u staničnom ciklusu između netretiranih i tretiranih stanica testirana je pomoću jednosmjerne analize varijance (*one-way ANOVA*) uz korištenje Dunnetovog *post hoc* testa za međusobnu usporedbu svakog pojedinog tretmana s netretiranim stanicama. *P*-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim. Statistička analiza provedena je pomoću programa MedCalc 18.2.1 (MedCalc Software) i GraphPadPrism 7.0.1 (GraphPad Software).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u uzorcima tkiva primarnih melanoma

Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u primarnom melanomu kože istražena je imunohistokemijskim bojanjem 67 arhivskih uzoraka tumorskog tkiva, a razina ekspresije određena je računalnom analizom digitalnih mikroskopskih fotografija tkivnih preparata.

Intenzitet obojenja preparata na testirane proteine prikazan je u skali od 0 do 3, gdje 0 predstavlja izostanak pozitivne reakcije, a 3 najveći intenzitet bojanja, odnosno jaku ekspresiju promatranog proteina. Ovako izražene vrijednosti govore o prisutnosti i intenzitetu ekspresije testiranih proteina signalnog puta HH-GLI, GLI1 i GLI3.

Rezultati imunohistokemijske analize pokazali su da većina uzoraka tkiva primarnog melanoma pokazuje ekspresiju proteina GLI1 i GLI3. Najviše uzoraka imalo je intenzitet 1 za oba proteina, dok je broj uzoraka s intenzitetom 2 bio podjednak za protein GLI1 i GLI3. Najmanji broj uzoraka je pokazao najjače obojenje intenziteta 3. Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike u jačini obojenja između proteina GLI1 i GLI3 ($P=0,1397$).

Postojanje ekspresije transkripcijskih faktora GLI1 i GLI3 potvrđuje da je signalni put HH-GLI aktivan u melanomu, što su već pokazala dosadašnja istraživanja.^{4,5}

Tablica 4.1. Rezultati intenziteta imunohistokemijske reakcije na testirane proteine GLI1 i GLI3 u parafinskim uzorcima tkiva primarnog melanoma kože. 0 - izostanak pozitivne reakcije, 1 - slaba pozitivna reakcija, 2 - umjerena pozitivna reakcija, 3 - jaka pozitivna reakcija, n - broj uzoraka tkiva. Intenzitet obojenja određen je na temelju mikroskopskih fotografija histoloških preparata u programu Adobe Photoshop inačica CS2 9.0.

Intenzitet	GLI1		GLI3	
	n	%	n	%
0	8	11,94	3	4,48
1	29	43,28	38	56,72
2	24	35,82	24	35,82
3	6	8,96	2	2,99

Nadalje je promatrana ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u različitim stadijima primarnog tumora: Tis i T4. Tis stadij se definira kao melanom *in situ* kod kojeg nema invazije, dok kod T4 stadija dolazi do invazije cijelog dermisa i hipodermisa, a postoji i mogućnost metastaziranja. Tis ima najbolju prognozu, dok suprotno tome T4 ima najlošiju prognozu.

Rezultati mog istraživanja pokazuju da kod ekspresije proteina GLI1 u uzorcima tumora stadija Tis prevladava intenzitet 1, dok je u uzorcima stadija T4 ekspresija proteina GLI1 jača, odnosno prevladava intenzitet 2 (tablica 4.2.). Statistička analiza je potvrdila da postoji značajna razlika u jačini ekspresije između stadija Tis i T4 ($P=0,0153$). Ista situacija se može primijetiti i kod ekspresije proteina GLI3 (tablica 4.3.) kod kojeg također postoji statistički značajna razlika u intenzitetu obojenja između tumora stadija Tis i T4 ($P=0,0008$).

Tablica 4.2. Intenzitet ekspresije proteina GLI1 u uzorcima tkiva tumora u stadiju Tis i T4. Statistički značajna vrijednost $P=0.0153$. 0 - izostanak pozitivne reakcije, 1 - slaba pozitivna reakcija, 2 - umjerena pozitivna reakcija, 3 - jaka pozitivna reakcija, n- broj uzoraka tkiva.

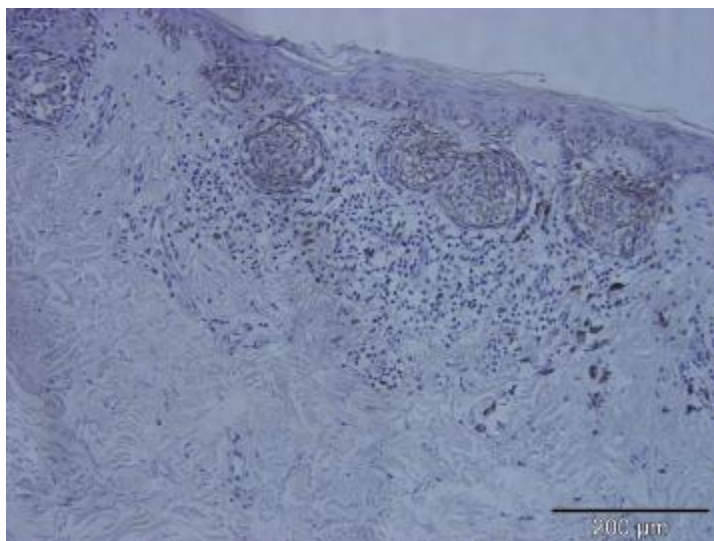
Intenzitet	Tis		T4	
	n	%	n	%
0	5	13,89	3	9,68
1	20	55,56	9	29,03
2	10	27,78	14	45,16
3	1	2,78	5	16,13

Tablica 4.3. Intenzitet ekspresije proteina GLI3 u uzorcima tkiva tumora u stadiju Tis i T4. Statistički značajna vrijednost $P=0,0008$. 0 - izostanak pozitivne reakcije, 1 - slaba pozitivna reakcija, 2 - umjerena pozitivna reakcija, 3 - jaka pozitivna reakcija, n - broj uzoraka tkiva.

Intenzitet	Tis		T4	
	n	%	n	%
0	3	8,33	0	0,00
1	25	69,44	13	41,94
2	8	22,22	16	51,61
3	0	0,00	2	6,45

Na fotografijama histoloških preaprata tkiva postoji vidljiva razlika u intenzitetima ekspresije proteina. Pozitivna reakcija ekspresije se očitava kao smeđe obojenje, a samim time što je prisutnije i intenzivnije smeđe obojenje veća je ekspresija proteina. Na nekim uzorcima

tkiva vidljivo je i smeđe obojenje za intenzitet 0, ali uzrok tom obojenju je uglavnom pigment melanin. (slika 4.1.)

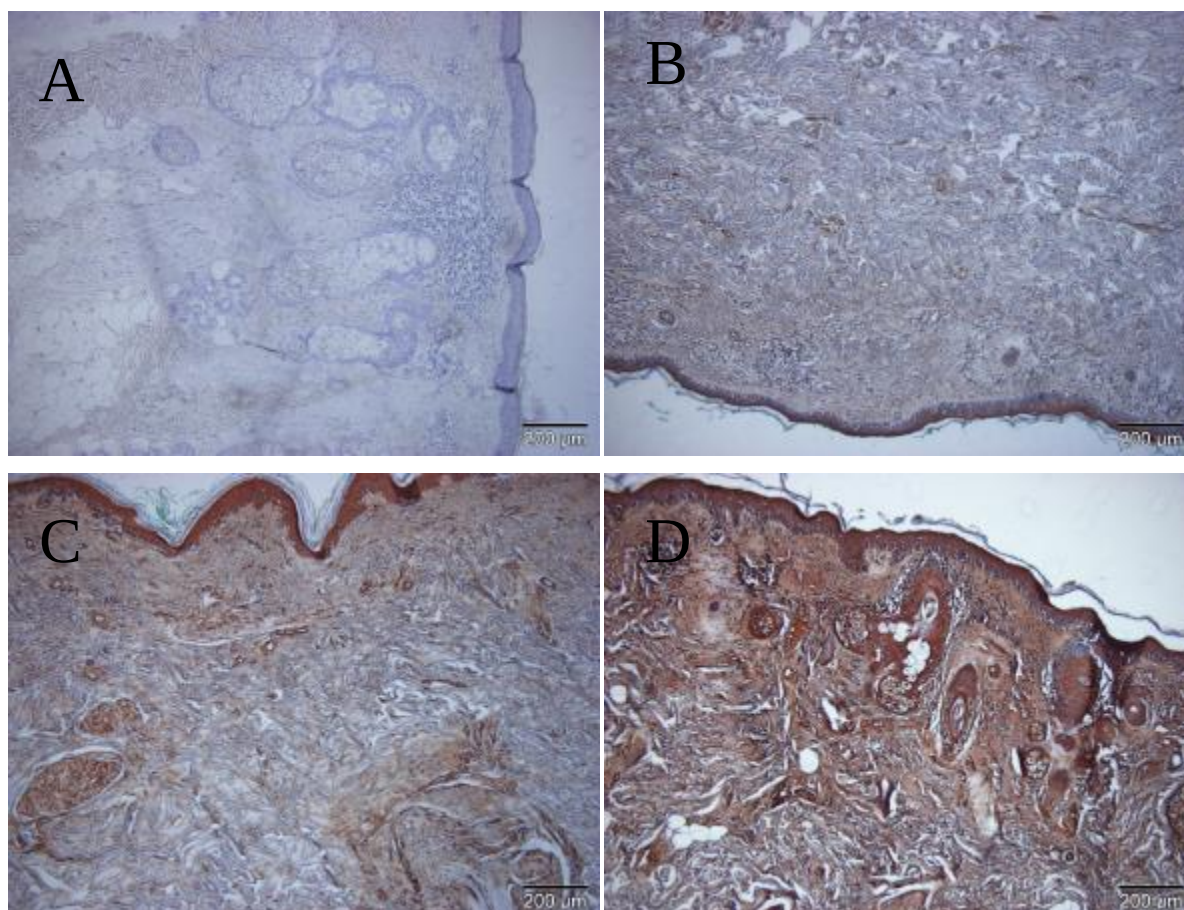


Slika 4.1. Mikroskopska fotografija histološkog preparata na koji nije dodano primarno antitijelo (negativna kontrola). Na ovom preparatu tamno smeđe obojenje daju zrnca melanina.

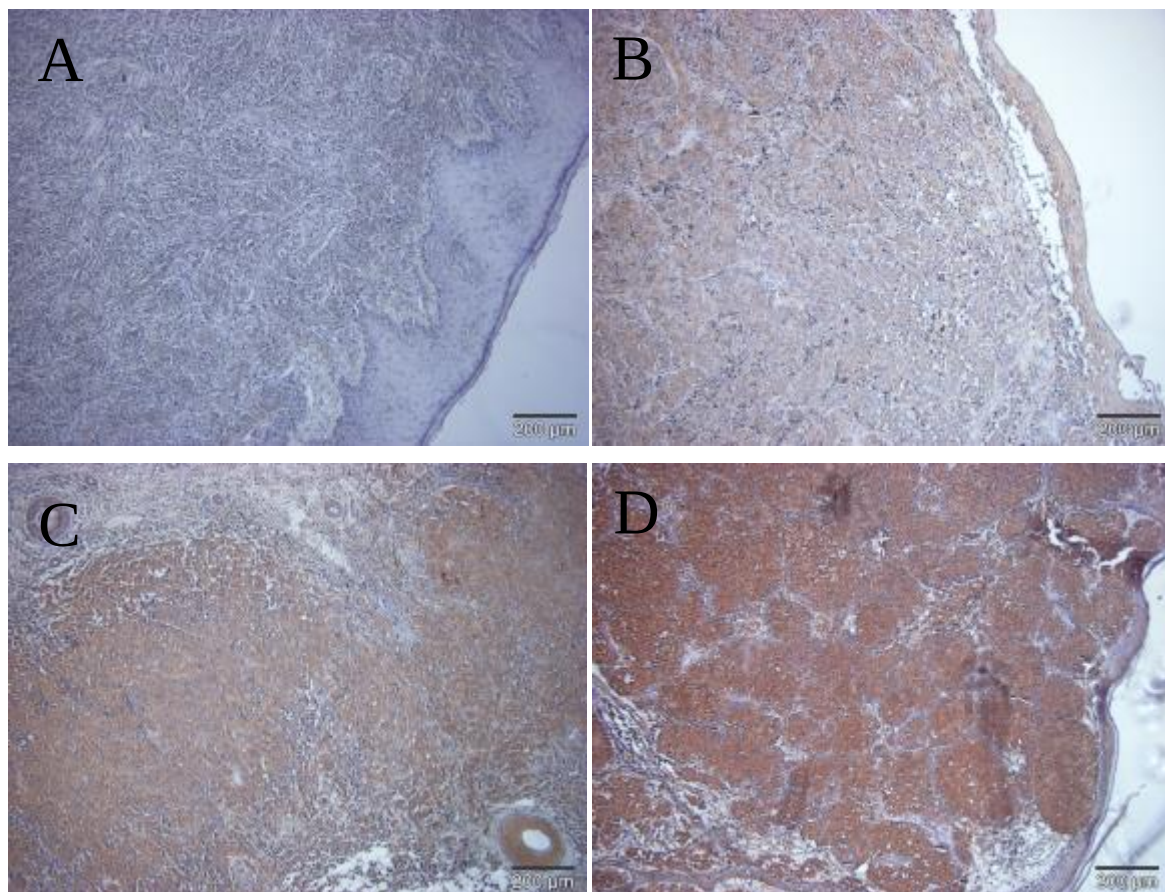
Pri usporedbi izgleda tkiva za stadij Tis vidi se kako je epitel uglavnom zaglađen bez značajnih invazija u dermis dok kod T4 stadija postoji jaka invazija dermisa i porast tumorske mase, te epitel više nije zaglađen (slika 4.2. – 4.5.).

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju poveznicu između ekspresije proteina GLI1 i GLI3 sa različitim stadijem primarnog tumora. Što je tumor invazivniji (stadij T4), to je veća ekspresija proteina, odnosno prevladavaju tumori intenziteta 2. S druge strane kod uzoraka tumora u početnom stadiju (Tis) prevladava ekspresija intenziteta 1. Također, tumori najjačeg intenziteta 3 gotovo isključivo pripadaju stadiju T4 (tablica 4.2. i 4.3.).

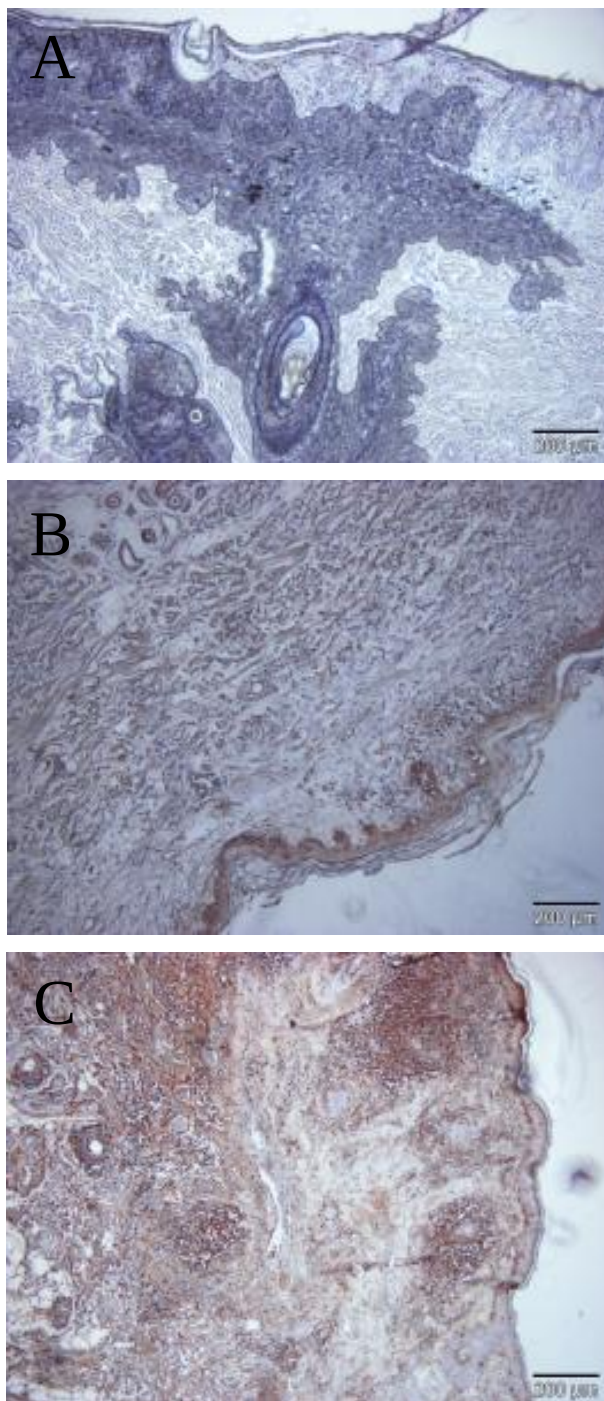
Ostaje za utvrditi kakva je razina ekspresije proteina GLI1 i GLI3 u tumorima stadija T1, T2 i T3, odnosno postoji li linearna povezanost ekspresije ta dva proteina sa stadijem razvoja primarnog melanoma. Također, što je još važnije, potrebno je istražiti može li se razina proteinske ekspresije povezati i sa stopom preživljenja pacijenata, pri čemu bi se proteini GLI mogli koristiti kao mogući prognostički biljezi kod oboljelih od primarnog melanoma kože.



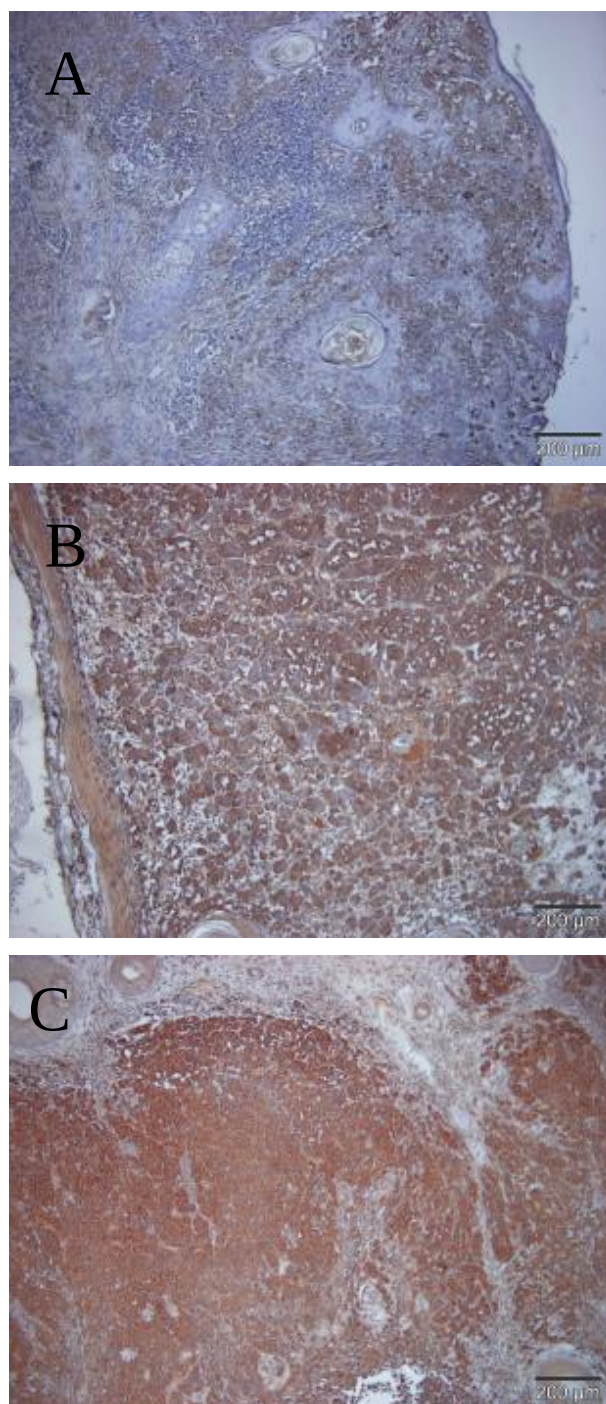
Slika 4.2. Mikroskopske fotografije histoloških preparata. Na slici su prikazani rezultati bojanja uzorka tkiva klasificiranog prema TNM kao stadij Tis. Slike A-D prikazuju ekspresiju proteina GLI1 u intenzitetu 0-3 (A- 0, B-1, C-2, D-3).



Slika 4.3. Mikroskopske fotografije histoloških preparata. Na slici su prikazani rezultati bojanja uzorka tkiva klasificiranog prema TNM kao stadij T4. Slike A-D prikazuju ekspresiju proteina GLI1 u intenzitetu 0-3 (A- 0, B-1, C-2, D-3).



Slika 4.4. Mikroskopske fotografije histoloških preparata. Na slici su prikazani rezultati bojanja uzorka tkiva klasificiranog prema TNM kao stadij Tis. Slike A-D prikazuju ekspresiju proteina GLI3 u intenzitetu 0-2 (A- 0, B-1, C-2).

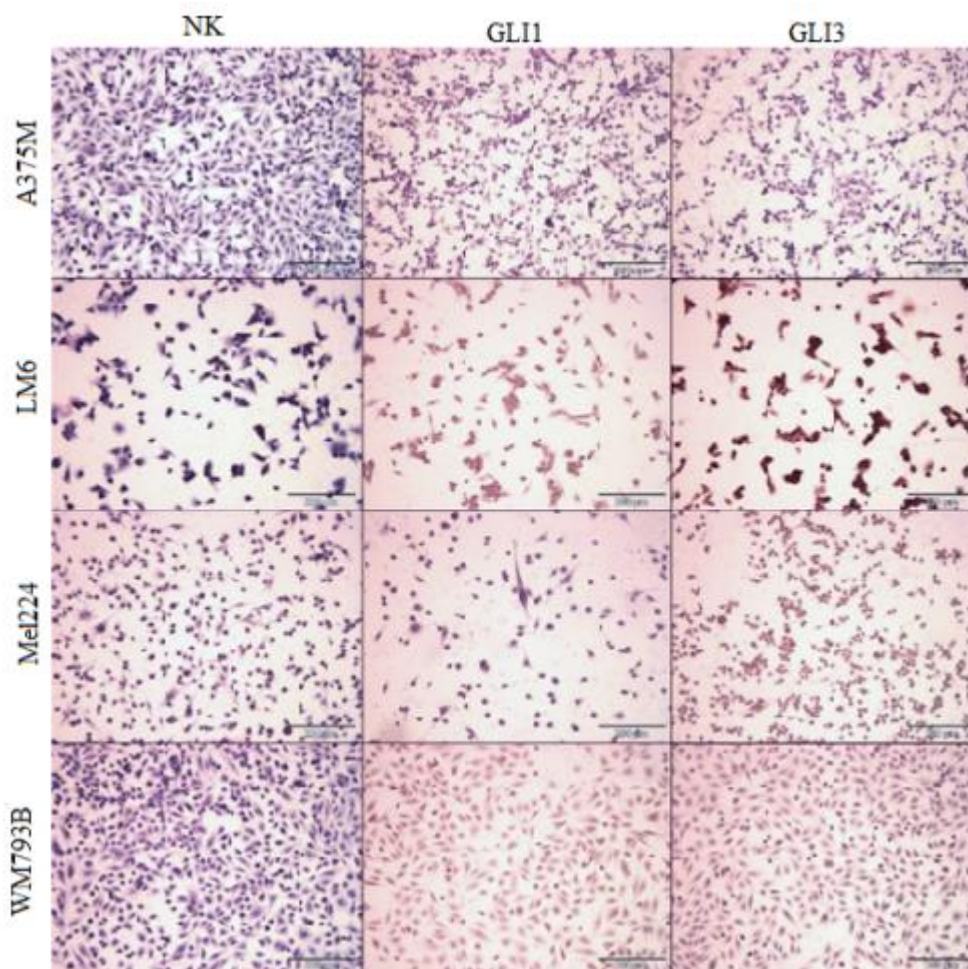


Slika 4.5. Mikroskopske fotografije histoloških preparata. Na slici su prikazani rezultati bojanja uzorka tkiva klasificiranog prema TNM kao stadij T4. Slike A-C prikazuju ekspresiju proteina GLI3 u intenzitetu 1-3 (A-1, B-2, C-3)

4.2. Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u humanim staničnim linijama melanoma

Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u melanomima dodatno je istražena u humanim staničnim linijama WM793B i LM6, kao modelima primarnog melanoma, te A375M i Mel224, kao modelima metastatskog melanoma, metodom imunocitokemije.

Rezultati imunocitokemijskog bojanja pokazuju da i humane stanične linije pokazuju ekspresiju proteina GLI i GLI3 (slika 4.6.), dakle signalni put HH-GLI je aktivan u humanim staničnim linijama melanoma. U staničnim linijama A375M i Mel224 ekspresija proteina GLI1 i GLI3 je slična. Razliku u ekspresiji vidimo kod staničnih linija WM793B i LM6 kod kojih je uočena razlika u jačoj ekspresiji proteina GLI3 u odnosu na GLI1. Također, vizualno se primjećuje da je ekspresija oba proteina generalno jača u staničnim linijama primarnog melanoma u usporedbi s metastatskim, što je u suprotnosti sa starijim istraživanjem Stecce i sur. iz 2007.⁵



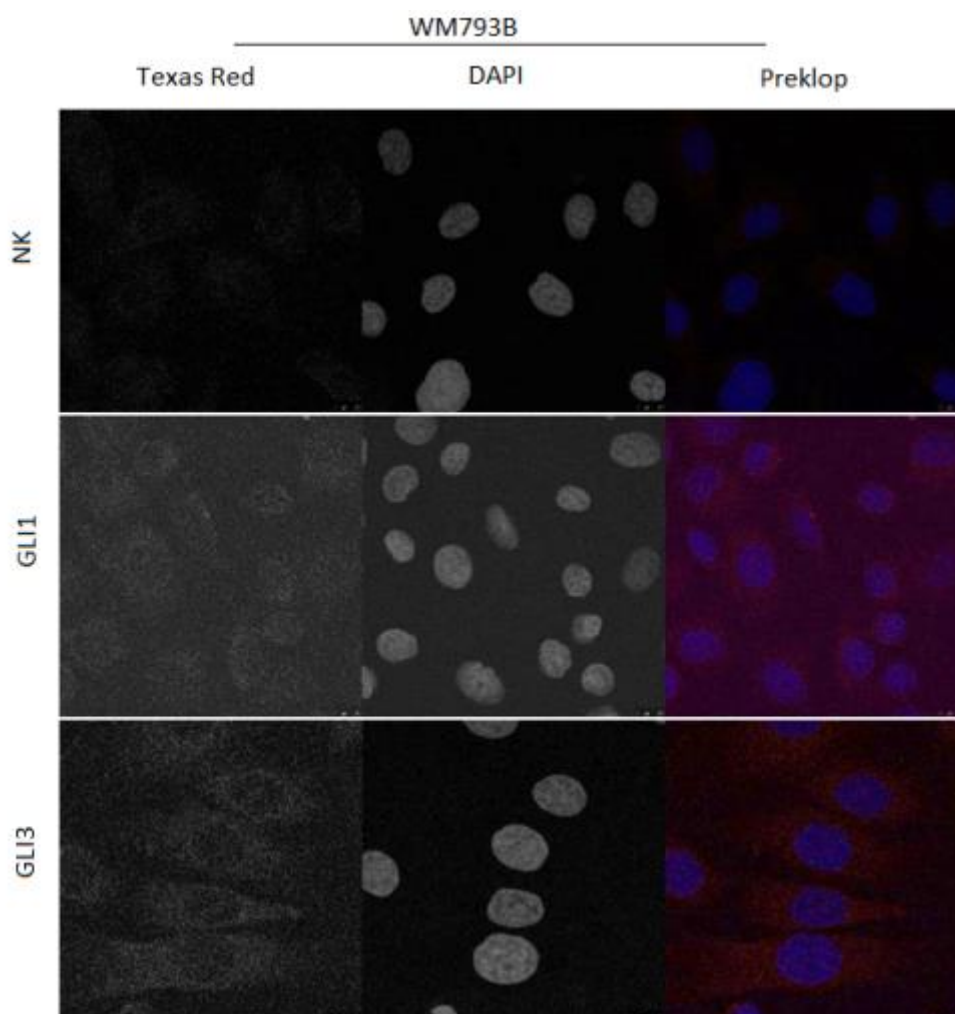
Slika 4.6. Imunocitokemijsko bojanje stanica. Na slici su prikazani rezultati bojanja za negativnu kontrolu (NK) te proteine GLI1 i GLI3 u četiri stanične linije humanog melanoma: A375M, LM6, Mel224 i WM793B. Sve su fotografije napravljene na svjetlosnom mikroskopu, povećanje 20x, IRB

4.3. Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 u stanicima

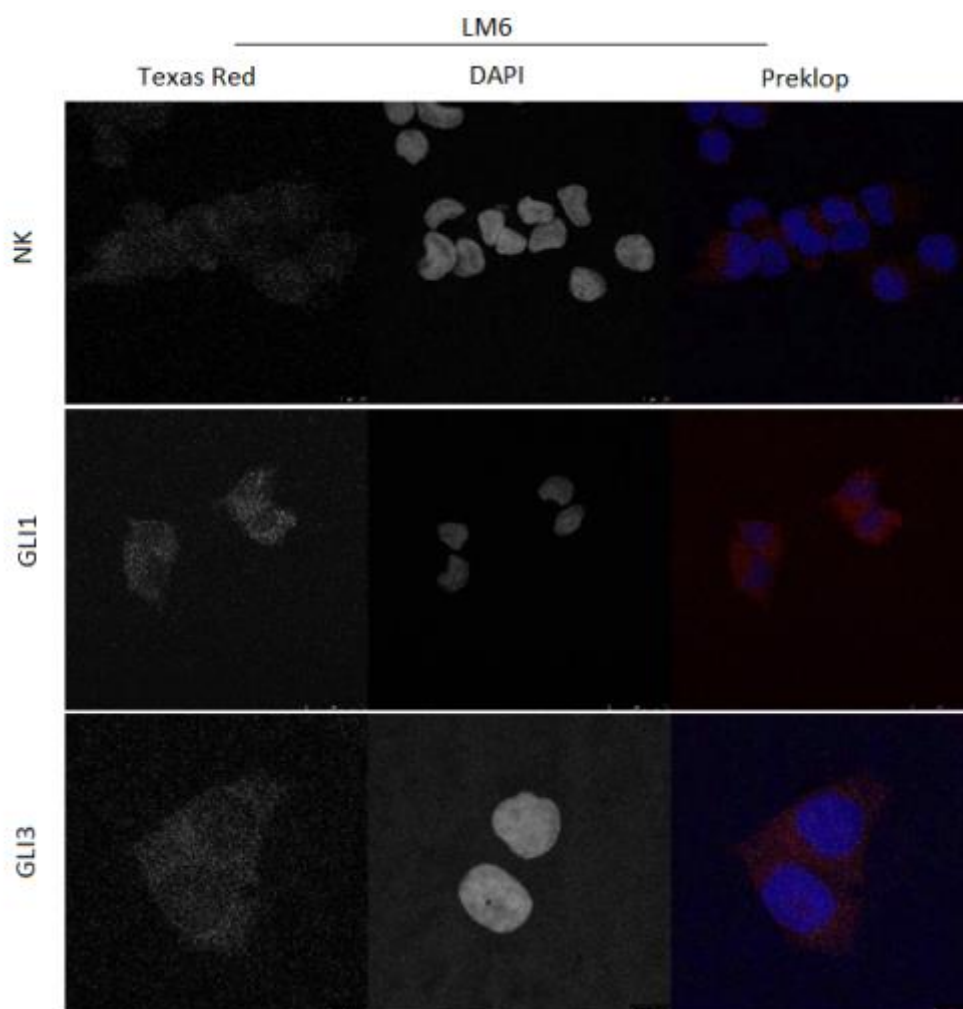
Za precizniju lokalizaciju proteina GLI1 i GLI3 unutar staničnih odjeljaka koristili smo metodu imunofluorescence.

Rezultati imunofluorescence pokazuju da su proteini GLI1 i GLI3 smješteni u jezgri ili citoplazmi ili u oba stanična odjeljka, što je u skladu s očekivanjima obzirom da se radi o transkripcijskim faktorima koji kada su aktivni se nalaze u jezgri, a u citoplazmi se nalaze u represorskom obliku. Kod stanične linije WM793B vidimo lokalizaciju proteina GLI3 u citoplazmi, dok je GLI1 lokaliziran u blizini jezgrine ovojnice, te se malim dijelom nazire

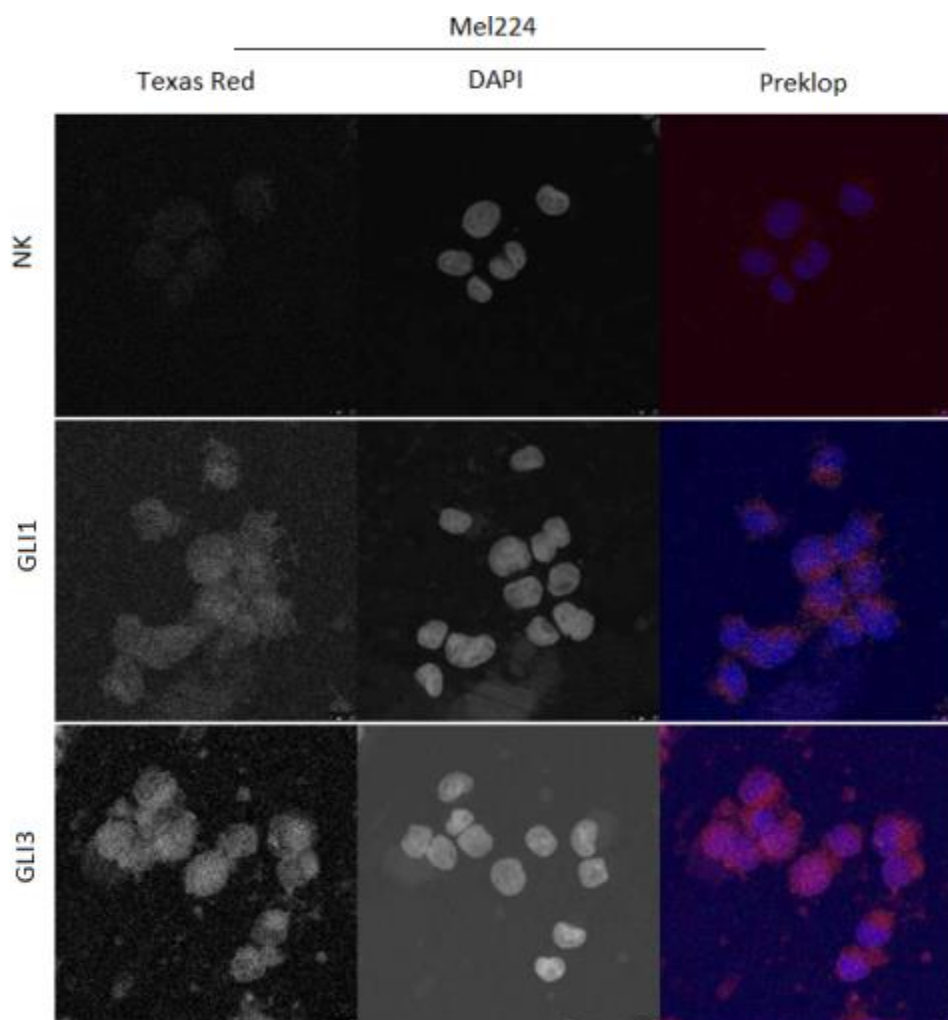
njegova lokalizacija u jezgri, ali zbog nedovoljne jačine signala (starost sekundarnog antitijela obilježnog Texas Red-om) ne možemo biti sigurni je li lokaliziran u jezgri (slika 4.7.). U staničnoj liniji LM6 proteini GLI 1 i GLI3 su kolokalizirani u citoplazmi (slika 4.8.). Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 je kod stanične linije Mel224 zabilježena u jezgri (slika 4.9.). Obzirom da se radi o metastatskoj liniji to može biti očekivano. Kod stanične linije A375M lokalizacija proteina GLI1 je blizu jezgrine ovojnice, dok se protein GLI3 nalazi u citoplazmi (slika 4.10.).



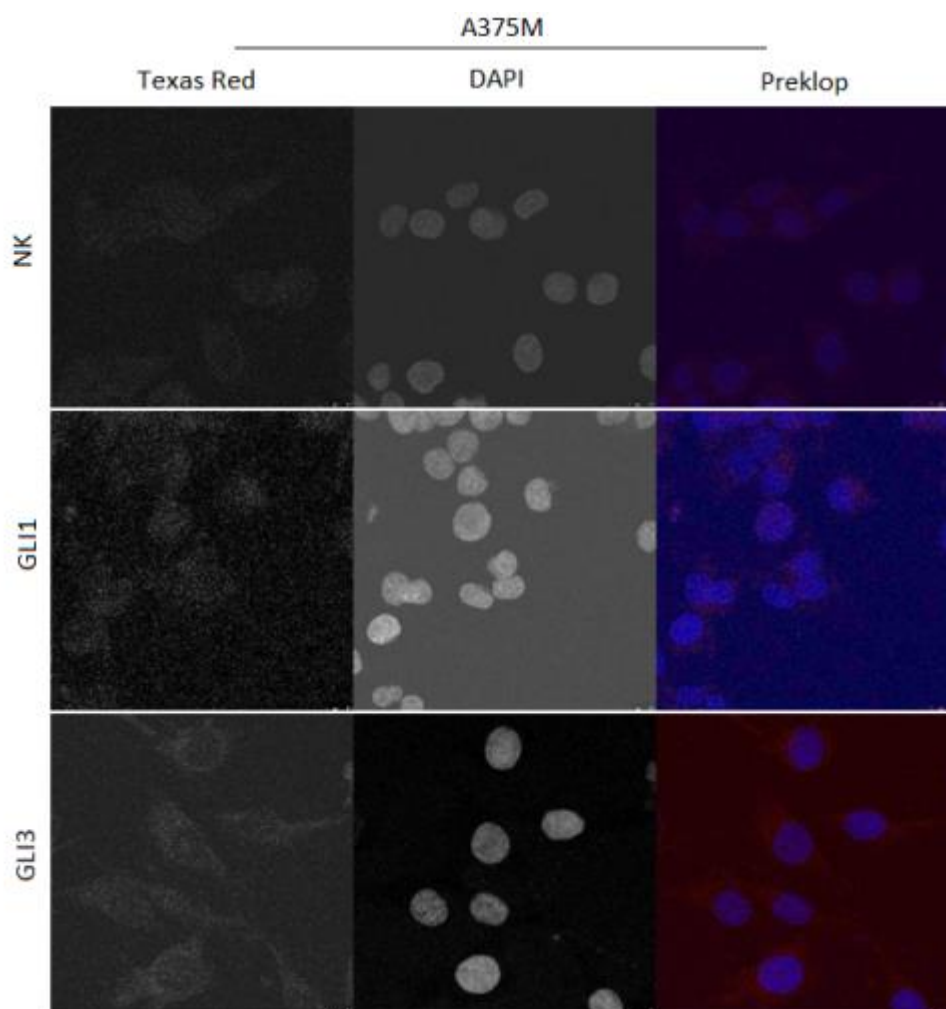
Slika 4.7. Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 u staničnoj liniji WM793B. Na slici su prikazani rezultati imunofluorescencijskog bojanja stanica sekundarnim antitijelom označenim fluorescentom bojom Texas Red (crveno obojenje). Za obojenje jezgri je upotrijebljen DAPI (boji jezgre stanica u plavo)



Slika 4.8. Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 u staničnoj liniji LM6. Na slici su prikazani rezultati imunofluorescencijskog bojanja stanica sekundarnim antitijelom označenim fluorescentom bojom Texas Red (crveno obojenje). Za obojenje jezgri je upotrijebljen DAPI (boji jezgre stanica u plavo)



Slika 4.9. Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 u staničnoj liniji Mel 224. Na slici su prikazani rezultati imunofluorescencijskog bojanja stanica sekundarnim antitijelom označenim fluorescentom bojom Texas Red (crveno obojenje). Za obojenje jezgri je upotrijebljen DAPI (boji jezgre stanica u plavo)



Slika 4.10. Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 u staničnoj liniji A375M. Na slici su prikazani rezultati imunofluorescencijskog bojanja stanica sekundarnim antitijelom označenim fluorescentom bojom Texas Red (crveno obojenje). Za obojenje jezgri je upotrijebljen DAPI (boji jezgre stanica u plavo)

4.4. Utjecaj aktivacije i inhibicije signalnog puta HH-GLI na stanični ciklus

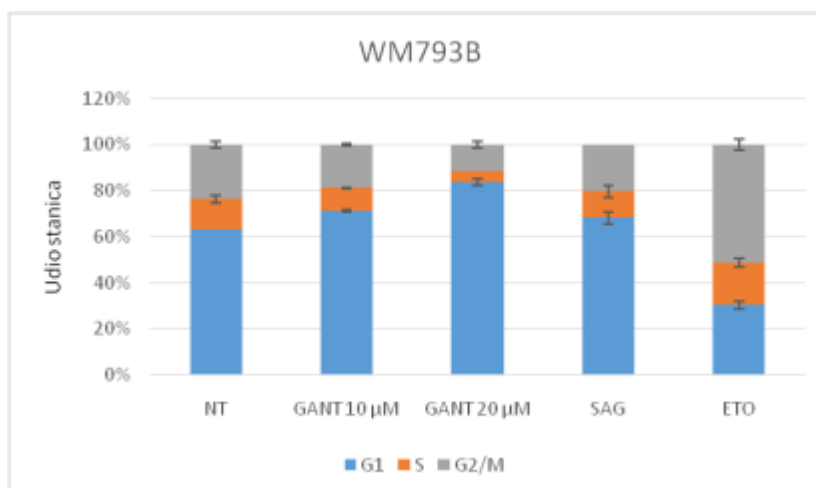
Da bi istražili moguću korist inhibitora i aktivatora signalnog puta HH-GLI za liječenje melanoma analizirali smo njihov utjecaj na stanični ciklus, pošto je poznato da je disregulacija staničnog ciklusa jedna od oznaka razvoja melanoma.³⁹ U tu svrhu tretirali smo humane stanične linije WM793B, LM6, A375M i Mel224 s GANT61, SAG-om i etopozidom (ETO) te postotak stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa odredili pomoću aparata MUSE *Cell Analyzer*.

Rezultati su pokazali da kod svih staničnih linija tretiranih etopozidom vidimo statistički značajan porast broja stanica u fazi G2/M u odnosu na netretirane stanice (slika 4.14., 4.18., 4.22. i 4.26.). To je u skladu s očekivanjima obzirom da je etopozid citostatik koji vezanjem na protein tubulin sprječava stvaranje staničnog diobenog vretena te zaustavlja stanice u metafazi mitoze i fazi G2 staničnog ciklusa. ETO je dodatno korišten i kao kontrola da li aparat MUSE dobro radi, obzirom da se zna da ETO radi zastoj u G2/M fazi.⁴⁰

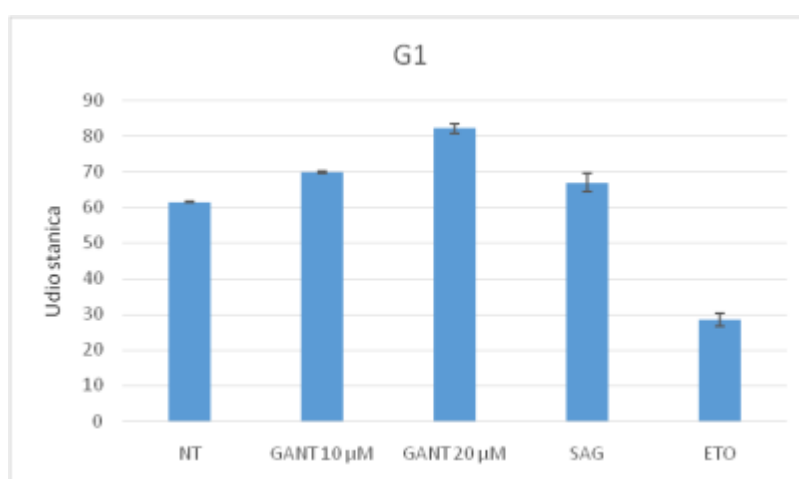
Kod staničnih linija tretiranih SAG-om ne postoje statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanične linije. Iako SAG djeluje kao aktivator signalnog puta, obzirom da je u tumorskim stanicama signalni put već aktivan, SAG ga ne aktivira dodatno. Inače, SAG djeluje na način da potiče proliferaciju i ubrzava vrijeme duplikacije stanica.⁴¹

Kod staničnih linija tretiranih s GANT61 (10 μ M i 20 μ M) postoje značajne razlike utjecaja GANT-a u odnosu na netretirane stanice, a među njima su najznačajnije one koje rade zastoj u G1 fazi, obzirom da je upravo to mehanizam djelovanja GANT-a.⁴² Takav slučaj imamo kod staničnih linija LM6, WM793B i Mel224 (slika 4.12., 4.16. i 4.20.). Uz to imamo i značajan utjecaj GANT61 (20 μ M) na S fazu kod stanične linije A375M. Iako je primarni mehanizam GANT-a zastoj u G1 fazi, u slučaju prevelikog oštećenja DNA može raditi i zastoj u S fazi, što je ovdje upravo i slučaj obzirom da se radi o metastatskim stanicama.

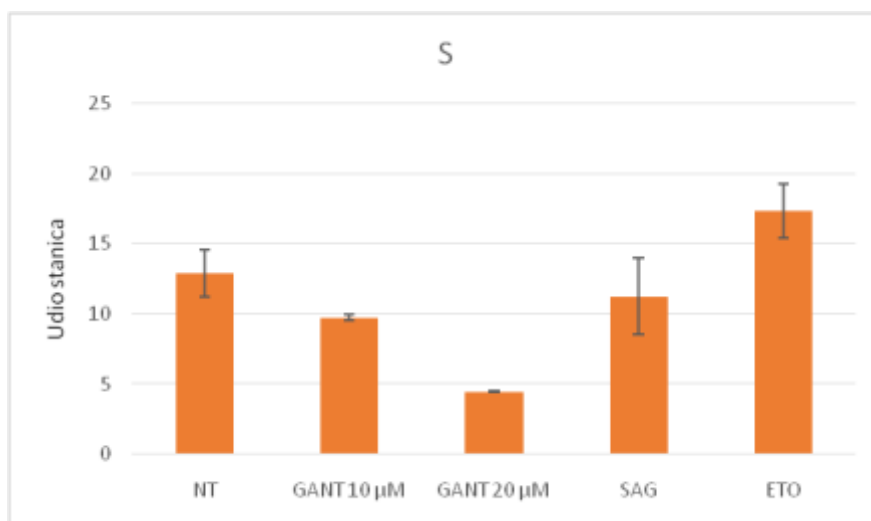
Dodatno, proučavanjem populacijskog profila stanica (slika 4.27.) primijećeno je da kod tretmana GANT-om (20 μ M) stanice umiru puno više nego što bi trebale u odnosu na tretman nižom koncentracijom GANT-a (10 μ M). Na temelju toga može se izvesti zaključak da bi GANT u većim koncentracijama mogao biti znatno letalan.



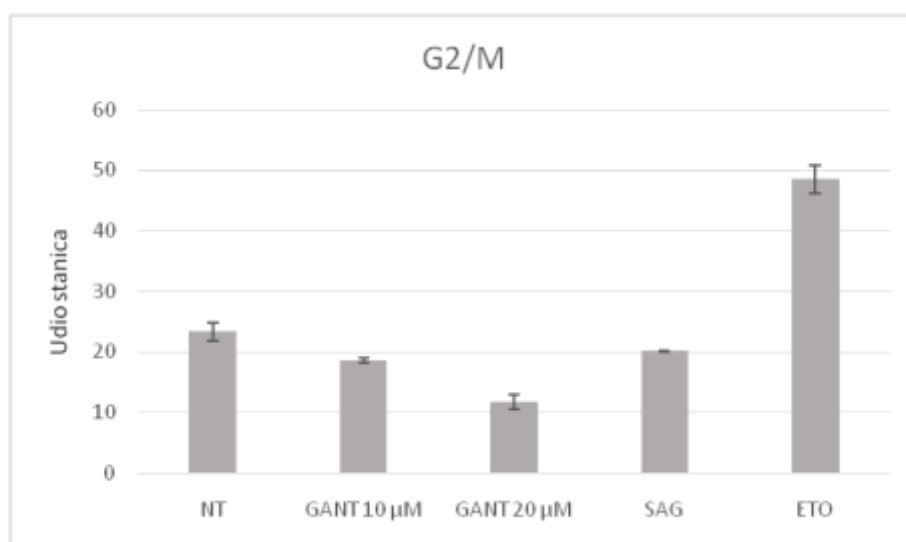
Slika 4.11. Zbirni prikaz utjecaja pojedinih tretmana na faze staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija WM793B tretirana je sa sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa).



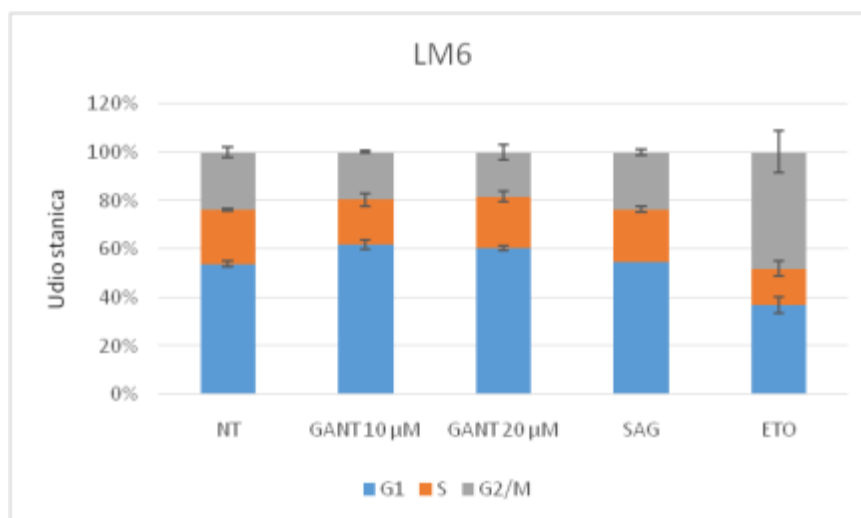
Slika 4. 12. Utjecaj kemijskih spojeva na G1 fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija WM793B tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 i ETO na stanični ciklus ($P < 0,0001$).



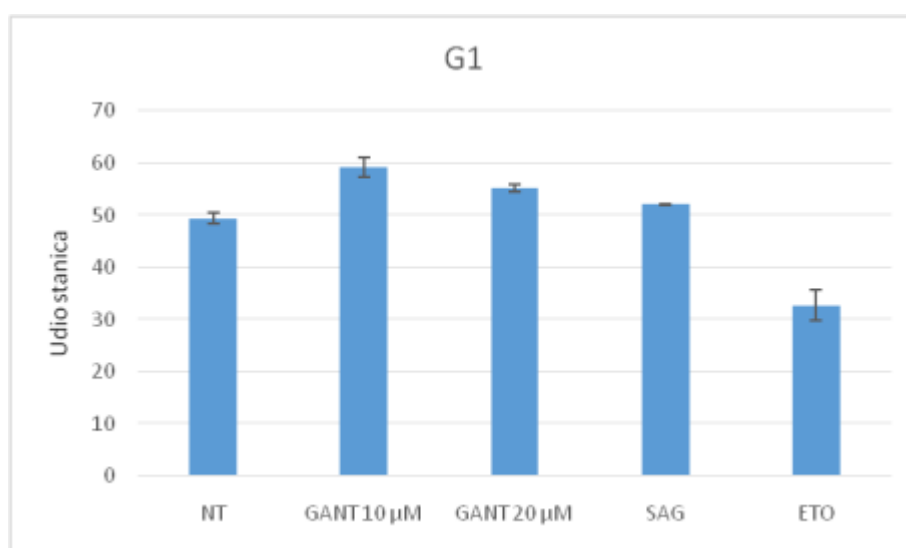
Slika 4.13. Utjecaj kemijskih spojeva na S fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija WM793B tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 (20 µM) na stanični ciklus ($P=0,0013$).



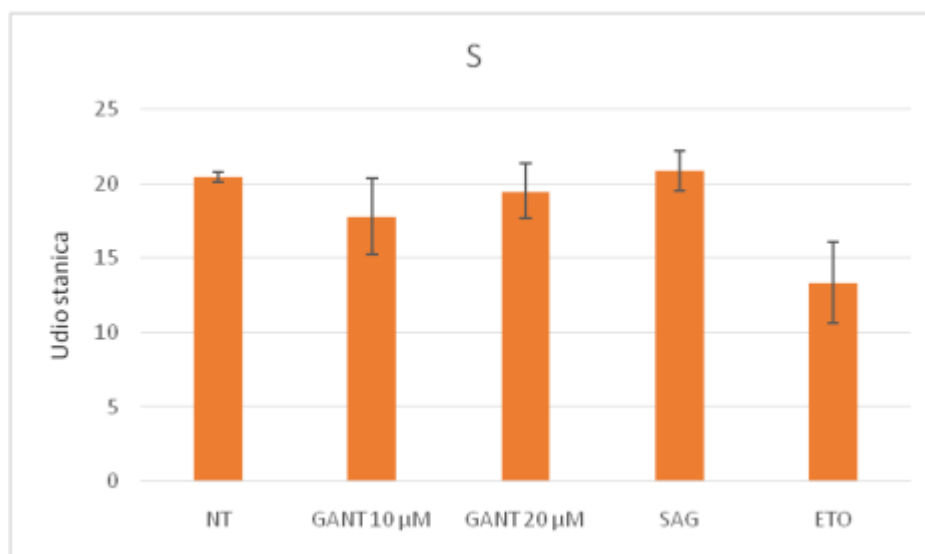
Slika 4.14. Utjecaj kemijskih spojeva na G2/M fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija WM793B tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 i ETO na stanični ciklus ($P<0,0001$).



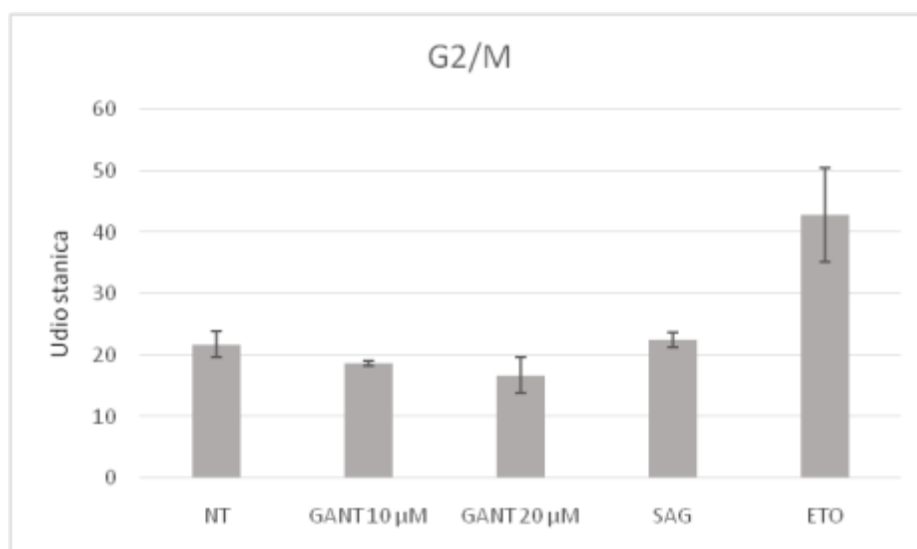
Slika 4.15. Zbirni prikaz utjecaja pojedinih tretmana na pojedine faze staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija LM6 tretirana je sa sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i Etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa).



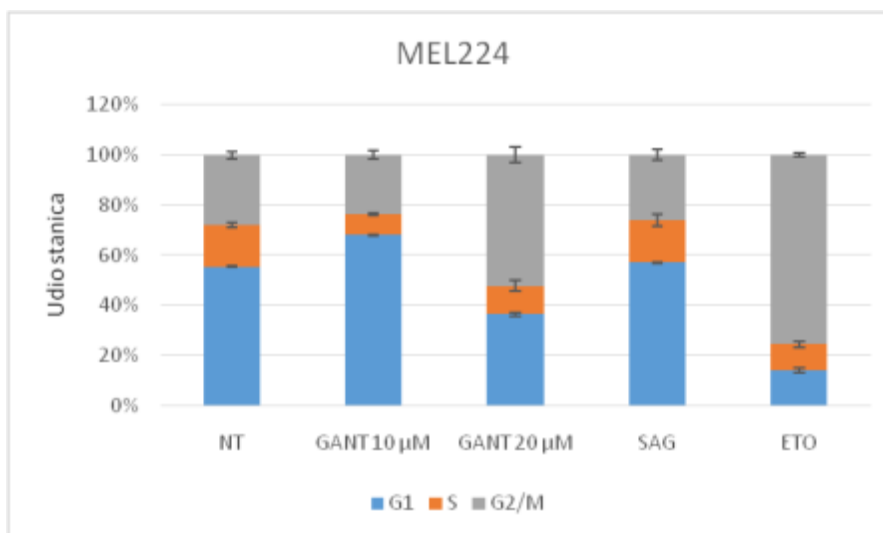
Slika 4.16. Utjecaj kemijskih spojeva na G1 fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija LM6 tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 (10 µM) i ETO na stanični ciklus ($P=0,0002$).



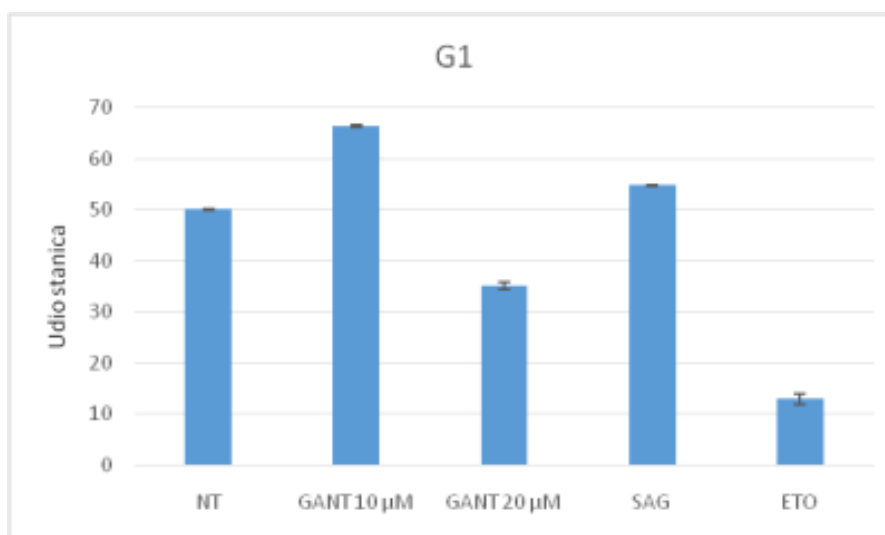
Slika 4.17. Utjecaj kemijskih spojeva na S fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija LM6 tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 μ M i 20 μ M) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala da ne postoji utjecaj korištenih spojeva na stanični ciklus ($P=0,0647$).



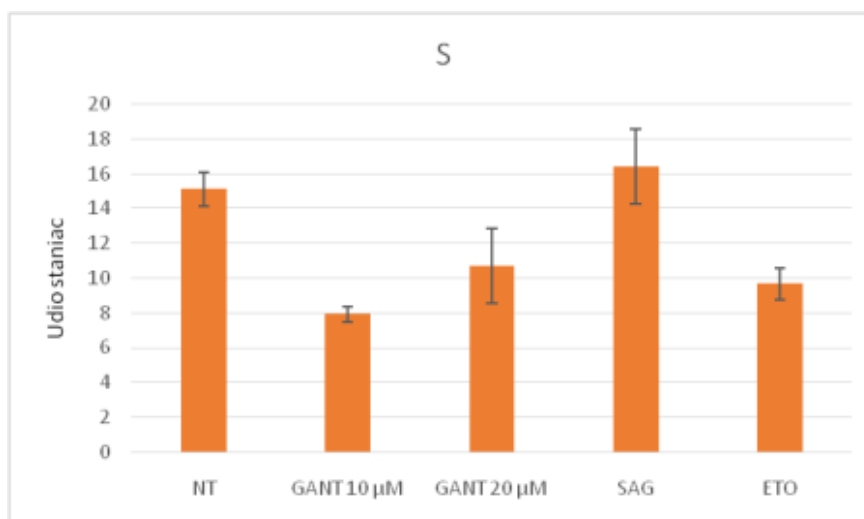
Slika 4.18. Utjecaj kemijskih spojeva na G2/M fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija LM6 tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 μ M i 20 μ M) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja ETO na stanični ciklus ($P=0,0038$).



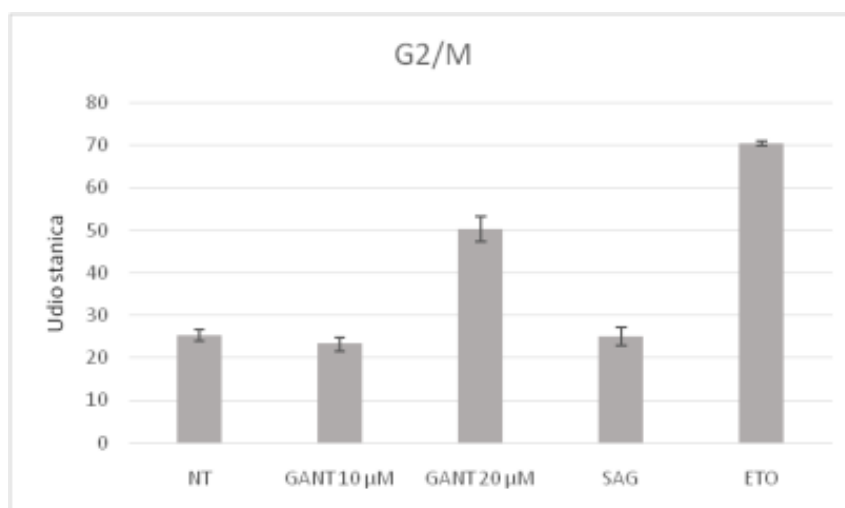
Slika 4.19. Zbirni prikaz utjecaja pojedinih tretmana na pojedine faze staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija Mel224 tretirana je sa sljedećim spojevima: GANT61 (10 μ M i 20 μ M) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa).



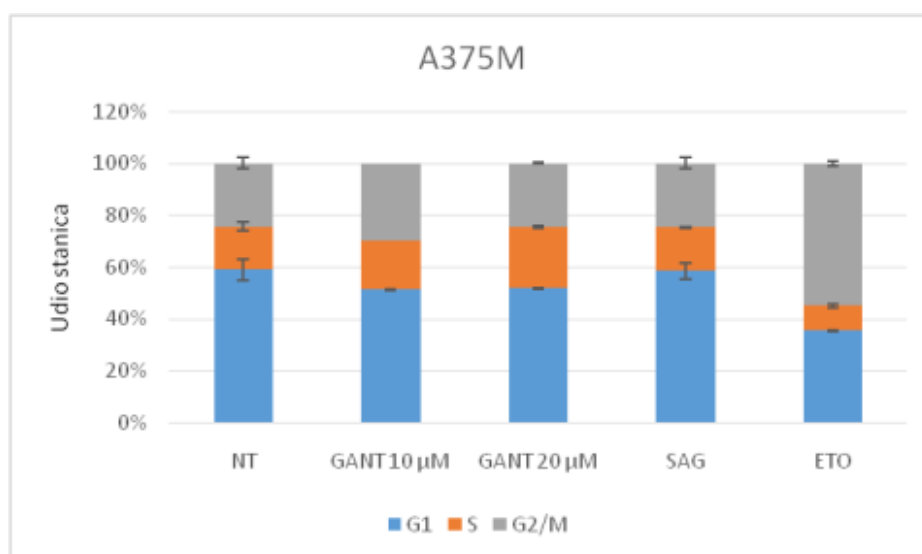
Slika 4.20. Utjecaj kemijskih spojeva na G1 fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija Mel224 tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 μ M i 20 μ M) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 i ETO na stanični ciklus ($P < 0,0001$).



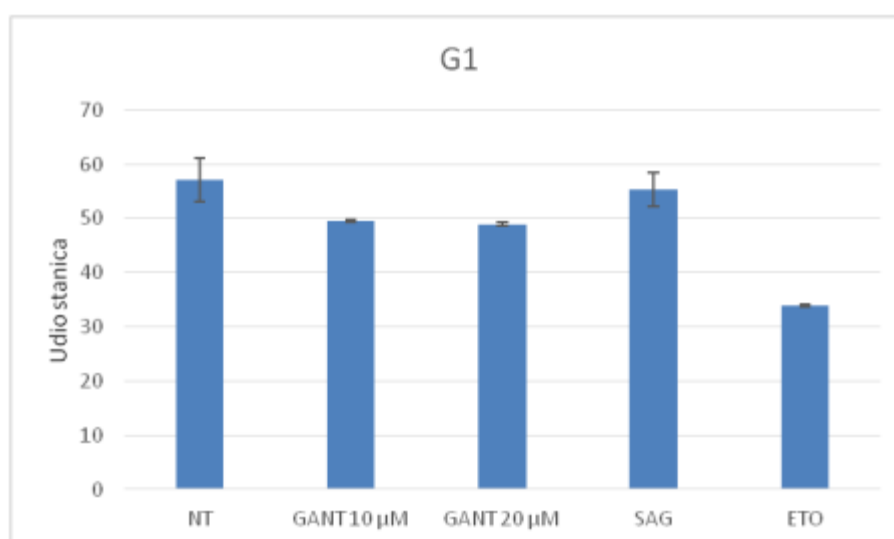
Slika 4.21. Utjecaj kemijskih spojeva na S fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija Mel224 tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 (10 µM) i ETO na stanični ciklus ($P=0,0076$).



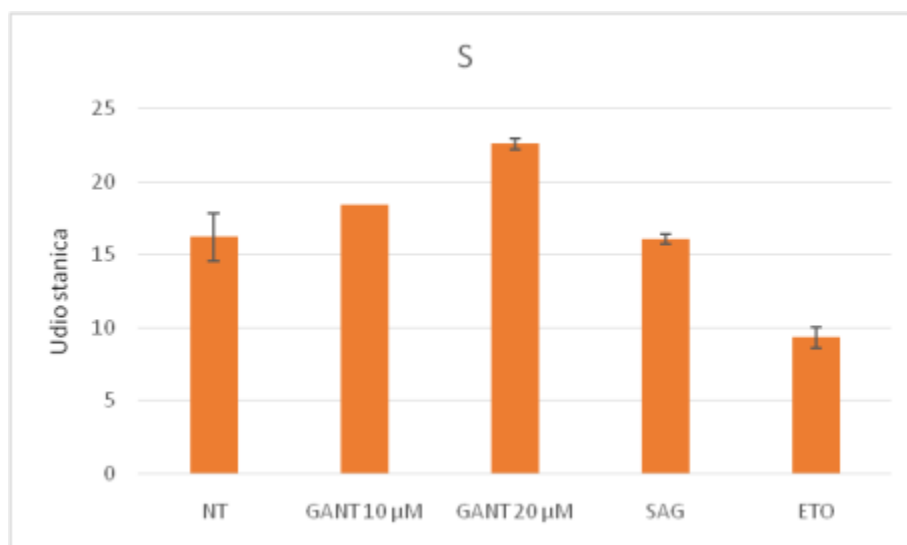
Slika 4.22. Utjecaj kemijskih spojeva na G2/M fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija Mel224 tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 (20 µM) i ETO na stanični ciklus ($P<0,0001$).



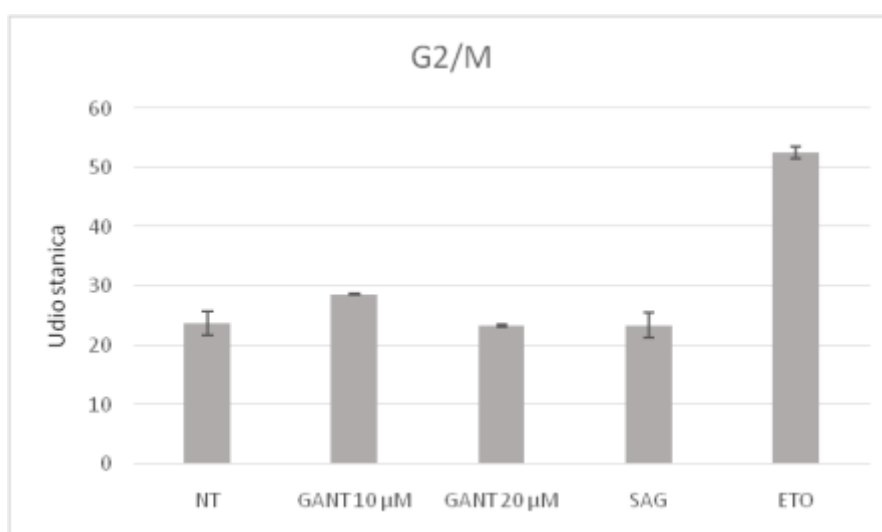
Slika 4.23. Zbrini prikaz utjecaja pojedinih tretmana na pojedine faze staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija A375M tretirana je sa sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa).



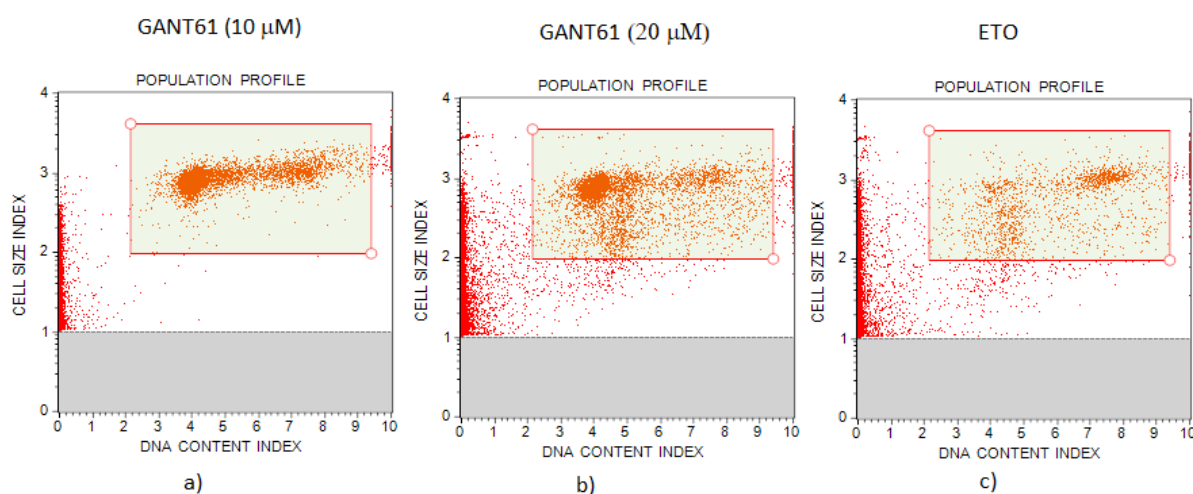
Slika 4.24. Utjecaj kemijskih spojeva na G1 fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija A375M tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 µM i 20 µM) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 i ETO na stanični ciklus ($P=0,0003$).



Slika 4.25. Utjecaj kemijskih spojeva na S fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija A375M tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 μ M i 20 μ M) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja GANT61 (20 μ M) i ETO na stanični ciklus ($P=0,0002$).



Slika 4.26. Utjecaj kemijskih spojeva na G2/M fazu staničnog ciklusa u odnosu na netretirane stanice (NT). Stanična linija A375M tretirana je sljedećim spojevima: GANT61 (10 μ M i 20 μ M) (inhibitor), SAG-om (aktivator) i etopozidom (ETO) (pozitivna kontrola inhibicije staničnog ciklusa). Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj spoja ETO na stanični ciklus ($P=0,0001$).



Slika 4.27. Prikaz rezultata analize staničnog ciklusa u obliku populacijskog profila stanice. Na dijagramu se može pratiti sadržaj DNA (*DNA content index*) te veličina stanica (*Cell size index*). U crvenom kvadratiću je raspored stanica po fazama G1, S i G2/M. Sve izvan toga su ili prazne stanice (donji lijevi dio) ili agregati (gornji desni dio) koji se ne uzimaju u obzir pri određivanju broja stanica u pojedinim fazama. Sa slike je vidljivo da kod stanica tretiranih GANT-om (20 µM) imamo povećan broj mrtvih stanica (donji lijevi kut) u odnosu na tretman s GANT-om (10 µM) (slike 4.27.a i b).

Inhibitori signalnog puta HH-GLI pokazuju slabu efikasnost u kliničkoj primjeni obzirom da oni djeluju na uzvodne komponente signalne kaskade (SMO i HH), a znamo da se signalni put HH-GLI može aktivirati i nekanonskim signalima. Novija istraživanja pokazuju da regulacija proteina GLI pokazuje puno bolji učinak, jer se njihovom inhibicijom koče i kanonski i nekanonski put prijenosa signala.⁴³ Najčešće korišteni inhibitori proteina GLI su upravo GANT61 i GANT58²⁴ te su potrebna daljnja istraživanja *in vitro* i *in vivo* o njihovoj mogućoj koristi u liječenju primarnog melanoma kože.

§ 5. ZAKLJUČAK

Analizom rezultata provedenog istraživanja o ekspresiji proteina GLI1 i GLI3 u uzorcima tkiva primarnog melanoma i humanim staničnim linijama melanoma, te analizom rezultata utjecaja tretmana stanica inhibitorima i aktivatorima signalnog puta HH-GLI na stanični ciklus došli smo do sljedećih zaključaka:

- Proteini GLI1 i GLI3 su pojačano eksprimirani u tkivnim uzorcima primarnog melanoma
- Nema razlike u razini ekspresije između proteina GLI1 i GLI3
- Postoji povezanost razine ekspresije proteina GLI1 i GLI3 sa stadijem razvoja primarnog melanoma kože, pri čemu je ekspresija oba proteina značajno viša u tumorima stadija T4 u odnosu na stadij Tis
- Proteini GLI1 i GLI3 su eksprimirani u humanim staničnim linijama melanoma LM6, WM793B, A375M i Mel224
- stanična linija LM6 pokazuje izrazito jaku ekspresiju proteina GLI3
- Lokalizacija proteina GLI1 i GLI3 unutar stanice je na očekivanim mjestima: i u jezgri i u citoplazmi
- Postoji statistički značajan utjecaj spoja GANT61, koji je inhibitor proteina GLI, na stanični ciklus

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

BSA	albumin iz goveđeg seruma (eng. Bovine Serum Albumin)
BCC	bazeocelularni karcinom (eng. Basal Cell Carcinoma)
BRAF	gen BRAF
BRAF	protein BRAF
CDK	ciklin-ovisna kinaza (eng. Cyclin Dependant Kinase 1)
CDK4	ciklin-ovisna kinaza 4
CDKN2A	ciklin-ovisan inhibitor kinaze 2A
DAB	diaminobenzidin
DAPI	4,6-dimidino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ETO	etopozid
FBS	fetalno goveđi serum (eng. Fetal Bovine Serum)
GANT	antagonist proteina GLI (eng. GLI Antagonist)
GLI	protein GLI
HH	gen Hedgehog
HH	protein Hedgehog (od eng. jež)
Hh-GLI	Hedgehog-GLI
HRP	peroksidaza iz hrena (eng. Horseradish peroxidase)
IgG	imunoglobulin
NRAS	gen NRAS
P53	protein 53
PBS	fosfatni pufer (eng. Phosphate Buffer Saline)
PKA	Protein kinaza A
PTCH1	gen Patched kod ljudi
PTCH	protein Patched
rpm	broj okretaja u minuti (eng. Revolutions per minute)

RTK	receptor tirozinskih kinaza
SAG	agonist proteina Smo (eng. Smoothened agonist)
SCC	karcinom pločastih stanica (eng. Squamos Cell Carcinoma)
SMO	protein Smoothened
SUFU	protein Suppressor of Fused
TBST	TBS-Tween (eng. Tris Buffer Saline)
TNM	klasifikacija tumora (eng. T-Tumor, N-Nodul, M-Metastasis)
UV	ultraljubičasto zračenje (eng. Ultraviolet)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. W. Ingham, A. P. McCahon, *Genes Dev.* **15** (2001) 3059-3087.
2. J. Jiang, C. C. Hui, *Dev. Cell.* **15** (2008) 801–812.
3. H. Tsao i sur., *N. Engl. J. Med.* **351** (2004) 998–1012.
4. J. F. Solus, S. Kraft, G. F. Murphy, *Adv. Anat. Pathol.* **20** (2013) 217–226.
5. B. Stecca i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) 5895–5900.
6. Y. Katoh i M. Katoh, *Curr. Mol. Med.* **9** (2009) 873–886.
7. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of THE CELL*, Garland Science, New York, 2007, str. 1205-1231.
8. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of THE CELL*, Garland Science, New York, 2007, str. 1054-1101.
9. S. Kogan, Q. Zeng, N. Ash, R. A. Greenes, *Proc. AMIA Symp.* (2001) 329-333.
10. F. E. Saenz, A. N. LaCrue, R. M. Cross, J. R. Maignan, K. O. Udenze, R. Manetsch, D. E. Kyle, *Antimicrob Agents Chemoter* **57**(12) (2013) 6187-6195.
11. J. Lipozenčić, *Uloga kože, razvitak kože, pregled građe i funkcija kože*, Naklada Zadro, Zagreb, 1999, str. 14-18.
12. F. Blažević, *Razvoj in vitro modela rane prikladnog za procjenu učinka nanosustava kitozana i melatonina na migraciju i proliferaciju fibroblasta*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015, str. 1-3
13. 01.03 Anatomija i fiziologija kože, *Avena Lab*,
<http://avenalab.com/images/dokumentacija/Anatomija-i-fiziologija-koe.pdf> (datum pristupa 03. siječnja 2019.)
14. M. Brenner, V. J. Hearing III *Photochem Photobiol.* **84**(3) (2008) 539-549
15. Y. Wang, *Melanocytes, melanin-synthesis, and related signaling pathway*, HAL archives-ouvertes, 2018
16. S. Kandra, *Melanom – epidemiološka analiza*, Završni rad, Sveučilište sjever, Sveučilište u Varaždinu, 2016, str. 3-6, 12
17. <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts#general> (datum pristupa 10. siječnja 2019.)

18. <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/melanoma-causes-and-risk-factors> (datum pristupa 10. siječnja 2019.)
19. K. Lisica, *Melanom*, Završni rad, Sveučilište Sjever, Sveučilište u Varaždinu, 2017, str. 7
20. <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/types-of-melanoma> (datum pristupa 12. siječnja 2019.)
21. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/melanoma/stages-types/clark-breslow-staging> (datum pristupa 12. siječnja 2019.)
22. <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/documents/melanomasmall.pdf> (datum pristupa 15. siječanj 2019)
23. M. Martinić, *Ekspresija proteina Hedgehog-Gli signalnog puta u stanicama karcinoma debelog crijeva*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011, str. 8-11
24. D. Trnski, *Uloga protein-kinaze GSK3 β u aktivaciji signalnog puta Hedgehog- Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva čovjeka*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Doktorat, Osijek, 2015, str. 1-9, 15-19
25. S. Kratf, S. R. Granter, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**(6) 2014 759-87
26. Alexaki V-I, Javelaud D, Van Kempen LCL, Mohammad KS, Dennler S, Luciani F, et al. *J Natl Cancer Inst.* **102**(15) (2010) 1148–59
27. C. Cox-Jones, M. J. Lubetsky, S. A. Fultz, D. J. Kolko, *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* **29**(6) (1990) str. 936-41
28. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069064> (datum pristupa 25.siječnja 2019.)
29. I. Osman, E. Friedman, A. Pavlick III *Pharmaceuticals (Basel)* **6**(11) (2013) 1429-1450.
30. P. Ozretić, M. Čretnik, S. Levanat III *Int. J. Oncol* **34**(4) (2009) 1045-50.
31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467869/> (datum pristupa 15. siječnja 2019.)
32. https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/I_MUNOHISTOKEMIJA_I_IN_SITU_HIBRIDIZACIJA.pdf (datum pristupa 12.prosinca 2018)
33. M. Martinić, *Ekspresija proteina Hedgehog-Gli signalnog puta u stanicama karcinoma debelog crijeva*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011, str. 19

-
34. D. Trnski, *Uloga protein-kinaze GSK3 β u aktivaciji signalnog puta Hedgehog- Gli u stanicama karcinoma debelog crijeva čovjeka*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Doktorat, Osijek, 2015, str.53
 35. M. Knežević, *Učinci benzimidazola na stanični ciklus tumorskih stanica*, Završni rad, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište u Osijeku, 2017, str. 6-7
 36. F. Džafić, M. Delić-Šarac, S. Mutevelić, J. Karamahić ; *Protočna citometrija: osnove i značaj u kliničkoj praksi*, Soreli, Tuzla, 2018, str. 11-12
 37. I. Krizman, *Genotoksični učinci hipertermije, citostatika cisplatine i propolisa na zdrave i tumorske stanice miša*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 21-23
 38. <https://www.avivasysbio.com/protocols-procedures/ihc#IHC> (datum pristupa 15. prosinca 2018.)
 39. W. Xu i G. McArthur, *Curr. Oncol. Rep.* **18** (2016) 34
 40. C. Nam, K. Doi, H. Nakayama, *Histol Histopathol.* **25**(4) (2010) 485-93.
 41. O. Bragina, S. Sergejeva, M. Serg, T. Zarkovsky, A. Maloverjan, P. Kogerman, A. Zarkovsky, *Neurosci Lett.* **482**(2) (2010) 81-5.
 42. R. K. Srivastava, S. Z. Kaylani, N. Edrees, C. Li, S. S. Talwelkar, J. Xu, K. Palle, J. G. Pressey, M. Athar, *Oncotarget.* **5**(23) (2014) 12151-65.
 43. M. Sabol, D. Trnski, V. Musani, P. Ozretić, S. Levanat, *Int. J. Mol. Sci.* **19**(9) (2018)

§ 8. DODATAK

Tablica 8.1. Rezultati kvantifikacije imunohistokemijskog bojenja proteina GLI1 i GLI3 u uzorcima tkiva primarnog melanoma kože stadija Tis i T4

		INTENZITET				INTENZITET	
UZORAK TKIVA	STADIJ	GLI1	GLI3	UZORAK TKIVA	STADIJ	GLI1	GLI3
Mel-01	T4	48,91	75,68	Mel-35	Tis	55,4	56,77
Mel-02	T4	96,12	106,56	Mel-36	T4	100,03	145,15
Mel-03	T4	75,69	70,42	Mel-37	Tis	72,7	58,77
Mel-04	T4	99,48	100,64	Mel-38	Tis	72,68	89,96
Mel-05	Tis	56,12	65,65	Mel-39	T4	99,88	65,45
Mel-06	Tis	93,57	90,77	Mel-40	Tis	89,87	69,36
Mel-07	Tis	70,72	81,86	Mel-41	Tis	86,51	75,56
Mel-08	T4	72,27	82	Mel-42	T4	68,32	59,35
Mel-09	Tis	75,33	71,27	Mel-43	Tis	54,31	79,62
Mel-10	Tis	82,2	69,9	Mel-44	Tis	65,11	80,54
Mel-11	Tis	81,02	70,82	Mel-45	Tis	67,07	51,94
Mel-12	T4	99,16	73,58	Mel-46	Tis	64,94	76,98
Mel-13	Tis	93,43	80,73	Mel-47	Tis	67,94	107,91
Mel-14	T4	95,76	108,7	Mel-48	T4	102,74	112,97
Mel-15	Tis	72,18	67,58	Mel-49	T4	88,54	120,07
Mel-16	T4	97,2	105,5	Mel-50	Tis	117,49	104,23
Mel-17	Tis	85,19	90,66	Mel-51	T4	85,95	115,03
Mel-18	Tis	69,66	81,84	Mel-52	T4	76,48	95,79
Mel-19	T4	92,51	94,68	Mel-53	Tis	92,44	90,01
Mel-20	T4	68,02	78,21	Mel-54	T4	79,21	91,17
Mel-21	Tis	71,19	79,64	Mel-55	Tis	75,92	50,2
Mel-22	T4	51,19	64,81	Mel-56	T4	78,94	88,54
Mel-23	Tis	67,73	87,53	Mel-57	T4	92,17	99,98
Mel-24	T4	96,74	80,94	Mel-58	Tis	55,92	73,34
Mel-25	Tis	64,9	67,99	Mel-59	Tis	67,28	67,7
Mel-26	T4	71,22	83,68	Mel-60	Tis	74,74	67,74
Mel-27	T4	53,51	60,68	Mel-61	Tis	78,5	63,77
Mel-28	T4	88,6	60,12	Mel-62	Tis	65,21	67,41
Mel-29	T4	93,85	94,09	Mel-63	T4	72,88	88,38
Mel-30	Tis	71,63	90,84	Mel-64	Tis	70,47	64,5
Mel-31	Tis	41,95	81	Mel-65	T4	87,71	99,13
Mel-32	T4	84,49	105,15	Mel-66	T4	65,24	88,47
Mel-33	T4	62,78	84,29	Mel-67	Tis	72,47	80,49
Mel-34	Tis	82,34	74,41				

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Kristina Sladić

Datum rođenja: 06. listopada 1993.

Mjesto rođenja: Šibenik

Obrazovanje

2000–2008 Osnovna škola Petar Krešimir IV., Šibenik

2008–2012 Medicinska i kemijska škola, Šibenik

2012–2016 Prediplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2016-2019 Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2013. Posebna Rektorova nagrada za akademsku godinu 2012./2013. Za sudjelovanje u organizaciji 6. Otvorenog dana Kemijskog odsjeka PMF-a

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013. 6. Otvoreni dan kemijskog odsjeka

2014. 7. Otvoreni dan kemijskog odsjeka

2015. 8. Otvoreni dan kemijskog odsjeka

2016. 21. Smotra Sveučilišta u Zagrebu