

Sveobuhvatni model stečene otpornosti na karboplatinu in vitro kao eksperimentalni alat za određivanje novih ciljeva za terapiju raka jajnika

Kralj, Juran

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:733784>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

JURAN KRALJ

**SVEOBUHVAATNI MODEL STEČENE
OTPORNOSTI NA KARBOPLATINU *IN*
VITRO KAO EKSPERIMENTALNI ALAT
ZA ODREĐIVANJE NOVIH CILJEVA ZA
TERAPIJU RAKA JAJNIKA**

DOKTORSKI RAD

RIJEKA, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

JURAN KRALJ

**SVEOBUHVAATNI MODEL STEČENE
OTPORNOSTI NA KARBOPLATINU *IN*
VITRO KAO EKSPERIMENTALNI ALAT ZA
ODREĐIVANJE NOVIH CILJEVA ZA
TERAPIJU RAKA JAJNIKA**

DOKTORSKI RAD

MENTORICA:

DR. SC. ANAMARIA BROZOVIĆ

RIJEKA, 2023.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

JURAN KRALJ

**NOVEL COMPREHENSIVE *IN VITRO*
MODEL OF ACQUIRED RESISTANCE TO
CARBOPLATIN AS A TOOL TO IDENTIFY
NEW TARGETS FOR OVARIAN CANCER
THERAPY**

DOCTORAL THESIS

MENTOR:

DR. SC. ANAMARIA BROZOVIĆ

RIJEKA, 2023

Ova doktorska disertacija je izrađena u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom **dr.sc. Anamarije Brozović**, više znanstvene suradnice u zvanju znanstvene savjetnice.

Istraživanje opisano u disertaciji financirano je sredstvima istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Određivanje ključnih molekula epitelno-mezenhimalne tranzicije kao mogućih ciljeva za terapiju raka jajnika (DEvOuT)“ (IP-2016-06-1036). Osobno računalo za bioinformatičke analize kupljeno je donacijom Hrvatske lige protiv raka. Kratkotrajni, istraživački boravak doktoranda u Laboratoriju za genomiku i transkriptomiku Sveučilišta u Düsseldorfu financiran je kroz stipendiju STSM (eng. *Short Term Scientific Mission*) COST akcije 17104. Shematski prikazi u disertaciji izrađeni su korištenjem programa BioRender, osim ako nije drugačije napisano. Pravo publiciranja istih u sklopu disertacije obuhvaćeno je *Free Basic* pretplatom na program.

Doktorska disertacija obranjena je dana **13.3.2023.** u 12:00 h na Odjelu za biotehnologiju u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

- **izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj**, predsjednica povjerenstva (Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci)
- **izv. prof. dr. sc. Maja Matulić**, članica (Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu)
- **dr. sc. Ivica Rubelj**, znanstveni savjetnik, član (Institut Ruđer Bošković, Zagreb)

Zahvala

Na koncu ovog velikog životnog poglavlja, jedne stepenice u nizu od skoro deset godina biološkog i biomedicinskog obrazovanja, htio bih izraziti veliko hvala svim ljudima koji su bili uz mene.

Najprije bih zahvalio svojoj mentorici Anamariji na formalnoj i neformalnoj potpori, prilikama i znanju koje je podijelila sa mnom, te silnom prostoru kojeg mi je bezuvjetno pružila kako bih se mogao razvijati u smjeru koji sam odaberem. Bezbroj puta sam čuo od prijatelja i kolega: „Jurane, ti znaš da nijedan šef u budućnosti neće bit kao tvoja šefica sad?“. Složio bih se sa svima i rekao da zasigurno nijedan budući šef ili šefica neće biti kao moja mentorica Anamaria. Hvala Vam!

Zahvalio bih se i Margareti i Vanji na pomoći s eksperimentima, ali i super atmosferi koju smo dijelili na poslu. Bili smo odličan tim! Veliko hvala i kolegicama Mariji, Isabelli, Anji i Ivani što su se uvijek trudile da nam soba bude najudobnije radno mjesto. Zahvalio bih se i ostatku laboratorija: Davoru, Dragomiri, Nikolini, Kseniji, Andreji, Mladenu, Ani i Marini. Dodatno hvala Marini na sveprisutnoj tehničkoj podršci.

Kako život ne bi bio isti bez ostalih kolega s posla, zahvalio bih i Nikolini, Matei, Eli, Ivi, Kate, Ani i svima drugima koje sam zaboravio spomenuti. Zahvalio bih se i svojim kolegama s nogometa, ekipi Mladih istraživača i vanjskim suradnicima Dariji, Sanji i Denisu od kojih sam puno naučio.

Posebno i nemjerljivo hvala posvetio bih svojoj obitelji koja je bila tu svaku minutu svakoga dana, njima koji su činili moje dane ljepšima, a noći lakšima. Bio sam naporan sin i brat, s previše energije i uvijek „leteći“, postavljao tisuću pitanja i radio po svom, ali vi ste uvijek bili tu. Nema vas svijet!

Na kraju bih posebno zahvalio svojoj zaručnici Ivi što me zavoljela, bila uz mene i odlučila tu i ostati!

- *Vaš Juran* -

Sažetak

Rak jajnika je ginekološka bolest koja, uslijed nedostatka specifičnih simptoma i farmakogenetskih biljega (biomarkera), često biva otkrivena u kasnim stadijima, kada se bolest već proširila i na druge organe. Malobrojne bolesnice koje odgovore na primarnu terapiju vrlo često razviju otpornost na lijekove. Kako bismo bolje razumjeli taj ključni problem uspješne terapije, razvili smo model stanica postepenog razvoja otpornosti raka jajnika na karboplatinu, sastavljenog od roditeljskih stanica i sedam varijanti sa stabilnom rastućom otpornosti na karboplatinu. Svaka varijanta, uključujući i roditeljske stanice, karakterizirana je s obzirom na otpornost na najčešće korištene kemoterapeutike u terapiji raka jajnika, razine biljega epitelno-mezenhimske tranzicije i metastatskog potencijala. Nadalje, nakon izmjerene ekspresije gena u svim varijantama stanica korištenjem dva pristupa analizirali smo dobivene vrijednosti bioinformatičkim metodama. Dobivene liste značajno promijenjenih gena (DEG) i gena čija ekspresija korelira s odgovorom na karboplatinu (CCORG) uspoređene su u kontekstu signalnih puteva, interakcija proteina i bioloških procesa. Izdvojeni su potencijalno interesantni geni čija je uloga u procesima razvoja otpornosti i epitelno-mezenhimske tranzicije analizirana *in vitro* metodama, a njihov značaj kao mogućih farmakogenetskih biljega u klinici bioinformatičkim analizama informacija u dostupnim bazama podataka. Dodatnim eksperimentima korištenjem specifičnih inhibitora pojedinih proteina od interesa ispitana je važnost izdvojenih signalnih puteva u razvoju otpornosti i pokretljivosti stanica. Predstavljeni model, zajedno s dva različita pristupa analizi ekspresije gena doprinio je razumijevanju razvoja otpornosti i omogućio detekciju gena čija uloga dosad nije bila opisana u kontekstu otpornosti i pokretljivosti stanica te smo time pokazali međusobnu povezanost ova dva fenomena potaknuta lijekom.

Ključne riječi

Rak jajnika, otpornost na lijekove, karboplatina, epitelno-mezenhimska tranzicija, farmakogenetski biljezi

Summary

Due to the lack of specific early-stage symptoms and biomarkers, ovarian cancer is often diagnosed in late stages, when the disease has already spread. A small number of patients that positively respond to chemotherapy often develop drug resistance upon therapy. To tackle the problem, we developed high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) model composed of variants with differing degrees of resistance to carboplatin. All variants, including the parental cells, were characterized in terms of carboplatin and paclitaxel sensitivity, markers of epithelial-mesenchymal transition and metastatic properties (migration and invasion). To understand the differences, we measured the expression of genes in all established variants and analysed it by two different bioinformatics approaches. Resulting differentially expressed gene (DEG) and carboplatin-correlating gene (CCORG) lists were compared in terms of signalling pathways, protein interactions and biological processes. Potentially interesting genes were selected and analysed in terms of their role in resistance development and metastasis by *in vitro* experiments. Their prognostic and predictive clinical value was examined by *in silico* approaches. Additional experiments using inhibitors were used to examine the role of selected signaling pathways. Presented cell model, along with two distinct approaches to gene expression analysis gave us a valuable insight in resistance development mechanisms and enabled us to select novel genes with reported functions in drug resistance and drug-induced epithelial-mesenchymal transition.

Keywords

Ovarian cancer, drug resistance, carboplatin, epithelial-mesenchymal transition, biomarkers

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Rak jajnika	1
1.1.1 Epidemiologija	1
1.1.2 Čimbenici rizika	1
1.1.3 Otkrivanje i određivanje proširenosti	2
1.1.4 Tipovi raka jajnika	3
1.1.5 Rak pokrovnih stanica jajnika	4
1.2 Liječenje raka jajnika	5
1.3 Otpornost stanica raka na kemoterapiju	7
1.3.1 Tipovi otpornosti	7
1.3.2 Molekularni mehanizmi otpornosti na terapiju	7
1.3.3 Višestruka otpornost raka na terapije	11
1.3.4 Farmakogenetski biljezi otpornosti i personalizirana medicina	11
1.4 Epitelno-mezenhimska tranzicija	12
1.5 Povezanost otpornosti na lijekove i EMT-ja	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1 Materijali	16
3.1.1 Osnovne kemikalije	16
3.1.2 Puferi i otopine	17
3.1.3 Kompleti kemikalija i standardi	19
3.1.4 Lijekovi i inhibitori	19
3.1.5 Početnice	20
3.1.6 Male interferirajuće RNA	21
3.1.7 Protutijela	21
3.1.8 Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali	22
3.1.9 Računalni programi, alati i baze podataka	25
3.1.10 Linije stanica	26

3.2 Metode	26
3.2.1 Održavanje, razvoj i karakterizacija kultura stanica	26
3.2.1.1 Uzgoj kultura stanica	26
3.2.1.2 Razvoj MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3 stanica otpornih na CBP opetovanim tretmanom s CBP-om	27
3.2.1.3 Razvoj i izdvajanje MES-OV stanica klonova jednokratnim tretmanom s CBP-om	28
3.2.1.4 Određivanje stope proliferacije stanica	29
3.2.1.5 Morfološka karakterizacija stanica	30
3.2.2 Određivanje preživljenja stanica	30
3.2.2.1 Test metabolizma resazurina	30
3.2.2.2 Test klonalnog rasta stanica	32
3.2.2.3 Test određivanja stope smrti stanice	32
3.2.3 Određivanje pokretljivosti stanica	34
3.2.3.1 Test zacjeljivanja rana	34
3.2.3.2 Test migracije	36
3.2.3.3 Test invazije	37
3.2.4 Određivanje ekspresije gena	38
3.2.4.1 Izolacija RNA	38
3.2.4.2 Određivanje koncentracije i kvalitete RNA	39
3.2.4.3 Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja	40
3.2.4.4 Metoda hibridizacije DNA mikročipova	41
3.2.5 Određivanje ekspresije proteina	42
3.2.5.1 Izolacija proteina	42
3.2.5.2 Određivanje koncentracije proteina	43
3.2.5.3 Metoda Western blot	43
3.2.6 Promjena ekspresije gena i proteina	46
3.2.6.1 Utišavanje specifičnih gena transfekcijom stanica sa siRNA	46
3.2.6.2 Inhibicija signalnih puteva tretmanom stanica inhibitorima	47
3.2.7 Bioinformatička obrada i analiza podataka	47
3.2.7.1 Analiza rezultata metode hibridizacije DNA mikročipova	47
3.2.7.2 Analiza stupnja grupiranosti podataka	47
3.2.7.3 Analiza značajno promijenjenih gena	48
3.2.7.4 Analiza korelacije promjene ekspresije gena i osjetljivosti na CBP	48
3.2.7.5 Analiza interakcija između proteina	48
3.2.7.6 Analiza setova gena i signalnih puteva	49

3.2.7.7	Analiza vrijednosti gena kao farmakogenetskih biljega	49
3.2.8	Statistička analiza podataka	49
4.	REZULTATI	51
4.1	Karakterizacija stanica	51
4.1.1	Morfološke karakteristike varijanti stanica MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3	51
4.1.2	Osjetljivost varijanti stanica MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3 na CBP i TAX	53
4.1.3	Pokretljivost varijanti stanica MES-OV	54
4.1.4	Ekspresija gena biljega EMT-ja u varijantama stanica MES-OV	55
4.1.5	Osjetljivost MES-OV stanica klonova na CBP i TAX	58
4.1.6	Ekspresija gena biljega EMT-ja u MES-OV stanicama klonova	59
4.2	Analiza ekspresije gena varijanti stanica MES-OV	61
4.2.1	Grupiranje analiziranih varijanti stanica MES-OV	61
4.2.2	Usporedba gena i rezultata analiza dviju lista - DEG i CCORG	62
4.2.3	Probir gena za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP	65
4.2.4	Probir signalnih puteva za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP	69
4.3	Ispitivanje uloge osam izdvojenih gena u otpornosti stanica na CBP i pokretljivosti	69
4.3.1	Provjera efikasnosti utišavanja gena metodom transfekcije stanice sa siRNA	69
4.3.2	Uloga osam izdvojenih gena u odgovoru stanica MES-OV i MES-OV CBP8 na tretman s CBP-om	71
4.3.3	Uloga osam izdvojenih gena u pokretljivosti stanica MES-OV i MES-OV CBP8	73
4.3.4	Vrijednost osam izdvojenih gena kao mogućih farmakogenetskih biljega	76
4.4	Ispitivanje funkcije izdvojenih signalnih puteva u otpornosti stanica MES-OV i MES-OV CBP8 na CBP i pokretljivosti	80
4.4.1	Preživljenje stanica MES-OV i MES-OV CBP8 nakon tretmana s 14 odabranih inhibitora	80
4.4.2	Utjecaj Rapamycin-a, Wortmannin-a, SB216763-a i Triptolide-a na preživljenje stanica MES-OV i MES-OV CBP8 nakon tretmana CBP-om	83
4.4.3	Pokretljivost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 nakon tretmana s 14 odabranih inhibitora	86

5. RASPRAVA	89
6. ZAKLJUČCI	99
7. LITERATURA	100
8. POPIS ILUSTRACIJA	114
9. PRIVITCI	117
10. ŽIVOTOPIS	119
11. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	120
12. POPIS JAVNIH PREZENTACIJA	121

Popis kratica

ABB	pufer za vezanje aneksin V-FITC-a	engl. <i>Annexin V-FITC-binding buffer</i>
ABC	ATP-vezujući kazetni protein transporter	engl. <i>ATP-Binding Cassette Transporter</i>
<i>ABCB1</i>	ATP-vezujući kazetni protein 1 podgrupe B	engl. <i>ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1</i>
<i>ABCC1</i>	ATP-vezujući kazetni protein 1 podgrupe C	engl. <i>ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 1</i>
<i>ABCG2</i>	ATP-vezujući kazetni protein 2 podgrupe G	engl. <i>ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2</i>
<i>ACTB</i>	aktin beta	engl. <i>Actin Beta</i>
Akt/ERK	serin treoninska kinaza Akt/ kinaza regulirana izvanstaničnim signalom	engl. <i>AKT Serine/Threonine Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
Akt1/2	serin treoninska kinaza Akt 1/2	engl. <i>AKT Serine/Threonine Kinase 1/2</i>
ANOVA	analiza varijance	engl. <i>analysis of variance</i>
APS	amonijev persulfat	engl. <i>ammonium persulfate</i>
<i>ARID1A</i>	interakcijska domena 1A bogata bazama A i T	engl. <i>AT-Rich Interaction Domain 1A</i>
ATCC	Zbirka američke tipske kulture	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
AUC	površina ispod krivulje	engl. <i>area under curve</i>
<i>AUTS2</i>	gen 2 osjetljivosti na autizam	engl. <i>Autism Susceptibility Gene 2</i>
<i>BCA</i>	bicinhoninska kiselina	engl. <i>bicinchoninic acid</i>
<i>BCL2</i>	gen 2 limfoma B stanica	engl. <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
<i>BCL-xL</i>	izrazito veliki gen 2 limfoma B stanica	engl. <i>B-Cell Lymphoma 2-Extra Large</i>
BCRP	protein otpornosti raka dojke	engl. <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
<i>BRAF</i>	proto-onkogenska serin treoninska kinaza proteina B-Raf	engl. <i>B-Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase</i>
<i>BRCA1/2</i>	gen raka dojke 1/2	engl. <i>Breast Cancer Gene 1/2</i>
BSA	albumin seruma goveda	engl. <i>bovine serum albumin</i>
CA125	tumorski antigen 125	engl. <i>Cancer Antigen 125</i>
CBP	karboplatina	engl. <i>carboplatin</i>
<i>CD147</i>	klaster diferencijacije 147	engl. <i>Cluster of Differentiation 147</i>
cDDP	cisplatina	engl. <i>cisplatin</i>
<i>CDH2</i>	kadherin 2	engl. <i>Cadherin 2</i>
CDK	kinaza ovisna o ciklinu	engl. <i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
cDNA	komplementarna DNA	engl. <i>complementary DNA</i>
<i>CNOT8</i>	podjedinica 8 transkripcijskog kompleksa CCR4-NOT	engl. <i>CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 8</i>

CRISPR-Cas9	skupljena, pravilno raspoređena, kratka palindromska ponavljanja-protein 9 povezan s CRISPR-om	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR Associated Protein 9</i>
CSC	matična stanica tumora	engl. <i>cancer stem cell</i>
CSDE1	protein E1 s domenom hladnog šoka	engl. <i>Cold Shock Domain-Containing Protein E1</i>
Ct	prag ciklusa	engl. <i>cycle treshold</i>
DEG	razlikovno eksprimirani geni	engl. <i>differentially expressed genes</i>
diH ₂ O	deionizirana voda	engl. <i>deionised water</i>
DMF	dimetilformamid	engl. <i>dimethylformamide</i>
DMSO	dimetilsulfoksid	engl. <i>dimethylsulfoxide</i>
DNER	receptor povezan s epidermalnim faktorom rasta nalik na Delta i Notch	engl. <i>Delta and Notch-like Epidermal Growth Factor-Related Receptor</i>
EDTA	etilendiamin tetraoctena kiselina	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EdU	5-etinil-2'-deoksiuridin	engl. <i>5-ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
EGA	Europska arhiva genoma i fenoma	engl. <i>European Genome-phenome Archive</i>
ELOVL7	protein 7 produljivanja vrlo dugačkog lanca masnih kiselina	engl. <i>Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein 7</i>
EMT	epitelno-mezenhimska tranzicija	engl. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
EOC	rak pokrovnih stanica	engl. <i>epithelial ovarian cancer</i>
EpCAM	molekula adhezije stanica epitela	engl. <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ERBB2, Her2	tirozinska kinaza 2 Erb-B2 receptora	engl. <i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
ERCC1	križna komplementarna skupina 1 ekscizijskog popravka	engl. <i>Excision Repair Cross Complementation Group 1</i>
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalima	engl. <i>Extracellular Receptor Kinase</i>
EtBr	etidij bromid	engl. <i>ethidium bromide</i>
FAM167A	član A obitelji sa sličnošću sekvenci 167	engl. <i>Family With Sequence Similarity 167 Member A</i>
FBLN5	fibulin 5	engl. <i>Fibulin 5</i>
FBS	serum fetusa goveda	engl. <i>fetal bovine serum</i>
FC	stopa promjene	engl. <i>fold change</i>
FIGO	Međunarodna federacija ginekologije i opstetricije	engl. <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
FILIP1L	protein nalik filamin A-interagirajućem proteinu 1	engl. <i>Filamin A-Interacting Protein 1 Like</i>
FITC	fluorescein izotiocijanat	engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FN1	fikronektin	engl. <i>Fibronectin 1</i>
FOLR1	alfa receptor folata	engl. <i>Folate Receptor Alpha</i>

<i>FRG2</i>	gen 2 regije FSDH	engl. <i>FSHD Region Gene 2</i>
<i>GAPDH</i>	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDNF/RET	neurotrofni faktor izveden iz glijalne linije stanica/preuređena tijekom transfekcije (kinaza)	engl. <i>Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor/Rearranged During Transfection (Kinase)</i>
GEO	Omnibus ekspresije gena	engl. <i>Gene Expression Omnibus</i>
GFP	zeleni fluorescirajući protein	engl. <i>Green Fluorescent Protein</i>
GO	ontologija gena	engl. <i>gene ontology</i>
<i>GRAMD1B</i>	gen 1 B s domenom GRAM	engl. <i>GRAM Domain Containing 1B</i>
GSK-3	kinaza 3 glikogen sintaze	engl. <i>Glycogen Synthase Kinase-3</i>
GST	glutation-S-transferaza	engl. <i>Glutathione S-Transferase</i>
h	sat	engl. <i>hour</i>
HE4	protein 4 epididmisa čovjeka	engl. <i>Human Epididymis Protein 4</i>
HEPES	N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonična kiselina	engl. <i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid</i>
<i>HES7</i>	gen 7 obitelji Hairy and Enhancer of Split	engl. <i>Hairy And Enhancer Of Split 7</i>
<i>hg38</i>	izdanje genoma čovjeka 38	engl. <i>human genome build 38</i>
HGSOC	serozni rak jajnika visokog stupnja	engl. <i>high-grade serous ovarian cancer</i>
<i>HOTAIR</i>	transkript HOX protusmilsene RNA unutar gena	engl. <i>HOX Transcript Antisense Intergenic RNA</i>
HR	omjer rizika	engl. <i>hazard ratio</i>
<i>HS3ST3A1</i>	3-sulfotransferaza 3A1 heparan sulfat-glukozamina	engl. <i>Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 3A1</i>
<i>HS3ST3B1</i>	3-sulfotransferaza 3B1 heparan sulfat-glukozamina	engl. <i>Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 3B1</i>
IC50	koncentracija kod koje je inhibicija 50%	engl. <i>inhibitory concentration 50%</i>
IE	efekt interakcije	engl. <i>interaction effect</i>
<i>JNK</i>	N-terminalna kinaza Jun-a	engl. <i>JUN N-Terminal Kinase</i>
KEGG	Enciklopedija gena i genoma sveučilišta Kyoto	engl. <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KM	Kaplan-Meier	engl. <i>Kaplan-Meier</i>
<i>KRAS</i>	gen virusa sarkoma Kirstenova štakora	engl. <i>Kirsten Rat Sarcoma Virus Gene</i>
LC-masna kiselina	masna kiselina dugog lanca	engl. <i>long-chain fatty acid</i>
lncRNA	duga nekodirajuća RNA	engl. <i>long non-coding RNA</i>
MAP	protein aktiviran mitogenom	engl. <i>Mitogen-Activated Protein</i>

<i>MAP1B</i>	protein 1B aktiviran mitogenom	engl. <i>Mitogen-Activated Protein 1B</i>
McCoy	McCoy-eva modifikacija osnovnog A5 medija	engl. <i>McCoy's A5 medium</i>
MDR1	gen 1 višestruke otpornosti	engl. <i>Multidrug Resistance 1</i>
<i>MEK1</i>	kinaza 1 puta MAPK/ERK	engl. <i>MAPK/ERK Kinase 1</i>
MET	mezenhimalno-epitelna tranzicija	engl. <i>mesenchymal-epithelial transition</i>
<i>MFSD6</i>	gen proteina koji sadrži domenu superobitelji glavnog pomagača 6	engl. <i>Major Facilitator Superfamily Domain-Containing 6</i>
min	minuta	engl. <i>minute</i>
miR-106a	mikro RNA 106a	engl. <i>micro RNA 106a</i>
miR-124	mikro RNA 124	engl. <i>micro RNA 124</i>
miR-141	mikro RNA 141	engl. <i>micro RNA 141</i>
miR-186	mikro RNA 186	engl. <i>micro RNA 186</i>
miR-200	mikro RNA 200	engl. <i>micro RNA 200</i>
miR-591	mikro RNA 591	engl. <i>micro RNA 591</i>
<i>MIR99AHG</i>	gen domaćin klastera mir-99a-let-7c	engl. <i>Mir-99a-Let-7c Cluster Host Gene</i>
miRNA	mikro RNA	engl. <i>micro RNA</i>
MR	magnetska rezonancija	engl. <i>magnetic resonance</i>
mRNA	glasnička RNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MRP1	protein 1 povezan s višestrukom otpornosti	engl. <i>Multidrug Resistance-Associated Protein 1</i>
mTOR	mehanička meta rapamicin kinaze	engl. <i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>
NADH, NAD-H	nikotinamid adenin dinukleotid-H	engl. <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide-H</i>
NANOG	gen za faktor transkripcije Nanog	engl. <i>Nanog Transcription Factor Gene</i>
ncRNA	nekodirajuća RNA	engl. <i>non-coding RNA</i>
NF-κB	transkripcijski faktor koji se veže na pojačivač κ lakog lanca aktiviranih B stanica	engl. <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
Notch	homologni protein neurogenog lokusa	engl. <i>Neurogenic Locus Notch Homolog Protein</i>
<i>NTM</i>	neurotrimin	engl. <i>Neurotrimin</i>
<i>OCT4</i>	transkripcijski faktor 4 koji veže na oktamere	engl. <i>Octamer-Binding Transcription Factor 4</i>
Opti-MEM	minimalni medij za uzgoj stanica	engl. <i>optimal minimum essential media</i>
OS	ukupno preživljenje	engl. <i>overall survival</i>
pAkt	fosforilirani protein Akt	engl. <i>Phosphorylated Akt</i>
PARP	poli(ADP)-riboza polimeraza	engl. <i>Poly (ADP-Ribose) Polymerase</i>
PBS	fosfatni pufer	engl. <i>phosphate buffered saline</i>

PCA	analiza glavnih komponenti	engl. <i>principal component analysis</i>
PET-CT	pozitronska emisijska tomografija povezana s računalnom tomografijom	engl. <i>positron emission tomography-computed tomography</i>
PFA	paraformaldehid	engl. <i>paraformaldehyde</i>
PFS	preživljenje bez napretka bolesti	engl. <i>progression-free survival</i>
PI	propidij jodid	engl. <i>propidium iodide</i>
PI3K	fosfoinozimid 3-kinaza	engl. <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PI3K p110δ	p110δ izoforma fosfoinozimid 3-kinaze	engl. <i>Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Isoform p110δ</i>
PI3Kα/δ/β	izoforme α/δ/β fosfoinozimid 3-kinaze	engl. <i>Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Isoforms α/δ/β</i>
<i>PIK3CA</i>	katalitička podjedinica alfa fosfoinozimid-3-kinaze	engl. <i>Phosphoinositide-3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
<i>PIK3R1</i>	regulatorna podjedinica 1 fosfoinozimid-3-kinaze	engl. <i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>
PKA	proteinska kinaza A	engl. <i>Protein Kinase A</i>
<i>PLTP</i>	protein transfera fosfolipida	engl. <i>Phospholipid Transfer Protein</i>
<i>PRKAR1B</i>	regulatorna podjedinica beta proteinske kinaze tipa 1 ovisne o CAMP-u	engl. <i>Protein Kinase CAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit Beta</i>
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze	engl. <i>quantitative polimerase chain reaction</i>
Rap1	protein 1 povezan s Ras-om	engl. <i>Ras-Associated Protein 1</i>
Ras	virus sarkoma štakora	engl. <i>Rat Sarcoma Virus</i>
ROC	radna karakteristika prijemnika	engl. <i>receiver operating characteristic</i>
ROS	reaktivne kisikove vrste	engl. <i>reactive oxygen species</i>
rRNA	ribosomska RNA	engl. <i>ribosomal RNA</i>
<i>RTF1</i>	komponenta kompleksa Paf1/RNA polimeraza II	engl. <i>Paf1/RNA Polymerase II Complex Component</i>
RT-qPCR	lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu	engl. <i>reverse transcription-quantitative polimerase chain reaction</i>
<i>SAMD9</i>	gen proteina koji sadrži domenu sterilnog motiva alfa 9	engl. <i>Sterile Alpha Motif Domain Containing 9</i>
SDS	natrij-dodecil sulfat	engl. <i>sodium-dodecil sulphate</i>
SDS-PAGE	denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pomoću natrij-dodecil sulfata	engl. <i>sodium dedecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>SERPINE2</i>	protein 2 grupe E serpina	engl. <i>Serpin Family E Member 2</i>
shRNA	RNA s malom ukosnicom	engl. <i>small hairpin RNA</i>
siRNA	male interferirajuće RNA	engl. <i>small interfering RNA</i>

SLC38A5	protein 5 grupe nositelja otopljene tvari 38	engl. <i>Solute Carrier Family 38 Member 5</i>
SLUG, SNAI2	transkripcijski represor 2 grupe snail	engl. <i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>
SNAIL, SNAI1	transkripcijski represor 1 grupe snail	engl. <i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i>
SOX2	transkripcijski faktor 2 SRY-box-a	engl. <i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
SST-RMA	transformacija prostora signala-robustna analiza više čipova	engl. <i>Signal Space Transformation-Robust Multichip Analysis</i>
STR	kratko uzastopno ponavljanje	engl. <i>short tandem repeat</i>
STRING	alat za pretraživanje i pronalaženje gena/proteina u interakciji	engl. <i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
survivin, BIRC5	survivin	engl. <i>Survivin</i>
TAC	konzola za analizu transkriptoma	engl. <i>Transcriptome Analysis Console</i>
TAE	tris-acetat-EDTA	engl. <i>tris-acetate-EDTA</i>
TAX	paklitaksel	engl. <i>paclitaxel, Taxol®</i>
TBS	trisom puferirana fiziološka otopina	engl. <i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	trisom puferirana fiziološka otopina-Tween 20	engl. <i>Tris-Buffered Saline-Tween 20</i>
TCA	trikloroacetna kiselina	engl. <i>trichloroacetic acid</i>
TCGA	Atlas genoma tumora	engl. <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin	engl. <i>N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine</i>
TGF- β	transformirajući faktor rasta beta	engl. <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TMEM200A	transmembranski protein 200A	engl. <i>Transmembrane Protein 200A</i>
TMEM47	transmembranski protein 47	engl. <i>Transmembrane Protein 47</i>
TP53	tumorski protein 53	engl. <i>Tumor Protein 53</i>
TSH	hormon koji stimulira štitnjaču	engl. <i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
TSPAN18	tetraspanin 18	engl. <i>Tetraspanin 18</i>
TWIST	transkripcijski faktor obitelji Twist bHLH	engl. <i>Twist Family bHLH Transcription factor</i>
WDR46	domena 46 ponavljanja WD	engl. <i>WD Repeat Domain 46</i>
Wnt	izvedenica iz naziva proteina Wingless i Integrated	engl. <i>Wingless Integrated</i>
ZEB2	homodomena 2 "cinkovog prsta" koja se veže na pojačivač	engl. <i>Zinc Finger Enhancer Box Binding Homeobox 2</i>

1. Uvod

1.1 Rak jajnika

Tumorima ili novotvorinama nazivamo skupine stanica čija proliferacija nije kontrolirana već se stanice dijele abnormalno. Oni mogu biti dobroćudni ili zloćudni. Dobroćudni tumori rastu, ali se ne šire u okolna tkiva, dok se zloćudni tumori (ili rakovi) agresivno šire na druga tkiva stvarajući udaljene metastaze [1,2].

1.1.1 Epidemiologija

Rak jajnika je maligna bolest koja obuhvaća rak jajnika, jajovoda i peritoneuma, a spada u najsmrtonosnije ginekološke bolesti. Ima veću smrtnost od raka tijela maternice i raka vrata maternice, iako se oni pojavljuju puno češće. U Sjedinjenim Američkim Državama se, na primjer, za 2022. godinu predviđa 19880 novih slučajeva i 12810 smrtnih slučajeva (64,4%) uzrokovanih rakom jajnika, čime se ovaj tip raka nalazi na petom mjestu prema smrtnosti kod žena [3]. Lošu statistiku liječenja ove bolesti potvrđuju i posljednji podaci u Republici Hrvatskoj, objavljeni u 2019. godini, kada je incidencija raka jajnika, jajovoda i povezanih oblika iznosila 485 slučajeva, s visokom stopom mortaliteta od čak 352 slučaja (72,5%) [4]. Razlozi visoke smrtnosti su nedostatak specifičnih simptoma i dijagnostičkih metoda što rezultira nesmetanim širenjem zloćudnih stanica po tijelu i otkrivanjem bolesti u uznapredovaloj fazi, kada je uspješnost liječenja znatno smanjena.

1.1.2 Čimbenici rizika

Najveći čimbenici rizika od oboljenja su, kao i kod većine bolesti, pojavnost tumora u prošlosti unutar obitelji i genetska predispozicija određena specifičnim mutacijama gena *BRCA1* i *BRCA2*. Vrlo važan čimbenik je također i dob, jer stopa incidencije raste proporcionalno starosti. Stopa oboljenja veća je kod žena starijih od 50 godina,

a najveća između 60. i 64. godine. S druge strane, žene koje su rodile u ranijoj dobi, ušle rano u menopauzu, koristile hormonsku kontracepciju ili u prehrani koriste namirnice s niskim postotkom masti imaju smanjen rizik od pojave raka jajnika. Rak jajnika se češće javlja u zemljama visokog standarda [5].

1.1.3 Otkrivanje i određivanje proširenosti

Sumnja na rak jajnika postavlja se tijekom općeg fizičkog pregleda bolesnica sa osjećajem nelagode i boli u području trbuha, napuhnutosi ili otečenost trbuha, poremećajima prehrane, problemima s mokrenjem, boli tijekom spolnog odnosa, kratkim dahom uslijed pleuralnog izliva i drugim simptomima koji su karakteristični i za poremećaje i bolesti vezane uz probavu i menstrualni ciklus. Prisustvo raka potvrđuje se transvaginalnim ultrazvukom, metodama MR i PET-CT ili određivanjem razine tumorskog biljega CA125. Faza ili stadij bolesti određuje se tijekom kirurškog odstranjivanja novotvorbe (laparatomije, laparoskopije) korištenjem službenog sistema FIGO. Rak jajnika svrstava se u četiri stadija prema uputama opisanim u Tablici 1 [6]. Stopa preživljenja unutar 5 godina od dijagnoze u prosjeku iznosi 48,6%. Međutim, postoji velika razlika u stopi smrtnosti ako je rak dijagnosticiran u ranoj (30,2%) ili kasnoj fazi bolesti (92,6%) [7].

Tablica 1 Stadiji raka jajnika prema sustavu FIGO

Stadij	Oznaka	Opis
I	IA	Rak ograničen na jedan jajnik (netaknute ovojnice) ili jajovod; bez prisutnosti raka na površini jajnika ili jajovoda; bez zloćudnih stanica u ascitnoj tekućini ili peritonealnim ispircima; bez metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenim tkivima
	IB	Rak na oba jajnika (netaknute ovojnice) ili jajovoda; bez prisutnosti raka na površini jajnika ili jajovoda; bez zloćudnih stanica u ascitnoj tekućini ili ispircima peritoneuma ili zdjelice; bez metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenim tkivima
	IC	Rak ograničen na jedan ili oba jajnika ili jajovoda; prisutan jedan od uvjeta: 1) prekinuta ovojnica raka tijekom operacije (IC1); 2) prisutnost raka na površini jajnika ili jajovoda, ili je ovojnica bila prekinuta prije operacije (IC2); 3) zloćudne stanice u ascitnoj tekućini ili ispircima peritoneuma ili zdjelice (IC3); bez metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenim tkivima

II	IIA	Rak na jednom ili oba jajnika ili jajovoda uz lokalno širenje na maternicu, jajnike ili jajovode; bez metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenim tkivima
	IIB	Rak na jednom ili oba jajnika ili jajovoda uz širenje na tkiva zdjelice ili peritonealne šupljine (mokraćni mjehur, debelo crijevo, rektum); bez metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenim tkivima
	IIIA1	Rak jednog ili oba jajnika ili jajovoda, ili postoji primarni rak peritoneuma koji se proširio na ostala tkiva zdjelice; metastaze promjera do 10 mm lokalno u retroperitonealnim limfnim čvorovima potvrđene citološkim ili histološkim pretragama
III	IIIA2	Rak jednog ili oba jajnika ili jajovoda, ili postoji primarni rak peritoneuma koji se proširio na ostala tkiva izvan zdjelice (metastaze do 10 mm)
	IIIB	Rak jednog ili oba jajnika ili jajovoda, ili postoji primarni rak peritoneuma koji se proširio na ostala tkiva izvan zdjelice (metastaze do 2 cm)
	IIIC	Rak jednog ili oba jajnika ili jajovoda, ili postoji primarni rak peritoneuma koji se proširio na ostala tkiva izvan zdjelice (metastaze veće od 2 cm)
IV	IVA	Rak jednog ili oba jajnika ili jajovoda, sa malignim stanicama u izljevima pluća potvrđenima citološkim metodama; nema metastaza u drugim tkivima
	IVB	Rak jednog ili oba jajnika ili jajovoda, s metastazama u jetri, slezeni, udaljenim limfnim čvorovima i drugim tkivima poput pluća ili kosti potvrđenima citološkim metodama

Preuzeto i prilagođeno prema [6].

1.1.4 Tipovi raka jajnika

Rak jajnika histološki dijelimo prema tipu staničja iz kojeg je nastao, pri čemu se svaki tip razlikuje i po načinu širenja, tretmanu i vjerojatnosti ishoda. Prvi i najčešći tip je rak pokrovnih stanica (rak stanica epitela ili epitelni rak) jajnika, jajovoda ili peritoneuma koji se najčešće javlja kod osoba starijih od 50 godina. Iz spolnih stanica jajnika nastaje drugi tip, vrlo rijedak rak zametnih stanica jajnika. Treći i najrjeđi tip nazivamo rak moždine (stroma) jajnika koji nastaje iz stanica strome vezivnog tkiva te se, zajedno s rakom zametnih stanica, pojavljuje u mlađoj dobi. Postoji i iznimno rijedak rak miješanog tipa za koji ne možemo sa sigurnošću potvrditi porijeklo te sekundarni rak nastao iz zloćudnih stanica koji metastaziraju u jajnik (najčešće iz dojke i probavnog sustava) [8]. Rak jajnika se nalazi u jednom ili oba jajnika, a širi se na maternicu, mokraćni mjehur, debelo crijevo, trbušnu šupljinu te

dalje po tijelu. U posljednjih nekoliko godina sve je više dokaza da su mnogi slučajevi, prvobitno klasificirani kao rakovi jajnika i peritonealne šupljine, pogrešno klasificirani i zapravo potječu iz jajovoda [9].

1.1.5 Rak pokrovnih stanica jajnika

Najčešći podtip raka pokrovnih stanica jajnika (EOC) je serozni adenokarcinom, koji može biti niskog ili visokog stupnja, a nastaje u pokrovnim stanicama jajnika ili jajovoda. Zatim slijede i manje učestali mucinozni (iz pokrovnih stanica vrata maternice), endometrijski (iz pokrovnih stanica sluznice maternice), rak bistrih stanica (iz pokrovnih stanica rodnice), prijelazni (Brennerov), miješani epitelni, miješani Mullerijanovi, nediferencirani te ostali neklasificirani tumori [6,10,11]. U novije vrijeme, EOC se može podijeliti i na dva tipa raka prema karakteristikama poput ishoda, brzini napretka, stabilnosti genoma i slično. U tip I bi spadali svi EOC-i uglavnom ranih stadija (I i II), niskog stupnja, koji slabo proliferiraju i dobro odgovaraju na kemoterapiju (Tablica 2). Iako se često javljaju mutacije u genima poput *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* i *ARID1A*, mutacije gena *TP53* i *BRCA1/2* nisu česte u skupini EOC tipa I [12–14]. Sukladno tome, pacijenti s EOC-om tip I imaju vrlo dobru stopu preživljenja. S druge strane, rakovi tipa II su uglavnom stadija III i IV, visokog stupnja, koji brzo proliferiraju i napreduju, šire se u okolna tkiva te, iako isprva dobro odgovaraju na kemoterapiju, vrlo često se ponovno javljaju nekoliko mjeseci ili godina nakon liječenja, zbog čega je stopa preživljenja bolesnica vrlo niska (Tablica 2) [11]. Gotovo svi EOC-i tipa II imaju prisutne mutacije gena *TP53*, *BRCA1/2*, a ponekad i *ERBB2* [12–15].

Tablica 2 Usporedba EOC-a tipa I i II.

	Tip I	Tip II
pojavnost	25%	75%
smrtnost	10%	90%
dijagnoza	rani stadij	kasni stadij
napredak bolesti	spor	brz
podtipovi	serozni EOC niskog stupnja	serozni EOC visokog stupnja
	EOC endometrija niskog stupnja	EOC endometrija visokog stupnja
	EOC bistrih stanica	nediferencirani EOC

	EOC mucinoznih stanica	
stabilnost genoma	stabilno	nestabilno

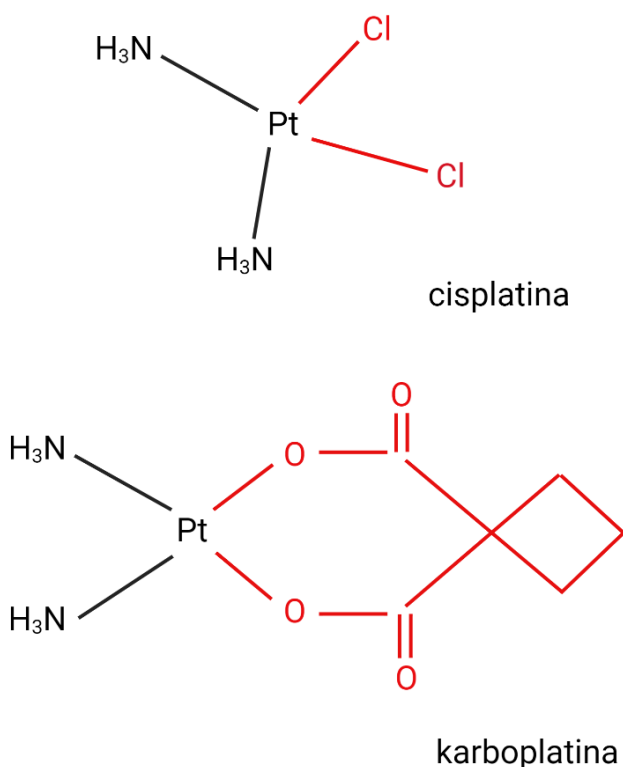
Preuzeto i prilagođeno iz [15].

1.2 Liječenje raka jajnika

Svim bolesnicama s rakom jajnika, bez obzira na simptome, kirurškim se zahvatom uklanja makroskopski vidljiva tumorska masa, pri čemu se uzima uzorak za biopsiju te ispire trbušna šupljina fiziološkom otopinom kako bi se uklonile zloćudne stanice. Nakon kirurškog zahvata i određivanja stadija bolesti slijedi minimalno šest tretmana kombinacijom kemoterapeutika. Ukoliko je potrebno zbog stadija bolesti, bolesnicama se uklanjaju i drugi organi ili tkiva zahvaćena rakom jajnika, a ponekad se daje i pred-operativna terapija kako bi se smanjio volumen tumora i povećala uspješnost kirurškog odstranjivanja. U posljednje vrijeme se sve češće propisuju radioterapija i/ili ciljana terapija bolesnicama čiji rak jajnika ispunjava uvjete za primjenu istih [7,16]. Radioterapija se koristi kao održavajuća ili palijativna terapija u slučajevima povrata bolesti, a posebno u slučaju razvoja otpornosti na terapiju, kada ostale metode ne djeluju. U usporedbi s kemoterapijom, radioterapija je vrlo skupa, ima slabiji i manje specifičan terapijski učinak na rak jajnika te ozbiljnije nuspojave [16]. U određenim slučajevima, u liječenju raka jajnika primjenjuje se i ciljana terapija; pazopanib i bevacizumab inhibiraju formiranje krvnih žila (angiogenezu), olaparib, veliparib i niraparib inhibiraju protein PARP i mnogi drugi. Trenutno se vrlo intenzivno istražuju terapije cjepivima koje ciljaju imunski sustav bolesnica sa svrhom efikasnije borbe vlastitim protutijelima. Međutim, osim nekolicine spojeva koji su u početnim fazama kliničkih ispitivanja i predstavljaju potencijalno interesantna rješenja, trenutno ne postoji metoda liječenja raka jajnika koja je jednaka ili uspješnija od kombinacije kirurškog zahvata i kemoterapije [16,17].

Uobičajena kemoterapija raka jajnika se već dugi niz godina sastoji od kombinacije spojeva na bazi platine i paklitaksela. Prvi lijek koji se koristio u kemoterapiji raka jajnika bila je cisplatina (cDDP), koja se aktivira ulaskom u stanicu zamjenom atoma klora molekulama vode. Aktivirani oblik cDDP-a se veže na dušike baza gvanozina u

DNA stvarajući takozvane adukte DNA (engl. *DNA adducts*). Adukti na molekuli DNA sprječavaju pristup enzimima, njeno odvijanje i replikaciju, uzrokujući tako programiranu smrt stanice (apoptozu). U novije vrijeme se umjesto cDDP-a koristi karboplatina (CBP), jer je manje štetna za zdrave stanice te uzrokuje manje nuspojave kod bolesnika. Mehanizmi aktivacije i djelovanja CBP-a su slični mehanizmima cDDP-a, osim što umjesto atoma klora, CBP sadrži ciklobutan-dikarboksilnu skupinu (Slika 1) [18,19].



Slika 1 Kemijske strukture cisplatine i karboplatine

Molekula cisplatine (gore) se sastoji od središnjeg atoma platine povezanog s dvije skupine amonijaka i dva atoma klora (označeno crveno). Karboplatina (dolje), umjesto dva atoma klora, ima prsten ciklobutan-dikarboksilata vezanog na središnji atom platine (označeno crveno) [20].

Paklitaksel (TAX), prodajnog imena Taxol®, spada u skupinu taksana, spojeve koji se vežu na tubulin, točnije tubulin β [21]. Tubulini čine skupinu globularnih proteina pri čemu tubulini α - i β polimeriziraju u mikrotubule, glavnu komponentu citoskeleta

eukariotske stanice. Mikrotubuli su, između ostalog, uključeni u diobu stanica [22]. Vezanjem paklitaksela na tubuline dolazi do stabilizacije mikrotubula čime je onemogućena njihova dinamika što dovodi do zaustavljanja diobe i poticanja smrti stanice. Također, vezanje TAX-a na protein Bcl-2 potiče njegovu fosforilaciju čime dolazi do poticanja apoptoze. Osim za liječenje raka jajnika, ovaj spoj, koji se dugi niz godina izolirao iz kore pacifičke tise (*Taxus brevifolia*), se još koristi i za liječenje raka pluća i dojki [23].

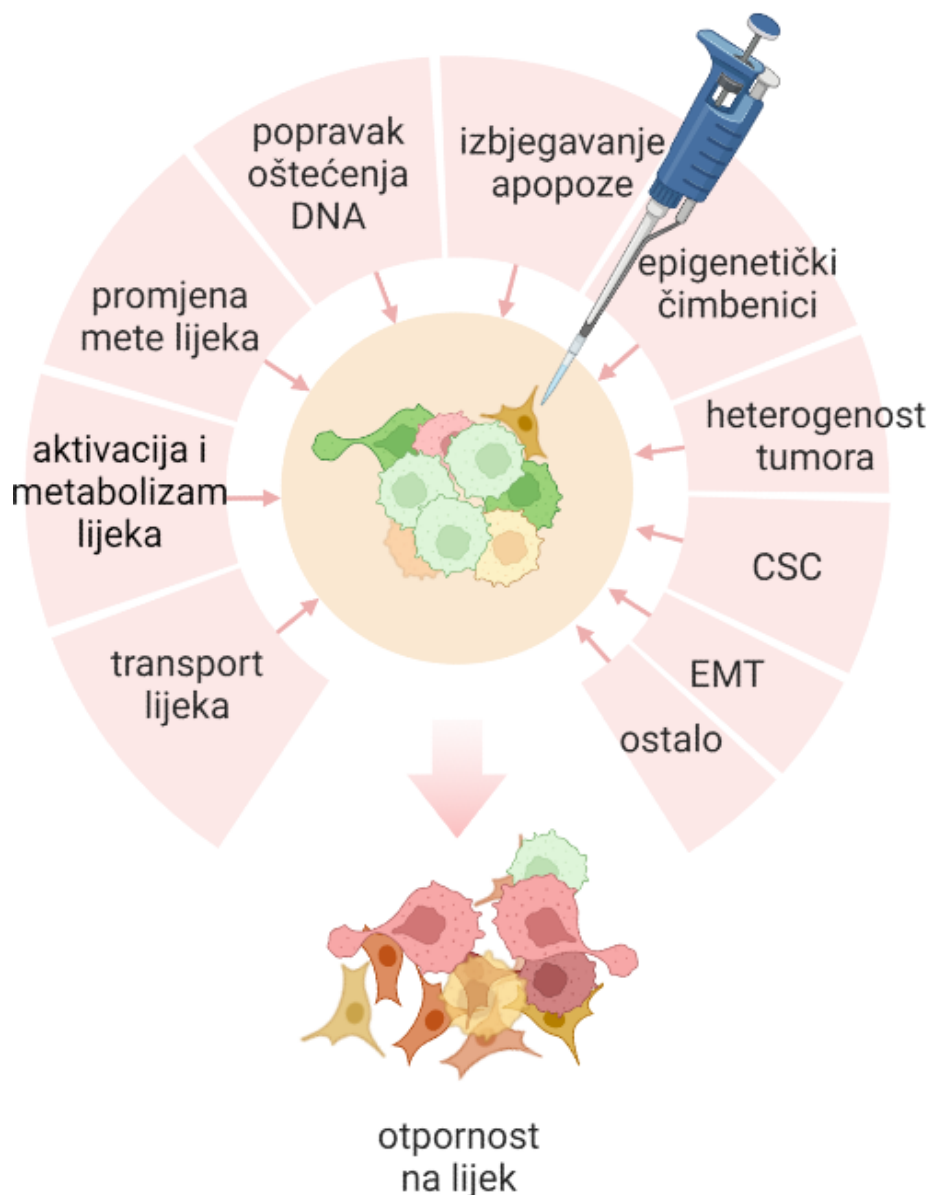
1.3 Otpornost stanica raka na kemoterapiju

1.3.1 Tipovi otpornosti

Iako je kemoterapija jedan od najčešćih terapijskih pristupa u liječenju različitih vrsta tumora već preko četrdeset godina, glavni problemi uspješne kemoterapije - razvoj otpornosti na terapiju i neželjene nuspojave - nisu riješeni. Otpornost na kemoterapiju može biti rezultat promjena nastalih prije ili tijekom/nakon terapije, zbog čega otpornost dijelimo na urođenu (engl. *intrinsic*) i stečenu (engl. *extrinsic*) [24]. Urođena otpornost javlja se tijekom procesa nastanka raka (karcinogeneze) uslijed promjena u genomu, zbog čega je kemoterapija već od početka liječenja nedovoljno učinkovita [25]. Stečena otpornost je otpornost koja se razvije zbog promjena u genetskom zapisu ili mikrookolišu stanica raka tijekom ili nakon višekratne primjene terapije. Bolesnice sa stečenom otpornosti isprva dobro odgovaraju na terapiju, ali s vremenom je odgovor sve slabiji [26].

1.3.2 Molekularni mehanizmi otpornosti na terapiju

Dosad je opisano više mehanizama pomoću kojih stanice raka mogu postati otporne na terapiju (Slika 2) [27,28].



Slika 2 Različiti mehanizmi kojima stanice raka mogu razviti otpornost na lijekove

Slika je preuzeta iz rada [27] i prilagođena. CSC, matične stanice tumora; EMT, epitelno mezenhimska tranzicija.

Proteini membrane stanice koji posreduju u ulasku ili izlasku tvari u stanicu zovu se transportni proteini ili transporteri. S obzirom da uglavnom svaki lijek mora proći kroz membranu stanice, bilo kakva promjena transportera koja utječe na stopu transporta tog lijeka može potencijalno postati mehanizmom otpornosti stanica. Najpoznatiji primjeri su geni porodice ABC - *ABCB1* (protein MDR1 ili P-glikoprotein), *ABCC1*

(protein MRP1) i *ABCG2* (protein BCRP) [29]. Sva tri proteina imaju funkciju izbacivanja tvari iz stanice [30]. Pokazano je da je pojačana ekspresija P-glikoproteina povezana s otpornosti raka jajnika na TAX [31], pojačana ekspresija MRP1-a s otpornosti raka pluća na cDDP [32], a pojačana ekspresija BCRP-a s otpornosti raka jajnika na cDDP i TAX [33]. Stoga, ukoliko se transporterima posredovan unos lijeka u stanicu smanji ili stopa iznošenja lijeka poveća, koncentracija lijeka će u stanici biti manja, zbog čega će terapija biti manje efikasna [27].

Nadalje, lijekovi u stanici ulaze u interakciju s drugim molekulama i proteinima koji mogu promijeniti, djelomično razgraditi ili stvoriti komplekse s lijekovima. Vrlo često je upravo ta interakcija lijeka potrebna za njegovu aktivaciju. Stanice mogu razviti otpornost na lijek tako da utječu na tu interakciju i time spriječe aktivaciju lijeka [27,34]. Primjer je otpornost na lijek posredovana većom koncentracijom enzima koji odstranjuju štetne tvari iz stanice. Primjeri takvih enzima su proteini sustava citokrom P450 te GST, koji uklanjaju štetne tvari iz stanice konjugacijom glutationa i ksenobiotika. Stanice raka često koriste upravo taj enzim kako bi iz stanice uklanjale lijekove poput cDDP-a i CBP-a. Naime, pojačanom ekspresijom GST-a povećava se konjugacija glutationa i lijeka i samim time povećava količina neaktiviranog lijeka u stanici [35].

Ukoliko se lijek uspješno aktivira u stanici, sljedeći mehanizam koji može utjecati na efikasnost lijeka je moguća promjena dostupnosti ili strukture ciljne molekule (mete) lijeka [27]. Primjer je molekula tubulina β , koja se često povezuje s otpornosti raka jajnika na taksane. Povećana koncentracija tubulina β III, ali i mutacija u jednoj bazi tubulina β -I, rezultiraju smanjenom efikasnošću TAX-a u liječenju raka jajnika [21,36].

Vrlo često korišten alat u kemoterapiji su i lijekovi koji potenciraju nastanak oštećenja u DNA zbog čega stanica umire. Primjer takvog djelovanja su već spomenuti spojevi na bazi platine. Uslijed kontinuirane izloženosti DNA štetnim učincima zračenja i tvari, stanica je tijekom evolucije razvila mehanizme popravka oštećenja u DNA [27,34]. Ukoliko je u stanici pojačana ekspresija gena koji sudjeluju u popravku DNA izrezivanjem nukleotida (na primjer *ERCC1*), takve stanice biti će otpornije na terapiju lijekovima na bazi platine [37,38]. Međutim, ukoliko je mutiran neki od gena koji kodiraju za proteine popravka DNA homolognom rekombinacijom (na primjer *BRCA1/2*), stanice će lošije popravljati oštećenja DNA i biti osjetljivije na terapiju. Iz

tog razloga je prognoza bolesnika s mutacijama u genima *BRCA1/2* znatno bolja od onih bez [39].

Ponekad određeni geni povezani s apoptozom mogu biti mutirani ili snižene ekspresije, zbog čega stanice raka lošije odgovaraju na terapiju [27]. Najpoznatiji primjeri takvih gena su *TP53* [40], *BCL2* [40] i obitelj *JNK* [41]. *BCL2*, *BCL-xL*, čija pojačana ekspresija indicira lošiju prognozu bolesnika s rakom jajnika, povezuje se i s otpornosti na spojeve s platinom i TAX [42,43]. Pokazano je također da je pojačana ekspresija survivina usko povezana s otpornosti na TAX, ali ne i na spojeve s platinom [44].

Razvoj otpornosti može biti posredovan i epigenetičkim alternacijama posredovanim s lncRNA i miRNA [45]. Dosad je pokazano da je u raku jajnika vrlo često pojačana ekspresija lncRNA *HOTAIR* koja preko signalnog puta NF- κ B aktivira popravak oštećenja DNA. Iz tog razloga stanice s pojačanom ekspresijom lncRNA *HOTAIR* slabije odgovaraju na terapiju spojevima s platinom [45]. Također, veliki broj miRNA poput *miR-186* [46], *miR-124* [47], *miR-591*, *miR-106a* [48], *miR-141* [48] i skupina *miR-200* [49] su dokazano uključene u otpornost na terapiju. Kao mehanizam otpornosti u tumorima otpornima na terapiju spominje se i DNA metilacija kojom se određeni geni aktiviraju ili inaktiviraju [50].

Tumorska masa je sastavljena od brojnih stanica s različitim morfološkim, funkcionalnim i genetskim karakteristikama. Pretpostavlja se da i terapija djeluje na stanice različito. Opetovanim tretmanom, stanice razvijaju različite mehanizme otpornosti unutar jedne mase tumora [51]. U toj heterogenoj masi stanica nalaze se i matične stanice tumora (CSC) iz kojih može nastati cijeli spektar stanica [51,52]. Iako matične stanice postoje u tumoru i prije kemoterapije, u posljednje vrijeme se smatra da sama terapija može potaknuti transformaciju normalnih matičnih stanica u CSC-ove preko pojačane ekspresije faktora transkripcije *SOX2* i *OCT4* [53].

U radovima koji se bave otpornosti na terapiju se vrlo često kao mehanizmi nastanka otpornosti spominju i promjene vezane uz EMT, kojeg ćemo posebno obraditi u poglavlju 1.4, te reaktivne oksidativne vrste (ROS), poticanje autofagije i hipoksije, inhibicija angiogeneze, dormancija CSC-ova i utjecaj tumorskog mikrokoliša [54,55].

1.3.3 Višestruka otpornost raka na terapije

Vrlo mali broj tumora se liječi samo jednim tipom kemoterapeutika. Primjer tome je rak testisa koji se uspješno liječi cDDP-om. U najvećem broju slučajeva tumori se liječe korištenjem više kemoterapeutika, odnosno kombinacijom dvaju ili više lijekova s različitim mehanizmom djelovanja čime se osigurava uspješnija terapija. No, rak vrlo često postane otporan, ne samo na lijekove koji se koriste u terapiji, već i na lijekove koji uopće nisu korišteni tijekom terapije. Nadalje, postoje vrlo agresivni tipovi raka koji tijekom karcinogeneze steknu otpornost na lijekove različitih mehanizama djelovanja [27]. Smatra se da su jedni od mogućih nosioca ove višestruke otpornosti raka upravo CSC-ovi koji vrlo često imaju pojačanu ekspresiju transportera i enzima koji sudjeluju u uklanjanju štetnih tvari iz stanice, zatim inhibirane signalne puteve apoptoze, pojačanu aktivnost mehanizama popravka oštećenja DNA i slično [27,34,56].

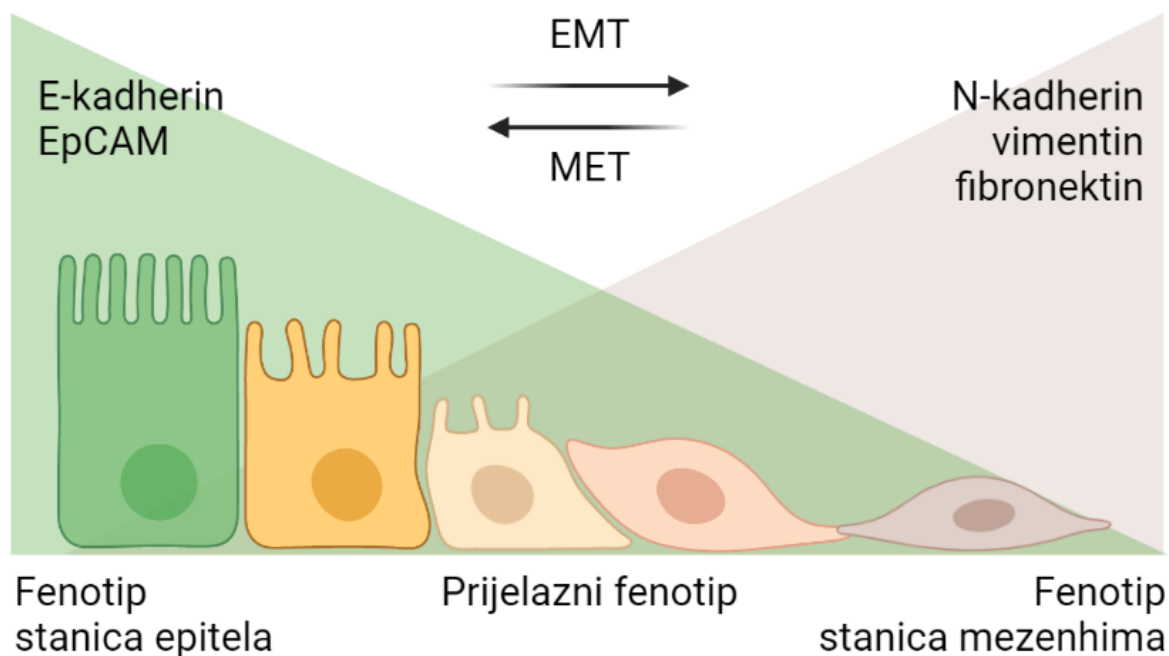
1.3.4 Farmakogenetski biljezi otpornosti i personalizirana medicina

Kako bi se bolje razumjeli molekularni mehanizmi otpornosti raka na terapiju, utvrdio najbolji način otkrivanja ili sprječavanja razvoja otpornosti na terapiju, te definirali mogući novi farmakogenetski biljezi (dalje u tekstu: biljezi) ili moguće nove ciljne molekule terapije, posljednjih se godina intenzivno pretražuju i analiziraju podaci genoma, transkriptoma, proteoma i miRNA tumora [57–59]. U kontekstu istraživanja i primjene rezultata u liječenju onkoloških bolesnika, biljezi predstavljaju snažan iskorak prema personaliziranom liječenju. Razlog tome je dokazana raznolikost svake individue na razini genoma te time i bolesti. Kombinacijom sekvenciranja DNA, RNA i metoda imunocitokemije moguće je djelomično predvidjeti odgovor bolesnika na buduću terapiju. Kako bi predviđanje bilo uspješnije, mnoga istraživanja nude potencijalno korisne panele s više biljega koji mogu pomoći boljem prepoznavanju otpornosti i ishoda kemoterapije. Kao zanimljivi su izdvojeni proteini CA125, HE4, transferin, FOLR1, metaloproteinaze izvanstaničnog matriksa, NANOG, aneksin A3, i drugi [16,60–62]. Međutim, mnogi kandidati se ispituju samo u kontekstu njihove vrijednosti kao biljega otpornosti, bez dodatnih analiza njihove funkcije. U istraživanju otpornosti raka jajnika zasad je na modelima stanica i životinja pokazano da

utišavanje gena *RTF1*, *CSDE1*, *CNOT8* i *MEK1* povećava osjetljivost na CBP [63], dok utišavanje gena *CD147* povećava osjetljivost na TAX [63]. Postoji veliki broj sličnih pokusa s drugim kandidatima koji nažalost još uvijek nisu rezultirali velikim napretkom terapije raka jajnika. Međutim, kako trenutno u kliničkom liječenju raka jajnika ne postoji standardizirana metoda otkrivanja otpornosti na terapiju, glavni fokus ovog rada će biti na otkrivanju potencijalno zanimljivih farmakogenetskih biljega i pokušaju razjašnjavanja njihove uloge u otpornosti i procesu epitelno-mezenhimske tranzicije.

1.4 Epitelno-mezenhimska tranzicija

Stanice epitela, koje odvajaju ili prekrivaju tkiva i organe, odlikuje vršno-bazna polarnost, čvrsta povezanost s bazalnom membranom i okolnim stanicama. S druge strane, stanice mezenhima izgledom i arhitekturom podsjećaju na nepolarizirane stanice fibroblasta, bez čvrstih veza sa stanicama ili drugim strukturama. Proces kojim stanice epitela postaju pokretljivije i poprimaju druge značajke stanica mezenhima naziva se epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), dok se obrnuti proces naziva mezenhimsko-epitelna tranzicija (MET). Do EMT-ja dolazi u ranim fazama razvoja embrija, ali i u kasnijem razvoju, diferencijaciji i zarastanju tkiva [64]. Tranzicija je koordinirana promjenama u ekspresiji takozvanih gena EMT-ja, njihovoj translaciji i post-translacijskim modifikacijama. U početnim fazama tranzicije dolazi do smanjenja ekspresije proteina E-kadherina i EpCAM te postupene pojačane ekspresije gena *CDH2*, *VIM* i *FN1*, odnosno proteina N-kadherina, vimentina i fibronektina [65,66]. Tijekom EMT-ja se događaju i značajne promjene u citoskeletu stanica. Dolazi do reorganizacije citoskeleta i formacije membranskih izbočina bogatih aktinom (lamelipodija, filopodija i invadopodija) koji daju stanici mogućnost kretanja i invazije [63]. U proces EMT-ja su uključene i promjene u signalnim putevima TGF- β , tirozinskih kinaza, Wnt, Notch, Hedgehog i drugima [63]. Vrlo česta pojava vezana uz EMT je nepotpuna tranzicija koja rezultira širokim spektrom stanica s ekspresijom markera EMT-ja i fenotipom i stanica epitela i stanica mezenhima (prijelazni fenotip) [65].



Slika 3 Epitelno-mezenhimska tranzicija

Karakteristike stanica epitela koje prolaze kroz proces EMT-ja i poprimaju odlike stanica mezenhima te njihovi najpoznatiji biljezi (epitelni: E-kadherin, EpCAM; mezenhimski: N-kadherin, vimentin i fibronektin) [65].

EMT se vrlo često spominje u kontekstu procesa širenja raka u udaljena tkiva kojima nastaju metastaze. U trenutku kada stanice raka, koje se nekontrolirano dijele, poprime karakteristike stanica mezenhima i postanu pokretljive, vrlo često razviju i svojstvo proteolitičke razgradnje izvanstaničnog matriksa. Pokretljive stanice tako prodiru kroz tkiva, te se kroz krvne i limfne žile rasprostranjuju po udaljenim tkivima. Nakon što stanice dođu u okoliš u kojemu su uvjeti za razvoj i diferencijaciju pogodni, prolaze kroz MET uspostavljajući udaljene metastaze [27,67].

1.5 Povezanost otpornosti na lijekove i EMT-ja

Povezanost razvoja otpornosti na kemoterapiju i EMT-ja je dosad istraživana i opisana u kontekstu raka jajnika, dojke, gušterače, pluća, debelog crijeva i drugih. Naime, uslijed tretmana lijekovima na bazi platine stanice raka vrlo često, osim

otpornosti, razviju i fenotip stanica mezenhima [67]. U slučaju raka jajnika, pokazano je da stanice otporne na spojeve na bazi platine i TAX imaju sniženu ekspresiju E-kadherina te pojačanu ekspresiju vimentina i transkripcijskih faktora *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST* i *ZEB2*. Iako su određene studije pokazale da stanice, odnosno tumori otporni na terapiju mogu biti prepoznati po razini ekspresije spomenutih gena povezanih s EMT-jem [68], u posljednjih nekoliko godina je pokazano da EMT status stanica ne mora nužno biti jednoznačno povezan s metastaziranjem i otpornosti na kemoterapiju. Naime, na temelju postojanja šireg spektra stanica s prijelaznim fenotipom (stanice intermedijera) pokazano je da upravo te stanice često imaju najveću pokretljivost, potencijal razvoja malignih tumora i najveću otpornost na lijekove [65,69,70].

2. Cilj istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja je bio doći do novih spoznaja o odnosu između otpornosti raka jajnika na terapiju i lijekom potaknutog EMT-ja, procesa uključenog u metastaziranje, odnosno utvrditi dijele li ova dva fenomena potaknuta lijekom neke zajedničke molekule ili se razvijaju i djeluju neovisno jedan o drugom.

U tu svrhu je trebalo:

- uspostaviti i karakterizirati stabilan model stanica raka jajnika s postepenim razvojem otpornosti na CBP *in vitro*
- bioinformatičkom analizom transkriptoma izdvojiti, a zatim funkcionalno ispitati gene od interesa u spomenutim procesima i utvrditi njihovu moguću važnost kao biljega preživljenja bolesnica s rakom jajnika, odnosno njihovog odgovora na terapiju
- bioinformatičkom analizom transkriptoma izdvojiti, a zatim funkcionalno ispitati signalne puteve od interesa u spomenutim procesima.

Pretpostavka je bila da će se, usprkos heterogenosti raka jajnika te složenosti regulacije na razini transkripata i proteina, korištenjem novog eksperimentalnog modela moći probrati novi geni, mogući farmakogenetski biljezi i/ili ciljevi za terapiju raka jajnika.

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Osnovne kemikalije

Kemikalije korištene za pripremu otopina i pufera navedene su u Tablici 3.

Tablica 3 Korištene osnovne kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
agaroza	Sigma-Aldrich, SAD
akrilamid (C_3H_5NO)	Serva, Njemačka
albumin seruma goveda, BSA	Macherey-Nagel, Njemačka
amonijev persulfat, APS ($(NH_4)_2S_2O_8$)	Serva, Njemačka
beta-merkaptetanol (C_2H_6OS)	Fluka, Njemačka
bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$)	Serva, Njemačka
bromfenol plavo ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)	Serva, Njemačka
deionizirana voda, diH ₂ O	Kefo d.o.o., Hrvatska
dimetilformamid, DMF ($HCON(CH_3)_2$)	Sigma-Aldrich, SAD
dimetilsulfoksid, DMSO (C_2H_6OS)	Gram Mol, Hrvatska
etanol, 96% (CH_3CH_2OH)	Kefo d.o.o., Hrvatska
etidij bromid, EtBr ($C_{21}H_{20}BrN_3$)	Serva, Njemačka
etilendiamin tetraoctena kiselina, EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	Kemika, Hrvatska
glicerol ($C_3H_8O_3$)	Kemika, Hrvatska
glicin (NH_2CH_2COOH)	Sigma-Aldrich, SAD
kalcijev klorid ($CaCl_2$)	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogen-fosfat (KH_2PO_4)	Kemika, Hrvatska
kalijev klorid (KCl)	Kemika, Hrvatska
klorovodična kiselina (HCl)	Gram Mol, Hrvatska
kristal ljubičasto ($C_{25}N_3H_{30}Cl$)	Difco Laboratories, SAD
Matrigel® Matrix for organoid culture, phenol-red-free, 10 ml	Corning, SAD
McCoy-eva modifikacija A5 medija (engl. <i>McCoy's A5 medium</i> , McCoy)	Capricorn Scientific, Njemačka
McCoy-eva modifikacija A5 medija s L-glutaminom, bez fenol crvenog (engl. <i>McCoy's A5 Medium with L-glutamine, without Phenol Red</i> , McCoy); prozirni medij	Capricorn Scientific, Njemačka
metanol (CH_3OH)	Gram Mol, Hrvatska

minimalni medij za uzgoj stanica, (engl. <i>optimal minimum essential media</i> , Opti-MEM)	Gibco, SAD
mlijeko u prahu, nemasno	Roth, Njemačka
N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonična kiselina, HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma-Aldrich, SAD
N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma-Aldrich, SAD
natrij-dodecil sulfat, SDS (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev hidrogen-fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid (NaCl)	Kemika, Hrvatska
natrijeva lužina (NaOH)	Kemika, Hrvatska
octena kiselina (C ₃ H ₄ O ₂)	Kemika, Hrvatska
Orange G	Sigma-Aldrich, SAD
Paraformaldehid, PFA , 3,7% (C ₂₀ H ₁₄ Br ₂ N ₂ PtS)	Merck Milipore, Njemačka
Pen Strep, mješavina antibiotika	Gibco, SAD
Ponceau S, prah	Sigma-Aldrich, SAD
pročišćena voda bez RNaza	Qiagen, Njemačka
propidij jodid, PI (C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄)	Thermo Fisher Scientific, SAD
resazurin (C ₁₂ H ₇ NO ₄), prah	Sigma-Aldrich, SAD
serum fetusa goveda, FBS	Sigma-Aldrich, SAD
tekućina za brojanje stanica, IsoFlow Sheat Fluid	Beckman Coulter, SAD
tekućina za mjerenje na protočnom citometru FACSFlow	BD Biosciences, SAD
trikloroctena kiselina, TCA (C ₂ HCl ₃ O ₂)	Serva, Njemačka
Tripsin-EDTA, otopina	Sigma-Aldrich, SAD
tris baza (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich, SAD
tris-HCl	Merck Milipore, Njemačka
Tween-20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.2 Puferi i otopine

Korišteni puferi i otopine navedeni su u Tablici 4, zajedno s načinom pripreme.

Tablica 4 Korišteni puferi i otopine

Otopina	Priprema
agaroza (1%), otopina	1 g agaroza + 100 mL diH ₂ O
APS (10%), radna otopina	500 mg APS + 5 mL diH ₂ O
etanol (70%), otopina	730 mL etanol (96%) + 270 mL diH ₂ O
fosfatni pufer, PBS	0,2 g KCl + 0,2 g KH ₂ PO ₄ + 8,0 g NaCl + 1,15 g Na ₂ HPO ₄ + 1000 ml diH ₂ O

kristal ljubičasto (0,2%), radna otopina	0,2 mL kristal ljubičasto + 99,8 mL 2% etanol
Matrigel® (20%), radna otopina	0,2 mL Matrigel® + 0,8 mL medij za izgladnjivanje
medij za uzgoj stanica bez dodatka antibiotika; medij bez antibiotika	5000 mL McCoy + 500 mL FBS
medij za uzgoj stanica s 2% FBS-a; medij za izgladnjivanje	5000 mL McCoy + 100 mL FBS (omjer 1:50; 2%)
medij za uzgoj stanica; medij	5000 mL McCoy + 500 mL FBS + 5 mL Pen Strep
otopina nemasnog mlijeka (5%)	1 g mlijeko u prahu + 20 mL pufer TBS-T
poliakrilamid (30%), radna otopina	29,2 g akrilamid + 0,8 g bisakrilamid u 100 mL diH ₂ O
Ponceau S (0,1%), radna otopina	3 g TCA + 0,1 g Ponceau S u 100 mL miliQ H ₂ O
propidij jodid (1%), radna otopina	1 mL PI + 99 mL diH ₂ O
pufer NaCl/PI	0,1497 g KH ₂ PO ₄ + 8,99 g NaCl + 0,525 Na ₂ HPO ₄ + 1 L diH ₂ O
pufer TAE (1x)	100 mL TAE pufer (50x) + 4900 mL diH ₂ O
pufer TAE (50x)	242 g tris baza + 57,1 mL ledena octena kiselina, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) u 1 L diH ₂ O
pufer TBS (10x)	500 mL tris-HCl (pH 7,5) + 300 mL 5 M NaCl + 200 mL diH ₂ O
pufer TBS-T	50 mL pufer 10x TBS + 450 mL diH ₂ O + 450 µL Tween-20
pufer tris-HCl (pH 6,8; 0,5 M), gornji ili sabijajući pufer	6g tris-HCl + 100 mL diH ₂ O + 6 M HCl do pH 6,8
pufer tris-HCl (pH 8,8; 1,5 M), donji ili razdvajajući pufer	18,2 g tris-HCl + 100 mL diH ₂ O + 6 M HCl do pH 8,8
pufer za uzorke (1x)	60 µL pufer za uzorke (6x) + 300 µL diH ₂ O
pufer za uzorke (6x)	1,2 g SDS + 2 mL diH ₂ O + 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) + 30 mg bromfenol plavo + 3 mL glicerol + 1,2 mL β-merkaptioetanol + diH ₂ O do 10 mL
pufer za prijenos proteina	3,03 g tris baza + 14,4 glicin (pH = 8,3) + 200 mL 20% metanol + 800 mL diH ₂ O
pufer za vezanje aneksin V-FITC, ABB (1x)	1 mL 10x ABB + 9 mL diH ₂ O
pufer za vezanje aneksin V-FITC-a, ABB (10x)	2,38 g HEPES (NaOH do pH 7,4) + 8,18 g NaCl + 0,36 g CaCl ₂ + 1,0 g 1% BSA
resazurin (0,1%), radna otopina	0,1 mL resazurin, otopina + 99,9 mL pufer NaCl/PI
resazurin, otopina	110,5 g resazurin (prah) + 1 mL DMF
SDS (10%), radna otopina	10 g SDS + 100 mL diH ₂ O
tris-glicinski pufer (10x)	15,1 g tris baza + 72,1 g glicin + 5 g SDS + diH ₂ O do 1 L (pH 8,3)

tris-glicinski pufer (1x)	100 mL tris-glicinski pufer (10x) + 900 mL diH ₂ O
----------------------------------	---

3.1.3 Kompleti kemikalija i standardi

Korišteni kompleti i standardi navedeni su u Tablici 5.

Tablica 5 Korišteni kompleti kemikalija i standardi

Komplet	Kataloški broj	Proizvođač
AllPrep DNA/RNA Mini Kit®	80204	Qiagen, SAD
BD Pharmingen™ Annexin V-FITC	556420	BD Biosciences, SAD
Clariom™ S Assay	902927	Applied Biosystems, SAD
Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit	C10420	Thermo Fisher Scientific, SAD
DharmaFECT Transfection reagent	T-2001-02	Dharmacon, USA
GeneChip WT PLUS Reagent Kit	902280	Applied Biosystems, SAD
PageRuler Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Scientific, SAD
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Fisher Scientific, SAD
PowerSYBR® Green PCR Master Mix	1808578	Thermo Fisher Scientific, SAD
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit®	K1622	Thermo Fisher Scientific, SAD
RNase-Free DNase Set	79256	Qiagen, Njemačka
Trans-Blot Turbo Transfer Pack	1704159	Bio-Rad, USA
Western Lightening™ Plus-ECL	NEL104001EA	PerkinElmer, USA

3.1.4 Lijekovi i inhibitori

Korišteni lijekovi i inhibitori navedeni su u Tablici 6, zajedno s korištenim otapalom i koncentracijom primarne otopine. Otopine su čuvane pri -20°C. Završne koncentracije korištene u eksperimentima pripremljene su u mediju za uzgoj stanica.

Tablica 6 Korišteni lijekovi i inhibitori

Inhibitor/lijek	Otapalo	Koncentracija	Kataloški broj	Proizvođač
Karboplatina (CBP)	miliQ H ₂ O	26,94 mM	C2538-250MG	Sigma-Aldrich, SAD
Paklitaksel (TAX)	EtOH	7,03 mM	580556-5MG	Milipore, Njemačka
Rapamycin	DMSO	10 mM	53123-88-9	Sigma-Aldrich, SAD
AZD1080	DMSO	50 mM	HY-13862	MedChemExpress, SAD
SB216763	DMSO	50 mM	HY-12012	MedChemExpress, SAD

Idelalisib	DMSO	50 mM	S2226	MedChemExpress, SAD
LY294002	DMSO	50 mM	154447-36-6	Calbiochem, SAD
Wortmannin	DMSO	10 mM	19545-26-7	Sigma-Aldrich, SAD
Roscovitine	DMSO	282,13 mM	HY-30237	MedChemExpress, SAD
Rilpivirine	DMSO	136,46 mM	HY-10574	MedChemExpress, SAD
TIC-10	DMSO	80,86 mM	HY-15615A	MedChemExpress, SAD
TVB-3166	DMSO	162,56 mM	HY-120394	MedChemExpress, SAD
Febuxostat	DMSO	158,04 mM	HY-14268	MedChemExpress, SAD
Triptolide	DMSO	91,56 mM	HY-32735	MedChemExpress, SAD
Akti-1/2	DMSO	10 mM	A6730-5MG	Sigma-Aldrich, SAD
Cilengitide	DMSO	13,6 µM	SML1594	Sigma-Aldrich, SAD

3.1.5 Početnice

Korištene početnice navedene su u Tablici 7. Liofilizirane početnice su otopljene u pročišćenoj vodi bez RNaza u konačnoj koncentraciji od 100 µM. Otopine početnica čuvane su pri -20°C.

Tablica 7 Korištene početnice za RT-qPCR

Gen	5' – 3' proba	3' – 5' proba
<i>AUTS2</i>	GGTGAGCCGGCCTACGA	TCCTTCCGCTCCTCCTTCA
<i>DNER</i>	CAGCATCGACAGCGAGTTCA	CCGGGATTTCTTTCCAAACC
<i>ELOVL7</i>	TCGATGTGACATTGTTGACTATTCA	GGAGAAGTAATAAAGCCAGCAGGTA
<i>FAM167A</i>	CTGGAAGGCTTTCAGAGCATCG	TCAGCTTGTTGATGTGCCACG
<i>FBLN5</i>	CTGCTGGATGACAACCGAAGCT	GATAAGGCTCCTCACAGCGGAT
<i>FILIP1L</i>	CACCAAGCAGAAGACCTCTCAAG	CCATACTGAGCTTCCAGCAAAGC
<i>FRG2</i>	TCCAGTGAGAAGCACATACAAAGG	CCTTGAGCTTGTTTTCTCAGA
<i>GRAMD1B</i>	TGGGGGAGAAGATTGAGATG,	TGTCCACGCTGAAGTTGAAG
<i>HES7</i>	CATCAACCGCAGCCTGGAAGAG	CACGGCGAACTCCAATATCTCC
<i>HS3ST3A1</i>	TCGAGAGCTTGACGTTCAAAAA	GCGTAGATGCCGATCTGGAT
<i>HS3ST3B1</i>	CACCTTCGAGAGCTTGACGTT	GCGTAGATGCCGATCTGGAT
<i>MAP1B</i>	ACCACTCCTGAGGTCAAAGCTG	GCACAGCAGATGACTTGGTCGT
<i>MFSD6</i>	ATGTCATGCCACGCATTGA	TTGTTACATCTTCCTGTTCTTCCT
<i>MIR99AHG</i>	CATTTCTTGCCTGTACTGTTGCA	TTAGATTAGCACCTCTCTTCTTTGTG
<i>NTM</i>	CCACACCAATGCCAGCATCATG	TGAGAAGCAGGTGCAAGACCAG
<i>PIK3R1</i>	CGCCTCTTCTTATCAAGCTCGTG	GAAGCTGTCGTAATTCTGCCAGG
<i>PLTP</i>	TGCGCAGGTTCCGAATCTA	GGGCCTGTAATGGGATCAGA
<i>PRKAR1B</i>	ACCTGGATGACAACGAGAGGAG	TGTTGGTCACCCACTCTCCGTT

SAMD9	GGGAACCTACCTTGGCTATGCAC	CGTATTCCTGACGGTTCATTGCC
SERPINE2	AACTGGCATCTCCCCCTCTT	ATTGAAGTGGGAGCAGATGGA
SLC38A5	GGAAGTGCAGGATCCAAAGATG	CCCTCACGTTCTTGCCCTGTAG
TMEM200A	TGGGTCCAATACATCCTTGCA	TGGAGGGACCCCGGTCTA
TMEM47	CCGCCAGCTTGGACATCT	GCCAGAGTAGCAATCTGCCAAT
TSPAN18	CTCAACACCTTCGAGACCTACGT	ATCATGGCGAAAAGCTCGAT
WDR46	ACCTACCTGGATGTGTCACTGG	AGTGGCTCCTTCATAGCTGGAC

3.1.6 Male interferirajuće RNA

Korištene male interferirajuće RNA (siRNA) navedene su u Tablici 8. Radne otopine siRNA dobivene su otapanjem liofiliziranih siRNA u pročišćenoj vodi bez RNaza u koncentraciji od 100 µM. Otopine siRNA čuvane su pri -20°C.

Tablica 8 Korištene siRNA

ON-TARGETplus Human siRNA-SMART pool	Kataloški broj	Proizvođač
DNER	L-018708-01-0005	Dharmacon, Horizon Discovery Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo
TMEM200A	L-015162-02-0005	
MIR99AHG	R-031365-00-0005	
SERPINE2	L-012737-00-0005	
FBLN5	L-017621-00-0005	
WDR46	L-009242-01-0005	
HES7	L-009020-00-0005	
PRKAR1B	L-030847-02-0005	
Non-targeting Pool	D-001810-10-20	

3.1.7 Protutijela

Korištena protutijela otopljeni su u puferu TBS-T s 5% nemasnog mlijeka i navedena u Tablici 9.

Tablica 9 Korištena protutijela

Protutijelo	Proizvedeno u organizmu	Očekivana težina	Razrjeđenje	Kataloški broj	Proizvođač
Primarna protutijela					
Akt1/2/3 (H-136)	zec	60 kDa	1:1000	sc-8312	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Phospho-Akt (pAkt)(Ser473)	zec	60 kDa	1:1000	9271L	Cell Signaling, SAD
ERK1/2 (K-23)	zec	44 kDa	1:3000	sc-94	Santa Cruz Biotechnology, SAD
E-Cadherin (24E10)	zec	120 kDa	1:1000	3195	Cell Signaling, SAD
Purified Anti-N-Cadherin	miš	130 kDa	1:2000	610920	BD Biosciences, SAD
Vimentin (D21H3) XP®	zec	58 kDa	1:1000	5741	Cell Signaling, SAD
Anti-Fibronectin (ab2413)	zec	262 kDa	1:1000	GR3174516-4	Abcam, SAD
Sekundarna protutijela					
Anti-Mouse IgG (H+L)	koza	1 mg/mL	1:5000	G21040	Invitrogen, SAD
Anti-Rabbit IgG (H+L)	koza	1 mg/mL	1:5000	31466	Invitrogen, SAD

3.1.8 Uređaji, laboratorijski pribor i ostali materijali

Korišteni uređaji navedeni su u Tablici 10, a laboratorijski pribor i ostali materijali u Tablici 11.

Tablica 10 Korišteni uređaji

Namjena	Naziv uređaja	Proizvođač
analitička vaga	AB54-S	Mettler Toledo, SAD
aparatura za izlivanje gela i elektroforezu u gelu agaroze (kalup za izlivanje gela, češalj, kadica za	Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, SAD

elektroforezu)		
aparatura za izlivanje gela i vertikalnu elektroforezu proteina (kalup za izlivanje gela, češalj, kadica za elektroforezu)	Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems	Bio-Rad, SAD
automatski brojač i analizator stanica	Z2 Coulter [®] Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter, SAD
centrifuga	Heraeus Functionline Labofuge 400	Thermo Electron Corporation, SAD
centrifuga za mikroepruvete	Mini Spin	Eppendorf, Njemačka
digestor	KDG Zaštitni uređaj	Klimaoprema, Hrvatska
fluorescentni svjetlosni mikroskop s digitalnom kamerom	Olympus BX51 i kamera DP70	Olympus, Japan
grijač i miješalica	Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Njemačka
inkubator za uzgoj kulture stanica	Heraeus cell 150	Heraeus, Njemačka
izvor napona struje	PowerPack Basic	Bio-Rad, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema <i>custom</i>	Klimaoprema, Hrvatska
laserski pisac	LX-300+	EPSON, Japan
magnetska miješalica	Rotamix 560 MMH	Tehtnica Železniki, Slovenija
mikrovalna pećnica	MW17B	Končar, Hrvatska
pH metar	PH3 Sension+	Hach, SAD
protočni citometar	FACSCalibur	BD Biosciences, SAD
skener	ScanMaker 5900	Microtek, Tajvan
spektrofotometar	Tecan Infinite M200	Tecan Group Ltd, Švicarska
spremnik za tekući dušik	35VHC	Taylor-Wharton, SAD
svjetlosni mikroskop, invertni	Opton 4758862	Zeiss, Njemačka
tresilica	Vibromix 301 EVT	Tehtnica Železniki, Slovenija
uređaj za ispiranje mikročipova	GeneChip™ Fluidics Station 450	Applied Biosystems, SAD
uređaj za PCR	Eppendorf Thermal Cycler	Eppendorf, Njemačka
uređaj za PCR u stvarnom vremenu	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, SAD
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom	Ultrasonic Processor	Cole Palmer, SAD
uređaj za prijenos proteina	Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, SAD

	System	
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala	ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad, SAD
uređaj za vizualizaciju mikročipova	GeneChip Scanner	Applied Biosystems, SAD
UV-Vis spektrofotometar malih volumena	NanoVue	GE Healthcare, Life sciences, UK
vodena kupelj	JB Nova	Grant, Engleska
vorteks	EV - 100	Tehnica Železniki, Slovenija

Tablica 11 Korišteni laboratorijski pribor i ostali materijali

Pribor/materijal	Proizvođač
bočice za uzgoj stanica Falcon®, T-75	Corning, SAD
bočice za uzgoj stanica Falcon®, T-25	Corning, SAD
gumena strugalica	Falcon Becton Dickinson, SAD
nastavci za mikropipete s filterom ART™, 10 µL	Thermo Fisher Scientific, SAD
nastavci za mikropipete s filterom ART™, 1000 µL	Thermo Fisher Scientific, SAD
nastavci za mikropipete s filterom ART™, 200 µL	Thermo Fisher Scientific, SAD
nastavci za mikropipete, 1-10 µL	Molecular BioProducts, SAD
nastavci za mikropipete, 50-1000 µL	Brand, Njemačka
nastavci za mikropipete, 5-200 µL	Thermo Fisher Scientific, SAD
Petrijeve zdjelice promjera 6 cm Falcon®	Corning, SAD
plastične pipete 10 mL, sterilne	Lab Logistics Group, Njemačka
plastične pipete 5 mL, sterilne	Lab Logistics Group, Njemačka
pločice za uzgoj stanica s 12 bunarića Falcon®	Corning, SAD
pločice za uzgoj stanica sa 24 bunarića Falcon®	Corning, SAD
pločice za uzgoj stanica sa 6 bunarića Falcon®	Corning, SAD
pločice za uzgoj stanica sa 96 bunarića Falcon®	Corning, SAD
prozirne pločice s 96 bunarića, MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied biosystems, SAD
prozirni adhezivni film za prozirne pločice, MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied biosystems, SAD
set automatskih mikropipeta	Eppendorf, Njemačka
štipić za uzimanje briseva	Thermo Fisher Scientific, SAD
tube Falcon®, 15 mL	Falcon Becton Dickinson, SAD
tube Falcon®, 50 mL	Falcon Becton Dickinson, SAD

mikroeprovete od 1,5 mL	Brand, Njemačka
mikroeprovete za mjerenje na protočnom citometru Falcon®	Corning, SAD
ampule za smrzavanje stanica, 2 mL	Greiner bio-one, Austrija
umetci za pločice, Permabile Support for 24 Well Plate Falcon®, 8 uM	Falcon Becton Dickinson, SAD

3.1.9 Računalni programi, alati i baze podataka

Korišteni računalni programi, alati i baze podataka navedeni su u Tablici 12.

Tablica 12 Korišteni računalni programi, alati i baze podataka

Naziv	Verzija/ pristupljeno	Izdavač
Računalni programi		
7300 System SDS Software	1.4	Applied Biosystems, SAD
BD CellQuest™ Pro	6	Becton Dickinson, SAD
FlowLogic	8.6	Inivai Technologies, SAD
GraphPad Prism	8.4.2003	GraphPad Software, SAD
Image Lab	6.0.0	Bio-Rad Laboratories, SAD
ImageJ	1.52a	National Institutes of Health, SAD
Mendeley	1.19.8	Elsevier, Nizozemska
Microsoft Office 365	2210	Microsoft Software, SAD
Transcriptome Analysis Console (TAC)	4	Thermo Fisher Scientific, SAD
Računalni alati i baze podataka		
A database of genes related to platinum resistance [71]	27.06.2022.	http://ptcr-ddr.cptac-data-view.org/#/
Enrichr [1–3]	24.1.2022.	https://maayanlab.cloud/Enrichr/
KM Plotter [4]	24.1.2022.	https://kmplot.com/
Morpheus	18.6.2021.	https://software.broadinstitute.org/morpheus
PubMed	13.7.2020.	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
ROC Plotter [5]	30.12.2022.	https://www.rocplot.org/
STRING [6]	24.1.2022.	https://string-db.org/
VennPainter [7]	18.6.2021.	https://github.com/linguoliang/VennPainter

3.1.10 Linije stanica

U istraživanju je korištena linija stanica ljudskog cistadenokarcinoma jajnika MES-OV koja je uspostavljena i donirana od strane partnerskog laboratorija prof. Šikića sa Sveučilišta Stanford, SAD [68]. Uz nju su korištene i uzgajane prema uputama dobavljača linije stanica ljudskog adenokarcinoma jajnika OVCAR-3 (ATCC HTB-161) i SK-OV-3 (ATCC HTB-77) te ljudskog karcinoma pluća A549 (ATCC CCL-185), dobavljene iz kolekcije ATCC. Provjera izvornosti svih linija stanica provedena je pomoću usluge STR profiliranja firme Microsynth AG (Švicarska). Test kontaminacije stanica mikoplazmama provodio se jednom mjesečno (dipl. ing. Marina Šutalo, viša tehničarka u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković).

MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3 linije stanica korištene su kako bi se uzgojile stanice otporne na CBP. Linija stanica MES-OV i varijante otporne na CBP korištene su za opsežnu analizu ekspresije gena metodom hibridizacije DNA mikročipova. Linije stanica OVCAR-3 i SK-OV-3 korištene su kao dodatni modeli za probir gena kandidata za daljnja ispitivanja. Linija stanica MES-OV je također korištena i za razvoj modela stanica klonova. Linija stanica A549 korištena je kao dodatna kontrola tijekom mjerenja ekspresije proteina.

3.2 Metode

3.2.1 Održavanje, razvoj i karakterizacija kultura stanica

3.2.1.1 Uzgoj kultura stanica

Sve korištene stanice su uzgajane kao jednoslojne kulture u bočicama za uzgoj stanica u McCoy-ovoj modifikaciji 5A medija s dodatkom seruma fetusa goveda (10%) i mješavine antibiotika (0,1%) (dalje u tekstu: medij). Bočice sa stanicama držane su u inkubatoru u stalnim uvjetima vlažne atmosfere pri 37°C i 5% CO₂, osim ako nije drugačije navedeno.

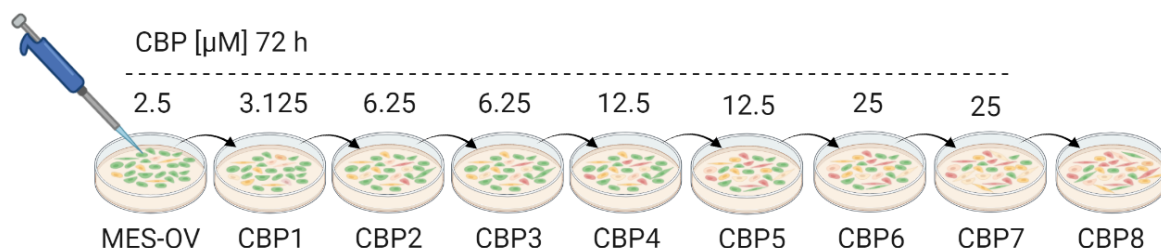
Zbog efikasnijeg dugotrajnog čuvanja i lakšeg transporta, stanice su smrznute te ih je prilikom prvog korištenja bilo potrebno otopiti. Stanice su odmrznute zagrijavanjem

ampule u vodenoj kupelji pri 37°C. Odmrznute stanice su zatim resuspendirane u prethodno zagrijanom mediju i prebačene u bočicu za uzgoj kulture stanica. Nakon 24 h od odmrzavanja, stanicama je promijenjen medij kako bi se uklonio DMSO korišten tijekom smrzavanja koji može negativno djelovati na rast kulture stanica. Stanice su rasađivane dva puta tjedno na način da je iz bočice uklonjen medij te su stanice dva puta isprane s prethodno ugrijanim PBS-om (37°C). Na isprane stanice dodana je otopina Tripsin-EDTA, proteolitičkog enzima, kojom su stanice odvojene od podloge. Djelovanje otopine Tripsin-EDTA pratilo se promatranjem stanica svjetlosnim mikroskopom i zaustavilo dodatkom medija. Stanice su zatim resuspendirane i razrijeđene i/ili nasađene u nove bočice/posude za uzgoj. Ukoliko su stanice nasađivane za eksperiment, potrebno je bilo prethodno izbrojiti stanice korištenjem automatskog brojača. Za brojanje stanica, 200 µL suspenzije stanica razrijeđeno je u 9800 µL tekućine za brojanje stanica. Uvjeti uređaja podešeni su tako da brojač broji čestice veličine od 10 do 25 µm. Srednja vrijednost najmanje dva brojanja se pomnožila s vrijednosti razrjeđenja kako bi se dobio broj stanica u pola mililitra suspenzije stanica. Prilikom smrzavanja stanica, suspenzija je nakon odvajanja od podloge za rast centrifugirana 10 min pri 1000 x g, resuspendirana u FBS-u, prebačena u ampulu za smrzavanje i postepeno hlađena na ledu 30 min. Nakon hlađenja, u ampulu je dodan DMSO (5% volumnog udjela) nakon čega je prebačena na prsten spremnika s tekućim dušikom gdje su stanice smrzavane u parama tekućeg dušika. Sljedeći dan ampule su stavljene u tekući dušik pri -196°C.

3.2.1.2 Razvoj MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3 stanica otpornih na CBP opetovanim tretmanom s CBP-om

U svrhu razvoja otpornosti stanica na kemoterapiju, konfluentne stanice MES-OV tretirane su dodavanjem CBP-a u medij u koncentraciji od 2,5 µM. Stanice su uzgajane 72 h, nakon čega je medij s tretmanom uklonjen, stanice isprane dva puta s prethodno ugrijanim PBS-om te je dodan novi medij bez CBP-a. Mali broj stanica koji je preživio tretman uzgajan je do ponovnog uspostavljanja stabilne kulture stanica. Novonastala kultura stanica obilježena je oznakom MES-OV CBP1 (Slika 4). Stanice su rasađene najmanje dva puta prije smrzavanja i/ili nasađivanja za daljnje eksperimente. Isti postupak tretmana, sa sve većim koncentracijama CBP-a, ponovljen je više puta s novo uspostavljenim stanicama sve dok korištenjem 25 µM

CBP-a nije razvijena stabilna varijanta oznake MES-OV CBP8 (Slika 4). Prilikom odmrzavanja varijanti stanica otpornih na CBP, svaki put se provjeravao postotak preživljenja stanica uslijed tretmana s različitim koncentracijama CBP-a (opisano u poglavlju 3.2.2.1). Slična procedura razvoja varijanti stanica otpornih na CBP primijenjena je i na stanice OVCAR-3 i SK-OV-3, što je rezultiralo uspostavljanjem ukupno tri modela stanica raka jajnika otpornih na CBP. Razlike u razvoju varijanti stanica obuhvaćale su primjenu različitog broja, odnosno ponavljanja pojedinih tretmana.



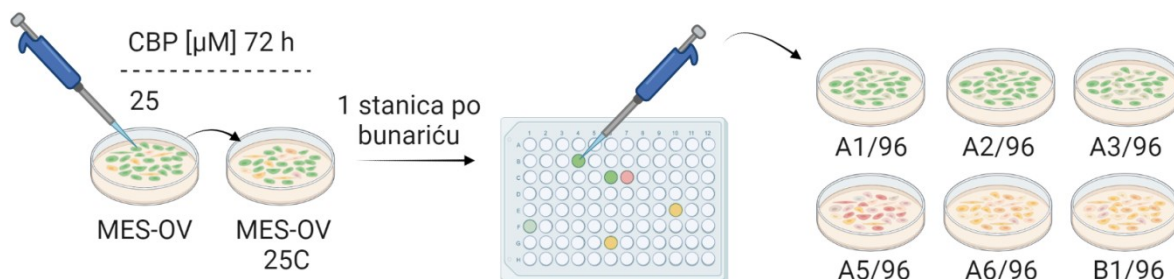
Slika 4 Shematski prikaz razvoja varijanti stanica MES-OV otpornih na CBP

Stanice MES-OV su opetovano tretirane rastućim koncentracijama CBP-a. Nakon svakog tretmana u trajanju od 72 h, preživjele stanice su uzgajane do uspostavljanja konfluentne kulture. Najveća korištena koncentracija CBP-a iznosila je 25 μ M.

3.2.1.3 Razvoj i izdvajanje MES-OV stanica klonova jednokratnim tretmanom s CBP-om

U svrhu razvoja otpornosti na CBP, stanice MES-OV tretirane su jednokratno s 25 μ M CBP. Stanice su uzgajane 72 h, nakon čega je medij s tretmanom uklonjen, stanice isprane dva puta s prethodno ugrijanim PBS-om te je dodan novi medij bez CBP-a. Mali broj stanica koji je preživio tretman uzgajan je do ponovnog uspostavljanja stabilne kulture stanica (Slika 5). Novonastala kultura stanica obilježena je oznakom MES-OV 25C i rasađena najmanje dva puta prije smrzavanja i/ili nasađivanja za daljnje eksperimente. U svrhu izdvajanja pojedinačnih stanica klonova sa sposobnošću preživljavanja tretmana CBP-om i karakteristikama potrebnima za uspostavu kolonije stanica (klonalni rast, matičnost), stanice MES-OV 25C su odignute od podloge korištenjem otopine Tripsin-EDTA te nasađene u pločicu za uzgoj stanica s 96 bunarića u konačnom broju od jedne stanice po bunariću.

Stanice su uzgajane 60 dana ili do uspostave stabilnih kultura stanica, koje su potom prebačene u posude za uzgoj većih površina. Isti postupak ponovljen je dva puta. U konačnici, samo šest pojedinačnih stanica (pet iz prvog (A) i jedna iz drugog (B) eksperimenta) je preživjelo tretman CBP-om i uspostavilo stabilne kulture stanica klonova obilježenih oznakama MES-OV 25C A1/96, A2/96, A3/96, A5/96, A6/96 i B1/96 (Slika 5).



Slika 5 Shematski prikaz razvoja kultura stanica MES-OV klonova nakon tretmana CBP

Stanice MES-OV su tretirane s 25 μ M CBP-om 72 h i uzgajane do uspostave konfluentne kulture stanica (lijevo). Preživjele i namnožene stanice su odignute od podloge i nasađene na pločicu s 96 bunarića u koncentraciji od jedne stanice po bunariću (sredina). Stanice koje su se namnožile su prebačene u posude za uzgoj stanica većih površina i uzgajane kao zasebne kulture stanica (šest kultura stanica prikazanih desno).

3.2.1.4 Određivanje stope proliferacije stanica

U svrhu određivanja stope dijeljenja (proliferacije) stanica koristio se test temeljen na mjerenju ugradnje 5-etinil-2'-deoksiuridina (EdU), analoga timina, u novosintetiziranu DNA. Stanice su nasađene u pločice s 96 bunarića u koncentraciji od 5×10^3 stanica/180 μ L po bunariću. Nakon 96 h inkubacije, stanice su pripremljene korištenjem komercijalno dostupnog kompleta Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 prema uputama proizvođača. Uzorci su mjereni na protočnom citometru korištenjem računalnog programa BD CellQuest™ Pro te analizirani u programu FlowLogic. Pomoću signala azida Alexa Fluor™ 488 koji se kovalentno veže s EdU-om ugrađenim u DNA stanica, izračunati su postotci stanica s ugrađenim EdU-om bioloških replika istog uzorka (prosječni postotci), koji su se koristili kao mjera stope proliferacije stanica. Promjena stope proliferacije (FC) izračunata je prema jednadžbi:

FC(stope proliferacije)= stopa proliferacije(novorazvijene linije stanica)/stopa proliferacije(roditeljske linije stanice).

1

Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta prikazani su kao stupci prosječne stope proliferacije, a varijacije u mjerenju su izražene standardnim devijacijama.

3.2.1.5 Morfološka karakterizacija stanica

Stanice su nasađene u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm (2×10^5 stanica/5 mL) i uzgajane 48 h. Nakon uklanjanja medija stanice su isprane dva puta PBS-om i fiksirane 10 min u metanolu. Nakon što su se osušile od metanola, stanice su isprane u PBS-u i inkubirane 30 minuta u 0,2%-tnoj otopini kristal ljubičastog. Stanice su isprane pod mlazom vodovodne vode i fotografirane pod povećanjem od 100x, 200x i 400x korištenjem svjetlosnog mikroskopa.

3.2.2 Određivanje preživljenja stanica

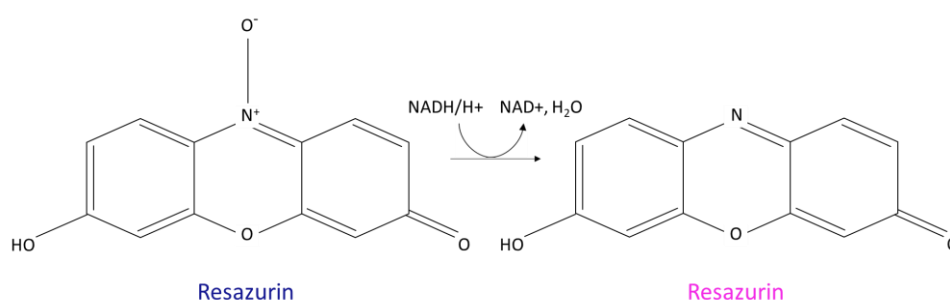
3.2.2.1 Test metabolizma resazurina

U svrhu mjerenja preživljenja stanica nakon tretmana koristio se test metabolizma resazurina koji mjeri vijabilnost stanica. Stanice su nasađene u pločice s 96 bunarića u koncentraciji od 5×10^3 stanica/180 μ L po bunariću. Nakon 24 h, stanice su tretirane različitim koncentracijama spojeva dodavanjem 20 μ L unaprijed pripremljenih otopina. Svaki tretman ispitivao se u minimalno četiri bunarića (replika). Nakon 72 h inkubacije, medij iznad stanica je uklonjen, a na stanice je dodano 110 μ L radne otopine 0,1%-tnog resazurina i prozirnog medija (medij McCoy bez fenol crvenog) u omjeru 1:10. Stanice su inkubirane 3 h, tijekom čega su metabolički aktivne stanice enzimima reduktazama mitohondrija metabolizirale plavo obojeni resazurin u ružičasto obojeni resorufin (Slike 6 i 7). Nakon inkubacije, optička gustoća otopine iznad stanica izmjerena je korištenjem spektrofotometra pri valnoj duljini od 564 nm. Konačne apsorbancije otopina svakog bunarića izračunate su oduzimanjem vrijednosti apsorbancije bunarića s otopinom bez stanica (negativna kontrola). Koncentracija koja smanjuje preživljenje ispitivanih stanica na polovicu vrijednosti izmjerene u netretiranim stanicama (IC_{50}) izračunata je korištenjem računalnog

programa GraphPad Prism iz korigiranog dijagrama zavisnosti koncentracije ispitivanog spoja i apsorbancije prilagođenog korištenjem metode nelinearne regresije. U svrhu usporedbe vrijednosti IC_{50} između linija stanica, dodatno je izračunata stopa promjene (FC) prema jednadžbi:

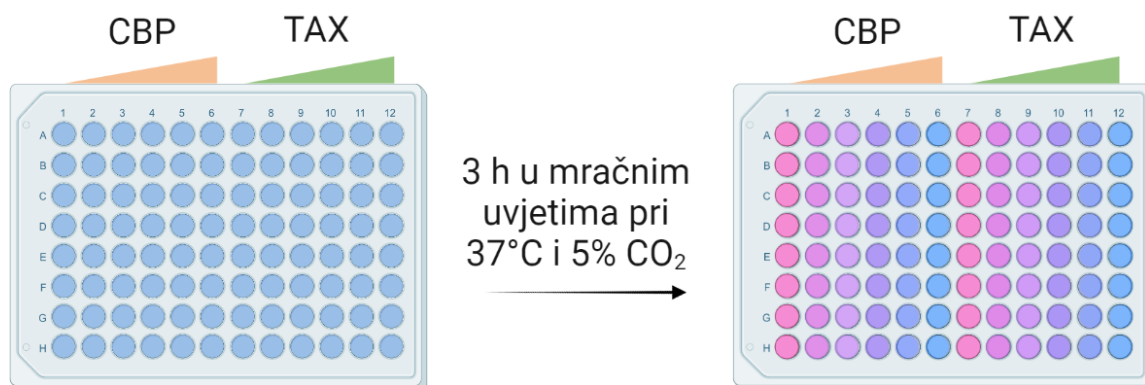
$$FC(IC_{50}) = IC_{50}(\text{novorazvijena linija stanica}) / IC_{50}(\text{roditeljska linija stanica}) \quad 2$$

Rezultati su prikazani kao stupci srednje vrijednosti apsorbancija svakog tretmana (apsolutne vrijednosti), ili kao stupci srednje vrijednosti apsorbancija svakog tretmana normaliziranih na apsorbanciju negativne kontrole pojedinih tretmana (normalizirane vrijednosti), zajedno s vrijednostima standardnih devijacija.



Slika 6 Princip pretvorbe plavog resazurina u ružičasto obojeni resorufin djelovanjem enzima reduktaza mitohondrija

Molekularne strukture resazurina i resorufina, zajedno s enzimom NADH koji reducira plavo obojeni resazurin. Nusprodukti reakcije su NAD^+ i molekula vode.



Slika 7 Shematski prikaz pretvorbe plavog resazurina u ružičasto obojeni resorufin djelovanjem enzima reduktaza mitohondrija metabolički aktivnih stanica

Medij iznad stanica je nakon 72 h inkubacije spojem od interesa uklonjen i dodana je pripremljena radna otopina resazurina pomiješana s medijem bez fenol crvenog. Stanice su inkubirane u mraku pri 37°C, tijekom čega se plavo obojeni resazurin reducirao u ružičasto obojeni resorufin. Nakon 3 h, apsorbancija otopine svakog bunarića izmjerena je na valnoj duljini od 564 nm korištenjem spektrofotometra. Narančasto i zeleno su označeni trendovi porasta koncentracija CBP-a i TAX-a korištenih u eksperimentu.

3.2.2.2 Test klonalnog rasta stanica

Metoda se temelji na činjenici da se stanica raka u povoljnim uvjetima neograničeno dijeli. Svaka stanica raka će stoga, nakon određenog vremena, stvoriti koloniju stanica. Stanice su nasađene u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm u koncentraciji od $1-3 \times 10^3$ stanica/5 mL. Nakon 10 do 15 dana, ovisno o veličini nastalih kolonija, medij iznad stanica je uklonjen, a stanice isprane dva puta PBS-om. Stanice su zatim fiksirane u metanolu 10 min. Nakon sušenja, stanice su obojane 30 minuta otopinom kristal ljubičastog. Obojane kolonije temeljito su isprane pod mlazom vodovodne vode, osušene i izbrojane. Ukupnom broju kolonija doprinosile su samo kolonije s najmanje 50 stanica. Kolonije su fotografirane pod 1x i 100x povećanjem korištenjem svjetlosnog mikroskopa.

3.2.2.3 Test određivanja stope smrti stanice

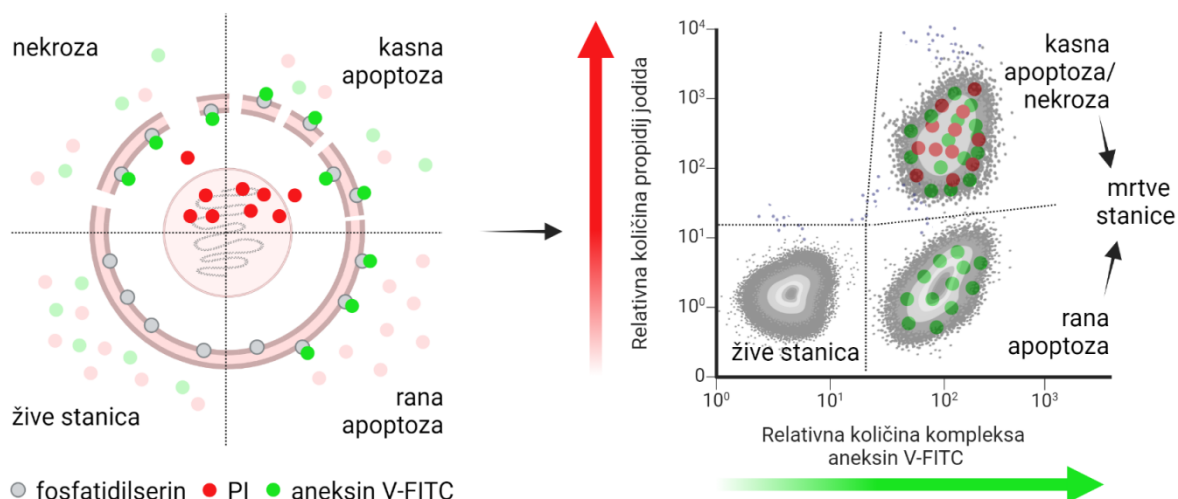
Aneksin V (engl. *annexin V*, *annexin A5*) je protein koji se specifično veže za fosfatidilserin koji se nalazi u membrani stanice okrenut citosolu. Jedna od karakteristika ranih faza apoptoze upravo je izvrtnje fosfatidilserina na vanjsku stranu membrane [72]. Dvostrukim bojanjem stanica crveno fluorescirajućim PI-om, koji ulazi u stanicu tek u kasnijim fazama programirane smrti stanice (apoptoze) kada je integritet membrane narušen [73], i komercijalno dostupnim kompletom BD Pharmingen™ Annexin V-FITC (dalje u tekstu: kompleks aneksin V-FITC) - kompleksom proteina aneksin V i zeleno fluorescirajućeg fluorescein izotiocijanata (FITC) - možemo razlučiti žive stanice od onih u apoptози ili neprogramiranoj smrti stanice (nekrozi) (Slika 8) [74].

U svrhu dodatnog određivanja preživljenja stanica nakon tretmana CBP-om, mjerena je stopa ugradnje PI-a u DNA/RNA i vezanja kompleksa aneksin V-FITC-a na

komponente membrane stanice. Stanice su nasadene u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm u koncentraciji od 1×10^5 stanica/5 mL medija. Ukoliko se ispitivao učinak tretmana, koncentracija stanica je iznosila $1,7 \times 10^5$ stanica/5 mL medija. Idući dan stanice su tretirane različitim koncentracijama ispitivanog spoja i inkubirane 72 h. Nakon tretmana, medij iznad stanica svakog uzorka prikupljen je u zasebnu, prethodno obilježenu mikroepruvetu. Stanice su zatim odvojene od podloge, resuspendirane u mediju u kojemu su rasle i centrifugirane 10 min pri $1100 \times g$. Supernatanti su uklonjeni, a talozi stanica resuspendirani u 500 mL PBS-a. Postupak je ponovljen ukupno dva puta. Stanice su zatim izbrojane korištenjem automatskog brojača stanica, centrifugirane 5 min pri $1000 \times g$, a supernatanti uklonjeni. Talozi su resuspendirani u volumenu $1 \times \text{ABB}$ -a određenom brojem stanica u pojedinom uzorku ($V(1 \times \text{ABB}, \text{mL}) = N(\text{ukupni broj stanica})/10^5$). Na taj način je u svakom uzorku dobivena suspenzija stanica koncentracije 10^5 stanica/mL, koja se razdijelila po 1 mL, odnosno 10^5 stanica, u mikroepruvete za mjerenje na protočnom citometru. Uzorci su centrifugirani 10 min pri $1000 \times g$. Supernatanti su uklonjeni, a talozi resuspendirani u 100 μL odgovarajućih otopina aneksin V-FITC-a i PI-a prethodno pripremljenima prema uputama u Tablici 13. Nakon 15 minuta, u suspenziju stanica dodano je 400 μL $1 \times \text{ABB}$ -a, a mikroepruvete su stavljene na led. Uzorci su analizirani na protočnom citometru. Rezultati su prikupljeni pomoću programa BD CellQuest™ Pro te obrađeni u programu FlowLogic i prikazani kao stupci zbroja postotaka svih mrtvih stanica (stanica u nekrozi te ranoj i kasnoj fazi apoptoze) (Slika 8).

Tablica 13 Priprema uzoraka za mjerenje smrti stanica bojanjem s aneksin V-FITC-om i PI-om

	Oznaka uzorka	Smjesa
Netretirane kontrole	0 (+ ABB)	100 μL $1 \times \text{ABB}$
	A (+ ABB)	2,5 μL aneksin V-FITC + 97,5 μL $1 \times \text{ABB}$
	PI (+ ABB)	10 μL PI + 90 μL $1 \times \text{ABB}$
	A + PI (+ ABB)	2,5 μL aneksin V-FITC + 10 μL PI + 87,5 μL $1 \times \text{ABB}$
Tretman (1 do n)	A + PI (+ ABB)	2,5 μL aneksin V-FITC + 97,5 μL $1 \times \text{ABB}$



Slika 8 Shematski prikaz određivanja tipa smrti stanice bojanjem aneksin V-FITC-om i PI-om

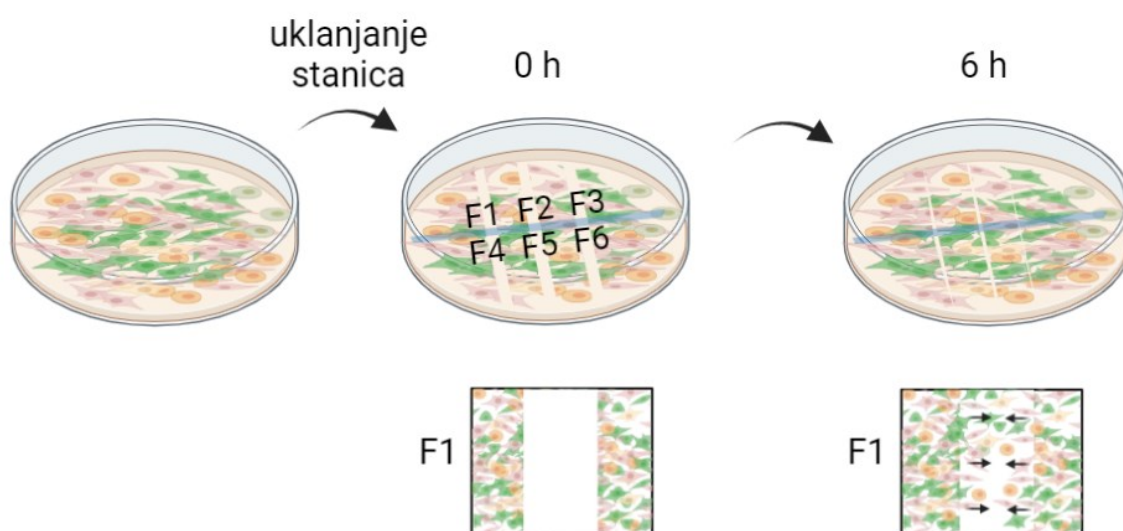
Stanice su nasađene i tretirane te nakon 72 h pripremljene za mjerenje ugradnje PI-a i aneksin V-FITC-a u stanice korištenjem protočnog citometra. Crveno fluorescirajući PI ulazi u stanice samo kada je integritet membrane narušen, dok se zeleno fluorescirajući aneksin V-FITC veže na fosfatidilserin koji se izvrće s unutarnje na vanjsku stranu membrane u ranoj fazi apoptoze (lijevo). Očitavanjem signala crveno obojenog PI-a i zeleno obojenog kompleksa aneksin V-FITC-a u svakoj stanici, prikupljeni su podaci prikazani na grafikonu (desno). Stanice bez detektiranih signala (žive stanice) svrstane su u donji lijevi kvadrant, stanice obojene samo zeleno (rana apoptoza) u donji desni, a stanice obojene zeleno i crveno (kasna apoptoza/nekroza) u gornji desni kvadrant.

3.2.3 Određivanje pokretljivosti stanica

3.2.3.1 Test zacjeljivanja rana

U svrhu određivanja stope migracije većeg broja stanica korišten je test zacjeljivanja rana. Stanice su gusto nasađene (5×10^4 stanica/1 mL) u pločice s 24 bunarića. Ukoliko se ispitivao učinak tretmana na migraciju stanica tada je stanicama uklonjen stari i dodan novi medij te ispitivani spojevi željenih koncentracija. Nakon 24 h (ili nakon željenog trajanja tretmana) uklonjen je medij, dodan je medij za izgladnjivanje s 2% FBS-a što je omogućilo sinkronizaciju ciklusa stanica. Nakon 24 h, preciznim potezima nastavkom za pipete volumena 20 μ L uklonjene su stanice s podloge u obliku tri usporedne crte koje se protežu preko cijele površine bunarića (vizualno

podsjećaju na rane nastale djelovanjem oštih predmeta na kožu zbog čega se metoda naziva testom zacjeljivanja rana). Medij iznad stanica je uklonjen zajedno s ostacima uklonjenih stanica te je na dnu pločice (s vanjske strane) vodootpornim markerom označena crta koja pravilno dijeli bunarić na gornju i donju polovicu (Slika 9). Stanice su zatim dvaput oprezno isprane prethodno ugrijanim PBS-om te je dodan novi medij s 10% FBS-a. Stanice koje se nalaze na mjestima označenim F1-F6 fotografirane su pod 100x povećanjem korištenjem fluorescentnog svjetlosnog mikroskopa s digitalnom kamerom. Fotografiranje istih područja ponovljeno je i 6 h kasnije, kada su stanice migrirale i ponovno djelomično ili potpuno prekrile područja bez stanica. Površine područja bez stanica izmjerene su na fotografijama korištenjem alata za uređivanje fotografija i mjerenje gustoće piksela računalnog programa ImageJ. Usporedbom izmjerenih površina odmah nakon uklanjanja stanica (0 h) i nakon 6 h izračunat je postotak prekrivanja površine bez stanica koji se koristio kao mjera stope migracije stanica nakon 6 h. Rezultati su prikazani kao stupci stopa migracija (apsolutne vrijednosti) ili kao omjeri stopa migracija normalizirani na negativne kontrole pojedinih tretmana (normalizirane vrijednosti), zajedno s vrijednostima standardnih devijacija.



Slika 9 Shematski prikaz testa zacjeljivanja rana

Stanice su nasađene i uzgajane do konfluentnosti. Dio stanica u obliku tri usporedne crte koje se protežu vertikalno preko cijele površine bunarića je uklonjen (bež boje), a markerom je označena horizontalna linija koja dijeli bunarić na gornju i donju polovicu (plave boje). Stanice su fotografirane u područjima označenima slovima F1-F6. Nakon 6 h inkubacije u

mediju, stanice su ponovno fotografirane na istim mjestima označenima slovima F1-F6. Strelice prikazuju smjer migracije stanica u prazan prostor.

3.2.3.2 Test migracije

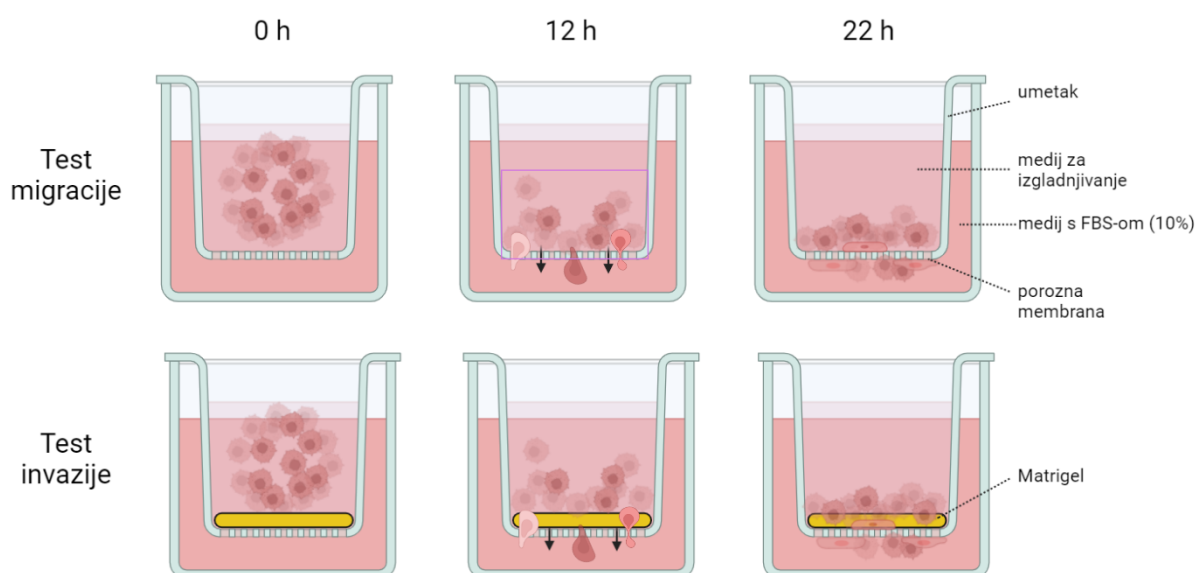
U svrhu određivanja stope migracije pojedinačnih stanica korišten je test migracije u umetcima za pločice s 24 bunarića. Test se temelji na kretanju izgladnjelih stanica iz područja manje u područje veće koncentracije hranjivih tvari kroz membranu s porama promjera 8 μm (Slika 10). Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji 2×10^5 stanica/2 mL. Ukoliko se ispitivao učinak tretmana na migraciju stanica tada je nakon 24 h stanicama uklonjen stari te dodan novi medij i ispitivani spojevi željenih koncentracija. Nakon 24 h (ili nakon željenog trajanja tretmana) uklonjen je medij i dodan medij za izgladnjivanje, što je omogućilo sinkronizaciju ciklusa stanica. Nakon 24 h izgladnjivanja, stanice su odignute od podloge, resuspendirane u mediju za izgladnjivanje i izbrojane korištenjem automatskog brojača. Umetci za pločice postavljeni su u bunariće, a na gornju stranu membrane umetka nanesen je 1 mL suspenzije stanica u mediju za izgladnjivanje koncentracije 2×10^4 stanica/mL. U bunarić ispod umetka dodan je 1 mL medija s dodatkom FBS-a (10%) kako bi se ostvario gradijent koncentracije hrane, pokretač migracije stanica. Stanice su inkubirane 22 h, nakon čega su umetci izvađeni iz bunarića. Budući da se metoda temelji na mogućnosti stanica da migriraju iz nižeg u područje više koncentracije hrane, stanice s gornje strane membrane umetka koji nisu prošle na donju stranu nježno su uklonjene pamučnim vrhom štapića za uzimanje briseva. Membrane umetaka, zajedno sa stanicama, isprane su dva puta u PBS-u i fiksirane 10 min u 3,7%-tnoj otopini PFA. Stanice su isprane dva puta u PBS-u i obojane 0,2%-tnom otopinom kristal ljubičastog. Nakon 30 minuta, stanice su temeljito isprane pod mlazom vodovodne vode, osušene i fotografirane pod povećanjem 10x korištenjem fluorescentnog svjetlosnog mikroskopa s digitalnom kamerom. Površine membrane prekrivene stanicama izmjerene su na fotografijama korištenjem alata za uređivanje fotografija i mjerenje gustoće piksela računalnog programa ImageJ. Usporedbom izmjerenih površina stanica sa i bez tretmana (kontrola) izračunati su postotci migriranih stanica nakon 22 h koji su se koristili kao mjere stope migracije. Stope migracije uspoređene su te su izračunati omjeri. Rezultati su prikazani kao

stupci omjera stopa migracija normalizirani na kontrole pojedinih tretmana (normalizirane vrijednosti), zajedno s vrijednostima standardnih devijacija.

3.2.3.3 Test invazije

U svrhu određivanja stope invazije pojedinačnih stanica korišten je test invazije u umetcima za pločice s 24 bunarića. Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji 2×10^5 stanica/2 mL. Ukoliko se ispitivao učinak tretmana na invaziju stanica tada je nakon 24 h stanicama uklonjen stari te dodan novi medij i ispitivani spojevi željenih koncentracija. Nakon 24 h (ili nakon željenog trajanja tretmana) uklonjen je medij te dodan je medij za izgladnjivanje, što je omogućilo sinkronizaciju ciklusa stanica. Nakon 24 h izgladnjivanja, stanice su odignute od podloge, resuspendirane u mediju za izgladnjivanje i izbrojane korištenjem automatskog brojača stanica. Pločica s 24 bunarića, željeni broj umetaka, otopina Matrigel®-a i medij bez dodatka FBS-a i antibiotika unaprijed su se ohladili na 4°C zbog toga što je Matrigel® pri 4°C tekućina, a pri 37°C gel koji se koristi kao zamjena za izvanstanični matriks. Radna otopina Matrigel®-a pripremljena se razrjeđivanjem hladnog Matrigel®-a u hladnom mediju bez dodataka u omjeru 1:5. Ohlađeni umetci postavljeni su u bunariće, a na gornju stranu membrane nanoseno je 40 µL ohlađene radne otopine Matrigel®-a. Drugi dan, stanice su isprane dva puta medijem bez dodataka podgrijanim pri 37°C, odvojene od podloge, izbrojane i resuspendirane u istom mediju u koncentraciji od 1×10^5 stanica/mL. U umetke s polimeriziranim Matrigel®-om oprezno je dodan 1 mL suspenzije stanica, a u bunarić ispod umetka dodan je 1 mL medija s uobičajenim postotkom FBS-a (10%) kako bi se ostvario gradijent koncentracije hrane koji će biti glavni pokretač kretanja stanica. Stanice su inkubirane 22 h, nakon čega su umetci izvađeni iz bunarića. Pošto se metoda temelji na mogućnosti određenih stanica da razgrade izvanstanični matriks i migriraju u područje više koncentracije hrane (Slika 10), stanice s gornje strane membrane umetka koje nisu prošle na donju stranu nježno su uklonjene pamučnim vrhom štapića za uzimanje briseva, zajedno s ostatkom Matrigel®-a. Membrane, zajedno sa stanicama koje su prodrle kroz Matrigel®, isprane su dva puta u PBS-u i fiksirane 10 min u 3,6%-tnoj otopini PFA. Stanice su isprane dva puta u PBS-u i obojane 0,2%-tnom otopinom kristal ljubičastog. Nakon 30 minuta, stanice su temeljito isprane pod mlazom vodovodne vode, osušene i fotografirane pod povećanjem 10x korištenjem

fluorescentnog svjetlosnog mikroskopa s digitalnom kamerom. Površine membrane prekrivene stanicama koje su prodrle kroz Matrigel® izmjerene su na fotografijama korištenjem alata za uređivanje fotografija i mjerenjem gustoće piksela računalnog programa ImageJ. Usporedbom izmjerenih površina stanica s i bez tretmana (kontrola) izračunati su postotci invadiranih stanica nakon 22 h koji su se koristili kao mjera stope invazije. Stope invazije uspoređene su te su izračunati omjeri. Rezultati su prikazani kao stupci omjera stopa invazije normalizirani na kontrole pojedinih tretmana (normalizirane vrijednosti), zajedno s vrijednostima standardnih devijacija.



Slika 10 Usporedba testa migracije i testa invazije

U gornjem redu prikazana je shema testa migracije, a u donjem testa invazije stanica pomoću umetaka za pločice. U oba testa se koristi gradijent koncentracije hrane kao glavni pokretač stanica. Testovi se razlikuju po tome što u testu invazije, stanice prvo moraju razgraditi Matrigel® (žuto) koji imitira izvanstanični matriks i tek onda migrirati kroz membranu, dok u testu migracije stanice samo migriraju kroz membranu. Strelice označavaju smjer kretanja stanica.

3.2.4 Određivanje ekspresije gena

3.2.4.1 Izolacija RNA

Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji od 2×10^5 stanica/2 mL. Nakon tretmana i željenog trajanja inkubacije, stanice su odvojene od podloge,

resuspendirane u mediju i centrifugirane 10 min pri 1000 x g. Supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran u PBS-u i ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a suhi talog stanica ohlađen na ledu i korišten kao ishodišni materijal za izolaciju RNA. Ukupna RNA izolirana je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta AllPrep DNA/RNA Mini Kit® na ledu, prema uputama proizvođača. Za izolaciju ukupne RNA korišten je 96%-tni etanol čime je izmijenjen originalni protokol proizvođača kompleta. Tijekom izolacije je, korištenjem komercijalno dostupnog kompleta RNase-Free DNase Set uklonjena DNA iz uzorka. Izolirana i prikupljena RNA čuvala se u pročišćenoj vodi bez RNaza u mikroeprijetama od 1,5 mL pri -80°C.

3.2.4.2 Određivanje koncentracije i kvalitete RNA

Koncentracija i kvaliteta izoliranih RNA izmjerene su korištenjem UV-Vis spektrofotometra malih volumena. Pročišćena voda bez RNaza korištena je za kalibraciju mjerenja. Omjeri apsorbancija pri valnim duljinama A260/280 i A260/230 su korišteni kao indikacija prisutnosti proteina ili organskih spojeva u uzorku RNA. Ukoliko su omjeri iznosili ≥ 1.8 , uzorak RNA je smatran pročišćenim i spremnim za daljnje analize.

Integritet i čistoća RNA su u slučaju slanja uzoraka RNA na analizu ekspresije gena putem hibridizacije DNA mikročipova provjereni kratkotrajnim razdvajanjem ukupne RNA prema težini horizontalnom elektroforezom u gelu agaroze. Pripremljen je gel od 1%-tne agaroze s dodatkom EtBr-a koji je izliven u odgovarajući kalup te je umetnut nastavak za stvaranje bunarića (češljic). Gel je ostavljen da se ohladi i polimerizira. Nakon 30 min, polimerizirani gel je postavljen u kadnicu za horizontalnu elektroforezu i dodan je pufer 1x TAE do oznake na kadici. Uzorci RNA odmrznuti su i pomiješani s bojom Orange G te nanješeni u bunariće gela u volumenu od 10 μ L po bunariću. Uzorci su razdvojeni tijekom 15 min pri 400 V. Razdvojena RNA vizualizirana je na uređaju za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala. Ukoliko su dva signala koji predstavljaju 18S i 28S RNA ribosoma bili jasno vidljivi, uzorak je smatran ispravnim. Ako je umjesto jasnih signala RNA bio vidljiv mutni razvučeni signal (engl. *smear*), RNA uzorka se smatrala raspadnuta i nije korištena za daljnja ispitivanja.

3.2.4.3 Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja

U svrhu određivanja ekspresije gena dvaju ili više uzoraka stanica, korištena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (RT-qPCR). Izolirana RNA provjerene kvalitete i integriteta prepisana je u cDNA korištenjem metode RT pomoću komercijalno dostupnog kompleta RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit®. Prema uputama proizvođača, u reakcijsku smjesu se, uz izoliranu RNA, dodala smjesa nasumičnih početnica, mješavina dNTP-a, pufer, voda bez nukleaza, inhibitor RNAza te enzim reverzna transkriptaza. Reakcija RT se provodila u uređaju za PCR prema uvjetima opisanima u Tablici 14. Nakon reakcije, smjesa cDNA je čuvana pri -20°C ili je odmah korištena za određivanje ekspresije gena metodom qPCR.

Tablica 14 Program reakcije reverzne transkripcije

		Ciklus (35x)		
Korak	Aktivacija enzima reverzne transkriptaze	Denaturacija	Prianjanje	Sinteza
T/°C	94	94	58	72
t/min	3:00	0:30	0:30	0:45

cDNA umnožena metodom RT je odmrznuta, razrijeđena 15x u diH₂O-u i nanesena zajedno s komercijalno dostupnom smjesom PowerSYBR® Green PCR Master Mix i početnicama u prozirnu pločicu s 96 bunarića prema uputama navedenim u Tablici 15. Kao referentni gen korišten je *GAPDH*. Svaki gen ispitan je u triplicatu. Za analizu je korišten uređaj za PCR u stvarnom vremenu s računalnim programom 7300 System SDS Software. Za reakciju je korišten protokol naznačen u Tablici 16. Tijekom reakcije, uređaj zabilježi fluorescencijski signal zelene boje SYBRGreen koja se nespecifično ugrađuje u novonastalu DNA tijekom svakog ciklusa (amplifikacijska krivulja) i napravi krivulju disocijacije novonastalih odsječaka DNA kako bi se mogla pratiti kvaliteta i specifičnost novonastalih odsječaka DNA. Rezultati reakcije su pomoću disocijacijskih krivulja provjereni i izraženi kao vrijednosti ciklusa u kojemu se prvi put detektirao signal boje SYBRGreen vezane na DNA ispitivanog gena (Ct). Navedene Ct vrijednosti ispitivanih gena su normalizirane na Ct vrijednosti *GAPDH* te uspoređene između različitih uzoraka korištenjem jednadžbi:

Normalizacija: $\Delta Ct = Ct(\text{gena od interesa}) - Ct(\text{referentnog gena})$ 3

Relativna promjena ekspresije gena: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tretmana}) - \Delta Ct(\text{kontrola})$ 4

Konačni rezultati vrijednosti relativne promjene ekspresije gena između dva ili više uzoraka (FC) prikazani su kao stupci prosječnih FC vrijednosti sa standardnim devijacijama iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Ukoliko su FC vrijednosti bile velike, rezultati su prikazani kao $\log_2 FC$.

Tablica 15 Komponente smjese reakcije RT

Reagens	Volumen po bunariću/ μL
PowerSYBR Green (2x)	5
5'-3' početnica (1 μM)	1
3'-5' početnica (1 μM)	1
razrijeđena cDNA	3
UKUPNO	10

Tablica 16 Program reakcije qPCR

Korak	Aktivacija DNA polimeraze	Ciklus (40x)		Krivulja disocijacije			
		Denaturacija	Prianjanje/sinteza	0	1	2	3
T/ $^{\circ}\text{C}$	95	95	60	95	60	95	60
t/min	10:00	0:15	1:00	0:15	1:00	0:15	0:15

3.2.4.4 Metoda hibridizacije DNA mikročipova

U svrhu određivanja relativne ekspresije velikog broja gena korištena je metoda hibridizacije DNA mikročipova koji koriste kratke oligonukleotidne odsječke (engl. *short oligonucleotide arrays*) tvrtke Affymetrix. Metoda se temelji na komplementarnom sparivanju umnoženih i biotinom-obilježenih DNA odsječaka iz ispitivanih uzoraka s velikim brojem odsječaka za svaki od preko 20 000 gena koji su pričvršćeni za supstrat mikročipa. Po četiri uzorka (replike) svake od sedam varijanti stanica MES-OV otpornih na CBP, zajedno s roditeljskim stanicama MES-OV, prikupljeno je kao suhi talog. Varijanta stanica MES-OV CBP1 nije korištena za analizu zbog gotovo neprimjetnih promjena u odnosu na roditeljsku liniju MES-OV. Iz

taloga je izolirana RNA (opisano u 3.2.4.1) te je izmjerena njena koncentracija i provjerena kvaliteta (opisano u 3.2.4.2). Ukupno 32 uzorka RNA poslana su u partnerski Laboratorij za genomiku i transkriptomiku Sveučilišta u Düsseldorf-u (Njemačka) gdje se provela analiza metodom hibridizacije DNA mikročipova korištenjem kompleta GeneChip WT PLUS Reagent Kit, Clariom™ S Assay i uređaja za ispiranje mikročipova. Uređaj za vizualizaciju mikročipova je korišten za fotografiranje čipova i detekciju fluorescirajućih signala hibridiziranih biotinom-obilježenih odsječaka DNA. Kako bi fluorescirajući signali s fotografije bili pravilno detektirani i pripisani određenim genima, u izborniku uređaja definiran je tip korištenog DNA mikročipa te su provjereni signali kontrolnih hibridizacijskih proba, napravljena pozadinska normalizacija i izračunate vrijednosti signala više istih uzoraka (replikata). Nakon analize fotografija, rezultati su izraženi kao $\log_2$ vrijednosti jačine signala svakog bunarića (koji odgovara relativnoj ekspresiji jednog gena). Daljnja bioinformatička obrada rezultata korištenjem računalnog programa Transcriptome Analysis Console (TAC) opisana je u poglavlju 3.2.7.

3.2.5 Određivanje ekspresije proteina

3.2.5.1 Izolacija proteina

Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji 3×10^5 stanica/2 mL. Nakon tretmana i željenog trajanja inkubacije, stanice su odvojene od podloge, resuspendirane u mediju i centrifugirane 10 min pri 1000 x g. Supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran u PBS-u i ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a suhi talog stanica je ohlađen u ledu ili spremljen pri -20°C te korišten kao ishodišni materijal za izolaciju proteina. U slučaju prikupljanja stanica u svrhu određivanja statusa fosforiliranosti proteina Akt, stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji 3×10^5 stanica/2 mL, tretirane, te nakon željenog trajanja inkubacije isprane s 2 mL PBS-a. PBS je uklonjen, a na stanice je dodano 300 μL 1x koncentriranog pufera za uzorke. Stanice su sastrugane gumenom strugalicom, prebačene u mikroepruvete i čuvane pri -20°C .

3.2.5.2 Određivanje koncentracije proteina

U svrhu određivanja koncentracije proteina korištena je metoda određivanja količine proteina pomoću BCA korištenjem komercijalnog kompleta Pierce™ BCA Protein Assay Kit prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na pretvorbi Cu^{2+} u svjetloplavi Cu^+ u kiselim uvjetima pomoću ukupnih proteina u suspenziji te vezanjem BCA sa Cu^+ uz formiranje ljubičastih vodotopivih kompleksa. Apsorbancija otopine u bunarićima pločice je izmjerena pri 562 nm korištenjem spektrofotometra. Rezultati su analizirani korištenjem računalnog programa Microsoft Excel. Iz apsorbancija je izračunata prosječna apsorbancija replikata i njihova standardna devijacija. Vrijednost prosječne apsorbancije kontrola oduzeta je od prosječnih apsorbancija uzoraka i standarda kako bi se dobile normalizirane vrijednosti apsorbancije. Metodom linearne regresije napravljena je standardna krivulja apsorbancije u odnosu na koncentraciju standarda proteina albumina. Pomoću jednadžbe pravca izračunate su koncentracije uzoraka ($\mu\text{g/mL}$), koje su, da bi se dobile konačne koncentracije, pomnožene s X, ukoliko su uzorci bili razrijeđeni za faktor X.

3.2.5.3 Metoda Western blot

U svrhu određivanja relativne ekspresije proteina od interesa korištena je metoda Western blot koja obuhvaća 1) razdvajanje proteina po veličini, 2) prijenos proteina na čvrstu podlogu te 3) obilježavanje i vizualizaciju ciljanog proteina korištenjem protutijela.

Razdvajanje proteina po veličini odvijalo se u denaturirajućim uvjetima metodom SDS-PAGE. Gel za elektroforezu napravljen je neposredno prije nanošenja uzoraka korištenjem kompleta za izradu gelova prema uputama iz Tablice 17. Koncentracija poliakrilamidnog gela za razdvajanje iznosila je 10%, dok je koncentracija gela za sabijanje iznosila 5% poliakrilamida.

Tablica 17 Priprema gelova za sabijanje i razdvajanje proteina

	Gel za sabijanje/gornji gel (mL)	Gel za razdvajanje/donji gel (mL)
	5%	10%
diH₂O	5,5	7,9
30%-tna smjesa poliakrilamida	1,3	6,7
Tris-HCl	1,0*	5,0**
10% SDS	0,08	0,2
10% APS	0,08	0,2
TEMED	0,008	0,008

* pH = 6,8; ** pH = 8,8

Prvo je pripremljena mješavina gela za razdvajanje (donji gel), koja je pipetirana u prostor između stakalaca za formiranje gela. Na mješavinu je oprezno dodan diH₂O kako bi spriječio dodir mješavine gela sa zrakom. Nakon što se gel polimerizirao, pripremljena je i izlivena mješavina gela za sabijanje (gornji gel). Voda iznad donjeg gela se uklonila, a na nju se izlila mješavina gornjeg gela te uklopio češljic za izradu bunarića za nanošenje uzoraka. Nakon što se i gornji gel polimerizirao, komplet stakalaca s gelom se prenio u kadicu za elektroforezu. Kadica se ispunila 1x tris-glicinskim puferom do razine kada je komplet stakalaca s gelom bio potpuno uronjen u pufer. Uklonio se češljic i provjerio integritet bunarića. Uzorci prikupljeni na način opisan u poglavlju 3.2.5.1 su, prije nanošenja na gel, pomiješani sa 6x puferom za uzorke u omjeru 6:1, sonicirani 3 puta po 10 sekundi korištenjem uređaja za razbijanje stanica ultrazvukom i denaturirani zagrijavanjem 3 min pri 96°C korištenjem grijača i miješalice. Uzorci prikupljeni vrućim 1x puferom za uzorke su sonicirani i denaturirani zagrijavanjem pri istim uvjetima. Ovisno o koncentraciji proteina izmjerenoj metodom BCA (opisano u poglavlju 3.2.5.2) određeni volumen svakog uzorka nanesen je u bunariće gela. Standard za elektroforezu PageRuler® Prestained Protein Ladder nanesen je u poseban bunarić u volumenu od 2 µL. Kadica je spojena na uređaj za napajanje, a elektroforeza se provodila 20 min pri uvjetima i jakosti struje od 80 V, a zatim pri 100 V dok plava linija bromfenol plavog iz pufera za uzorke nije došla do donjeg ruba gela i krenula izlaziti iz njega.

Nakon razdvajanja proteina metodom SDS-PAGE, proteini su preneseni na membranu od nitroceluloze korištenjem kompleta za polusuhi prijenos proteina

Trans-Blot Turbo Transfer Pack i uređaja za prijenos proteina prema uputama proizvođača. Gel s razdvojenim proteinima izvađen je iz kompleta stakalaca, ispran u puferu za prijenos proteina te pripremljen prema uputama proizvođača komercijalnog kompleta za polusuhi prijenos. Prijenos proteina trajao je 12 min pri uvjetima jakosti struje od 1,5 V i 1,5 A. Gel je uklonjen, a membrana je isprana 5 min u puferu TBS-T. Količina nanesenih proteina na membrani provjerena je inkubiranjem membrane 1 min u otopini boje Ponceau S i dokumentiranjem obojene membrane korištenjem skenera (Slika P1). Boja Ponceau S je uklonjena inkubacijom membrane 5 min u puferu TBS-T.

U svrhu obilježavanja odabranih proteina protutijelima, membrane su najprije inkubirane 1 h pri sobnoj temperaturi u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u prahu kako bi se kasnije spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Membrana je isprana 3 puta po 5 min u puferu TBS-T te inkubirana 2 h pri sobnoj temperaturi u otopini primarnog protutijela razrijeđenog u puferu TBS-T prema smjernicama proizvođača navedenima u Tablici 9. Membrana je zatim isprana 3 puta po 5 min u puferu TBS-T te inkubirana 2 h pri sobnoj temperaturi u otopini sekundarnog protutijela razrijeđenog u puferu TBS-T prema smjernicama proizvođača navedenima u Tablici 9. Nakon konačnog ispiranja 3 puta po 5 min puferom TBS-T, na membrane je, prema uputama proizvođača, dodan reagens dobiven miješanjem dvije komponente komercijalno dostupnog kompleta Western Lightning™ Plus-ECL. Proteini od interesa vizualizirani su korištenjem uređaja za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala (Slika P1). Dobivene fotografije obrađene su korištenjem računalnog programa Image Lab te analizirane korištenjem alata za uređivanje fotografija i mjerenje gustoće piksela računalnog programa ImageJ. Signali specifičnih proteina normalizirani su na signal proteina ERK1/2 te uspoređeni između uzoraka. Rezultati su prikazani kao stupci omjera promjena ekspresije proteina (FC) ili $\log_2FC$ normalizirani na kontrole pojedinih tretmana (normalizirane vrijednosti), zajedno s vrijednostima standardnih devijacija.

3.2.6 Promjena ekspresije gena i proteina

3.2.6.1 Utišavanje specifičnih gena transfekcijom stanica sa siRNA

U svrhu kratkoročnog snižavanja ekspresije (utišavanja) gena od interesa korištena je metoda transfekcije stanica sa siRNA. Metoda se temelji na komplementarnom spajanju mRNA gena od interesa i posebno dizajniranih komplementarnih odsječaka siRNA, što ima za posljedicu raspadanje i uklanjanje vezanih mRNA i smanjenje količine proteina (utišavanje) ciljanog gena u stanici. Razina proteina je smanjena dok god je količina siRNA u stanici dostatna za uklanjanje mRNA (do nekoliko dana). Kako bi se povećala šansa za uspješno utišavanje proteina, korišteni su komercijalni dostupni kompleti ON-TARGETplus siRNA-SMART pool (dalje u tekstu: siRNA, Tablica 8) koji imaju četiri različite sekvence siRNA za isti gen. Stanice su nasađene u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji od 3×10^5 stanica/2 mL. Drugi dan, kada su stanice prekrivale otprilike 70% površine bunarića, uklonjen je medij, a stanice su isprane s PBS-om. Pripremljene su smjese za transfekciju ovisno o korištenoj koncentraciji siRNA (25 i 50 nM) i broju bunarića prema uputama u Tablici 18. Na stanice je dodano 400 μ L pripremljenih smjesa siRNA u konačnim koncentracijama navedenima u Tablici 18 i 1600 μ L medija bez antibiotika. Kao negativna kontrola transfekcije korišten je komplet ON-TARGETplus Non-targeting Pool (si(-), Tablica 8). Stanice su u smjesi za transfekciju inkubirane 48 h, nakon čega je medij uklonjen, a stanice isprane PBS-om. Stanice su odvojene od podloge te nasađene za daljnje eksperimente i/ili prikupljene na način opisan u poglavlju 3.2.5.1.

Tablica 18 Reagensi korišteni za jednu reakciju transfekcije stanica ovisno o koncentraciji siRNA

		siRNA [25 nM]	siRNA [50 nM]
	$c_1(\text{siRNA})/\text{nM}$	5000	5000
	$c_2(\text{siRNA})/\text{nM}$	25	50
Mikroeproveta A	$V_1(\text{siRNA})/\mu\text{L}$	10	20
	$V(\text{Opti-MEM})/\mu\text{L}$	190	180
Mikroeproveta B	$V(\text{DharmaFECT Transfection Reagent})/\mu\text{L}$	4	4
	$V(\text{Opti-MEM})/\mu\text{L}$	196	196
	$V(\text{medij bez antibiotika})/\mu\text{L}$	1600	1600
	$V(\text{ukupno})/\mu\text{L}$	2000	2000

3.2.6.2 Inhibicija signalnih puteva tretmanom stanica inhibitorima

U svrhu promjene ekspresije proteina, stanice su nasađene u pločice s 96 (5×10^3 stanica/180 μ L), 24 (2×10^4 stanica/1 mL) ili 6 bunarića (3×10^5 stanica/2 mL). Nakon 24 h, stanice su tretirane različitim koncentracijama inhibitora (Slika 26) dodavanjem unaprijed pripremljenih otopina (Tablica 6). Svaki tretman ispitivao se u minimalno dva bunarića (replike). Nakon 72 h inkubacije, medij iznad stanica je uklonjen, a stanice su analizirane na način opisan u poglavljima 3.2.2.1, 3.2.2.3 i 3.2.3.1, ovisno o korištenoj metodi.

3.2.7 Bioinformatička obrada i analiza podataka

3.2.7.1 Analiza rezultata metode hibridizacije DNA mikročipova

U svrhu obrade rezultata dobivenih metodom hibridizacije DNA mikročipova, rezultati su uvezeni u računalni program TAC. Uzorci su označeni ovisno o grupi kojoj su pripadali (MES-OV, MES-OV CBP2-CBP8). Kao referentni genom odabran je genom čovjeka verzije *hg38*. Tip analize je postavljen na „expression“, dok se za sažimanje koristila metoda SST-RMA. Rezultati metode su bile normalizirane prosječne vrijednosti signala pojedinih gena (FC).

3.2.7.2 Analiza stupnja grupiranosti podataka

U svrhu određivanja stupnja grupiranosti podataka koristile su se metoda PCA i metoda klasteriranja prema hijerarhiji korištenjem unaprijed definiranih postavki unutar računalnog programa TAC. Metoda PCA na temelju ekspresije gena stvara reprezentacije uzoraka u 3D prostoru koje sažimaju i opisuju varijacije između uzoraka. S druge strane, metoda klasteriranja prema hijerarhiji na temelju vrijednosti ekspresija gena stvara dendrogram koji opisuje uzorke. Metoda se temelji na povezivanju sličnih uzoraka i formiranju klastera.

3.2.7.3 Analiza značajno promijenjenih gena

U svrhu analize svih značajno promijenjenih gena (DEG) korišten je računalni program TAC. Rezultati metode SST-RMA svih uzoraka (CBP2, CBP3, ..., CBP8) uspoređeni su metodom ANOVA s roditeljskim stanicama MES-OV, dok je u svrhu usporedbe dvaju uzoraka korišten Studentov t-test. Dobivene vrijednosti promjene ekspresije gena (FC) normalizirane su na geometrijski prosjek ekspresija *GAPDH* i *ACTB* i obilježene kao skup podataka „ALL“. Naknadno je izračunata i vrijednost $\log_2FC$ korištenjem računalnog programa Microsoft Excel. Vrijednosti $\log_2FC$ stanica MES-OV CBP8 filtrirane su pod uvjetima prilagođene p -vrijednost $<0,05$ i $\log_2FC = |1|$, sortirane po vrijednosti $\log_2FC$ i izvezene kao tablica pod nazivom „DEG“.

3.2.7.4 Analiza korelacije promjene ekspresije gena i osjetljivosti na CBP

Obrađeni i izvezeni podaci pod nazivom „ALL“ iz poglavlja 3.2.7.3 uvezeni su u računalni program „R“. Korištenjem programskih paketa *base* (verzija 4.0.3), *ggplot2* (verzija 3.3.3) i *stats* (verzija 3.6.2), u set podataka „ALL“ dodan je redak s vrijednostima $\log_2IC_{50}$ - osjetljivosti svih stanica varijanti na CBP. Izračunat je Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) ekspresije svakog gena ($\log_2FC$) i $\log_2IC_{50}$ CBP-a kroz svih sedam novorazvijenih varijanti i dodan kao novi stupac „ ρ “ podacima „ALL“. U svrhu ispitivanja razlike korištenja koeficijenta korelacije za probir gena u odnosu na korištenje vrijednosti FC, geni su filtrirani pod uvjetima prilagođene p -vrijednost $<0,05$ i $\rho > |0,667|$ kako bi novi skup gena imao jednak broj redaka kao „DEG“, i izvezeni kao skup podataka „CCORG“. Ipak, kada je koeficijent korelacije korišten kao dodatan filter prilikom probira gena za daljnja ispitivanja funkcije, geni su filtrirani pod uvjetom p -vrijednost $<0,05$ i $\rho > |0,8|$ kako bi se probrao samo mali broj značajno promijenjenih gena s visokim korelacijskim koeficijentom.

3.2.7.5 Analiza interakcija između proteina

U svrhu analize interakcija između proteina korišten je alat STRING [75]. Simboli gena od interesa uneseni su u STRING. Interakcije proteina su analizirane i poredane prema vrijednostima povjerenja (engl. *confidence score*) koji poprimaju vrijednosti od 0 (najmanja vjerojatnost događaja) do 1 (najveća vjerojatnost

događaja). Interakcije između odabranih proteina analizirane su korištenjem podataka dobivenih pretraživanjem tekstova, eksperimenata, baza podataka i povezanih ekspresija pri uvjetima vrijednosti povjerenja od 0,500.

3.2.7.6 Analiza setova gena i signalnih puteva

U svrhu analize setova gena i signalnih puteva korišten je besplatni alat Enrichr [76–78]. Liste gena pod oznakama “DEG” i “CCORG” uvezene su u alat Enrichr te analizirane u bazama podataka ontologije gena (GO), KEGG i WikiPathways korištenjem unaprijed zadanih postavki.

3.2.7.7 Analiza vrijednosti gena kao farmakogenetskih biljega

U svrhu analize značaja gena kao farmakogenetskih biljega (biomarkera) za ukupno preživljenje bolesnika (OS) i preživljenje bez napretka bolesti (PFS) korišten je besplatni alat KM Plotter [79]. Analize su koristile setove podataka iz više poznatih baza setova ekspresije gena (GEO, EGA i TCGA). Liste odabranih gena uvezene su odabirom probi provjerene kvalitete (engl. *JetSet probes*) specifičnih za gene od interesa. Skup podataka na kojemu je napravljena analiza obuhvaćao je uzorke tkiva bolesnica s rakom jajnika tipa HGSOC, razine (engl. *grade*) 2, 3 i 4, koje su primile terapiju CBP-om. Pacijentice su podijeljene po preživljenju na dvije grupe korištenjem automatski izračunatog praga, prema ekspresiji ispitivanog gena i vrijednostima OS, odnosno PFS. Rezultati su prikazani pomoću grafikona *Kaplan Meier*, zajedno s vrijednostima omjera pojave događaja (HR) i p-vrijednosti izračunatih metodom *log-rank*. U svrhu analize vrijednosti gena kao biomarkera odgovora na terapiju (engl. *predictive value*), isti set probi analiziran je na istom setu bolesnica korištenjem besplatnog alata ROC Plotter [80]. Rezultati su prikazani pomoću grafikona ROC, zajedno s vrijednostima površine ispod krivulje (AUC) i p-vrijednostima.

3.2.8 Statistička analiza podataka

U svrhu statističke analize podataka koristio se računalni program GraphPad Prism. Za usporedbu dva uzorka koristio se Studentov t-test, ili *one-way* ANOVA s

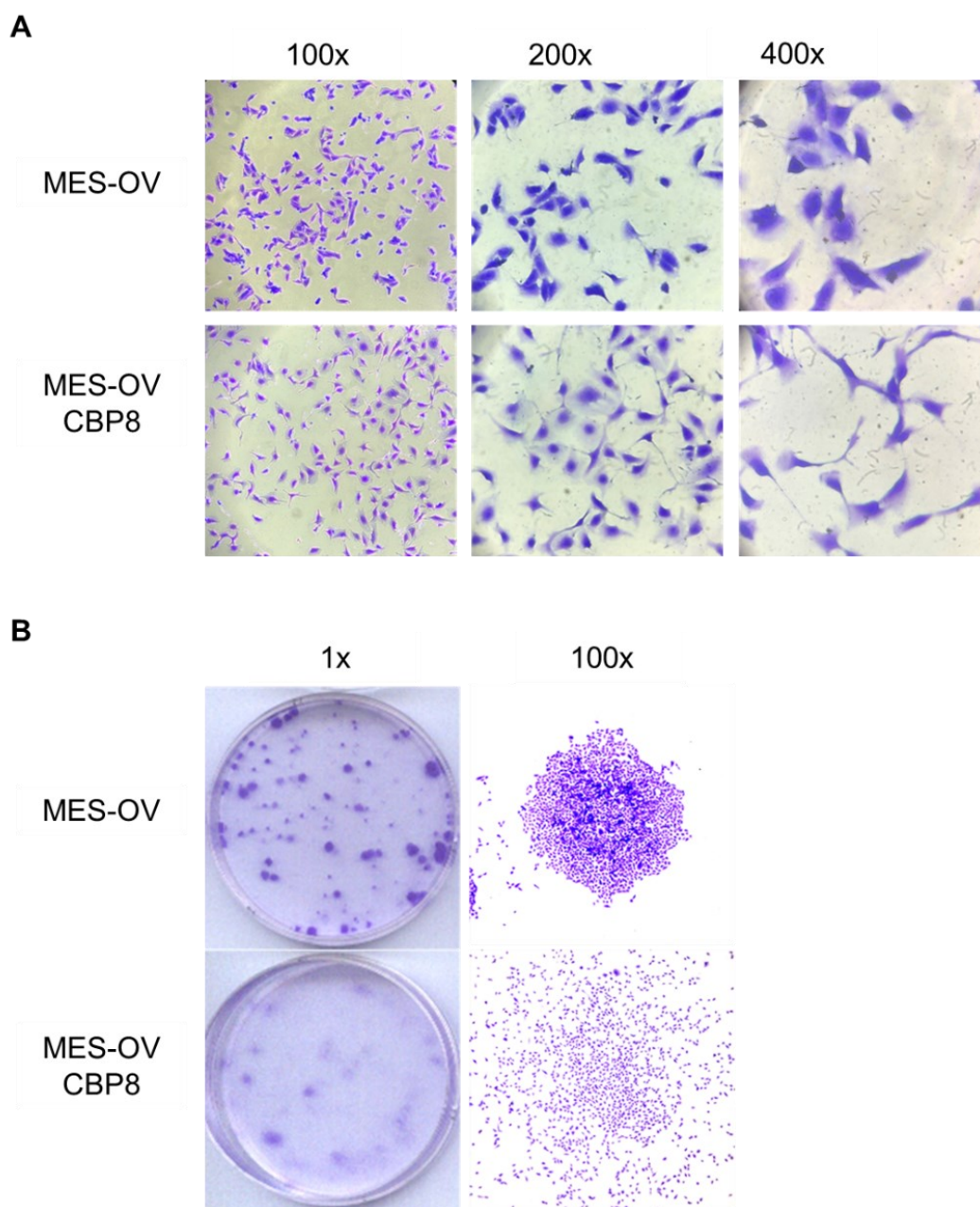
Dunnettovim testovima *post hoc*. Za usporedbu tri ili više uzoraka koristila se *two-way* ANOVA s Bonferronijevim testovima *post hoc*, osim u slučajevima kada su se uspoređivala tri ili više uzorka s više nezavisnih varijabli; tada je korištena ANOVA povezanih mjerenja (engl. *factorial ANOVA*). Razlika uzoraka smatrana je statistički značajnom ukoliko je *p*-vrijednost bila manja od 0,05. U slučaju ANOVE povezanih mjerenja, vrijednost efekta interakcije (IE) uvijek je korištena kako bi se ispitao kombinirani efekt nezavisnih varijabli, neovisno o prikazu na grafikonu (apsolutne ili normalizirane vrijednosti). Ukoliko je $IE < 0,05$, razlika je smatrana statistički značajnom (NI, nema interakcije; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4. Rezultati

4.1 Karakterizacija stanica

4.1.1 Morfološke karakteristike varijanti stanica MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3

Roditeljske stanice MES-OV, SK-OV-3 i OVCAR-3 bile su opetovano tretirane rastućim koncentracijama CBP-a u svrhu izdvajanja stanica s prilagodbama koje im omogućuju preživljenje tretmana (opisano u poglavlju 3.2.1.2). Uzgojene varijante stanica bile su značajno drugačijih morfoloških karakteristika u odnosu na roditeljske. Zbog izduženijeg oblika u odnosu na roditeljske i gubitka polariziranosti, nove varijante stanica su nalikovale više stanicama mezenhimskog nego epitelnog tkiva. Promjena je bila najizraženija u stanicama razvijenim korištenjem najvećih koncentracija CBP-a (MES-OV CBP8; Slika 11A). Iste promjene primijećene su i kod stanica SK-OV-3 CBP6 i OVCAR-3 CBP7 (neprikazani rezultati), kod kojih su roditeljske stanice imale fenotip nalik epitelnim, a otporne stanice fenotip nalik mezenhimskim stanicama. Osim razlika u izgledu pojedinačnih stanica, testom klonalnog rasta (opisan u poglavlju 3.2.2.2) utvrđeno je da se stanice razlikuju i u izgledu kolonija. Stanice MES-OV CBP8 stvarale su kolonije jednakom dinamikom kao i MES-OV. Kod MES-OV stanica, kolonije su imale jasne rubove jer su bile sačinjene od stanica koje su se međusobno dodirivale. S druge strane, stanice MES-OV CBP8 su unutar kolonije bile razmaknutije, odnosno gotovo nisu imale dodirnih točaka, zbog čega je rub kolonije bio nejasan i neravan (Slika 11B).

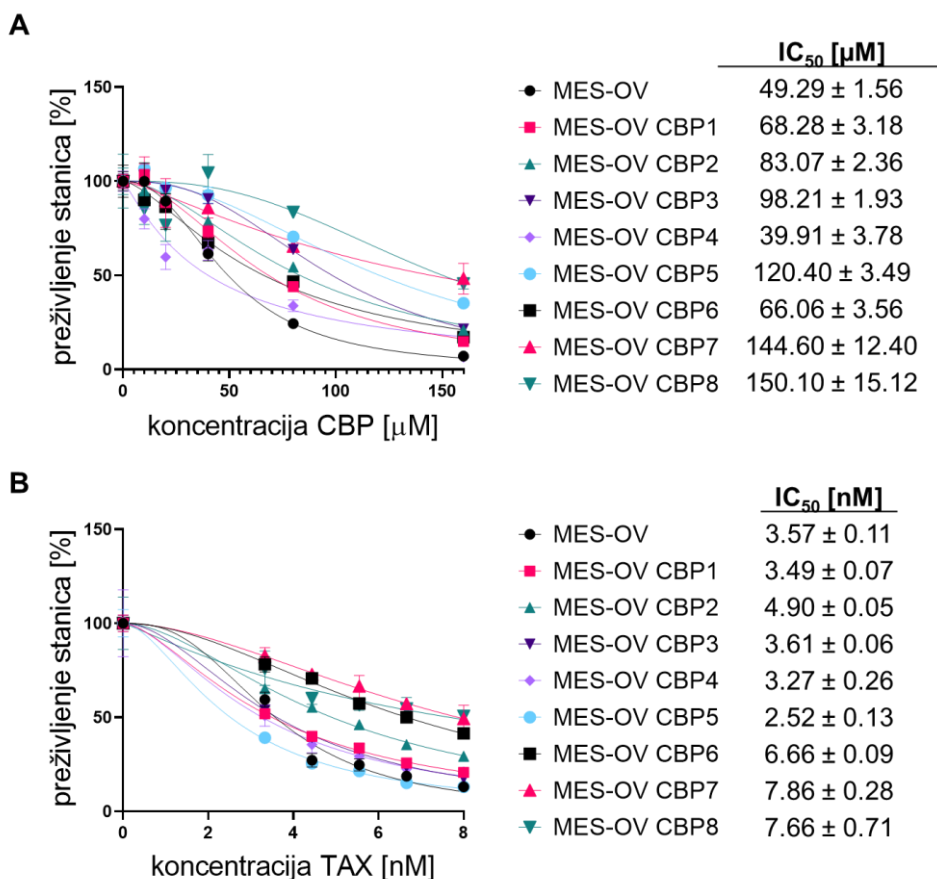


Slika 11 Morfološke karakteristike stanica i kolonija MES-OV i MES-OV CBP8

Stanice su nasadene u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm. Nakon 10 do 15 dana, pojedinačne stanice (A) i populacije stanica (B) su fiksirane u metanolu, obojane otopinom kristal ljubičastog i fotografirane pod povećanjem od 1x, 100x, 200x i 400x korištenjem svjetlosnog mikroskopa. Prikazana je reprezentativna fotografija iz najmanje tri pokusa.

4.1.2 Osjetljivost varijanti stanica MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3 na CBP i TAX

Osjetljivost varijanti stanica raka jajnika na CBP i TAX ispitana je testom metabolizma resazurina (opisan u poglavlju 3.2.2.1). Prema vrijednostima IC_{50} , novorazvijene varijante stanica MES-OV imale su između 0,81 i 3,0 puta promijenjenu osjetljivost na CBP i između 0,71 i 2,2 puta na TAX (Slika 12) u odnosu na roditeljske stanice MES-OV. Sve razvijene varijante bile su otporne na CBP i TAX, osim CBP4 koja je bila osjetljivija na CBP, odnosno CBP5, koja je bila osjetljivija na TAX, u odnosu na MES-OV. Najveću otpornost na CBP imale su stanice MES-OV CBP8, a na TAX MES-OV CBP7. U slučaju stanica SK-OV-3 i OVCAR-3 te njihovih varijanti dobivenih opetovanim tretmanom primijećen je sličan trend otpornosti na CBP, ali ne i TAX. Stanice SK-OV-3 CBP6 razvijene najvećom koncentracijom CBP-a imale su 3,5 puta promijenjenu osjetljivost na CBP, ali gotovo nepromijenjenu osjetljivost na TAX (-0,98 puta). Promjena osjetljivosti stanica OVCAR-3 CBP7 na CBP i TAX je iznosila 2,5 i 2,1 puta (neprikazani podaci). Promjene u osjetljivosti bile su stabilne kroz više od 30 generacija kultura stanica (pasaža) i brojnih odmrzavanja, bez dodatnih tretmana stanica CBP-om (neprikazani podaci). Kako bi se utvrdilo da li je do opisanih promjena u osjetljivosti moglo doći zbog različite dinamike rasta stanica, izmjerena je i izračunata stopa proliferacije stanica na način opisan u poglavlju 3.2.1.4. Varijante stanica MES-OV CBP8, SK-OV-3 CBP6 i OVCAR-3 CBP7 razvijene najvećim koncentracijama CBP-a imale su 1,46, 1,2 i 0,92 puta promijenjene stope proliferacije nakon 72 h u odnosu na odgovarajuće roditeljske stanice (neprikazani rezultati).



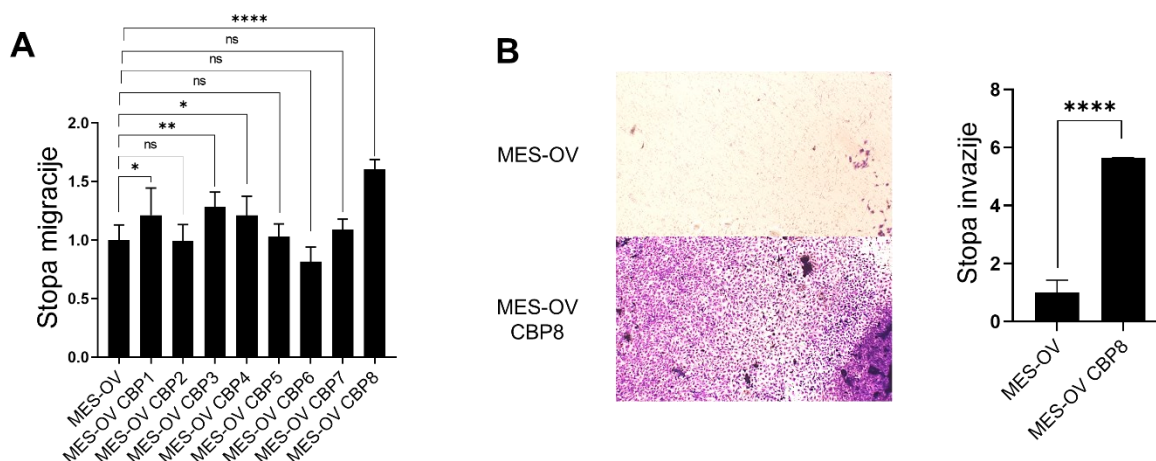
Slika 12 Vijabilnost novorazvijenih varijanti stanica MES-OV

Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića te drugi dan tretirane različitim koncentracijama CBP-a i TAX-a. Vijabilnost stanica izmjerena je testom metabolizma resazurina nakon 72 h. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao krivulje preživljenja svake varijante stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane samo DMSO), zajedno s pripadajućim vrijednostima IC_{50} i standardnim devijacijama.

4.1.3 Pokretljivost varijanti stanica MES-OV

U svrhu mjerenja pokretljivosti stanica, izmjerena je stopa migracije većeg broja stanica testom zacjeljivanja rana (opisano u poglavlju 3.2.3.1) svih varijanti stanica MES-OV. Blago povećana stopa migracije u odnosu na MES-OV zabilježena je u varijantama CBP1, CBP3 i CBP4, a samo u CBP8 je bila statistički značajna (Slika 13A). Povećana stopa migracije stanica MES-OV CBP8 u odnosu na MES-OV (1,84 puta) potvrđena je i testom migracije s umetcima opisanim u poglavlju 3.2.3.2 (neprikazani rezultati). Stopa invazije pojedinačnih stanica (opisana u poglavlju

3.2.3.3) određena je samo za varijantu MES-OV CBP8 i roditeljske stanice MES-OV. Zaključno, stanice MES-OV CBP8 imale su 1,6 puta veću stopu migracije (Slika 13A) i 5,6x veću stopu invazije u odnosu na MES-OV (Slika 13B).



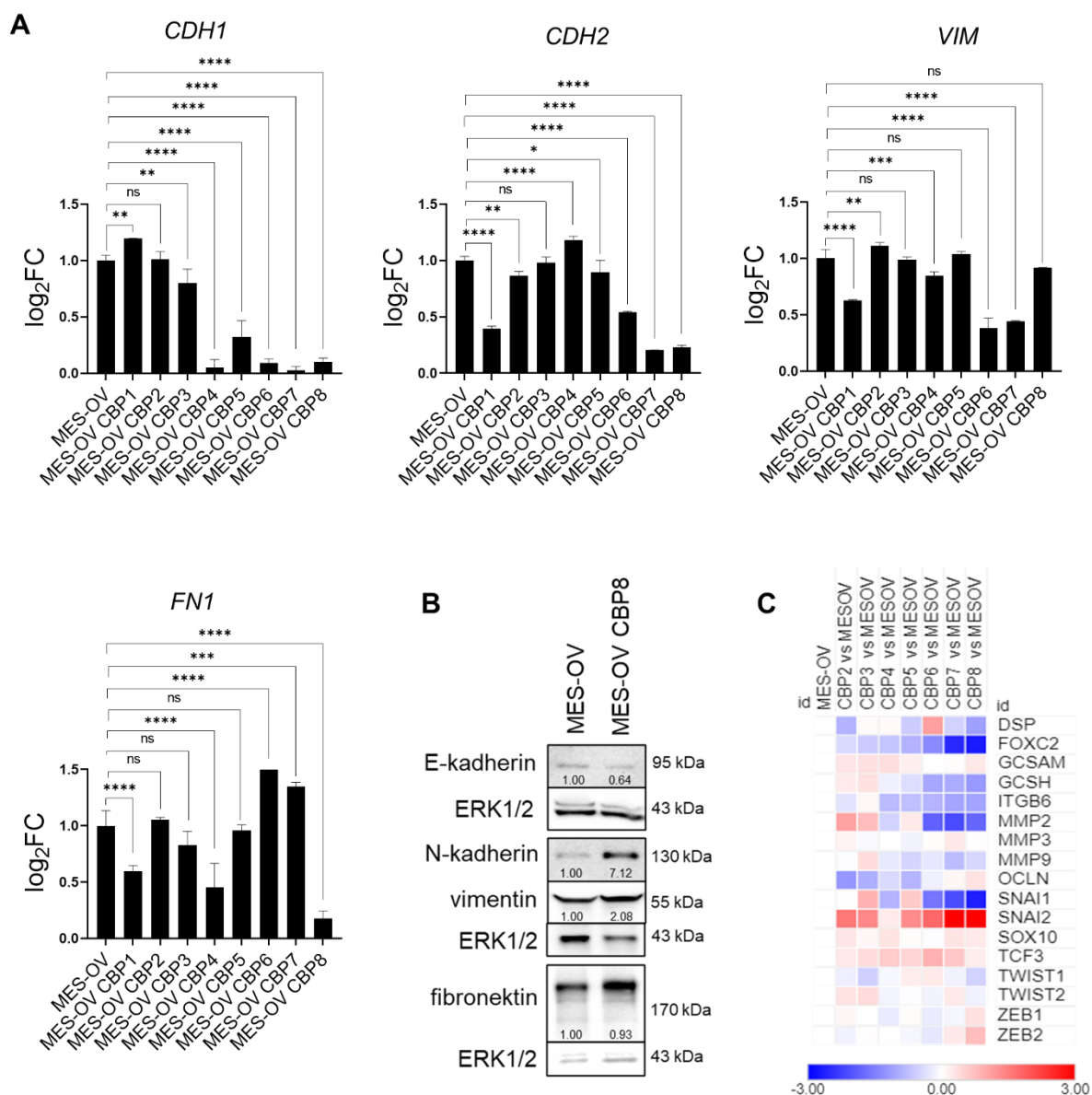
Slika 13 Pokretljivost novorazvijenih varijanti stanica MES-OV

Stanice su nasađene u pločice s 24 bunarića. (A) Migracija stanica izmjerena je testom zacjeljivanja rana. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao relativne prosječne stope migracije u odnosu na MES-OV stanice, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. (B) Invazija stanica izmjerena je testom invazije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao relativne prosječne stope invazije u odnosu na MES-OV stanice, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

4.1.4 Ekspresija gena biljega EMT-ja u varijantama stanica MES-OV

U svrhu određivanja statusa EMT-ja varijanti stanica, određena je relativna promjena ekspresije četiri gena, poznatih kao biljega EMT-ja: *CDH1*, *CDH2*, *VIM* i *FN1*, svake varijante stanica MES-OV pomoću metode RT-qPCR (opisane u poglavlju 3.2.4.3). U pravilu, stanice koje imaju smanjenu ekspresiju biljega epitelnog fenotipa (*CDH1*), a povišenu ekspresiju biljega mezenhimskog fenotipa (*CDH2*, *VIM*, *FN1*), prema konvenciji se nazivaju stanice nalik stanicama mezenhima [65]. Prema rezultatima dobivenim metodom RT-qPCR, ekspresija četiri gena je značajno drugačija u svakoj varijanti stanica MES-OV u odnosu na roditeljske. Ekspresija *CDH1* se kroz varijante, u odnosu na MES-OV, smanjivala zajedno s osjetljivosti na CBP. Međutim, i ekspresija biljega mezenhimskog fenotipa (*CDH2*, *VIM* i *FN1*) se također smanjivala

s osjetljivošću na CBP (Slika 14A). Rezultati su potvrdili rezultate dobivene metodom hibridizacije DNA mikročipova (opisane u poglavlju 3.2.4.4). Ekspresija četiri markera EMT provjerena je i na razini proteina metodom Western blot (opisanom u poglavlju 3.2.5.3). Ekspresija proteina E-kadherina bila je snižena u stanicama MES-OV CBP8 u odnosu na MES-OV (Slika 14B) te se podudarala s promjenom ekspresije gena *CDH1* (Slika 14A). Promjena proteina biljega mezenhimskog fenotipa je bila slična (u slučaju fibronektina) ili veća (u slučaju N-kadherina i vimentina) u stanicama otpornima na CBP (Slika 14B), što je suprotno rezultatu dobivenom na razini ekspresije gena (Slika 14A). Kako bi se dodatno opisao status EMT-ja razvijenih stanica, analizirala se promjena ekspresije dodatnih 17 gena povezanih s EMT-jem (Slika 14C) korištenjem metode hibridizacije DNA mikročipova. Rezultati analize pokazali su značajnu promjenu ekspresije gena *DSP*, *FOXC2*, *GCSH*, *ITGB6*, *MMP2*, *OCLN*, *SNAI1* i *SNAI2* kroz razvijene varijante u odnosu na MES-OV. Analizom korelacije promjene ekspresije gena s osjetljivošću na CBP (opisane u poglavlju 3.2.7.4) utvrđeno je da samo geni *DSP* ($\rho=-0.64$) i *SNAI2* ($\rho=0.74$) koreliraju s osjetljivošću na CBP.



Slika 14 Ekspresija gena biljega EMT-ja u novorazvijenim varijantama stanica MES-OV

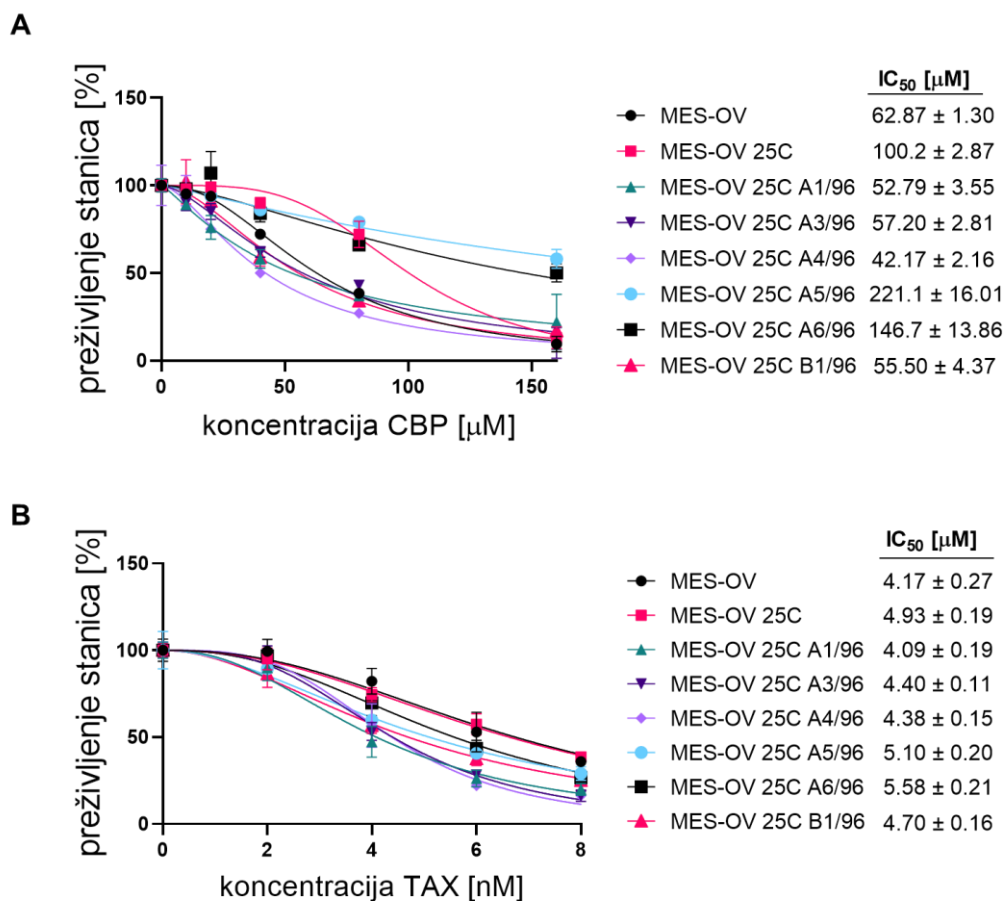
Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h. Izolirana je ukupna RNA nakon čega je (A) određena ekspresija gena *CDH1*, *CDH2*, *VIM* i *FN1* metodom RT-qPCR. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna stopa promjene ekspresije u odnosu na MES-OV stanice, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Izolirani su ukupni proteini nakon čega je (B) određena ekspresija E-kadherina, N-kadherina, vimentina, fibronektina i ERK1/2 metodom Western blot. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta, zajedno s relativnim omjerima ekspresije proteina u MES-OV CBP8 u odnosu na MES-OV i molekularne težine na kojima je detektiran signal. Signal proteina ERK1/2 je korišten kao referentni signal. (C) Vrijednosti relativne ekspresije

(log₂FC) panela dodatnih 17 gena analizirane su u svim varijantama stanica MES-OV korištenjem računalnog programa TAC i vizualizirane korištenjem alata Morpheus u obliku plota *heatmap*. Crvena boja označava pojačanu, a plava sniženu ekspresiju gena u odnosu na signal detektiran u MES-OV stanicama korištenjem metode hibridizacije DNA mikročipova.

4.1.5 Osjetljivost MES-OV stanica klonova na CBP i TAX

Stanice klonova razvijene su tretmanom s CBP-om i izdvojene na način opisan u poglavlju 3.2.1.3. Razlog uspostavi ovih tipova stanica je bio razviti stanice koje su preživjele ekvivalentnu koncentraciju CBP-a koja se koristi u liječenju te zadržale sposobnost klonalnog rasta. Na taj način je razvijen model u uvjetima koji donekle imitiraju uvjete u klinici gdje visokim dozama citostatika unutar jednog ciklusa dolazi do ubijanja najvećeg broja stanica raka, a vrlo mali broj stanica preživi i zadrži sposobnost diobe.

U svrhu određivanja osjetljivosti razvijenih stanica klonova na tretman CBP-om i TAX-om korišten je test metabolizma resazurina (opisan u poglavlju 3.2.2.1) koji mjeri vijabilnost stanica. Matična populacija stanica klonova MES-OV 25C i stanice pojedinačnih klonova su se razlikovale od stanica MES-OV u osjetljivosti na CBP i TAX. Uzimajući u obzir vrijednosti IC₅₀, na CBP su najotpornije, u odnosu na roditeljske MES-OV, bile stanice klonova A5/96 (3,51 puta), A6/96 (2,33 puta) i matična populacija MES-OV 25C (1,59 puta), dok su ostale stanice klonova bile više osjetljive na CBP (Slika 15A). Isti trend promjene osjetljivosti uočen je i u slučaju križne otpornosti na TAX, s manje značajnim promjenama (do 1,33 puta; Slika 15B).



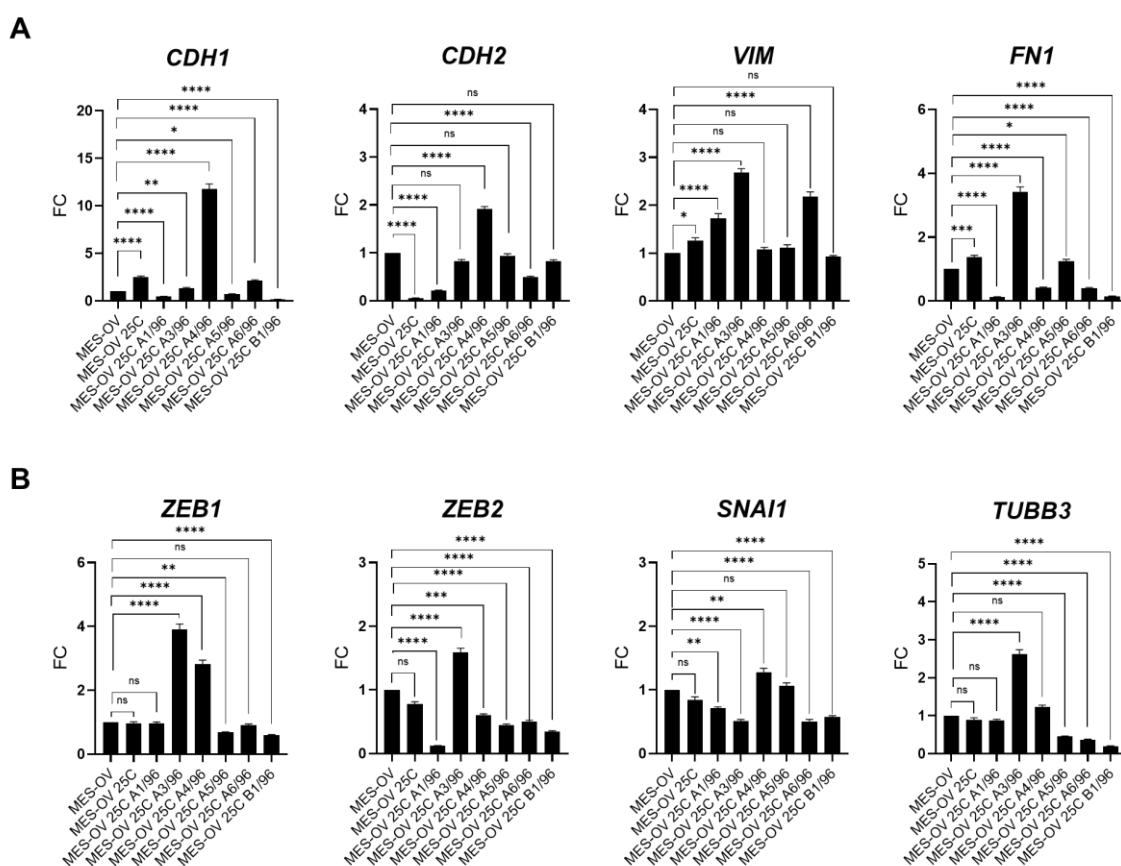
Slika 15 Vijabilnost novorazvijenih MES-OV stanica klonova

Stanice su nasadene u bočice za uzgoj i drugi dan tretirane različitim koncentracijama CBP-a i TAX-a. Vijabilnost stanica izmjerena je testom metabolizma resazurina. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao krivulje preživljenja svake varijante stanica u odnosu na kontrolu (stanice tretirane DMSO-om) nakon tretmana (A) CBP-om i (B) TAX-om u trajanju od 72 h, zajedno s pripadajućim vrijednostima IC_{50} i standardnim devijacijama.

4.1.6 Ekspresija gena biljega EMT-ja u MES-OV stanicama klonova

U svrhu određivanja statusa EMT-ja MES-OV stanica klonova, mjerena je relativna promjena ekspresije gena *CDH1*, *CDH2*, *VIM* i *FN1* svake populacije stanica klonova pomoću metode RT-qPCR (opisane u poglavlju 3.2.4.4). Ekspresija gena bila je različito promijenjena u svih sedam populacija klonova u odnosu na MES-OV (Slika 16A). Analizom korelacije promjene ekspresije gena ($\log_2FC$) i odgovora na CBP

(IC₅₀) na stanicama matične populacije MES-OV 25C i klonova A5/96 i A6/96, sa istaknutom otpornosti na CBP, nije primijećena značajna korelacija u slučaju nijednog gena (neprikazani rezultati). Iz tog razloga su napravljene dodatne analize relativne promjene ekspresije gena *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2* i *TUBB3* koji su često povezivani s procesom EMT i smanjenom osjetljivošću na CBP (Slika 16B) [67,81–83]. Međutim, nije primijećena statistički značajna promjena ekspresije četiri spomenuta gena (Slika 16B), kao ni korelacija s odgovorom na CBP (neprikazani rezultati) u stanicama klonova koji pokazuju istaknutu otpornost na CBP (A5/96 i A6/96) u odnosu na druge klonove.



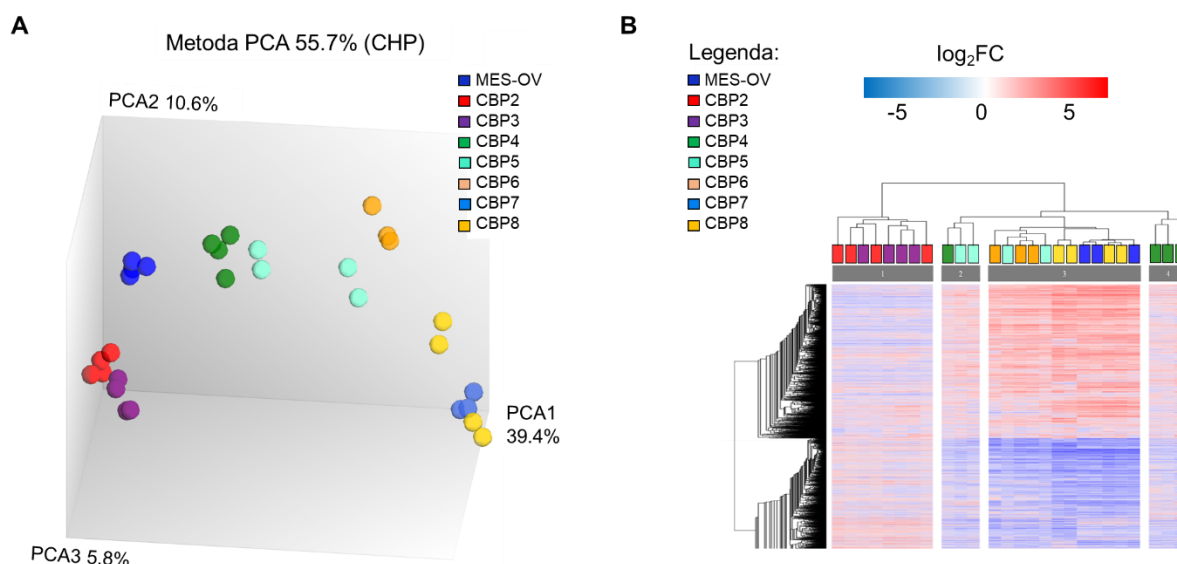
Slika 16 Ekspresija gena biljega EMT-ja u novorazvijenim MES-OV stanicama klonova

Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h. Iz izolirane ukupne RNA stanice je određena ekspresija gena biljega EMT-ja metodom RT-qPCR. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna stopa promjene ekspresije gena u odnosu na MES-OV stanice, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$

4.2 Analiza ekspresije gena varijanti stanica MES-OV

4.2.1 Grupiranje analiziranih varijanti stanica MES-OV

Ekspresija 21449 gena analizirana je metodom hibridizacije DNA mikročipova (opisanom u poglavlju 3.2.4.4) u svim razvijenim varijantama stanica MES-OV. Grupiranje uzoraka analizirano je metodama PCA i klasteriranja prema hijerarhiji (opisanima u poglavlju 3.2.7.2). Rezultati analize pokazali su visoki stupanj sličnosti promjene ekspresije gena varijanti CBP2 i CBP3, te CBP7 i CBP8, u odnosu na roditeljsku liniju MES-OV (Slika 17). Varijanta CBP5 dijelila je sličnosti s varijantama CBP4 i CBP6. Sličan trend primijećen je korištenjem obje metode.



Slika 17 Grupiranost varijanti stanica MES-OV prema ekspresiji svih analiziranih gena

Grupiranost novorazvijenih varijanti provjerena je metodom (A) PCA i (B) klasteriranjem prema hijerarhiji. Svaka boja označava uzorke koji pripadaju jednoj varijanti stanica. Na grafikonu *heatmap*, crvena boja označava pojačanu, a plava sniženu ekspresiju gena u odnosu na prosječnu vrijednost tog gena u stanicama MES-OV.

4.2.2 Usporedba gena i rezultata analiza dviju lista - DEG i CCORG

U svrhu izdvajanja gena koji su značajno promijenjeni između stanica MES-OV CBP8 i MES-OV korištena je metoda analize značajno promijenjenih gena (DEG) pod uvjetima $p\text{-vrijednost} < 0,05$ i $\log_2FC = |1|$ (opisana u poglavlju 3.2.7.3). Za izdvajanje gena čija promjena ekspresije u razvijenim varijantama stanica korelira s osjetljivošću varijanti na CBP (CCORG) korištena je analiza korelacije promjene ekspresije gena i osjetljivosti na CBP primjenom uvjeta $p\text{-vrijednost} < 0,05$ i $p > |0.667|$ (opisana u poglavlju 3.2.7.4). Obje analize su rezultirale listama od 2127 gena, od kojih su dijelile njih 647 te imale podjednak broj gena s pojačanom ili smanjenom ekspresijom, zbog čega je njihova usporedba bila jednostavnija (Tablica 19). Lista DEG imala je u prosjeku veću promjenu ekspresije ($\log_2FC$ i $|\log_2FC|$) u usporedbi s listom CCORG, dok je lista CCORG imala veću prosječnu vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije (ρ) (Tablica 19). Analiza interakcija proteina (opisana u poglavlju 3.2.7.5) pokazala je da između proteina kodiranih genima iz grupe CCORG postoji 66,37% više ukupnih interakcija proteina ($N=13285$), u odnosu na proteine kodirane genima iz grupe DEG ($N=7985$) (Tablica 19). Dodatnom podjelom i analizom broja interakcija prema tipovima podataka utvrđeno je da povećanom broju interakcija u grupi CCORG najviše doprinose podaci iz analiza povezanih ekspresija ($N=2893$, +243,58% u odnosu na listu DEG) i eksperimenata ($N=3049$, +228,20% u odnosu na listu DEG), a manje iz pročišćenih baza podataka ($N=4073$, +54,75% u odnosu na listu DEG) i pretraživanjem tekstova ($N=4835$, +27,04% u odnosu na listu DEG) (Tablica 19). Nadalje, analizom setova gena (opisanom u poglavlju 3.2.7.6) utvrđena je uključenost gena s liste DEG u procese diferencijacije i signalni put PI3K-Akt, dok su geni s liste CCORG bili zastupljeniji u kategorijama bioloških procesa i signalnih puteva povezanih s procesiranjem i metabolizmom RNA te translacijom (Tablica 19). Rezultati usporedbe pokazali su da se primjenom filtera promjene ekspresije gena dobiva značajno različita lista gena u kontekstu interakcija proteina i funkcijama u odnosu na gene dobivene primjenom korelacije s osjetljivošću na CBP kao filtera.

Tablica 19 Analiza i usporedba lista gena DEG i CCORG i rezultata analize interakcija između proteina kodiranih genima istih

		DEG	CCORG
Opisna statistika	N(gena)	2127	2127
	N(gena pojačane/smanjene ekspresije)	950/1177 (44,6/55,3%)	1001/1126 (47,1/52,9%)
	Prosjeck/medijan log ₂ FC	-0,181/-1,055	-0,001/-0,075
	Prosjeck/medijan log ₂ FC	1,698/1,415	0,882/0,735
	Min/max FC	-9,935/6,915	-9,935/5,305
	Prosjeck/medijan p	-0,043/-0,250	0,882/0,735
	Prosjeck/medijan p	0,548/0,571	0,768/0,750
	Min/max p	-1/1	-1/1
Analiza interakcija između proteina	N(čvorova; proteina)	2064	2077
	N(ukupnih veza; interakcija)	7985	13285
	N(veza): pretraživanje tekstova	3806	4835
	N(veza): eksperimenti	929	3049
	N(veza): baze podataka	2632	4073
	N(veza): povezana ekspresija	842	2893

Tablica 20 Usporedba rezultata analize setova gena lista DEG i CCORG

	DEG	CCORG
GO: biološki procesi[#]	formacija endoderma (GO:0001706) (q=0,0056)	biogeneza ribosoma (GO:0042254) (q=2,32E-09)
	diferencijacija stanica endoderma (GO:0035987) (q=0,0100)	procesiranje rRNA (GO:0006364) (q=8,08E-09)
	regulacija migracije stanica (GO:0030334) (q=0,0100)	metabolički proces rRNA (GO:0016072) (q=1,89E-08)
	organizacija ECM-a (GO:0030198) (q=0,0100)	procesiranje ncRNA (GO:0034470) (q=1,63E-07)
	pozitivna regulacija višestaničnog organskog procesa (GO:0051240) (q=0,0100)	translacija u mitohondriju (GO:0032543) (q=1,66E-04)
	regulacija aktivnosti kinaza MAP (GO:0043405) (q=0,0100)	dokidanje translacije u mitohondriju (GO:0070126) (q=1,66E-04)
	aksonogeneza (GO:0007409) (q=0,0100)	dokidanje translacije (GO:0006415) (q=7,61E-04)

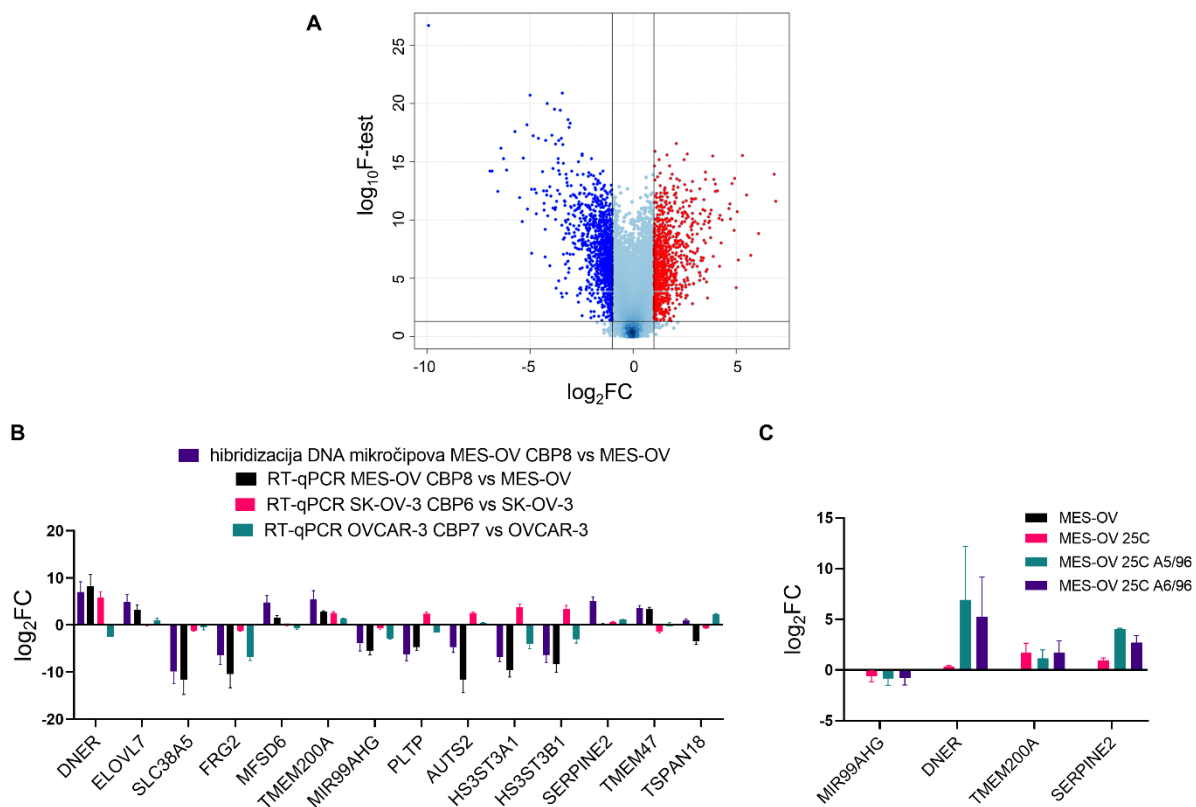
	pozitivna regulacija migracije stanica (GO:0030335) (q=0,0100)	translacijsko produljivanje u mitohondriju (GO:0070125) (q=0,0017)
	unutarnji signalni put apoptoze (GO:0097193) (q=0,0187)	nadzor RNA u jezgri (GO:0071027) (q=0,0020)
	pozitivna regulacija pokretljivosti stanice (GO:2000147) (q=0,0190)	pozitivna regulacija lokalizacije proteina na telomernu regiju kromosoma (GO:1904816) (q=0,0020)
KEGG#	navođenje aksona (q=0,0004)	biogeneza ribosoma kod eukariota (q=0,0124)
	signalni putevi u tumoru (q=0,0019)	degradacija RNA (q=0,0124)
	signalni put kalcija (q=0,0434)	mitofagija (q=0,0124)
	signalni put PI3K-Akt (q=0,0434)	spliceosom (q=0,0124)
	signalni put Ras (q=0,0590)	transport RNA (q=0,0124)
	signalni put Rap1 (q=0,0780)	ribosom (q=0,0216)
	smični stres tekućine i ateroskleroza (q=0,0780)	polimeraza RNA (q=0,0382)
	hepatocelularni karcinom (q=0,0780)	rak debelog crijeva (q=0,0476)
	proteoglikani u tumoru (q=0,0780)	rak gušterače (q=0,0598)
	lizosom (q=0,0957)	autofagija (q=0,0598)
WikiPathways#	diferencijacija ektoderma (WP2858) (q=0,0000)	integrirani signalni put raka dojke (WP1984) (q=0,0030)
	signalni put opredijeljenosti stanica mezoderma (WP2857) (q=0,0037)	biosinteza masnih kiselina (WP357) (q=0,0083)
	signalni put glukokortikoidnog receptora (WP2880) (q=0,0037)	metabolizam pirimidina (WP4022) (q=0,0083)
	signalni put PI3K-Akt (WP4172) (q=0,0078)	jednouglični metabolizam (WP241) (q=0,0486)
	sinteza kolagena tipa I u kontekstu poremećaja <i>Osteogenesis imperfecta</i> (WP4786) (q=0,0590)	homeostaza bakra (WP3286) (q=0,0486)
	meta put receptora jezgre (WP2882) (q=0,0114)	signalni put androgenog receptora (WP138) (q=0,0486)
	fibroza pluća (WP3624) (q=0,0141)	reprogramiranje metabolizma u raku debelog crijeva (WP4290) (q=0,0486)
	signalna os GDNF/RET (WP4830) (q=0,0211)	beta-oksidacija LC-masnih kiselina u mitohondriju (WP368) (q=0,0486)
	razvoj sabirnog sustava uretre (WP5053) (q=0,0457)	signalni put TSH (WP2032) (q=0,0486)

	diferencijacija stanica progenitora srca (WP2406) (q=0,0457)	signalni put TGF-beta (WP366) (q=0,0486)
--	---	--

Prikazano je samo 10 najznačajnijih rezultata

4.2.3 Probir gena za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP

Kao što smo prethodno naveli u poglavlju 3.2.7.3, u prvom pristupu su korišteni geni koji su promijenjeni između stanica MES-OV CBP8 i MES-OV te izdvojeni pod uvjetima prilagođene p-vrijednost < 0,05 i $\log_2FC = |1|$ (lista DEG; Slika 18A) te je pristupljeno njihovom daljnjem probiru. Ukupno 100 gena (50 gena s najvišom i 50 s najnižom ekspresijom u odnosu na MES-OV) je izdvojeno i pretraženo u bazi podataka PubMed prema funkciji u stanici i dosad opisanim ulogama u otpornosti na CBP, procesu EMT-ja i posttranslacijskoj (epigenetičkoj) regulaciji korištenjem ključnih riječi “ovarian cancer”, “HGSOC”, “platinum”, “carboplatin” “cisplatin”, “resistance” i “gene name”. Samo 14 gena (*DNER*, *ELOVL7*, *SLC38A5*, *FRG2*, *MFSD6*, *TMEM200A*, *MIR99AHG*, *PLTP*, *AUTS2*, *HS3ST3A1*, *HS3ST3B1*, *SERPINE2*, *TMEM47*, *TSPAN18*) odabrano je za daljnju analizu. Promjena ekspresije odabranih gena, određena metodom hibridizacije DNA mikročipova (opisanom u poglavlju 3.2.4.4), provjerena je korištenjem metode RT-qPCR u stanicama MES-OV i MES-OV CBP8 te u dodatna dva modela stanica; OVCAR-3/OVCAR-3 CBP7 i SK-OV-3/SK-OV-3 CBP6. Samo *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A* i *SERPINE2* su u sva tri modela stanica imali promjenu u istom smjeru ekspresije (Slika 18B). Rezultati su potvrđeni i na modelu MES-OV stanica klonova koji su bili najotporniji na CBP (MES-OV 25C, MES-OV 25C A5/96 i A6/96; Slika 18C) u odnosu na MES-OV. Na temelju rezultata, četiri izdvojena gena su odabrana za daljnja ispitivanja njihove eventualne uloge u otpornosti i EMT.



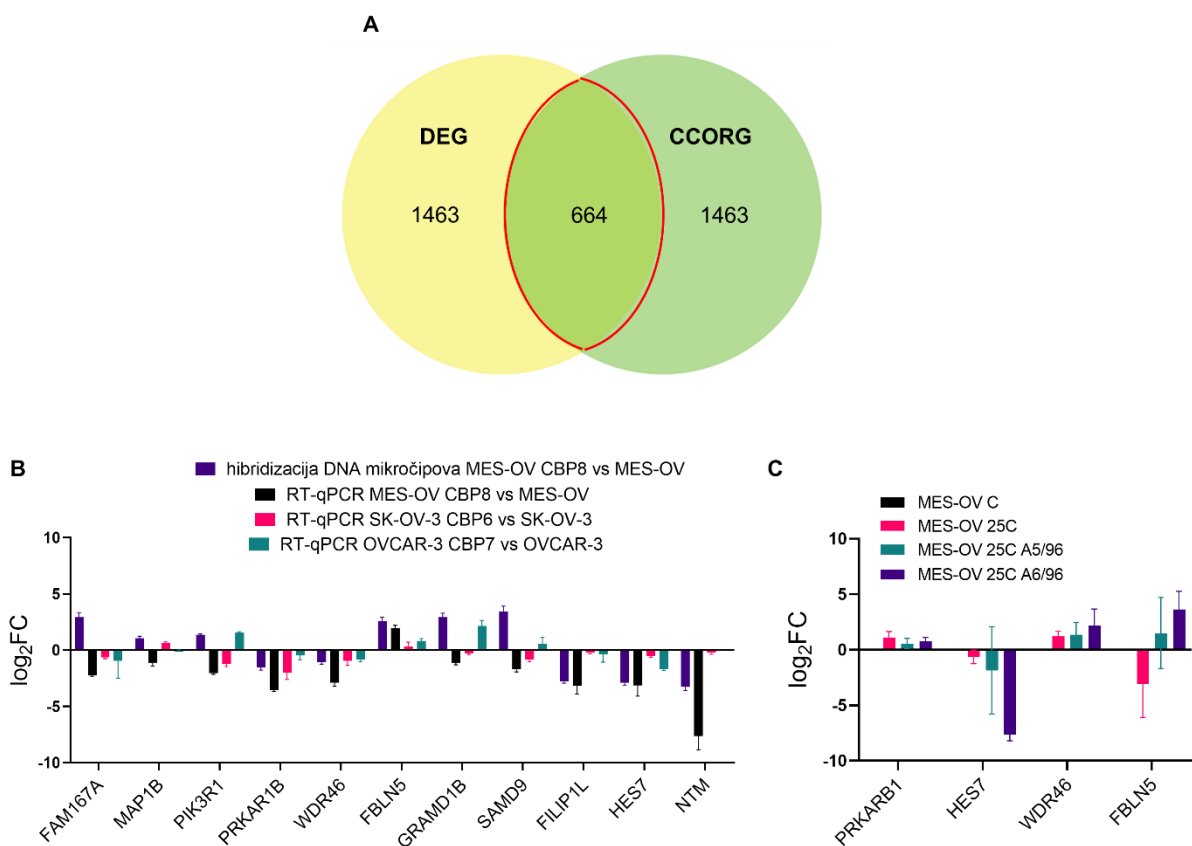
Slika 18 Probir gena liste DEG za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP

(A) Rezultati bioinformatičke analize liste DEG između stanica MES-OV CBP8 i MES-OV filtrirani su prema kriterijima $p < 0,05$ i $\log_2 FC > |1|$ i vizualizirani korištenjem računalnog alata Morpheus u obliku plota *volcano*. Crveno su označeni geni koji su prošli navedene filtere i imali pojačanu, a plavo sniženu ekspresiju u stanica MES-OV CBP8 u odnosu na MES-OV.

(B) Ekspresije 14 odabranih gena određene su u šest uzoraka linija stanica: MES-OV/MES-OV CBP8, SK-OV-3/SK-OV-3 CBP6 i OVCAR-3/OVCAR-3 CBP7 korištenjem RT-qPCR. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Na grafikonu su prikazane relativne, prosječne vrijednosti $\log_2 FC$ izmjerene metodom hibridizacije DNA mikročipova i/ili RT-qPCR svake otporne linije stanica u odnosu na odgovarajuću roditeljsku liniju stanica, zajedno sa standardnim devijacijama.

(C) Ekspresije *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2* izmjerene su metodom RT-qPCR u stanicama MES-OV, MES-OV 25C, MES-OV 25C A5/96 i MES-OV 25C A6/96. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazane su relativne prosječne vrijednosti $\log_2 FC$ u odnosu na stanice MES-OV, zajedno sa standardnim devijacijama.

Drugi pristup izdvajanju gena od interesa temeljio se, uz otprije spomenute uvjete prilagođene $p\text{-vrijednost} < 0,05$ i $\log_2FC = |1|$, na primjeni dodatnog uvjeta visoke korelacije gena sa osjetljivošću na CBP ($|\rho| > 0.8$) (opisano u poglavlju 3.2.7.4). Na taj način su u analizu uključene sve varijante stanica MES-OV, a ne samo MES-OV CBP8. Primjena tri navedena filtera rezultirala je listom od 664 gena (lista DEG-CCORG; Slika 19A). Ukupno 100 gena (50 gena s najvećom i 50 s najnižom ekspresijom u odnosu na MES-OV) je izdvojeno i pretraženo u bazi podataka PubMed prema uvjetima spomenutim u prethodnom poglavlju. Samo 11 gena (*FBLN5*, *GRAMD1B*, *SAMD9*, *FILIP1L*, *HES7*, *NTM*, *FAM167A*, *MAP1B*, *PIK3R1*, *PRKAR1B*, i *WDR46*) je odabrano i analizirano metodom RT-qPCR na dodatna tri modela spomenuta u prethodnom ulomku. Samo je ekspresija *FBLN5*, *WDR46*, *HES7* i *PRKAR1B* bila slična u dva modela OVCAR-3/OVCAR-3 CBP7 i SK-OV-3/SK-OV-3 CBP6 (Slika 19B). U modelu stanica klonova, ekspresija *PRKAR1B* i *WDR46* je bila suprotna rezultatima dobivenim u ostalim analiziranim modelima (Slika 19C). Međutim, zbog toga što promjene uočene u modelu stanica klonova najviše odgovaraju promjenama u ranijim varijantama modela razvoja otpornosti, rezultati su uspoređeni s istima te su sva četiri izdvojena gena odabrana za daljnje eksperimente ispitivanja funkcije.



Slika 19 Probir gena liste DEG-CCORG za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP

(A) Rezultati bioinformatičke analize liste DEG-CCORG (označeni crvenim obrubom) filtrirani su prema kriterijima $p < 0,05$, $\log_2FC > 1$ i $|p| > 0,8$, i vizualizirani korištenjem računalnog alata VennPainter u obliku plota *venn*. (B) Ekspresije 11 odabranih gena određene su u šest uzoraka linija stanica (MES-OV/MES-OV CBP8, SK-OV-3/SK-OV-3 CBP6 i OVCAR-3/OVCAR-3 CBP7). Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazane su relativne prosječne vrijednosti $\log_2FC$ izmjerene metodom hibridizacije DNA mikročipova i/ili RT-qPCR svake razvijene linije stanica u odnosu na odgovarajuće roditeljske stanice, zajedno sa standardnim devijacijama. (C) Ekspresije *PRKAR1B*, *HES7*, *WDR46* i *FBLN5* izmjerene su metodom RT-qPCR u stanicama MES-OV, MES-OV 25C, MES-OV 25C A5/96 i MES-OV 25C A6/96. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Prikazane su relativne prosječne vrijednosti $\log_2FC$ u odnosu na stanice MES-OV, zajedno sa standardnim devijacijama.

4.2.4 Probir signalnih puteva za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP

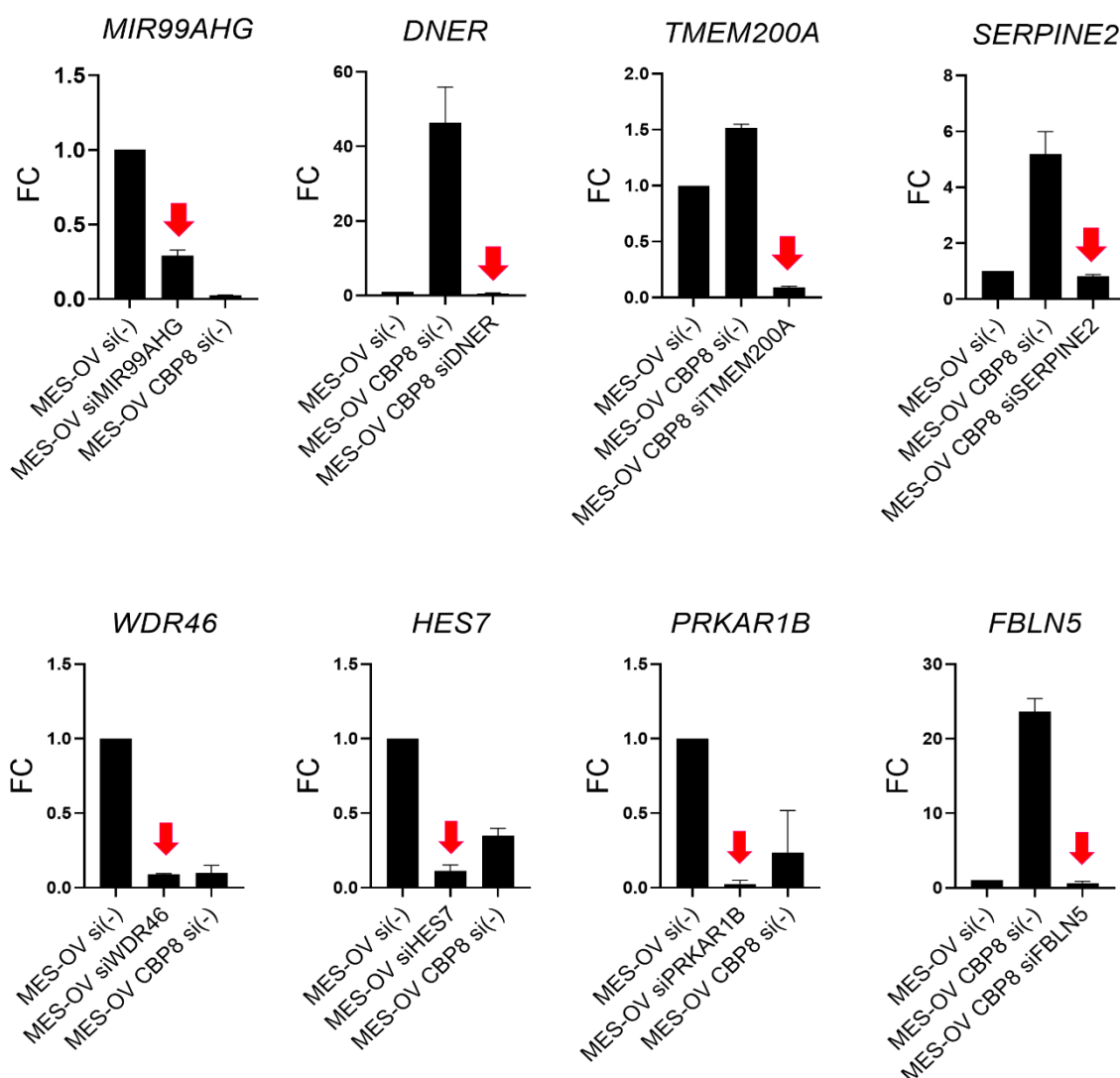
U svrhu izdvajanja setova gena i signalnih puteva koji imaju potencijalno važnu ulogu u procesima razvoja smanjene osjetljivosti na CBP i/ili EMT, korišteni su rezultati analize setova gena (opisane u poglavlju 3.2.7.6) prikazani u Tablici 20. Setovi gena i signalni putevi spomenuti u tablici pretraženi su u bazi podataka PubMed prema dosad opisanim ulogama u procesima smanjene osjetljivosti/otpornosti na spojeve s platinom (CBP, cDDP) i EMT-ja. Uzimajući u obzir i uključenost brojnih gena s lista DEG, CCORG u procese diferencijacije, signalni put PI3K-Akt, te biološke procese i signalne puteve povezane s procesiranjem i metabolizmom RNA i translacijom, ukupno je za daljnja ispitivanja odabrano 14 komercijalno dostupnih inhibitora: Rapamycin (Sirolimus; inhibitor mTOR-a), LY294002 (inhibitor PI3K $\alpha/\delta/\beta$ -a), Wortmannin (inhibitor PI3K-a), Idelalisib (inhibitor PI3K p110 δ -a), AZD1080 (inhibitor GSK-3-a), SB216763 (inhibitor GSK-3-a), Akti-1/2 (inhibitor Akt1/2-a), TIC-10 (inhibitor Akt/ERK-a), Cilengitide (inhibitor receptora integrina), Triptolide (inhibitor NF- κ B), Rilpivirine (inhibitor reverzne transkriptaze bez nukleozida), Roscovitine (inhibitor CDK-a), Febuxostat (inhibitor ksantin oksidaze) i TVB-3166 (inhibitor sintetaze masnih kiselina).

4.3 Ispitivanje uloge osam izdvojenih gena u otpornosti stanica na CBP i pokretljivosti

4.3.1 Provjera efikasnosti utišavanja gena metodom transfekcije stanice sa siRNA

U svrhu ispitivanja uloge osam odabranih gena (*MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *WDR46*, *HES7*, *PRKAR1B* i *FBLN5*) u odgovoru na tretman s CBP-om te pokretljivosti stanica, korištena je metoda utišavanja gena transfekcijom stanica sa siRNA (opisana u poglavlju 3.2.6.1). U slučaju gena s pojačanom ekspresijom u MES-OV CBP8 u odnosu na MES-OV (*DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2* i *FBLN5*), siRNA je unesena (transficirana) u stanice MES-OV CBP8. U slučaju gena sa

sniženom ekspresijom u MES-OV CBP8 u odnosu na MES-OV (*MIR99AHG*, *PRKAR1B*, *HES7* i *WDR46*), gen od interesa je unesen u stanice MES-OV. Uspješnost utišavanja svih gena potvrđena je metodom RT-qPCR mjerenjem ekspresije gena od interesa u stanicama MES-OV ili MES-OV CBP8 s utišanim genom u odnosu na iste stanice transficirane negativnom kontrolom (Slika 20).



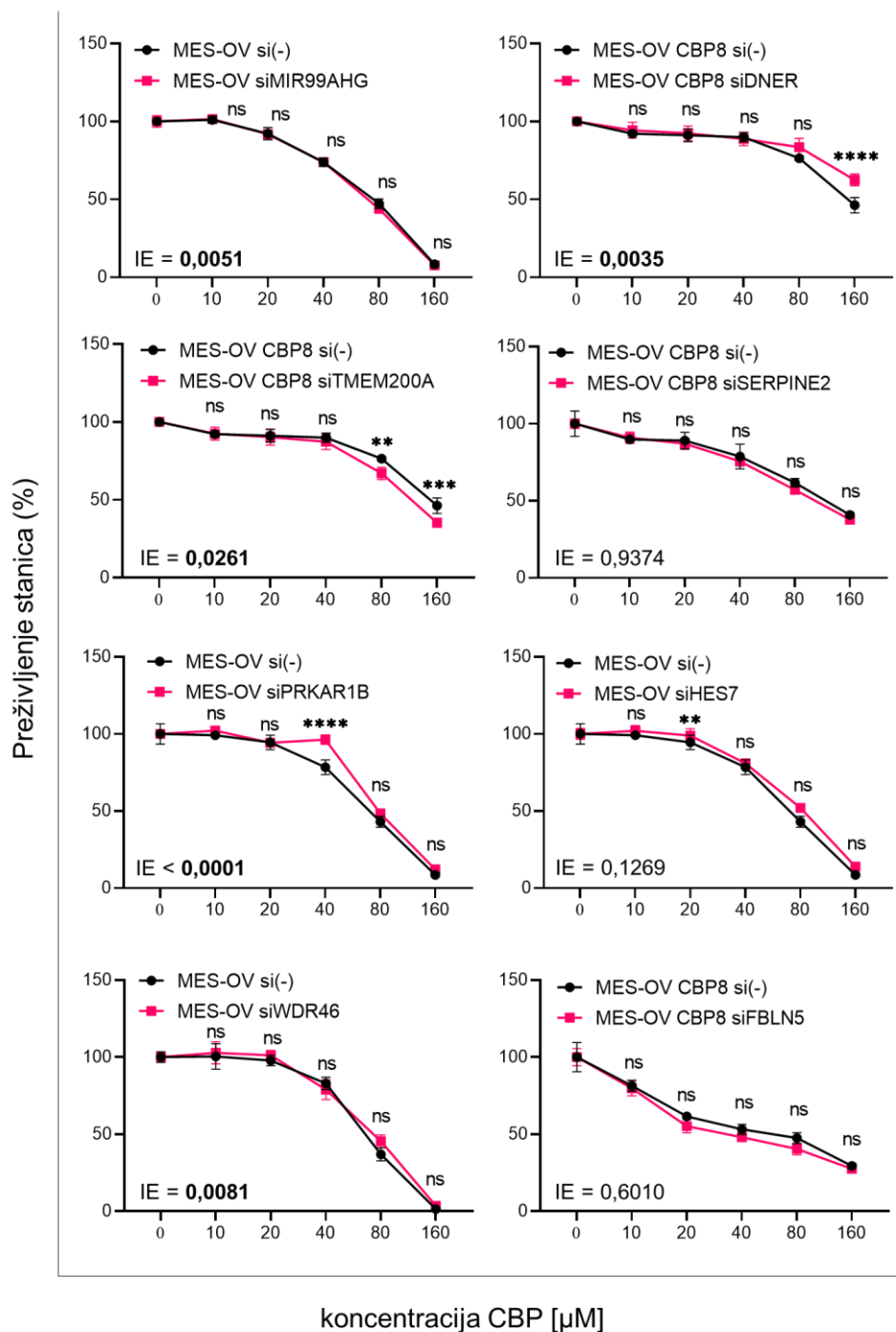
Slika 20 Provjera efikasnosti utišavanja gena *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *WDR46*, *HES7*, *PRKAR1B* i *FBLN5* metodom transfekcije stanica siRNA

Stanice su transficirane odgovarajućim siRNA i inkubirane 48 h. Uzorci su prikupljeni te je iz izolirane RNA određena ekspresija gena od interesa metodom RT-qPCR. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao relativne promjene ekspresije gena (FC) u odnosu na kontrolu transficiranu neciljajućim siRNA (MES-OV si(-) ili MES-OV CBP8

si(-)) iz reprezentativnog eksperimenta. Crvenom strelicom označen je efekt transfekcije stanica specifičnom siRNA na ekspresiju promatranog gena.

4.3.2 Uloga osam izdvojenih gena u odgovoru stanica MES-OV i MES-OV CBP8 na tretman s CBP-om

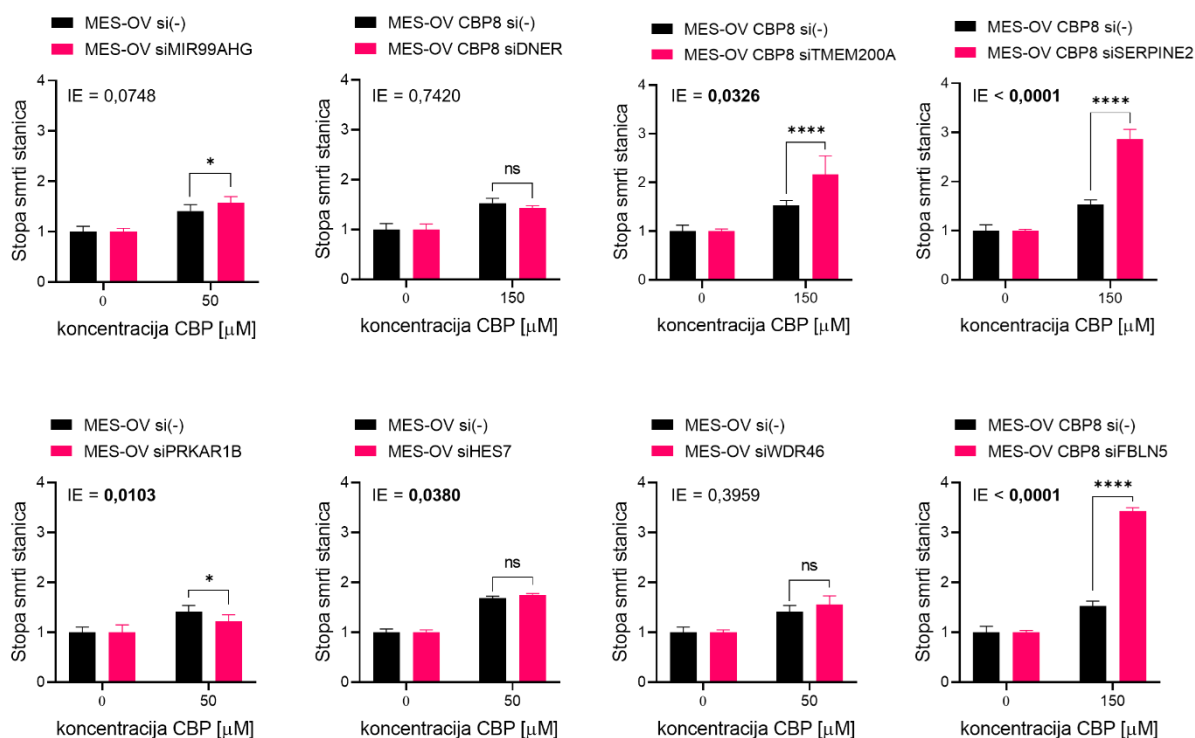
U svrhu ispitivanja uloge gena *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *WDR46*, *HES7*, *PRKAR1B* i *FBLN5* u odgovoru stanica MES-OV i MES-OV CBP8 na tretman CBP-om, utišane stanice su, zajedno s kontrolama, analizirane testom metabolizma resazurina (opisanom u poglavlju 3.2.2.1) i testom određivanja stope smrti stanice (opisanom u poglavlju 3.2.2.3). Utišavanje gena *MIR99AHG* nije utjecalo na vijabilnost stanica MES-OV nakon tretmana CBP-om (Slika 21), ali se vidio blagi porast relativnog broja mrtvih stanica mjerenjem stope smrti stanice u odnosu na stanice transficirane si(-) (Slika 22). Utišavanje gena *DNER* učinilo je stanice MES-OV CBP8 otpornijima na CBP u usporedbi sa stanicama transficiranih negativnom kontrolom transfekcije (si(-)) (Slika 21). Međutim, suprotno od očekivanja, mjerenjem stope smrti stanice nije primijećen porast broja mrtvih stanica (Slika 22). Utišavanje *TMEM200A* učinilo je stanice MES-OV CBP8 osjetljivijima na CBP u odnosu na MES-OV CBP8 si(-) (Slika 21), što je u skladu s detektiranim povećanjem u broju mrtvih stanica (Slika 22). Utišavanje *SERPINE2* nije imalo značajan utjecaj na vijabilnost stanica MES-OV CBP8 nakon tretmana s CBP-om (Slika 21), ali je mjerenjem smrti stanice specifično primijećen značajan porast broja mrtvih stanica (Slika 22). Sljedeće je ispitivana funkcionalnost gena s liste DEG-CCORG. Primijećeno je povećanje otpornosti stanica MES-OV na tretman CBP-om nakon utišavanja gena *PRKAR1B* u odnosu na MES-OV si(-) (Slika 21) te povećanje stope smrti stanica (Slika 22). Utišavanje *HES7* i *WDR46* nije imalo utjecaja na vijabilnost (Slika 21) i stopu smrti stanica MES-OV (Slika 22) u odnosu na MES-OV si(-), dok utišavanje *FBLN5* nije utjecalo na vijabilnost stanica MES-OV CBP8 (Slika 21), ali je primijećeno značajno povećanje stope smrti stanica (Slika 22) u odnosu na MES-OV CBP8 si(-). Konačno, samo je utišavanje *TMEM200A* u stanicama MES-OV CBP8 i *PRKAR1B* u stanicama MES-OV u odnosu na odgovarajuće si(-) kontrole utjecalo i na vijabilnost stanica i na promjenu stope smrti stanica (Tablica 21).



Slika 21 Vijabilnost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 s utišanim genima od interesa nakon tretmana s CBP-om

Stanice su nasadene i drugi dan transficirane sa siRNA gena *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *WDR46*, *HES7*, *PRKAR1B* i *FBLN5* u trajanju od 48 h. Nakon utišavanja, stanice su tretirane različitim koncentracijama CBP-a. Preživljenje stanica izmjereno je testom metabolizma resazurina nakon 72 h. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao krivulje preživljenja svake varijante stanica u odnosu na

kontrolu transficiranu sa si(-), zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$



Slika 22 Stopa smrti stanica MES-OV i MES-OV CBP8 s utišanim genima od interesa nakon tretmana s CBP-om

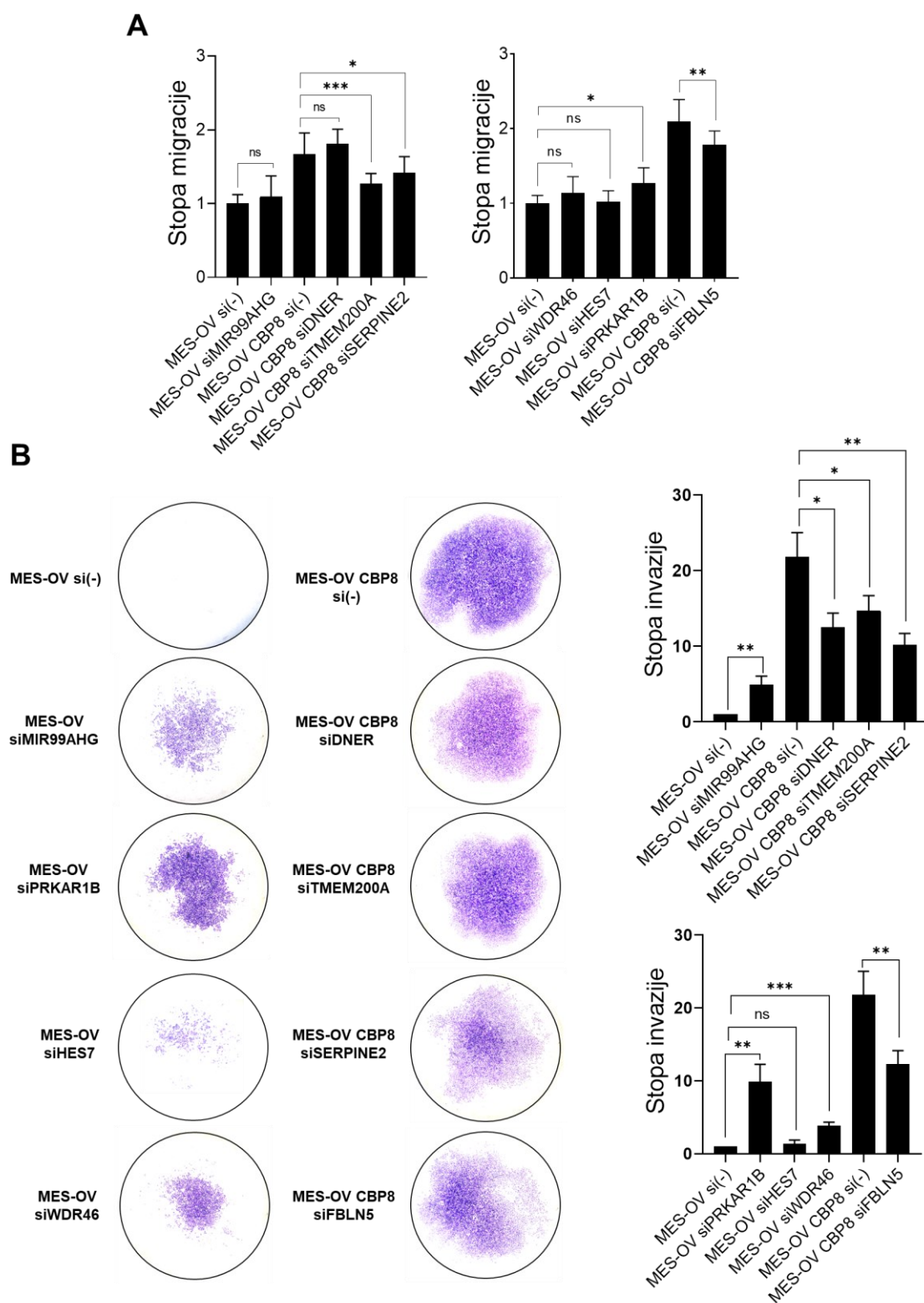
Stanice su nasađene i drugi dan transficirane sa siRNA gena *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *WDR46*, *HES7*, *PRKAR1B* i *FBLN5* u trajanju od 48 h. Nakon utišavanja, stanice su tretirane različitim koncentracijama CBP-a. Stopa smrti izmjerena je testom određivanja stope smrti stanica nakon 72 h. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao stupci promjene stope smrti svake varijante stanica u odnosu na kontrolu transficiranu sa si(-), zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

4.3.3 Uloga osam izdvojenih gena u pokretljivosti stanica MES-OV i MES-OV CBP8

U svrhu ispitivanja uloge gena *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *WDR46*, *HES7*, *PRKAR1B* i *FBLN5* u pokretljivosti stanica MES-OV i MES-OV CBP8, utišane

stanice su, zajedno s kontrolama, analizirane testom zacjeljivanja rana opisanim u poglavlju 3.2.3.1 i testom invazije opisanim u poglavlju 3.2.3.3.

Utišavanje gena *MIR99AHG* nije utjecalo na migraciju stanica MES-OV u odnosu na MES-OV si(-) (Slika 23A), ali je primijećen porast stope invazije ($p < 0,01$) (Slika 23B). Migracija stanica MES-OV CBP8 nije se promijenila nakon utišavanja gena *DNER* (Slika 23A), ali je zabilježeno smanjenje stope invazije u odnosu na MES-OV CBP8 si(-) (Slika 23B). Utišavanjem gena *TMEM200A* i *SERPINE2* u stanicama MES-OV CBP8 primijećeno je smanjenje stope migracije i invazije ($p < 0,05$; $p < 0,01$) u odnosu na MES-OV CBP8 si(-) (Slika 23). Nakon utišavanja gena *PRKAR1B* u MES-OV stanicama, primijećeno je povećanje stope migracije i invazije u odnosu na MES-OV si(-) (Slika 23). Utišavanje *HES7* nije utjecalo na stopu migracije i invazije stanica MES-OV (Slika 23), dok im je utišavanje gena *WDR46* značajno povećalo samo stopu invazije u odnosu na MES-OV si(-) (Slika 23B). Utišavanjem gena *FBLN5* u MES-OV CBP8 stanicama smanjila se stopa migracije i invazije ($p < 0,01$; Slika 23) u odnosu na stanice MES-OV CBP8 si(-). Konačno, promjena pokretljivosti stanica mjerena testom zacjeljivanja rana i testom invazije uočena je utišavanjem gena *TMEM200A* i *SERPINE2* u stanicama MES-OV CBP8 te *PRKAR1B* u stanicama MES-OV u odnosu na odgovarajuće kontrole (Tablica 21).



Slika 23 Pokretljivost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 s utišanim genima od interesa

Stanice su nasađene u pločice s 24 bunarića. (A) Migracija stanica izmjerena je testom zacjeljivanja rana. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao stupci prosječnih stopa migracije u odnosu na MES-OV stanice, zajedno s pripadajućim

vrijednostima standardne devijacije. (B) Invazija stanica izmjerena je testom invazije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao obrađene slike stanica koje su invadirale (lijevo) i kao stupci prosječnih stopa invazije u odnosu na MES-OV stanice, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Tablica 21 Sažetak efekata utišavanja gena na osjetljivost stanica na tretman CBP i pokretljivost

		preživljenje stanica	stopa smrti stanice	stopa migracije	stopa invazije
siRNA	MIR99AHG	=	S	=	↑
	DNER	R	=	=	↓
	TMEM200A	S	S	↓	↓
	SERPINE2	=	S	↓	↓
	PRKAR1B	R	R	↑	↑
	HES7	=	=	=	=
	WDR46	=	=	=	↑
	FBLN5	=	S	↓	↓

=, nema statistički značajne promjene; S, povećanje osjetljivosti na CBP (engl. *sensitisation*); R, povećanje otpornosti na CBP (engl. *resistance*); ↓, smanjenje pokretljivosti; ↑, povećanje pokretljivosti

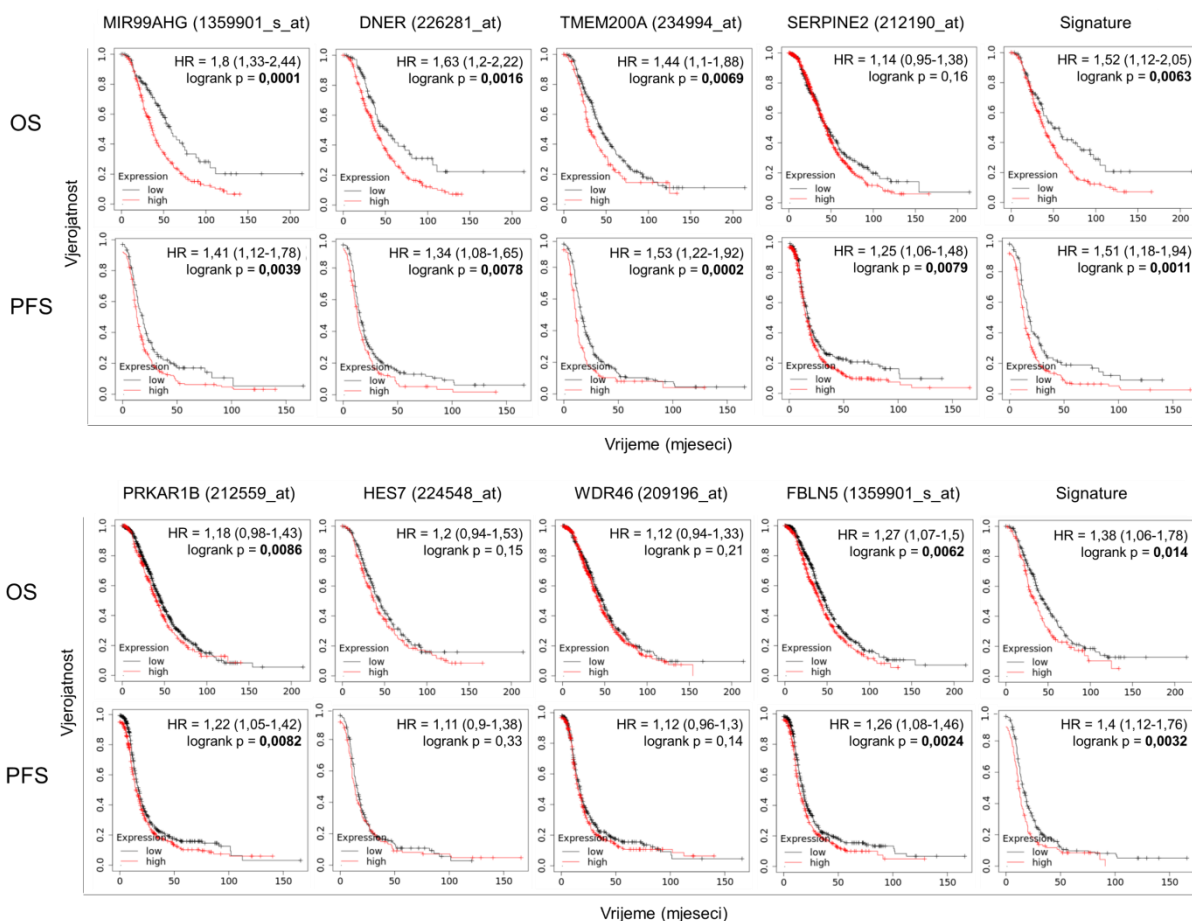
4.3.4 Vrijednost osam izdvojenih gena kao mogućih farmakogenetskih biljega

Moguća vrijednosti gena *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *WDR46*, *HES7*, *PRKAR1B* i *FBLN5* kao farmakogenetskih biljega analizirana je u kontekstu ukupnog preživljenja (OS), preživljenja bez napretka bolesti (PFS) i biljega odgovora na terapiju platinom (3.2.7.7) kod bolesnica sa seroznim rakom jajnika visokog stupnja (HGSOC).

Rezultati analize su pokazali vrlo visoku vrijednosti HR-a za *MIR99AHG* od 1,8 ($p=0,000$) za OS i 1,41 ($p=0,004$) za PFS (Slika 24, Tablica 22), ukazujući na to da njegova povećana ekspresija može biti dobar biljeg ukupnog preživljenja bolesnica s HGSOC-om i preživljenja bez napretka bolesti. Ti rezultati su suprotni rezultatima analize *MIR99AHG* u tri modela *in vitro* razvijenima u našem laboratoriju, gdje je

ekspresija *MIR99AHG* smanjena u stanicama MES-OV CBP8 koje bolje preživljavaju tretman CBP. Vrijednost AUC-a od *MIR99AHG* kao biljega odgovora bolesnica na terapiju lijekovima s platinom nije bila analizirana zbog nedostatka podataka u alatu ROC plotter. Gen *DNER* je imao visoku vrijednost HR-a od 1,63 ($p=0,002$) i 1,34 ($p=0,008$) u slučaju OS-a i PFS-a (Slika 24, Tablica 22), dok je njegova vrijednost AUC-a iznosila 0,603 ($p=0,002$) (Slika 25A). *TMEM200A* je također imao visoku vrijednost HR-a od 1,44 ($p=0,007$) i 1,53 ($p=0,000$) u slučaju OS-a i PFS-a (Slika 24, Tablica 22), dok je njegova vrijednost AUC-a iznosila 0,635 ($p=0,000$) (Slika 25A). Vrijednost HR-a u slučaju OS-a i AUC-a gena *SERPINE2* nije bila statistički značajna ($p=0,1600$ i $p=0,098$), dok je u slučaju PFS-a ona iznosila 1,25 ($p=0,008$) (Slika 24, Tablica 22, Slika 25A). Kada su sva četiri gena liste DEG bila zajednički analizirana kao set potencijalnih biljega (panel), HR vrijednosti OS-a i PFS-a su iznosile 1,52 ($p=0,006$) i 1,51 ($p=0,001$) (Slika 24, Tablica 22), a AUC vrijednost 0,596 ($p=0,004$) (Slika 25A). Zbog iznimno zanimljivih rezultata, geni su ispitani ne samo unutar skupine bolesnica sa HGSOE-om koje su primile terapiju na bazi platine, već i kod onih kojima je prije terapije platinom bio uspješno uklonjen veći dio, ako ne i cijeli makroskopski vidljiv rak jajnika (engl. *optimal debulking*) (Slika 25B), odnosno onih koje su primile kombiniranu terapiju spojevima s platinom i taksanima (Slika 25C). Jedini gen koji je imao visoke vrijednosti AUC-ova unutar dvije dodatne skupine bolesnica bio je *TMEM200A* s vrijednostima od 0,761 ($p=0,000$) (Slika 25B) i 0,726 ($p=0,003$).

U slučaju gena s liste DEG-CCORG, jedina statistički značajna vrijednost HR-a zabilježena je u slučaju OS-a za gen *FBLN5* te je iznosila 1,27 ($p=0,0062$) (Slika 24, Tablica 22). Vrijednosti AUC-ova su bile statistički značajne samo za gene *PRKAR1B* i *FBLN5*, te su iznosile 0,638 ($p=2,2e-06$) i 0,576 ($p=2,3e-02$) (Slika 24, Tablica 22). Vrijednosti HR-ova panela četiri gena liste DEG-CCORG iznosile su 1,38 ($p=0,014$) i 1,40 ($p=0,0032$) za OS i PFS, odnosno 0,576 ($p=2,3e-02$) za AUC (Slika 24, Tablica 22). Ostali geni nisu pokazali statistički značaj kao biljezi. Geni liste DEG-CCORG imali su općenito značajno lošije vrijednosti kao biljezi u odnosu na gene liste DEG, s iznimkom gena *PRKAR1B*.

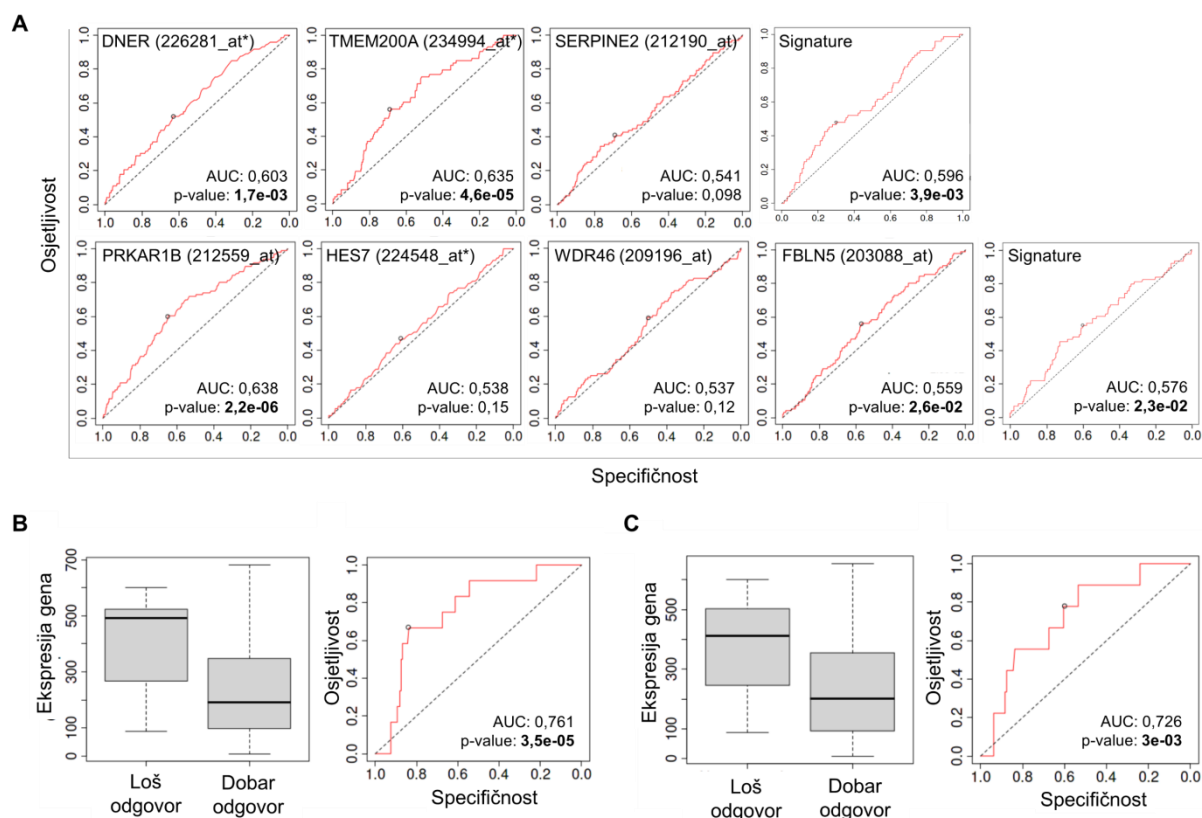


Slika 24 Vrijednost osam izdvojenih gena kao biljega OS-a i PFS-a bolesnica s HGSOC-om

Vrijednost gena *MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *PRKAR1B*, *HES7*, *WDR46* i *FBLN5* kao biljega preživljenja analizirana je korištenjem računalnog alata KM Plotter u kontekstu ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez napretka bolesti (PFS). Analiza je napravljena na setovima uzoraka tkiva pacijentica s rakom jajnika tipa HGSOC, razine (engl. *grade*) 2, 3 i 4 koje su primile terapiju na bazi platine. Rezultati su prikazani pomoću grafikona *Kaplan Meier*, zajedno s vrijednostima omjera pojave događaja (HR) i p-vrijednosti izračunatih metodom *log-rank*. Crvena linija označava preživljenje bolesnica s pojačanom, a crna sa sniženom ekspresijom gena od interesa, u odnosu na računalno određeni prag. Podebljano su označene statistički značajne p-vrijednosti.

Tablica 22 Vrijednost osam izdvojenih gena kao biljega OS-a i PFS-a bolesnica s HGSOC-om

	OS (406 bolesnica)		PFS (403 bolesnica)	
Gen	Grupa s niskom ekspresijom (u mjesecima)	Grupa s visokom ekspresijom (u mjesecima)	Grupa s niskom ekspresijom (u mjesecima)	Grupa s visokom ekspresijom (u mjesecima)
<i>MIR99AHG</i>	58	36,4	18,2	13
<i>DNER</i>	52	37,9	15	13
<i>TMEM200A</i>	44	29,9	16	11
<i>SERPINE2</i>	45,4	44,5	17,1	15,6
Panel DEG	49	38,9	18,1	13,6
<i>PRKAR1B</i>	45,5	40,1	17,4	15
<i>HES7</i>	44	37	15	13,4
<i>WDR46</i>	48,2	43,9	17,1	15,4
<i>FBLN5</i>	47,8	40,5	18,1	14,4
Panel CCORG	45	33,8	15,9	12



Slika 25 Vrijednost osam izdvojenih gena kao biljega odgovora bolesnica s HGSOC-om na terapiju platinom

(A) Vrijednost gena *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *PRKAR1B*, *HES7*, *WDR46* i *FBLN5*, te panela tri gena liste DEG i četiri gena liste CCORG kao biljega odgovora bolesnica s HGSOc-om na terapiju spojevima s platinom analizirana je korištenjem računalnog alata ROC Plotter. Analiza je napravljena na setovima uzoraka tkiva bolesnica s rakom jajnika tipa HGSOc, razine (engl. *grade*) 2, 3 i 4, koje su primile terapiju na bazi platine. Rezultati su prikazani pomoću grafikona *ROC plot*, zajedno s AUC i p-vrijednostima. (B) Vrijednosti gena *TMEM200A* kao biljega odgovora na tretman spojevima s platinom dodatno je analizirana na uzorcima bolesnica kod kojih je tijekom kliničkog zahvata u potpunosti uklonjena većina ili cijeli volumen tumora (engl. *optimal debulking*). (C) U analizu su uključene i bolesnice koje su primile kombiniranu terapiju spojevima s platinom i taksana. Rezultati su prikazani pomoću grafikona *box plot* (usporedba ekspresije gena u skupinama bolesnica s dobrim i lošim odgovorom na terapiju) i *ROC plot*, zajedno s AUC i p-vrijednostima. Podebljano su označene statistički značajne p-vrijednosti.

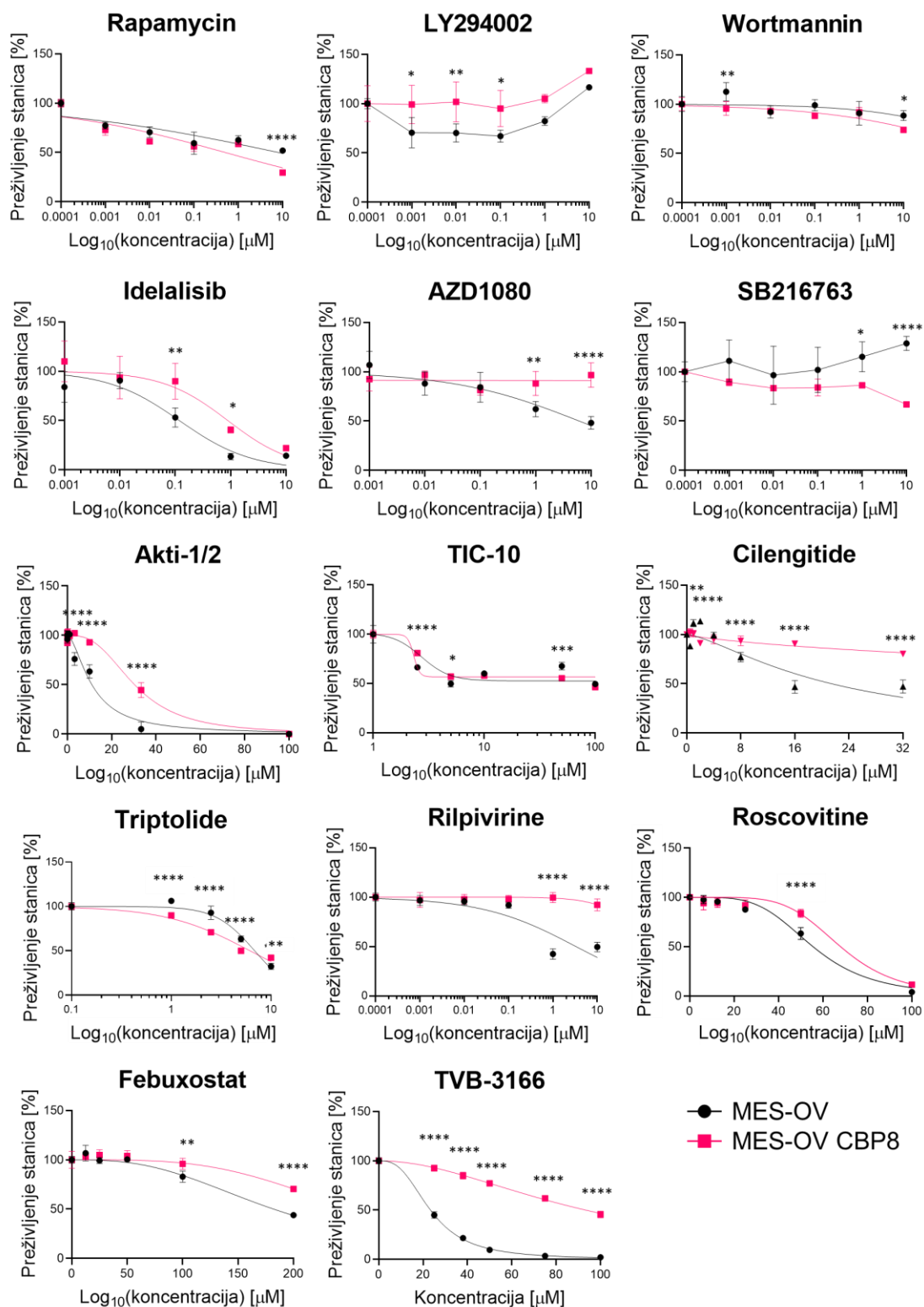
4.4 Ispitivanje funkcije izdvojenih signalnih puteva u otpornosti stanica MES-OV i MES-OV CBP8 na CBP i pokretljivosti

U svrhu ispitivanja funkcije izdvojenih signalnih puteva u otpornosti stanica MES-OV i MES-OV CBP8 na CBP i njihove pokretljivosti, stanice su tretirane s 14 odabranih inhibitora (opisano u poglavlju 3.2.6.2): Rapamycin, LY294002, Wortmannin, Idelalisib, AZD1080, SB216763, Akti-1/2, TIC-10, Cilengitide, Triptolide, Rilpivirine, Roscovitine, Febuxostat i TVB-3166. Tretiranim stanicama određena je vijabilnost testom metabolizma resazurina (opisanim u poglavlju 3.2.2.1), stopa stanične smrti (test opisan u poglavlju 3.2.2.3) i stopa migracije stanica testom zacjeljivanja rana (opisanim u poglavlju 3.2.3.1).

4.4.1 Preživljenje stanica MES-OV i MES-OV CBP8 nakon tretmana s 14 odabranih inhibitora

U svrhu određivanja uključenosti izdvojenih signalnih puteva u preživljenje stanica nakon tretmana CBP-om, prvo je provjeren utjecaj različitih koncentracija svakog

inhibitora na vijabilnost stanica MES-OV i MES-OV CBP korištenjem testa metabolizma resazurina (opisan u poglavlju 3.2.2.1). Rezultati su pokazali da su stanice MES-OV CBP8 bile otpornije na tretman s LY294002, Idelalisib, AZD1080, Akti-1/2, Cilengitide, Rilpivirine, Roscovitine, Febuxostat i TVB-3166 u usporedbi sa stanicama MES-OV (Slika 26). Obje linije stanica imale su sličan odgovor na tretman s inhibitorom TIC-10 (Slika 26). Nadalje, stanice MES-OV CBP8 bile su osjetljivije na Rapamycin, Wortmannin, SB216763 i Triptolide u usporedbi s MES-OV (Slika 26) te se s njima nastavilo u detaljna ispitivanja njihovog utjecaja na odgovor stanica MES-OV i MES-OV CBP8 na tretman s CBP-om.



Slika 26 Vijabilnost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 tretiranih s 14 odabраних inhibitora

Stanice MES-OV i MES-OV CBP8 su tretirane različitim koncentracijama sljedećih inhibitora: Rapamycin, LY294002, Wortmannin, Idelalisib, AZD1080, SB216763, Akti-1/2, TIC-10, Cilengitide, Triptolide, Rilpivirine, Roscovitine, Febuxostat i TVB-3166. Vijabilnost stanica

izmjerena je testom metabolizma resazurina nakon 72 h. Eksperiment je ponavljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao krivulje preživljenja svake varijante stanica u odnosu na kontrolu tretiranu s DMSO, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

4.4.2 Utjecaj Rapamycin-a, Wortmannin-a, SB216763-a i Triptolide-a na preživljenje stanica MES-OV i MES-OV CBP8 nakon tretmana CBP-om

U svrhu ispitivanja četiri inhibitora na koji su stanice MES-OV CBP8 bile osjetljivije od MES-OV - Rapamycin, Wortmannin, SB216763 i Triptolide (Slika 26) - odabrane su koncentracije koje su u obje linije stanica smanjile vijabilnost stanica za najviše 20% (efektivne koncentracije inhibitora), kako bi se izbjegao negativni utjecaj samog inhibitora na preživljenje stanica, odnosno mogućnost dodatnih, nespecifičnih efekata inhibitora na homeostazu stanica. Stanice MES-OV i MES-OV CBP8 su prvo tretirane (predtretirane) odabranim koncentracijama inhibitora u trajanju od 2 h, a zatim tretirane različitim koncentracijama CBP (opisano u poglavlju 3.2.6.2). Kao kontrola eksperimenta korištene su stanice tretirane DMSO-om koji je korišten za otapanje svih inhibitora. Tretman Rapamycin-om smanjio je osjetljivost na CBP stanica MES-OV u odnosu na iste stanice tretirane samo CBP-om i DMSO-om (Slika 27A), što je potvrđeno mjerenjem stope smrti stanica (Slika 27B). Tretman Wortmannin-om također je smanjio osjetljivost stanica MES-OV u odnosu na iste stanice predtretirane s DMSO-om (Slika 27A), međutim, isti efekt nije primijećen mjerenjem stope smrti stanica (neprikazani rezultati). Tretman Triptolide-om nije utjecao na vijabilnost stanica MES-OV (Slika 27A) u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om, ali je smanjio stopu smrti stanica (Slika 27B). Tretman SB216763 nije imao utjecaja na vijabilnost stanica (Slika 27A) ili stopu smrti stanica (neprikazani rezultati) ni u jednoj liniji stanica u odnosu na stanice tretirane DMSO-om. U slučaju stanica MES-OV CBP8, povećana osjetljivost na CBP je primijećena nakon tretmana stanica Rapamycin-om i Triptolide-om u odnosu na stanice predtretirane DMSO-om, dok je nakon tretmana Wortmannin-om osjetljivost na CBP smanjena (Slika 27A). Mjerenjem stope smrti stanica MES-OV CBP8, primijećeno je smanjenje stope smrti stanica tretiranih Rapamycin-om nakon tretmana s CBP-om (Slika 27B) u odnosu na

stanice predtretirane DMSO-om, što je bilo suprotno rezultatu mjerenja vijabilnosti stanica. Tretman Triptolide-om povećao je stopu smrti stanica MES-OV CBP8 u odnosu na kontrolne stanice tretirane s DMSO-om (Slika 27B). Konačno, utjecaj na preživljenje stanica potvrđen je objema metodama samo kod stanica MES-OV predtretiranim Rapamycin-om i stanica MES-OV CBP8 predtretiranim Triptolide-om (Tablica 23).

preživljenja svake varijante stanica u odnosu na kontrolu transficiranu sa si(-) i tretiranu s DMSO-om, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. (B) Stopa smrti izmjerena je testom određivanja stope smrti stanica nakon 72 h. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao stupci promjene stope smrti svake varijante stanica u odnosu na kontrolu transficiranu sa si(-) i tretiranu s DMSO-om, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Tablica 23 Utjecaj Rapamycin-a, Wortmannin-a, SB216763-a i Triptolide-a na preživljenje stanica nakon tretmana s CBP-om

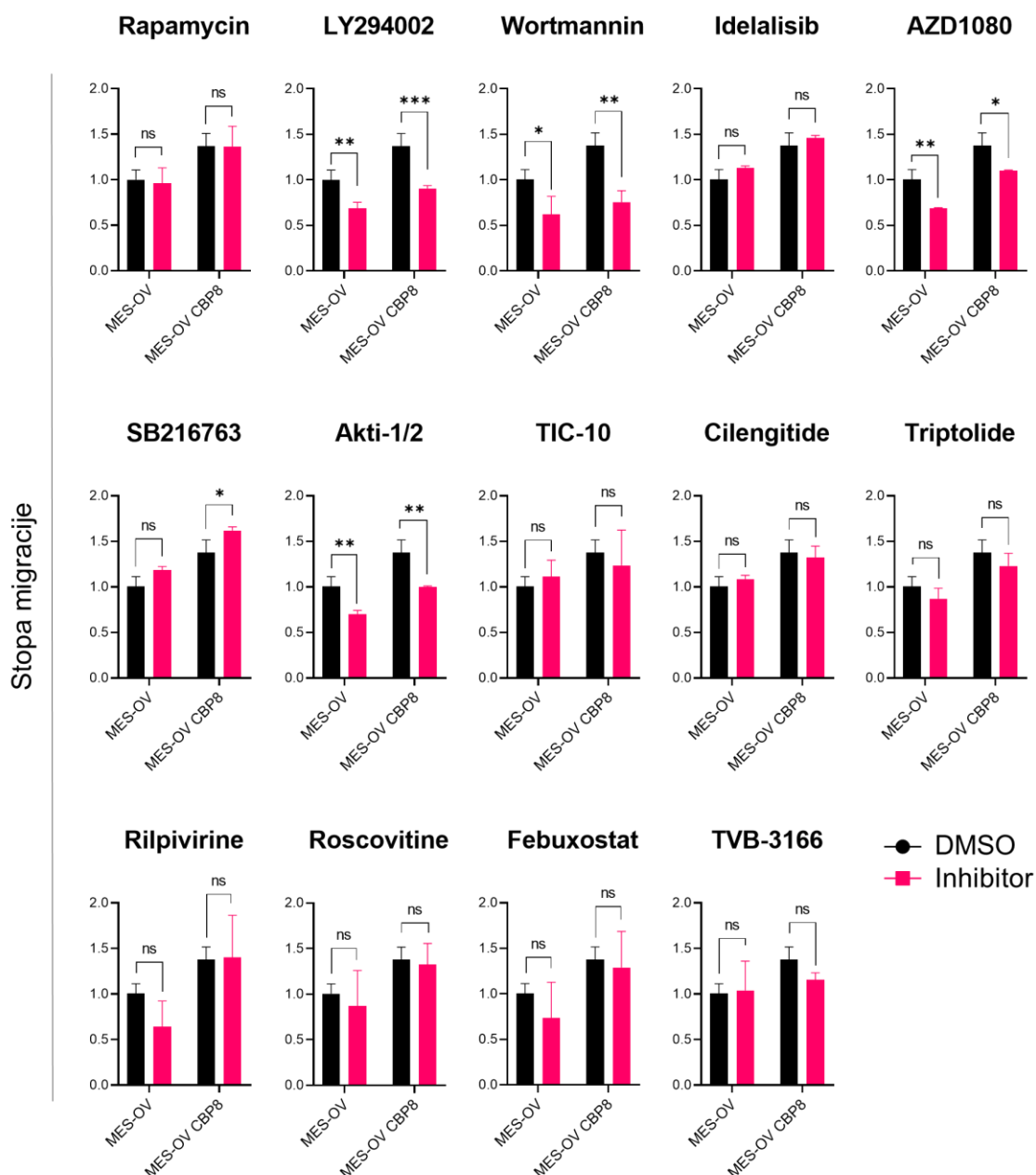
		Inhibitor			
		Rapamycin	Wortmannin	SB216763	Triptolide
preživljenje stanica	MES-OV	R	R	=	=
	MES-OV CBP8	S	R	=	S
stopa smrti stanice	MES-OV	R	/	/	R
	MES-OV CBP8	R	/	/	S

=, nema statistički značajne promjene; S, povećanje osjetljivosti na CBP (engl. *sensitisation*); R, povećanje otpornosti na CBP (engl. *resistance*); /, nije mjereno

4.4.3 Pokretljivost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 nakon tretmana s 14 odabranih inhibitora

U svrhu ispitivanja utjecaja 14 odabranih inhibitora na pokretljivost stanica, stanice MES-OV i MES-OV CBP8 su tretirane odabranim koncentracijama inhibitora na način opisan u poglavlju 3.2.6.2 te ispitane testom zacjeljivanja rana (opisan u poglavlju 3.2.3.1). Smanjena stopa migracije primijećena je kod obje linije stanica tretirane s inhibitorima LY294002-om, Wortmannin-om, AZD1080-om i Akti-1/2-om u odnosu na kontrolne stanice tretirane s DMSO-om (Slika 28). Povećanje stope migracije primijećeno je samo kod stanica MES-OV CBP8 tretiranih s SB216763-om u odnosu na iste stanice tretirane DMSO-om (Slika 28). Drugi inhibitori nisu utjecali na stopu migracije stanica MES-OV ili MES-OV CBP8 (Slika 28). Dodatna statistička analiza pokazala je da tretman niti jednim inhibitorom nije značajno drugačije utjecao na migraciju MES-OV CBP8 stanica u usporedbi s MES-OV (mjereno pomoću

vrijednosti efekta interakcije (IE)), zbog čega utjecaj na invaziju niti jednog od istraživanih inhibitora nije dalje ispitan testom invazije stanica (neprikazani rezultati).



Slika 28 Pokretljivost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 tretiranih sa 14 odabranih inhibitora

Stanice su tretirane s DMSO-om ili efektivnim koncentracijama inhibitora: Rapamycin (1 μ M), LY294002 (1 μ M), Wortmannin (10 μ M), Idelalisib (0,1 μ M), AZD1080 (1 μ M), SB216763 (1

μM), Akti-1/2 (10 μM), TIC-10 (10 μM), Cilengitide (9 μM), Triptolide (1 nM), Rilpivirine (10 μM), Roscovitine (10 μM), Febuxostat (50 μM) i TVB-3166 (12,5 μM). Migracija stanica izmjerena je 24 h nakon tretmana korištenjem testa zacjeljivanja rana. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao stupci prosječnih stopa migracije u odnosu na MES-OV stanice tretirane s DMSO-om, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

5. Rasprava

Istraživanje otpornosti raka na terapiju započelo je sredinom prošlog stoljeća [84]. Do danas su otkriveni brojni molekularni mehanizmi otpornosti te je nedvojbeno pokazano da sama terapija može potaknuti stečenu otpornost raka na lijek, limfangiogenezu i metastaziranje. Drugim riječima, stanice raka koje prežive kemoterapiju imaju veći metastatski potencijal nego prije terapije te su daleko manje osjetljive na sljedeći ciklus terapije [85–88]. U svrhu istraživanja osjetljivosti raka na terapiju i razumijevanja procesa metastaziranja te njihove međusobne povezanosti, kao alati se koriste trajne i primarne kulture stanica, organoidi, mišji modeli s ugrađenim tumorima čovjeka – ksenografti (engl. *patient-derived xenograft*), vinska mušica (*Drosophila melanogaster*), zebica (*Danio rerio*) te razni računalni modeli [89]. Generiranje podataka vezanih za genom, transkriptom, epigenetičke promjene genoma, miRNA ekspresije i proteom bolesnika specificiranih prema patohistološkim podacima i primljenoj terapiji, te osiguravanje njihove dostupnosti kroz formiranje različitih baza podataka kao što su GEO, TCGA i EGA, omogućilo je bolje razumijevanje podataka dobivenih *in vitro* i identificiranje novih farmakogenetskih biljega. [90–95]. Do sada je u otpornosti na lijekove istražena i dokazana važnost brojnih enzima proteaza, faktora izvanstaničnog matriksa, kemokina, faktora angiogeneze i metilacije DNA, miRNA, flavonoida i drugih faktora [96–98]. Unatoč intenzivnim naporima znanstvenika, nažalost i dalje ne postoji odobreni i standardizirani set biljega i/ili uputa kojima se može predvidjeti ili uspješno prebroditi otpornosti na terapiju kod bolesnika s uznapredovalim rakom jajnika.

U ovom radu cilj je bio istražiti odvijaju li se dva procesa - lijekom potaknuta stečena otpornost stanica raka jajnika i lijekom potaknut EMT - odvojeno ili dijele neke zajedničke molekule čime bi se dalo naslutiti da se radi o zajedničkoj regulaciji oba procesa. Nadalje, definiranjem „zajedničkih molekula“, cilj je bio pronaći nove ciljeve budućih terapija i/ili farmakogenetske biljege otpornosti. Za ostvarivanje ovog cilja bilo je potrebno pronaći dostupan set podataka ili model stanica koji bi opisivao postepeni razvoj lijekom potaknute stečene otpornosti i EMT-ja. Pretraživanjem dostupnih modela i setova podataka nije pronađen niti jedan alat koji bi omogućavao detaljno i postepeno praćenje promjena ekspresije gena i procesa EMT-ja tijekom razvoja otpornosti u kontekstu raka jajnika. Broj linija stanica otpornih na

kemoterapiju je bio vrlo ograničen, a dostupne su bile samo stanice ili setovi podataka stanica najistaknutijeg fenotipa od interesa (stanice s najvećom razvijenom otpornošću). Stoga, kako bi se ipak mogao pratiti postepeni razvoj otpornosti, u sklopu istraživanja je opetovanim tretmanom sve većim koncentracijama CBP-a uspostavljen i karakteriziran model MES-OV stanica seroznog raka jajnika visokog stupnja. Protokol razvoja modela stanica otpornih na lijekove je dobro poznat, otprije uspostavljen i vrlo zanimljiv znanstvenicima zbog mogućnosti selekcije stanica evolucijskim pritiskom (lijekom do interesa) u strogo kontroliranim uvjetima, što omogućava izdvajanje samo onih procesa i čimbenika koji su usko povezani s odgovorom na lijek [99–102]. Iako postoje modeli raka koji bolje odgovaraju stvarnim uvjetima raka kod bolesnika, korištenje 2D modela stanica se još uvijek smatra zlatnim standardom ranih prekliničkih studija jer omogućavaju relativno jeftino i jednostavno istraživanje funkcije gena i proteina korištenjem siRNA, shRNA, CRISPR-Cas9 i drugih metoda na velikoj skali [103–106]. Stoga je, kako bi potencijalno postao dodatan alat za istraživanja otpornosti na CBP i CBP-om potaknut EMT, uspostavljeni model stanica raka jajnika detaljno karakteriziran u kontekstu odgovora na CBP i TAX te biljega i procesa vezanih za EMT. Sličan pristup su do danas koristile dvije istraživačke grupe. Prva je grupa istraživala otpornost seroznog raka jajnika na TAX korištenjem stanica KF-28, pri čemu su analizirali miRNA i transkriptom, bez dodatnih analiza uloga izdvojenih molekula u stanici [107]. Druga grupa je razvila model stanica endometroidnog adenokarcinoma jajnika A2780 postepenim tretmanom s TAX-om [108], analizirala cijeli spektar razvijenih linija stanica u kontekstu njihove ekspresije i izdvojila set gena koji ostaje konstitutivno promijenjen tijekom svih stadija razvoja otpornosti. U odnosu na model korišten u ovom radu, objavljena istraživanja se razlikuju primjenom drugačijeg protokola korištenog za razvoj otpornih modela, tipom korištenih stanica te činjenicom da niti jedan model nije razvijen opetovanim tretmanima CBP-om. Nadalje, u niti jednom od navedenih istraživanja nije se za probir kandidata od interesa koristila korelacija ekspresije gena i odgovor stanica na CBP te ispitala funkcija izdvojenih gena kandidata. Nedostatak funkcionalnih ispitivanja odabranih molekula od interesa najveća je mana spomenutih [83,93,109] i sličnih istraživanja. U ovom radu napravljena je analiza funkcije izdvojenih kandidata u kontekstu otpornosti i pokretljivosti stanica. Iako su potrebna dodatna istraživanja kako bi se izdvojeni kandidati ovog istraživanja koristili kao farmakogenetski biljezi ili mete nove terapije,

novouspostavljeni model postepeno rastuće otpornosti stanica seroznog raka jajnika na CBP, probir kandidata temeljen na promjeni ekspresije i korelaciji ekspresija gena s odgovorom na CBP te rezultati analiza funkcija gena predstavljaju vrlo zanimljiv i dosad neopisan pristup istraživanju otpornosti raka jajnika na CBP.

Model stanica uspostavljen u našem laboratoriju karakterizirala je rastuća otpornost na CBP i križna otpornost na TAX te povećana pokretljivost (veća migratorna i invazivna sposobnost) u odnosu na izvorne, roditeljske stanice. O značajnosti dugoročnih i stabilnih promjena ekspresije gena govori činjenica da je kod varijante stanica MES-OV CBP8 - najotpornije varijante CBP otpornih stanica - utvrđeno čak 2127 od 21449 (9,92%) značajno promijenjenih gena (p -vrijednost $< 0,05$ i $\log_2FC = |1|$) u odnosu na stanice MES-OV. Sa stupnjem otpornosti varijanti stanica rasao je i broj značajno promijenjenih gena (neprikazani rezultati). Znanstvenici su nedavno pokazali da je lošija prognoza pacijenata povezana s pojačanom transkripcijom svih gena u stanici (hipertranskripcija) u odnosu na netumorske stanice [110]. Dobiveni rezultati se uklapaju u kontekst napretka maligne bolesti i ukazuju na potencijalnu ulogu broja promijenjenih gena u prognozi otpornosti na terapiju CBP. Nadalje, varijante stanica CBP2 i CBP3 su prema ekspresiji gena bile vrlo slične MES-OV, dok su slične uzorke ekspresije također dijelile CBP6, CBP7 i CBP8. Zanimljivo je i da su se ekspresije gena markera EMT-ja značajno mijenjale kroz varijante. Otporne stanice MES-OV CBP8 koje su nalikovale stanicama mezenhima su imale smanjenu razinu E-kadherina i fibronektina na razini gena i proteina. S druge strane, geni *CDH2* i *VIM* su bili smanjene ekspresije u otpornim stanicama, dok su razine proteina N-kadherina i vimentina bile povećane. Oprečni rezultati dobiveni na razini transkripata i proteina, N-kadherina i vimentina, su bili zabilježeni i ranije u sličnim istraživanjima [111,112], a mogu biti posljedica različite koncentracije i stabilnosti mRNA i proteina uslijed drugačijih stopi izgradnje i obrtaja, te količine produkta u rezervi koje kontrolira složena mreža signalnih puteva značajno izmijenjenih prilikom selekcijskog pritiska s CBP-om [112]. Značajnu ulogu u primijećenom efektu može imati i heterogenost uspostavljenih populacija stanica [112]. Naime, istraživanja su pokazala da unutar jedne populacije stanica raka postoji više tipova stanica/subpopulacija koje se mogu razlikovati po fenotipu i ekspresiji gena/proteina, što može imati za posljedicu različitu stopu proliferacije, pokretljivosti, svojstva matičnih stanica te otpornosti na lijekove [113–115]. Iako bi bilo za očekivati da će

unutar jedne populacije, one stanice/subpopulacije s povišenom ekspresijom markera stanica mezenhima, ujedno biti i stanice najmanje osjetljive na lijek, pokazano je drugačije. Najveću pokretljivost, potencijal razvoja raka i najveću otpornost na lijekove imale su stanice s takozvanim prijelaznim fenotipom [65], fenotipom potvrđenim i u našem istraživanju. Da bismo bolje shvatili korelaciju otpornosti i EMT-ja, analizirano je dodatnih 17 gena opisanih u kontekstu procesa EMT-ja. Osim gena *DSP*, *FOXC2*, *GCSH*, *ITGB6*, *MMP2*, *OCN*, *SNAI1* i *SNAI2* sa značajno promijenjenom ekspresijom između stanica MES-OV CBP8 i MES-OV, utvrđena je značajna korelacija između odgovora na CBP i ekspresije *DSP* ($\rho=-0.64$) i *SNAI2* ($\rho=0.74$). Uloge oba izdvojena gena otprije su opisane u različitim mehanizmima odgovora i otpornosti na lijekove i EMT-ju [116,117]. Dobiveni rezultati su ukazali da je odnos otpornosti stanica raka na lijek i lijekom potaknute EMT vrlo kompleksan te da su nužni dodatni eksperimenti u svrhu razumijevanja istog.

U potrazi za novim kandidatima uključenima u odgovor stanica raka jajnika na CBP i pokretljivost, odnosno metastaziranje, korištena su dva pristupa probiru gena. Prvi pristup je podrazumijevao izdvajanje značajno promijenjenih gena između stanica MES-OV CBP8 i MES-OV (DEG), a u drugom pristupu su korištenjem svih varijanti stanica izdvojeni geni čija je ekspresija značajno korelirala s odgovorom stanica na CBP (CCORG). Dva pristupa probiru gena rezultirala su dvjema listama od 2127 gena, od kojih su liste dijelile njih 31,22%, odnosno 664 gena. Osim značajno različitih signalnih puteva u koje su uključeni, geni liste CCORG imali su čak 66,37% više ukupnih interakcija proteina u odnosu na gene liste DEG. Spomenuti rezultati sugeriraju da probirom gena na temelju korelacije s odgovorom stanica na CBP dolazi do izdvajanja gena čija je međusobna povezanost već uočena u različitim modelnim sustavima te zabilježena u literaturi i bazama podataka. S druge strane, očekivalo se da će na listi DEG i njima povezanoj listi signalnih puteva doći do izdvajanja dosad neopisanih gena kandidata povezanih s promatranim selekcijskim pritiskom (CBP). Konačna pretpostavka je da korištenjem oba kriterija – značajno promijenjene ekspresije i korelacije s odgovorom na CBP - odnosno kombiniranjem gena obje liste (DEG-CCORG) potencijalno dolazi do povećanja šanse za pronalazak gena koji bi mogli imati ulogu u odgovoru stanica na CBP i metastaziranju. Iz tog razloga je, nakon usporedbe lista, napravljen detaljan probir kandidata lista DEG i DEG-CCORG za daljnja istraživanja. Nakon prvog koraka u

kojemu je izdvojeno ukupno 14 gena liste DEG i 11 gena liste DEG-CCORG, u probir gena kandidata su uključeni dodatni modeli s postepenim razvojem otpornosti na CBP (SK-OV-3/SK-OV-3 CBP6, OVCAR-3/OVCAR-3 CBP7). Na taj način odabrani geni kandidati nisu bili specifični za jednu liniju stanica raka jajnika niti za jedan protokol razvoja otpornosti na lijek. U konačnom probiru gena kandidata korišten je tzv. model stanica klonova. Koncept stanica klonova otpornih na lijekove poznat je u literaturi [118]. Ovim eksperimentalnim pristupom omogućeno je mjerenje ekspresije gena od interesa u pojedinačnim stanicama heterogene populacije stanica koja je preživjela tretman CBP-om te pojedinačnih stanica te populacije koje su imale ili zadržale svojstvo diobe. U konačnici je odabrano osam gena koji su imali sličnu promjenu ekspresije u sva četiri korištena modela stanica (MES-OV/CBP8, SK-OV-3/SK-OV-3 CBP6, OVCAR-3/OVCAR-3 CBP7 i model stanica klonova). Spomenuta složenost probira kandidata omogućila je izdvajanje gena koji bi mogli imati ulogu u razvoju otpornosti seroznog adenokarcinoma jajnika na CBP.

Analizom funkcionalnih uloga osam odabranih gena (*MIR99AHG*, *DNER*, *TMEM200A*, *SERPINE2*, *PRKAR1B*, *HES7*, *WDR46* i *FBLN5*) primijećene su značajne promjene u preživljenju, stopama smrti i pokretljivosti stanica samo u slučaju *TMEM200A* i *PRKAR1B*. Utišavanje *TMEM200A* u MES-OV CBP8 stanicama rezultiralo je smanjenjem preživljenja i pokretljivosti stanica, sugerirajući njihovu ulogu u oba procesa. *TMEM200A* je pokazao vrlo veliku vrijednost kao biljeg ukupnog preživljenja (HR=1,44), preživljenja bez napretka bolesti (HR=1,53) i kao biljeg odgovora na CBP (ROC=0,761). Proteini grupe *TMEM* su sastavni proteini membrana stanice [119]. Njihova uloga, pa tako i uloga proteina *TMEM200A*, još je uvijek nepoznata. Dosad je pokazano da članovi grupe *TMEM* mogu biti i pojačane i smanjene ekspresije u raku u odnosu na zdrava tkiva bolesnika, zbog čega su neki opisani kao geni koji sprječavaju stanice da poprime karakteristike stanica raka - supresori, a drugi kao geni čije promjene potiču razvoj raka – onkogeni [120]. Poznato da su geni *TMEM45A* i *TMEM205* uključeni u napredak tumorske bolesti, razvoj metastaza i otpornosti na kemoterapiju, dok su *TMEM48* i *TMEM97* definirani kao potencijalni biljezi raka pluća [120]. Nadalje, utišavanje *PRKAR1B* je dovelo do značajnih promjena vezanih za preživljenje i pokretljivost stanica. Stanice MES-OV s utišanim *PRKAR1B* bile su manje osjetljive na CBP i pokretljivije u odnosu na MES-OV stanice transficirane negativnom kontrolom. Zanimljivo je da je njegova uloga

otprije poznata u formiranju raka nadbubrežne žlijezde [121], a s njim povezane lncRNA *PRKAR1B-AS2* i *circ-PRKAR1B* su dokazano uključene u tumorigenezu, bolje preživljenje i otpornost raka jajnika i jetre na kemoterapiju [122,123]. Iako njegova uloga u otpornosti ili nastanku raka jajnika nije izravno poznata, *PRKAR1B* je gen koji kodira regulatornu podjedinicu proteinske kinaze A (PKA) koja ima važnu ulogu u napretku raka jajnika [124,125]. Zanimljivo je da u bazi gena i proteina povezanih s otpornosti na lijekove na bazi platine (engl. *A database of genes related to platinum resistance*) [71] nema niti *TMEM200A* niti *PRKAR1B*. Međutim, prisutno je ukupno četiri gena iz skupine *TMEM* od kojih su svi povećane ekspresije u tumorima otpornima na terapiju. U bazi se nalazi i gen koji kodira za drugu podjedinicu PKA - *PRKAR1A*, čija je ekspresija u tumorima otpornima na terapiju smanjena. Dobiveni rezultati ovog istraživanja u skladu su s literaturnim podacima stoga bi se *PRKAR1B* i *TMEM200A* mogli smatrati zanimljivim kandidatima za daljnja istraživanja.

Utišavanje *SERPINE2*, odnosno *FBLN5* u MES-OV CBP8 stanicama dovelo je do porasta stope smrti stanica te smanjenja stope migracije i invazije u odnosu na MES-OV CBP8 stanice transficirane negativnom kontrolom. Interesantno je da utišavanje oba gena nije imalo utjecaj na preživljenje stanica mjereno testom metabolizma resazurina. Slična, neočekivana nepodudarnost rezultata zabilježena je i u slučaju utišavanja *MIR99AHG*, *DNER*, *SERPINE2*, *WDR46*, *FBLN5* te inhibitora Rapamycin-a i Triptolide-a. Mogući razlog tome je razlika između osjetljivosti i metodologije dva korištena testa za mjerenje preživljenja stanica. Test metabolizma resazurina mjeri metaboličku aktivnost stanica, odnosno aktivnost reduktaza mitohondrija, dok s druge strane, test određivanja stope smrti stanica mjeri ugradnju PI-a i kompleksa aneksin V-FITC-a u stanice u nekrozi i/ili apoptozi [126]. Dosad je poznato da je izvrtnje fosfatidilserina, na kojeg se veže aneksin V-FITC, na vanjsku stranu membrane stanice, jedan od najranijih događaja vezanih uz apoptozu [72,127]. Nadalje, test metabolizma resazurina se temelji na aktivnosti svih promatranih stanica, dok korištenjem protočnog citometra u testu određivanja stope stanične smrti mjerimo stanje svake pojedinačne stanice, čime se povećava osjetljivost testa. Testovi u kojima se na dan analize koriste uzorci s ujednačenim brojem stanica, poput određivanja stope proliferacije, važni su i jer umanjuju mogući utjecaj različite proliferacije stanica [128,129]. Također, testovi bazirani na oksido-redukcijskim

reakcijama mogu vrlo često uvećati preživljenje ili propustiti detektirati smanjenje broja stanica zbog prisutnosti drugih superoksida i sličnih molekula u stanici [130], zbog čega je korištenje obiju metoda mjerenja preživljenja stanica i preklapanje njihovih rezultata u ovom istraživanju bilo ključni kriterij određivanja uloge kandidata u procesu razvoja otpornosti. Međutim, da efekti primijećeni nakon utišavanja *SERPINE2*, odnosno *FBLN5* nisu slučajni, govori činjenica da su oba gena dosad opisana u procesima napretka tumorske bolesti, otpornosti na lijekove te metastaziranje [131–134]. *SERPINE2* je inhibitor serinske proteaze i nalazi se uglavnom u izvanstaničnom matriksu. Luče ga brojne stanice, a pokazuje afinitet prema trombinu, tripsinu i urokinazi [135], zbog čega ne čudi da je njegovo utišavanje u modelu stanica korištenima u ovom radu imalo efekt na njihovu pokretljivost, i to najviše na stopu invazije. *FBLN5* također kodira za protein izvanstaničnog matriksa koji ima vrlo važnu ulogu u normalnom embrionalnom razvoju, komunikaciji između stanica i izvanstaničnog matriksa te organogenezi [115,136]. Njegova pojačana ekspresija potaknula je tumorski potencijal stanica fibrosarkoma čovjeka HT1080 pojačavajući sintezu DNA, migraciju i invaziju [137]. S druge strane, ekspresija *FBLN5* je bila snižena u tumorima bubrega, dojke, jajnika i debelog crijeva, što ga čini zanimljivim kandidatom s potencijalno važnim ulogama u spomenutim procesima, koje uvelike ovise o kontekstu (tkivu, stadiju bolesti, drugim signalnim molekulama) [130]. S obzirom da dosad nije opisana uloga gena *SERPINE2* i *FBLN5* u razvoju otpornosti raka jajnika, metastaziranju ili odgovoru na stres uzrokovan CBP-om, ovaj rad predstavlja prvi dokaz njihove potencijalne uloge u spomenutim procesima.

Zanimljivo je da su oba otprije istaknuta gena, *TMEM200A* i *PRKAR1B*, imali vrlo visoke koeficijente korelacije s CBP-om kroz varijante stanica MES-OV otpornih na CBP (0,714 i -0,964). Rezultat ide u prilog pretpostavci da korištenjem oba kriterija probira gena dolazi do povećanja šanse za pronalazak gena koji bi mogli imati ulogu u odgovoru stanica na CBP i metastaziranju. Međutim, dodatna istraživanja na većem broju gena su potrebna kako bi se pretpostavka potvrdila. Osim novih saznanja o ulogama dosad rijetko opisanih gena u otpornosti na CBP i procesu EMT-ja, ovaj rad opisuje i vrlo jednostavan pristup probiru gena analizom korelacija ekspresije gena i osjetljivosti na lijekove, odnosno bilo kojeg drugog fenotipskog obilježja.

S obzirom na složenost mehanizama i mreže signalnih puteva koji reguliraju odgovor stanica na stres uzrokovan lijekovima i metastaziranje, rezultati manipulacije pojedinačnih gena izdvojili su dva gena za koje se pokazalo da su uključeni u otpornost stanica na CBP, ali i u CBP-om potaknutom EMT-ju. Prilikom generiranja dviju lista gena, generirane su također i dvije različite liste setova gena i signalnih puteva. Generiranje spomenutih lista i njihova različitost potakla je razmišljanje može li inhibicija pojedinog signalnog puta imati značajniji efekt na procese od interesa u odnosu na manipulaciju samo jednog gena, te koji signalni putevi su zaista značajni. U tu svrhu su odabrani inhibitori signalnih puteva koji uključuju najveći broj gena s lista DEG i CCORG i pritom se u literaturi opisuju u kontekstu otpornosti ili procesa EMT-ja. Ispitan je njihov utjecaj na preživljenje i pokretljivost stanica MES-OV i MES-OV CBP8. MES-OV CBP8 linija stanica bila je jednako ili manje osjetljiva na većinu izabranih inhibitora u odnosu na MES-OV stanice. Međutim, MES-OV CBP8 stanice su bile osjetljivije na tretman Rapamycin-om (inhibitorom kompleksa mTOR), Wortmannin-om (inhibitorom PI3K širokog spektra), SB216763 (inhibitorom GSK-3) i Triptolide-om (inhibitorom NF- κ B) u odnosu na stanice MES-OV. Daljnjim istraživanjem pokazano je da su jedino stanice predtretirane Rapamycin-om ili Triptolide-om djelomično učinile MES-OV CBP8 stanice osjetljivijima na CBP. Dobiveni rezultati ukazuju da bi primarne mete Rapamycin-a (mTOR [138]) i Triptolide-a (NF- κ B [139]), ili njihove druge mete za koje imaju manji afinitet vezanja, poput p70S6K, 4E-BP1, ciklina-D, Bcl-2, Fas, Bax [140,141], mogle igrati ulogu u odgovoru stanica na CBP, odnosno na razvoj otpornosti na CBP. Uloge Rapamycin-a i Triptolide-a otprije su opisane u bolesti i napretku raku jajnika [140,142–146]. Primjenom Triptolide-a smanjena je otpornost raka jajnika na cDDP *in vitro* i *in vivo* inhibicijom signalnog puta PI3K/Akt/NF- κ B [143] i aktivacijom proteina Akt [147], dok je u stanicama raka pluća otpornima na TAX, tretmanom stanica Triptolide-om uspješno usporen proces EMT-ja, odnosno smanjena pokretljivost i matičnost tumora [148]. Navedeni rezultati, zajedno s rezultatima ovoga rada, ukazuju na postojanje zajedničkih molekula koje povezuju EMT i otpornosti na CBP, te otpornosti na lijekove sličnog i različitog mehanizma djelovanja kao što su CBP, cDDP i TAX. Daljnja istraživanja usmjerit će se na detaljnije analize meta Rapamycin-a i Triptolide-a, odnosno drugih molekula uključenih u signalne puteve koje inhibiraju.

Zanimljivo je da ciljanom inhibicijom proteina Akt ili PI3K korištenjem inhibitora LY294002-a, Wortmannin-a, Idelalisib-a, TIC-10-a i Akti-1/2-a u MES-OV modelu stanica nije uočen značajan efekt na preživljenje i pokretljivost stanica, iako se upravo ove molekule spominju u kontekstu otpornosti na lijekove na bazi platine [149] te se signalni put PI3K-Akt nalazi na obje generirane liste signalnih puteva ovog istraživanja. Dodatne analize ekspresije proteina Akt i njegove aktivirane forme pAkt su pokazale da stanice MES-OV CBP8 imaju povećanu ekspresiju obje forme proteina na konstitutivnoj razini (Slika P2A). Također je pokazano da, na razini transkriptoma, stanice MES-OV CBP8 imaju povećanu ekspresiju gena *AKT3* (Slika P2A). Inhibicija ekspresije pAkt-a u stanicama MES-OV CBP8 korištenjem inhibitora Akti-1/2 dovela je do porasta ukupnog Akt-a (neprikazani rezultati). Kao rezultat, stanice MES-OV CBP8 nakon inhibicije ne postaju osjetljivije na CBP jer dolazi do brze sinteze novog Akt-a. Pretpostavka je da su stanice otporne na CBP najvjerojatnije razvile alternativne načine preživljavanja aktivacijom drugih signalnih puteva ili molekula koje mogu prenositi isti signal. U ovom specifičnom primjeru bi tu ulogu mogao imati gen *AKT3* koji je, osim pojačane ekspresije, snažno korelirao s odgovorom stanica na TAX ($r=0,750$) (neprikazani rezultati). Sličan fenomen primijećen je i kod raka želuca gdje je povećana ekspresija *circ-AKT3*-a uzrokovala pojačanu ekspresiju *PIK3R1* i učinila stanice otporne na cDDP [150]. Nadalje, inhibitori signalnog puta PI3K/Akt i GSK-3 - LY294002, Wortmannin, AZD1080 i Akti-1/2 - smanjili su pokretljivost linija stanica MES-OV i MES-OV CBP8 ističući potencijalnu važnost spomenutih puteva i molekula, ne samo u otpornosti na CBP, već i metastaziranju. S obzirom na dobivene rezultate, buduća istraživanja trebalo bi usmjeriti na detaljnije razumijevanje uloge PI3K/Akt signalnog puta, posebice gena *AKT3*, odnosno proteina Akt3, GSK-3 i NF- κ B u otpornosti i migraciji stanica raka jajnika.

Zanimljivo je i neočekivano da su efekti utišavanja pojedinačnih gena imali sličan efekt na stanice kao i korišteni inhibitori. U svrhu povezivanja tih dvaju setova rezultata, napravljena je dodatna analiza interakcija proteina korištenjem alata STRING. Nije zabilježena nikakva poznata interakcija između proteina kodiranih genima *TMEM200A*, *SERPINE2*, *PRKAR1B*, *FBLN5* i/ili meta inhibitora Rapamycin-a i Triptolide-a (neprikazani rezultati). Pretpostavka je da izdvojeni geni i njihove uloge

u razvoju malignih tumora, procesu EMT i otpornosti na lijekove još uvijek nisu dobro istraženi.

6. Zaključci

Novouspostavljeni *in vitro* model stanica raka jajnika s rastućom, stabilnom otpornošću na CBP i križnom otpornošću na TAX, te kombinacija dva različita bioinformatička pristupa obradi podataka transkriptoma omogućili su identifikaciju *TMEM200A* i *PRKAR1B* kao mogućih novih ciljeva buduće terapije otpornih i metastatskih tumora jajnika te farmakogenetskih biljega u predviđanju preživljenja i uspješnosti terapije bolesnica s rakom jajnika tipa HGSOC.

Usporedba dviju bioinformatičkih analiza naglasila je važnost korištenja svih razvojnih varijanti modela stanica s rastućom otpornošću na CBP tijekom probira gena i proteina od interesa.

Analizom istih podataka definirani su i signalni putevi, mogući budući ciljevi kombinirane terapije raka jajnika otpornog na CBP. Daljnjom obradom rezultata analize signalnih puteva i ispitivanjem utjecaja inhibitora Rapamycin-a i Triptolide-a na stanice MES-OV i MES-OV CBP8, utvrđeno je da njihove mete imaju moguću ulogu u razvoju otpornosti na CBP.

Dodatna istraživanja su nužna kako bi se razjasnio način na koji geni *TMEM200A* i *PRKAR1B*, odnosno inhibitori Rapamycin i Triptolide utječu na razvoj otpornosti stanica raka jajnika na CBP, odnosno CBP-om potaknuti EMT.

7.Literatura

1. World Health Organization. Cancer Fact sheets. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2022.).
2. National Cancer Institute. What Is Cancer? . <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (2021.).
3. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. i Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **72**, 7–33 (2022).
4. Šekerija, M., Bubanović, L., Novak, P., Lončar, J., Čukelj, P., Glibo, M., Korda, K., Mikolaj, L. i Stupnik, D. *Incidencija raka u Hrvatskoj 2019.* <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-maligne-bolesti/> (2019.).
5. Roett, M. A. i Evans, P. Ovarian Cancer: An Overview. *Am. Fam. Physician* **80**, 609–616 (2009).
6. Berek, J. S., Renz, M., Kehoe, S., Kumar, L. i Friedlander, M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **155**, 61–85 (2021).
7. Reid, B. M., Permuth, J. B. i Sellers, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biol. Med.* **14**, 9–32 (2017).
8. Desai, A., Xu, J., Aysola, K., Qin, Y., Okoli, C., Hariprasad, R., Chinemerem, U., Gates, C., Reddy, A., Danner, O., Franklin, G., Ngozi, A., Cantuaria, G., Singh, K., Grizzle, W., Landen, C., Partridge, E. E., Rice, V. M., Reddy, E. S. P., i ostali. Epithelial ovarian cancer: An overview. *World J. Transl. Med.* **3**, 1–8 (2014).
9. Crum, C. P., Drapkin, R., Miron, A., Ince, T. A., Muto, M., Kindelberger, D. W. i Lee, Y. The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **19**, 3–9 (2007).
10. Gore, C. R., Patvekar, M. M., Kurade, S. J., Kumar, H. i Pagaro, P. M. Malignant Mixed Mullerian Tumor of the Ovary. *J. Obstet. Gynaecol. India* **64**, 62–64 (2014).
11. Kurman, R. J. i Shih, I. M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am. J. Pathol.* **186**, 733–747 (2016).
12. Roy, L. i Dahl, K. D. C. Can Stemness and Chemoresistance Be Therapeutically Targeted via Signaling Pathways in Ovarian Cancer? *Cancers (Basel)*. **10**, 241–263 (2018).
13. Romero, I. i Bast, R. C. Minireview: human ovarian cancer: biology, current

- management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* **153**, 1593–1602 (2012).
14. Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C. i Ledermann, J. A. Ovarian cancer. *Lancet (London, England)* **384**, 1376–1388 (2014).
 15. Dion, L., Carton, I., Jaillard, S., Timoh, K. N., Henno, S., Sardain, H., Foucher, F., Levêque, J., Rouge, T. de la M., Brousse, S. i Lavoué, V. The landscape and therapeutic implications of molecular profiles in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Med.* **9**, 1–12 (2020).
 16. Yan, X., Yin, J., Yao, H., Mao, N., Yang, Y. i Pan, L. Increased expression of annexin A3 is a mechanism of platinum resistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* **70**, 1616–1624 (2010).
 17. Palaia, I., Tomao, F., Sassu, C. M., Musacchio, L. i Panici, P. B. Immunotherapy For Ovarian Cancer: Recent Advances And Combination Therapeutic Approaches. *Onco. Targets. Ther.* **13**, 6109–6129 (2020).
 18. de Sousa, G. F., Wlodarczyk, S. R. i Monteiro, G. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **50**, 693–701 (2014).
 19. Carter, S. K. Cisplatin — Past, Present and Future. u *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy* (ur. Hacker, M. P., Douple, E. B. & Krakoff, I. H.) 359–376 (Springer, Boston, MA, 1984). doi:10.1007/978-1-4613-2837-7_28.
 20. Di Pasqua, A. J., Goodisman, J. i Dabrowiak, J. C. Understanding how the platinum anticancer drug carboplatin works: From the bottle to the cell. *Inorganica Chim. Acta* **389**, 29–35 (2012).
 21. Kamath, K., Wilson, L., Cabral, F. i Jordan, M. A. BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J. Biol. Chem.* **280**, 12902–12907 (2005).
 22. Borisy, G., Heald, R., Howard, J. i Jenke, C. Microtubules: 50 years on from the discovery of tubulin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 322–328 (2016).
 23. Kampan, N. C., Madondo, M. T., McNally, O. M., Quinn, M. i Plebanski, M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed Res. Int.* **2015**, 413076 (2015).
 24. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. i Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 714–726 (2013).
 25. Liu, M. X., Chan, D. W. i Ngan, H. Y. Mechanisms of Chemoresistance in Human Ovarian Cancer at a Glance. *Gynecol Obs.* **2**, 1000e104 (2012).
 26. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G. i Kyrodimos, E. The

- challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin. Exp. Metastasis* **35**, 309–318 (2018).
27. Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N. i Sarkar, S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)*. **6**, 1769–1792 (2014).
 28. Mai, J., Yang, L., Xie, H. J., Li, Y. Y., Wang, X. i Liu, X. X. Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Oncol. Rep.* **47**, 82–93 (2022).
 29. Abolhoda, A., Wilson, A. E., Ross, H., Danenberg, P. V., Burt, M. i Scotto, K. W. Rapid Activation of MDR1 Gene Expression in Human Metastatic Sarcoma after in Vivo Exposure to Doxorubicin1 | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research. *Clin. Cancer Res.* **5**, 3352–3356 (1999).
 30. Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J. i Chen, Z. S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin. J. Cancer* **31**, 58–72 (2012).
 31. Zhang, Y., Sriraman, S. K., Kenny, H. A., Luther, E., Torchilin, V. i Lengyel, E. Reversal of Chemoresistance in Ovarian Cancer by Co-Delivery of a P-Glycoprotein Inhibitor and Paclitaxel in a Liposomal Platform. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 2282–2293 (2016).
 32. Berger, W., Setinek, U., Hollaus, P., Zidek, T., Steiner, E., Elbling, L., Cantonati, H., Attems, J., Gsur, A. i Micksche, M. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **131**, 355–363 (2005).
 33. Chen, Y., Bieber, M. M. i Teng, N. N. H. Hedgehog signaling regulates drug sensitivity by targeting ABC transporters ABCB1 and ABCG2 in epithelial ovarian cancer. *Mol. Carcinog.* **53**, 625–634 (2014).
 34. Tapia, G. i Diaz-Padilla, I. *Molecular Mechanisms of Platinum Resistance in Ovarian Cancer. Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update* (IntechOpen, 2013). doi:10.5772/55562.
 35. Norouzi-Barough, L., Sarookhani, M. R., Sharifi, M., Moghbelinejad, S., Jangjoo, S. i Salehi, R. Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *J. Cell. Physiol.* **233**, 4546–4562 (2018).
 36. Giannakakou, P., Sackett, D. L., Kang, Y.-K. K., Zhan, Z., Buters, J. T. M. M., Fojo, T. i Poruchynsky, M. S. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant β -tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J. Biol. Chem.* **272**, 17118–17125 (1997).
 37. Selvakumaran, M., Pisarcik, D. A., Bao, R., Yeung, A. T. i Hamilton, T. C. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair

- pathway in ovarian cancer cell lines - PubMed. *Cancer Resist.* **63**, 1311–1316 (2003).
38. Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J. i Reed, E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J. Clin. Invest.* **94**, 703–708 (1994).
 39. Mylavarapu, S., Das, A. i Roy, M. Role of BRCA mutations in the modulation of response to platinum therapy. *Front. Oncol.* **8**, 1–11 (2018).
 40. Hientz, K., Mohr, A., Bhakta-Guha, D. i Efferth, T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* **8**, 8921–8946 (2017).
 41. Dhanasekaran, D. N. i Reddy, E. P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245–6251 (2008).
 42. Williams, J., Lucas, P. C., Griffith, K. A., Choi, M., Fogoros, S., Hu, Y. Y. i Liu, J. R. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol. Oncol.* **96**, 287–295 (2005).
 43. Chaudhry, P., Srinivasan, R. i Patel, F. D. Expression of the major fas family and Bcl-2 family of proteins in epithelial ovarian cancer (EOC) and their correlation to chemotherapeutic response and outcome. *Oncol. Res.* **18**, 549–559 (2010).
 44. Zaffaroni, N., Pennati, M., Colella, G., Perego, P., Supino, R., Gatti, L., Pilotti, S., Zunino, F. i Daidone, M. G. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1406–1412 (2002).
 45. Özeş, A. R., Miller, D. F., Özeş, O. N., Fang, F., Liu, Y., Matei, D., Huang, T. i Nephew, K. P. NF-κB-HOTAIR axis links DNA damage response, chemoresistance and cellular senescence in ovarian cancer. *Oncogene* **35**, 5350–5361 (2016).
 46. Zhu, X., Shen, H., Yin, X., Long, L., Xie, C., Liu, Y., Hui, L., Lin, X., Fang, Y., Cao, Y., Xu, Y., Li, M., Xu, W. i Li, Y. miR-186 regulation of Twist1 and ovarian cancer sensitivity to cisplatin. *Oncogene* **35**, 323–332 (2016).
 47. Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J. J., O'Donnell, J. D., Wang, J., Wenham, R. M., Coppola, D., Kruk, P. A., Nicosia, S. V. i Cheng, J. Q. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res.* **68**, 425–433 (2008).
 48. Ying, H., Xu, H., Lv, J., Ying, T. i Yang, Q. MicroRNA signatures of platinum-resistance in ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **36**, 16–20 (2015).
 49. Brozovic, A., Duran, G. E., Wang, Y. C., Francisco, E. B. i Sikic, B. I. The miR-200 family differentially regulates sensitivity to paclitaxel and carboplatin in human ovarian carcinoma OVCAR-3 and MES-OV cells. *Mol. Oncol.* **9**, 1678–

1693 (2015).

50. Syed, N., Coley, H. M., Sehouli, J., Koensgen, D., Mustea, A., Szlosarek, P., McNeish, I., Blagden, S. P., Schmid, P., Lovell, D. P., Hatzimichael, E. i Crook, T. Polo-like kinase Plk2 is an epigenetic determinant of chemosensitivity and clinical outcomes in ovarian cancer. *Cancer Res.* **71**, 3317–3327 (2011).
51. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. i Weinberg, R. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
52. Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E. i Weissman, I. L. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab. Invest.* **86**, 1203–1207 (2006).
53. Hu, X., Ghisolfi, L., Keates, A. C., Zhang, J., Xiang, S., Lee, D. K. i Li, C. J. Induction of cancer cell stemness by chemotherapy. *Cell Cycle* **11**, 2691–2698 (2012).
54. Haider, T., Pandey, V., Banjare, N., Gupta, P. N. i Soni, V. Drug resistance in cancer: mechanisms and tackling strategies. *Pharmacol. Reports 2020 725* **72**, 1125–1151 (2020).
55. Wu, Q., Yang, Z., Nie, Y., Shi, Y. i Fan, D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett.* **347**, 159–166 (2014).
56. Hofmann, G. A. i Mattern, M. R. Topoisomerase II in multiple drug resistance. *Cytotechnology* **12**, 137–154 (1993).
57. Ashfaq, R. Molecular profiling for personalized cancer care. *Clin. Exp. Metastasis* **29**, 653–655 (2012).
58. Malone, E. R., Oliva, M., Sabatini, P. J. B., Stockley, T. L. i Siu, L. L. Molecular profiling for precision cancer therapies. *Genome Med.* **12**, 1–19 (2020).
59. Henry, N. L. i Hayes, D. F. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* **6**, 140–146 (2012).
60. Wang, S., Jia, J., Liu, D., Wang, M., Wang, Z., Li, X., Wang, H., Rui, Y., Liu, Z., Guo, W., Nie, J. i Dai, H. Matrix Metalloproteinase Expressions Play Important role in Prediction of Ovarian Cancer Outcome. *Sci. Rep.* **9**, 11677 (2019).
61. Qin, S., Li, Y., Cao, X., Du, J. i Huang, X. NANOG regulates epithelial–mesenchymal transition and chemoresistance in ovarian cancer. *Biosci. Rep.* **37**, 20160247 (2017).
62. Atallah, G. A., Aziz, N. H. A., Teik, C. K., Kampan, N. C. i Shafiee, M. N. New Predictive Biomarkers for Ovarian Cancer. *Diagnostics* **11**, 465 (2021).
63. Lamouille, S., Xu, J. i Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–

- mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014 153 **15**, 178–196 (2014).
64. Hay, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)*. **154**, 8–20 (1995).
 65. Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. J. Y., Kalcheim, C., *i ostali*. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 341–352 (2020).
 66. Gires, O., Pan, M., Schinke, H., Canis, M. i Baeuerle, P. A. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev.* **39**, 969–987 (2020).
 67. Miow, Q. H. Q., Tan, T. Z. T., Ye, J., Lau, J. A. J., Yokomizo, T., Thiery, J.-P. P. i Mori, S. Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene* **34**, 1899–1907 (2015).
 68. Moisan, F., Francisco, E. B., Brozovic, A., Duran, G. E., Wang, Y. C., Chaturvedi, S., Seetharam, S., Snyder, L. A., Doshi, P. i Sikic, B. I. Enhancement of paclitaxel and carboplatin therapies by CCL2 blockade in ovarian cancers. *Mol. Oncol.* **8**, 1231–1239 (2014).
 69. Brozovic, A. The relationship between platinum drug resistance and epithelial–mesenchymal transition. *Arch. Toxicol.* **91**, 605–619 (2017).
 70. Loret, N., Denys, H., Tummers, P. i Berx, G. The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers (Basel)*. **11**, 838 (2019).
 71. Huang, D., Savage, S. R., Calinawan, A. P., Lin, C., Zhang, B., Wang, P., Starr, T. K., Birrer, M. J. i Paulovich, A. G. A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene 2021 4046* **40**, 6395–6405 (2021).
 72. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. i Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39–51 (1995).
 73. Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* **66**, 188–193 (1975).
 74. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T. i Oers, M. H. J. van. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood J.* **84**,

1415–1420 (1994).

75. von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M. A. i Bork, P. STRING: known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* **33**, D433–D437 (2005).
76. Chen, E. Y., Tan, C. M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G. V., Clark, N. R., Ma’ayan, A., Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., *i ostali*. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).
77. Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W. i Ma’ayan, A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).
78. Xie, Z., Bailey, A., Kuleshov, M. V., Clarke, D. J. B., Evangelista, J. E., Jenkins, S. L., Lachmann, A., Wojciechowicz, M. L., Kropiwnicki, E., Jagodnik, K. M., Jeon, M. i Ma’ayan, A. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Curr. Protoc.* **1**, e90 (2021).
79. Györfy, B., Lánczky, A. i Szállási, Z. Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocr. Relat. Cancer* **19**, 197–208 (2012).
80. Fekete, J. T., Ősz, Á., Pete, I., Nagy, G. R., Vereczkey, I. i Györfy, B. Predictive biomarkers of platinum and taxane resistance using the transcriptomic data of 1816 ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol.* **156**, 654–661 (2020).
81. Brozovic, A. The relationship between platinum drug resistance and epithelial-mesenchymal transition. *Arch. Toxicol.* **91**, 605–619 (2017).
82. Tan, T. Z., Miow, Q. H., Miki, Y., Noda, T., Mori, S., Huang, R. Y. i Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1279–1293 (2014).
83. Zyl, B. van, Tang, D., Bowden, N. A., Van Zyl, B., Tang, D., Bowden, N. A., Zyl, B. van, Tang, D., Bowden, N. A., Van Zyl, B., Tang, D. i Bowden, N. A. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: What can we use to improve treatment. *Endocr. Relat. Cancer* **25**, R303–R318 (2018).
84. Welch, A. D. The problem of drug resistance in cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **19**, 359–371 (1959).

85. Lee, H. H., Bellat, V. i Law, B. Chemotherapy induces adaptive drug resistance and metastatic potentials via phenotypic CXCR4-expressing cell state transition in ovarian cancer. *PLoS One* **12**, e0171044 (2017).
86. Harris, A. R., Esparza, S., Azimi, M. S., Cornelison, R., Azar, F. N., Llana, D. C., Belanger, M., Mathew, A., Tkachenko, S., Perez, M. J., Rosean, C. B., Bostic, R. R., Cornelison, R. C., Tate, K. M., Peirce-Cottler, S. M., Paquette, C., Mills, A., Landen, C. N., Saucerman, J., i *ostali*. Platinum chemotherapy induces lymphangiogenesis in cancerous and healthy tissues that can be prevented with adjuvant anti-VEGFR3 therapy. *Front. Oncol.* **12**, 801764 (2022).
87. Volk-Draper, L., Hall, K., Griggs, C., Rajput, S., Kohio, P., DeNardo, D. i Ran, S. Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a TLR4-dependent manner. *Cancer Res.* **74**, 5421–5434 (2014).
88. Volmer, L., Koch, A., Matovina, S., Dannehl, D., Weiss, M., Welker, G., Hahn, M., Engler, T., Wallwiener, M., Walter, C. B., Oberlechner, E., Brucker, S. Y., Pantel, K. i Hartkopf, A. Neoadjuvant chemotherapy of patients with early breast cancer is associated with increased detection of disseminated tumor cells in the bone marrow. *Cancers (Basel)*. **14**, 635–648 (2022).
89. Sajjad, H., Imtiaz, S., Noor, T., Siddiqui, Y. H., Sajjad, A. i Zia, M. Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Anim. Model. Exp. Med.* **4**, 87–103 (2021).
90. Phillips-Chavez, C., Watson, M., Coward, J. i Schloss, J. A systematic literature review assessing if genetic biomarkers are predictors for platinum-based chemotherapy response in ovarian cancer patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **76**, 1059–1074 (2020).
91. Udhaya Kumar, S., Thirumal Kumar, D., Siva, R., George Priya Doss, C. i Zayed, H. Integrative bioinformatics approaches to map potential novel genes and pathways involved in ovarian cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 391 (2019).
92. Very, N., Lefebvre, T. i Yazidi-Belkoura, I. El. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget* **9**, 1380–1402 (2018).
93. Wu, W., Wang, Q., Yin, F., Yang, Z., Zhang, W., Gabra, H. i Li, L. Identification of proteomic and metabolic signatures associated with chemoresistance of human epithelial ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* **49**, 1651–1665 (2016).
94. Bueschbell, B., Caniceiro, A. B., Suzano, P. M. S., Machuqueiro, M., Rosário-Ferreira, N. i Moreira, I. S. Network biology and artificial intelligence drive the understanding of the multidrug resistance phenotype in cancer. *Drug Resist. Updat.* **60**, 100811 (2022).
95. Stein-O'Brien, G., Kagohara, L. T., Li, S., Thakar, M., Ranaweera, R., Ozawa,

- H., Cheng, H., Considine, M., Schmitz, S., Favorov, A. V., Danilova, L. V., Califano, J. A., Izumchenko, E., Gaykalova, D. A., Chung, C. H. i Fertig, E. J. Integrated time course omics analysis distinguishes immediate therapeutic response from acquired resistance. *Genome Med.* **10**, 37 (2018).
96. Weidle, U. H., Birzele, F., Kollmorgen, G. i Rueger, R. Mechanisms and targets involved in dissemination of ovarian cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **13**, 407–423 (2016).
 97. Fang, F., Cardenas, H., Huang, H., Jiang, G., Perkins, S. M., Zhang, C., Keer, H. N., Liu, Y., Nephew, K. P. i Matei, D. Genomic and epigenomic signatures in ovarian cancer associated with resensitization to platinum drugs. *Cancer Res.* **78**, 631–644 (2018).
 98. Ye, Q., Liu, K., Shen, Q., Li, Q., Hao, J., Han, F. i Jiang, R. W. Reversal of multidrug resistance in cancer by multi-functional flavonoids. *Front. Oncol.* **9**, 487–502 (2019).
 99. Behrens, B. C., Hamilton T C, Masuda H, Grotzinger, K. R., Whang-Peng, J., Louie, K. G., Knutsen, T., McKoy, W. M., Young, R. C., Ozols, R. F. i B C Behrens, T C Hamilton, H Masuda, K R Grotzinger, J Whang-Peng, K G Louie, T Knutsen, W M McKoy, R C Young, R. F. O. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.* **47**, 414–418 (1987).
 100. Kreuzinger, C., von der Decken, I., Wolf, A., Gamperl, M., Koller, J., Karacs, J., Pfaffinger, S., Bartl, T., Reinthaller, A., Grimm, C., Singer, C. F., Braicu, E. I., Cunnea, P., Gourley, C., Smeets, D., Boeckx, B., Lambrechts, D., Perco, P., Horvat, R., *i ostali*. Patient-derived cell line models revealed therapeutic targets and molecular mechanisms underlying disease progression of high grade serous ovarian cancer. *Cancer Lett.* **459**, 1–12 (2019).
 101. Kreuzinger, C., Gamperl, M., Wolf, A., Heinze, G., Geroldinger, A., Lambrechts, D., Boeckx, B., Smeets, D., Horvat, R., Aust, S., Hamilton, G., Zeillinger, R. i Cacsire Castillo-Tong, D. Molecular characterization of 7 new established cell lines from high grade serous ovarian cancer. *Cancer Lett.* **362**, 218–228 (2015).
 102. Januchowski, R., Sterzyńska, K., Zaorska, K., Sosińska, P., Klejewski, A., Brązert, M., Nowicki, M. i Zabel, M. Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines. *J. Ovarian Res.* **9**, 65 (2016).
 103. Cheung, H. W., Cowley, G. S., Weir, B. A., Boehm, J. S., Rusin, S., Scott, J. A., East, A., Ali, L. D., Lizotte, P. H., Wong, T. C., Jiang, G., Hsiao, J., Mermel, C. H., Getz, G., Barretina, J., Gopal, S., Tamayo, P., Gould, J., Tsherniak, A., *i ostali*. Systematic investigation of genetic vulnerabilities across cancer cell lines reveals lineage-specific dependencies in ovarian cancer. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. **108**, 12372–12377 (2011).

104. Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E. P., Velasco-Herrera, M. D. C. i Yusa, K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat. Biotechnol.* **32**, 267–273 (2014).
105. Huesken, D., Lange, J., Mickanin, C., Weiler, J., Asselbergs, F., Warner, J., Meloon, B., Engel, S., Rosenberg, A., Cohen, D., Labow, M., Reinhardt, M., Natt, F. i Hall, J. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* **23**, 995–1001 (2005).
106. Marcotte, R., Brown, K. R., Suarez, F., Sayad, A., Karamboulas, K., Krzyzanowski, P. M., Sircoulomb, F., Medrano, M., Fedyshyn, Y., Koh, J. L. Y., van Dyk, D., Fedyshyn, B., Luhova, M., Brito, G. C., Vizeacoumar, F. J., Vizeacoumar, F. S., Datti, A., Kasimer, D., Buzina, A., *i ostali*. Essential gene profiles in breast, pancreatic, and ovarian cancer cells. *Cancer Discov.* **2**, 172–189 (2012).
107. Hassan, M. K., Waly, A. A., Elsayed, W., Keshk, S., Allam, W. R. i El-khamisy, S. F. Integrative microRNA and gene expression analysis identifies new epigenetically regulated microRNAs mediating taxane resistance in ovarian cancer. *Sci. Rep.* **11**, 562–578 (2021).
108. Szenajch, J., Szabelska-Beręsewicz, A., Świercz, A., Zyprych-Walczak, J., Siatkowski, I., Góralski, M., Synowiec, A. i Handschuh, L. Transcriptome remodeling in gradual development of inverse resistance between paclitaxel and cisplatin in ovarian cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9218–9248 (2020).
109. Januchowski, R., Sterzyńska, K., Zawierucha, P., Ruciński, M., Świerczewska, M., Partyka, M., Bednarek-Rajewska, K., Brązert, M., Nowicki, M., Zabel, M., Klejewski, A., Januchowski, R., Sterzyńska, K., Zawierucha, P., Ruciński, M., Świerczewska, M., Partyka, M., Bednarek-Rajewska, K., Brązert, M., *i ostali*. Microarray-based detection and expression analysis of new genes associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* **8**, 49944–49958 (2017).
110. Zatzman, M., Fuligni, F., Ripsman, R., Suwal, T., Comitani, F., Edward, L.-M., Denroche, R., Jang, G. H., Notta, F., Gallinger, S., Selvanathan, S. P., Toretsky, J. A., Hellmann, M. D., Tabori, U., Huang, A. i Shlien, A. Widespread hypertranscription in aggressive human cancers. *Sci. Adv.* **8**, eabn0238 (2022).
111. Van Den Berg, P. R., Budnik, B., Slavov, N. i Semrau, S. Dynamic post-transcriptional regulation during embryonic stem cell differentiation. *bioRxiv* 123497 (2017) doi:10.1101/123497.
112. Vogel, C. i Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 227–232 (2012).

113. Jolly, M. K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Onuchic, J. N., Levine, H. i Ben-Jacob, E. Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Front. Oncol.* **5**, 155–174 (2015).
114. Pastushenko, I. i Blanpain, C. EMT transition states during tumor progression and metastasis. *Trends Cell Biol.* **29**, 212–226 (2019).
115. Strauss, R., Li, Z. Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Möller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P., Drescher, C., Urban, N., Bartek, J. i Lieber, A. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* **6**, e16186 (2011).
116. Alves, C. L., Elias, D., Lyng, M. B., Bak, M. i Ditzel, H. J. SNAI2 upregulation is associated with an aggressive phenotype in fulvestrant-resistant breast cancer cells and is an indicator of poor response to endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **20**, 60–72 (2018).
117. Huang, R. Y. J., Wong, M. K., Tan, T. Z., Kuay, K. T., C Ng, A. H., Chung, V. Y., Chu, Y. S., Matsumura, N., Lai, H. C., Lee, Y. F., Sim, W. J., Chai, C., Pietschmann, E., Mori, S., Low, J. J. H., Choolani, M. i Thiery, J. P. An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis.* **4**, e915 (2013).
118. Greaves, M. i Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
119. Schmit, K. i Michiels, C. TMEM proteins in cancer: A review. *Front. Pharmacol.* **9**, 1345–1358 (2018).
120. Marx, S., Dal Maso, T., Chen, J. W., Bury, M., Wouters, J., Michiels, C. i Le Calvé, B. Transmembrane (TMEM) protein family members: Poorly characterized even if essential for the metastatic process. *Semin. Cancer Biol.* **60**, 96–106 (2020).
121. Drougat, L., Settas, N., Ronchi, C. L., Bathon, K., Calebiro, D., Maria, A. G., Haydar, S., Voutetakis, A., London, E., Faucz, F. R. i Stratakis, C. A. Genomic and sequence variants of protein kinase A regulatory subunit type 1 β (PRKAR1B) in patients with adrenocortical disease and Cushing syndrome. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **23**, 174–182 (2021).
122. Elsayed, A. M., Bayraktar, E., Amero, P., Salama, S. A., Abdelaziz, A. H., Ismail, R. S., Zhang, X., Ivan, C., Sood, A. K., Lopez-Berestein, G. i Rodriguez-Aguayo, C. PRKAR1B-AS2 long noncoding RNA promotes tumorigenesis, survival, and chemoresistance via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1882 (2021).
123. Liu, G., Ouyang, X., Gong, L., Yao, L., Liu, S., Li, J., Zhang, Q. i Xiao, Y. E2F3

- promotes liver cancer progression under the regulation of circ-PRKAR1B. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **26**, 104–113 (2021).
124. Cui, Y., Yang, S., Fu, X., Feng, J., Xu, S. i Ying, G. High levels of KAP1 expression are associated with aggressive clinical features in ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 363–377 (2015).
 125. Hu, M., Fu, X., Cui, Y., Xu, S., Xu, Y., Dong, Q. i Sun, L. Expression of KAP1 in epithelial ovarian cancer and its correlation with drug-resistance. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 17308–17320 (2015).
 126. Li, B., Dou, S. X., Yuan, J. W., Liu, Y. R., Li, W., Ye, F., Wang, P. Y. i Li, H. Intracellular transport is accelerated in early apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 12118–12123 (2018).
 127. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M. i Green, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**, 1545–1556 (1995).
 128. Kumar, N., Afjei, R., Massoud, T. F. i Paulmurugan, R. Comparison of cell-based assays to quantify treatment effects of anticancer drugs identifies a new application for Bodipy-L-cystine to measure apoptosis. *Sci. Reports 2018 81* **8**, 16363 (2018).
 129. Henslee, E. A., Torcal Serrano, R. M., Labeed, F. H., Jabr, R. I., Fry, C. H., Hughes, M. P. i Hoettges, K. F. Accurate quantification of apoptosis progression and toxicity using a dielectrophoretic approach. *Analyst* **141**, 6408–6415 (2016).
 130. Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O. i Kandhavelu, M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis 2022 277* **27**, 482–508 (2022).
 131. Chuang, H. W., Hsia, K. T., Liao, J. Bin, Yeh, C. C., Kuo, W. T. i Yang, Y. F. Serpine2 overexpression is associated with poor prognosis of urothelial carcinoma. *Diagnostics* **11**, 1928–1939 (2021).
 132. Li, R., Wu, H., Jiang, H., Wang, Q., Dou, Z., Ma, H., Yan, S., Yuan, C., Yang, N. i Kong, B. FBLN5 is targeted by microRNA-27a-3p and suppresses tumorigenesis and progression in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncol. Rep.* **44**, 2143–2151 (2020).
 133. Manders, D. B., Kishore, H. A., Gazdar, A. F., Keller, P. W., Tsunozumi, J., Yanagisawa, H., Lea, J. i Word, R. A. Dysregulation of fibulin-5 and matrix metalloproteases in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* **9**, 14251–14267 (2018).

134. Mao, M. i Wang, W. SerpinE2 promotes multiple cell proliferation and drug resistance in osteosarcoma. *Mol. Med. Rep.* **14**, 881–887 (2016).
135. Yang, Y., Xin, X., Fu, X. i Xu, D. Expression pattern of human SERPINE2 in a variety of human tumors. *Oncol. Lett.* **15**, 4523–4530 (2018).
136. Albig, A. R. i Schiemann, W. P. Fibulin-5 function during tumorigenesis. *Futur. Oncol.* **1**, 23–35 (2005).
137. Schiemann, W. P., Blobe, G. C., Kalume, D. E., Pandey, A. i Lodish, H. F. Context-specific Effects of Fibulin-5 (DANCE/EVEC) on Cell Proliferation, Motility, and Invasion: FIBULIN-5 IS INDUCED BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β AND AFFECTS PROTEIN KINASE CASCADES. *J. Biol. Chem.* **277**, 27367–27377 (2002).
138. Lin, N., Sato, T. i Ito, A. Triptolide, a novel diterpenoid triepoxide from *Tripterygium wilfordii* Hook. f., suppresses the production and gene expression of pro-matrix metalloproteinases 1 and 3 and augments those of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in human synovial. *Arthritis Rheum.* **44**, 2193–2200 (2001).
139. Vispé, S., DeVries, L., Créancier, L., Besse, J., Bréand, S., Hobson, D. J., Svejstrup, J. Q., Annereau, J. P., Cussac, D., Dumontet, C., Guilbaud, N., Barret, J. M. i Bailly, C. Triptolide is an inhibitor of RNA polymerase I and II-dependent transcription leading predominantly to down-regulation of short-lived mRNA. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2780–2790 (2009).
140. Liu, J., Zhang, L., Zhang, X. i Xing, X. Rapamycin enhanced the antitumor efficacy of oxaliplatin in cisplatin-resistant ovarian cancer cells A2780cis both in vitro and in vivo. *J. Chemother.* **27**, 358–364 (2015).
141. Guo, Q., Nan, X. X., Yang, J. R., Yi, L., Liang, B. L., Wei, Y. B., Zhu, N., Hu, S. B., Zhang, H., Luo, Y. i Xu, Y. F. Triptolide inhibits the multidrug resistance in prostate cancer cells via the downregulation of MDR1 expression. *Neoplasma* **60**, 598–604 (2013).
142. Schlosshauer, P. W., Li, W., Lin, K. T., Chan, J. L. K. i Wang, L. H. Rapamycin by itself and additively in combination with carboplatin inhibits the growth of ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **114**, 516–522 (2009).
143. Le, F., Yang, L., Han, Y., Zhong, Y., Zhan, F., Feng, Y., Hu, H., Chen, T. i Tan, B. TPL inhibits the invasion and migration of drug-resistant ovarian cancer by targeting the PI3K/AKT/NF- κ B-signaling pathway to inhibit the polarization of M2 TAMs. *Front. Oncol.* **11**, 704001 (2021).
144. Wang, R., Ma, X., Su, S. i Liu, Y. Triptolide antagonized the cisplatin resistance in human ovarian cancer cell line A2780/CP70 via hsa-mir-6751. *Future Med. Chem.* **10**, 1947–1955 (2018).

145. Zhong, Y. Y., Chen, H. P., Tan, B. Z., Yu, H. H. i Huang, X. S. Triptolide avoids cisplatin resistance and induces apoptosis via the reactive oxygen species/nuclear factor- κ B pathway in SKOV3PT platinum-resistant human ovarian cancer cells. *Oncol. Lett.* **6**, 1084–1092 (2013).
146. Zhong, Y., Le, F., Cheng, J., Luo, C., Zhang, X., Wu, X., Xu, F., Zuo, Q. i Tan, B. Triptolide inhibits JAK2/STAT3 signaling and induces lethal autophagy through ROS generation in cisplatin-resistant SKOV3/DDP ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* **45**, 69 (2021).
147. Huang, G., Hu, H., Zhang, Y., Zhu, Y., Liu, J., Tan, B. i Chen, T. Triptolide sensitizes cisplatin-resistant human epithelial ovarian cancer by inhibiting the phosphorylation of AKT. *J. Cancer* **10**, 3012–3020 (2019).
148. Tian, Y., Li, P., Xiao, Z., Zhou, J., Xue, X., Jiang, N., Peng, C., Wu, L., Tian, H., Popper, H., Poh, M. E., Marcucci, F., Zhang, C. i Zhao, X. Triptolide inhibits epithelial-mesenchymal transition phenotype through the p70S6k/GSK3/ β -catenin signaling pathway in taxol-resistant human lung adenocarcinoma. *Genet. Med.* **10**, 1007–1019 (2021).
149. Liu, R., Chen, Y., Liu, G., Li, C., Song, Y., Cao, Z., Li, W., Hu, J., Lu, C. i Liu, Y. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis.* **11**, 1–12 (2020).
150. Huang, X., Li, Z., Zhang, Q., Wang, W., Li, B., Wang, L., Xu, Z., Zeng, A., Zhang, X., Zhang, X., He, Z., Li, Q., Sun, G., Wang, S., Li, Q., Wang, L., Zhang, L., Xu, H. i Xu, Z. Circular RNA AKT3 upregulates PIK3R1 to enhance cisplatin resistance in gastric cancer via miR-198 suppression. *Mol. Cancer* **18**, 1–20 (2019).

8. Popis ilustracija

Tablica 1 Stadiji raka jajnika prema sustavu FIGO	2
Tablica 2 Usporedba EOC-a tipa I i II.	4
Slika 1 Kemijske strukture cisplatine i karboplatine	6
Slika 2 Različiti mehanizmi kojima stanice mogu razviti otpornost na lijekove	8
Slika 3 Epitelno-mezenhimski tranzicija.....	13
Tablica 3 Korištene osnovne kemikalije.....	16
Tablica 4 Korišteni puferi i otopine.....	17
Tablica 5 Korišteni kompleti kemikalija i standardi	19
Tablica 6 Korišteni lijekovi i inhibitori	19
Tablica 7 Korištene početnice za RT-qPCR	20
Tablica 8 Korištene siRNA.....	21
Tablica 9 Korištena protutijela	22
Tablica 10 Korišteni uređaji	22
Tablica 11 Korišteni laboratorijski pribor i ostali materijali	24
Tablica 12 Korišteni računalni programi, alati i baze podataka	25
Slika 4 Shematski prikaz razvoja varijanti stanica MES-OV otpornih na CBP	28
Slika 5 Shematski prikaz razvoja kultura stanica MES-OV klonova nakon tretmana CBP	29
Slika 6 Princip pretvorbe plavog resazurina u ružičasto obojeni resorufin djelovanjem enzima reduktaza mitohondrija.....	31
Slika 7 Shematski prikaz pretvorbe plavog resazurina u ružičasto obojeni resorufin djelovanjem enzima reduktaza mitohondrija metabolički aktivnih stanica	31
Tablica 13 Priprema uzoraka za mjerenje smrti stanica bojanjem s aneksin V-FITC-om i PI-om.....	33
Slika 8 Shematski prikaz određivanja tipa smrti stanice bojanjem aneksin V-FITC-om i PI-om.....	34
Slika 9 Shematski prikaz testa zacjeljivanja rana.....	35
Slika 10 Usporedba testa migracije i testa invazije	38
Tablica 14 Program reakcije reverzne transkripcije	40
Tablica 15 Komponente smjese reakcije RT	41
Tablica 16 Program reakcije qPCR	41

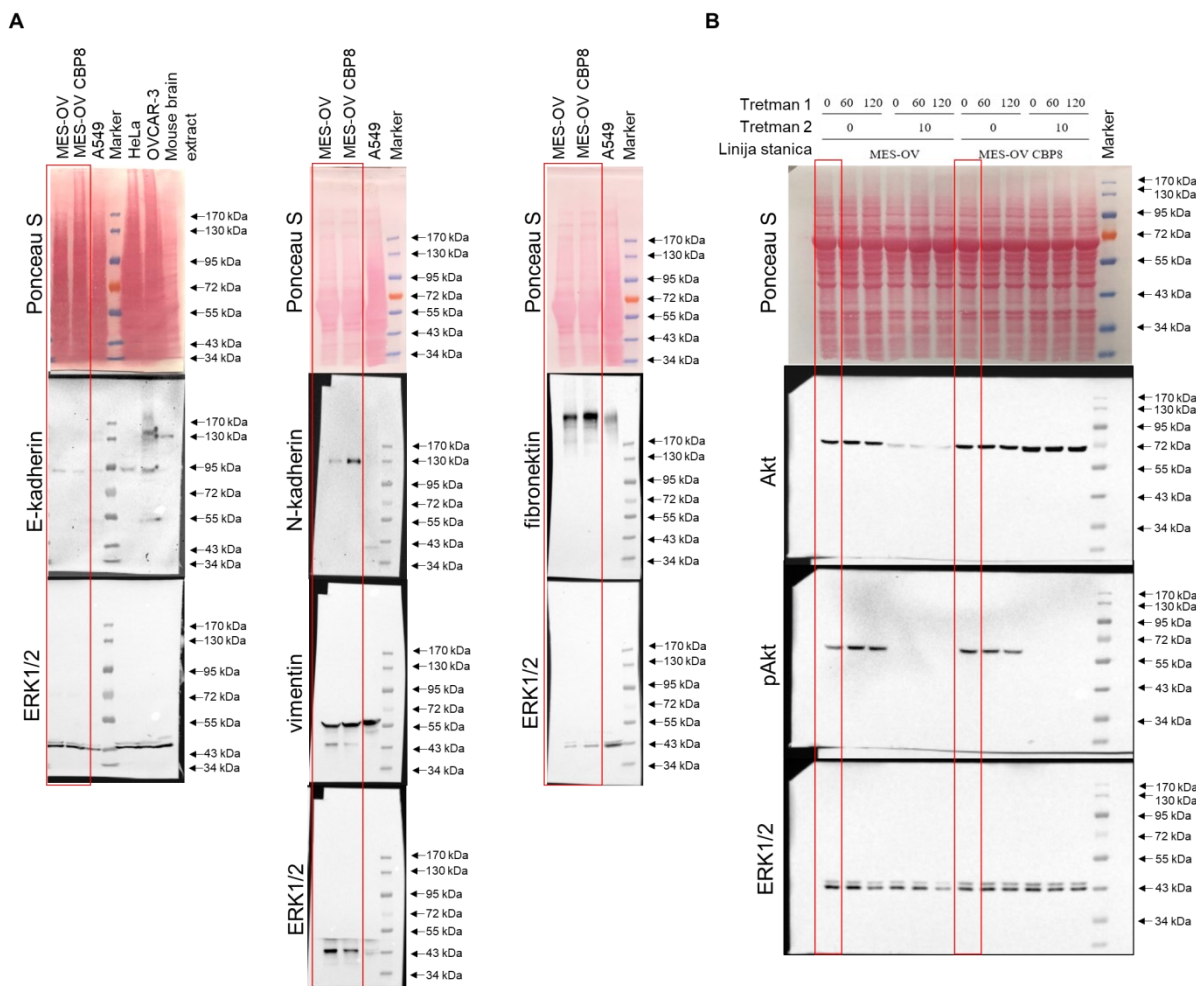
Tablica 17 Priprema gelova za sabijanje i razdvajanje proteina.....	44
Tablica 18 Reagensi korišteni za jednu reakciju transfekcije stanica ovisno o koncentraciji siRNA	46
Slika 11 Morfološke karakteristike stanica i kolonija MES-OV i MES-OV CBP8.....	52
Slika 12 Vijabilnost novorazvijenih varijanti stanica MES-OV	54
Slika 13 Pokretljivost novorazvijenih varijanti stanica MES-OV	55
Slika 14 Ekspresija gena biljega EMT-ja u novorazvijenim varijantama stanica MES-OV.....	57
Slika 15 Vijabilnost novorazvijenih MES-OV stanica klonova	59
Slika 16 Ekspresija gena biljega EMT-ja u novorazvijenim MES-OV stanicama klonova.....	60
Slika 17 Grupiranost varijanti stanica MES-OV prema ekspresiji svih analiziranih gena.....	61
Tablica 19 Analiza i usporedba lista gena DEG i CCORG i rezultata analize interakcija između proteina kodiranih genima istih.....	63
Tablica 20 Usporedba rezultata analize setova gena lista DEG i CCORG.....	63
Slika 18 Probir gena liste DEG za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP	66
Slika 19 Probir gena liste DEG-CCORG za daljnja istraživanja funkcije u procesima EMT-ja i otpornosti na CBP	68
Slika 20 Provjera efikasnosti utišavanja gena <i>MIR99AHG</i> , <i>DNER</i> , <i>TMEM200A</i> , <i>SERPINE2</i> , <i>WDR46</i> , <i>HES7</i> , <i>PRKAR1B</i> i <i>FBLN5</i> metodom transfekcije stanica siRNA	70
Slika 21 Vijabilnost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 s utišanim genima od interesa nakon tretmana s CBP-om	72
Slika 22 Stopa smrti stanica MES-OV i MES-OV CBP8 s utišanim genima od interesa nakon tretmana s CBP-om	73
Slika 23 Pokretljivost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 s utišanim genima od interesa	75
Tablica 21 Sažetak efekata utišavanja gena na osjetljivost stanica na tretman CBP i pokretljivost	76
Slika 24 Vrijednost osam izdvojenih gena kao biljega OS-a i PFS-a bolesnica s HGSOc-om.....	78

Tablica 22 Vrijednost osam izdvojenih gena kao biljega OS-a i PFS-a bolesnica s HGSOc-om.....	79
Slika 25 Vrijednost osam izdvojenih gena kao biljega odgovora bolesnica s HGSOc-om na terapiju platinom	79
Slika 26 Vijabilnost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 tretiranih sa 14 odabranih inhibitora	82
Slika 27 Preživljenje stanica MES-OV i MES-OV CBP8 predtretiranih inhibitorima Rapamycin-om, Wortmannin-om, SB216763-om i Triptolide-om te tretiranih s CBP 85	
Tablica 23 Utjecaj Rapamycin-a, Wortmannin-a, SB216763-a i Triptolide-a na preživljenje stanica nakon tretmana s CBP-om	86
Slika 28 Pokretljivost stanica MES-OV i MES-OV CBP8 tretiranih sa 14 odabranih inhibitora	87
Slika P1 Fotografije membrana korištenih za detekciju relativne količine proteina metodom Western blot	117
Slika P2 Analiza ekspresije proteina Akt i pAkt te gena AKT1/2/3 u stanicama MES-OV i MES-OV CBP8.....	118

Popis jednadžbi:

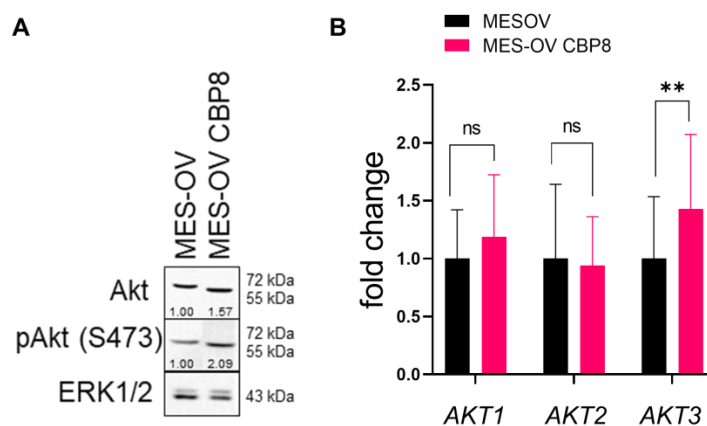
FC(stope proliferacije)= stopa proliferacije(novorazvijene linije stanica)/stopa proliferacije(roditeljske linije stanice).	1 - 30
FC(IC ₅₀)=IC ₅₀ (novorazvijena linija stanica)/IC ₅₀ (roditeljska linija stanica)	2 - 31
Normalizacija: $\Delta Ct = Ct(\text{gena od interesa}) - Ct(\text{referentnog gena})$	3 - 41
Relativna promjena ekspresije gena: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tretmana}) - \Delta Ct(\text{kontrola})$	4 - 41

9.Privitci



Slika P1 Fotografije membrana korištenih za detekciju relativne količine proteina metodom Western blot

Relativne količine proteina određene su metodom Western blot. Prije inkubacije u otopinama specifičnih protutijela, membrane su inkubirane u otopine boje Ponceau S. Signal ERK1/2 koristio se kao kontrola za normalizaciju. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Prikazane su fotografije cjelovitih reprezentativnih membrana iz Slike 14B (A) i Slike P2A (B), čiji su dijelovi označeni crvenim pravokutnicima korišteni za analize. Desno od fotografije membrana prikazane su i veličine korištenih markera.



Slika P2 Analiza ekspresije proteina Akt i pAkt te gena AKT1/2/3 u stanicama MES-OV i MES-OV CBP8

(A) Relativne količine proteina određene su metodom Western blot. Prije inkubacije u otopinama specifičnih protutijela, membrane su inkubirane u otopini boje Ponceau S. Signal ERK1/2 koristio se kao kontrola za normalizaciju. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Prikazani su specifični signali proteina, zajedno s omjerima u odnosu na isti signal u stanicama MES-OV. Pored signala prikazane su i veličine korištenog markera. (B) Dodatnom analizom rezultata hibridizacije DNA mikročipova izdvojene su ekspresije gena *AKT1*, *AKT2* i *AKT3*. Rezultati su prikazani kao stupci omjera promjene ekspresije gena (FC) u stanicama MES-OV CBP8 u odnosu na MES-OV.

10. Životopis

Rođen sam u Zagrebu, gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Upisao sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pridružio sam se Udruzi studenata biologije (BIUS) i sudjelovao na više znanstvenih projekata. Jedan semestar sam bio demonstrator iz kolegija Histologija i histokemija te Histologija i embriologija gdje sam usavršio svoje predavačke sposobnosti. Svoje organizacijske, komunikacijske i prezentacijske vještine imao sam priliku dokazati prvo kao sudionik, a dvije godine kasnije i kao voditelj radionica na projektu „Noć biologije“. Nakon tri godine preddiplomskog studija završene odličnim uspjehom, upisao sam diplomski studij molekularne biologije na istom fakultetu. Održavajući odličan uspjeh, dobio sam i iskoristio priliku biti dio Erasmus+ programa studentske razmjene. Proveo sam šest mjeseci na Tehničkom sveučilištu u Madridu studirajući biotehnologiju. To iskustvo mi je pomoglo steći nova znanja i iskustva rada i života u međunarodnom okruženju. U cijelom iskustvu puno mi je pomogla i stipendija za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu. Željani laboratorijskog iskustva, odradio sam dvije stručne prakse u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i Institutu Ruđer Bošković. Nakon isteka posljednje laboratorijske prakse odlučio sam ostati raditi diplomski rad u istom laboratoriju Instituta Ruđer Bošković, gdje sam se godinu dana poslije zaposlio kao asistent. Doktorski studij medicinske kemije upisao sam 2018. godine na odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci. U četiri godine posla i studija sudjelovao sam na više od 15 različitih seminara, kongresa i tečajeva, najviše iz područja bioinformatike i istraživanja raka. Danas, nakon više od 7 godina od mog prvog posjeta Institutu Ruđer Bošković, završavam studij medicinske kemije i nadam se nastaviti strmu krivulju učenja i doprinosa znanstvenoj, ali i široj zajednici.

11. Popis objavljenih radova

Grienke, U., Radić Brkanac, S., Vujčić, V., Urban, E., Ivanković, S., Stojković, R., Rollinger, J. M., Kralj, J., Brozović, A. i Radić Stojković, M. Biological activity of flavonoids and rare sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea ragusina* L. *Front Pharmacol.* **9**, 972 (2018).

Pernar Kovač, M., Kokan, Z., Kralj, J., Glasovac, Z., Tumir, L-M., Piantanida, I., Eljuga, D., Turel, I., Brozović, A. i Kirin, S. Organometallic ruthenium(II)-arene complexes with triphenylphosphine amino acid biconjugates: Synthesis, characterisation and biological properties. *Bioorg Chem.* **87**, 432-446 (2019)

Kralj, J., Bolje, A., Stupin Polančec D., Steiner, I., Gržan, T., Tupek, A., Stojanović, N., Hohloch, S., Urankar D., Osmak, M., Sarkar, B., Brozović, A. I Košmrlj, J. Half-Sandwich Ir(III) and Os(II) Complexes of Pyridyl-Mesoionic Carbenes as Potential Anticancer Agents. *Organometallics.* **38**, 4082-4092 (2019)

Zonjić, I., Radić Stojković, M., Crnolatac, I., Tomašić Paić, A., Pšeničnik, S., Vasilev, A., Kandinska, M., Mondeshki, M., Balushev, S., Landfester, K., Glavaš-Obrovac, L., Jukić, M., Kralj, J., Brozovic, A., Horvat, L. i Tumir, L. Styryl dyes with N-Methylpiperazine and N-Phenylpiperazine Functionality: AT-DNA and G-quadruplex binding ligands and theranostic agents. *Bioorganic Chem.* **127**, 105999 (2022)

Zonjić, I., Kurutos, A., Mihovilović, P., Crnolatac, I., Tumir, L., Tomašić Paić, A., Kralj, J., Horvat, L., Brozovic, A., Stojković, R. i Radić Stojković, M. Formation of triplex rA/dA-containing nucleic acid helices induced by new thiazole orange analogues and their biological evaluation. H-aggregate formation conditioned by rA sequence. *Dyes and pigments.* **207**, 110715 (2022)

Kralj, J., Pernar Kovač, M., Dabelić, S., Stupin Polančec, D., Wachtmeister, T., Köhrer, K. i Brozović, A. Transcriptome analysis of newly established carboplatin-resistant ovarian cancer cell model reveals genes shared by drug resistance and drug-induced EMT. *Br. J. Cancer.* (2023)

12. Popis javnih prezentacija

Rezultati istraživanja su prezentirani na sljedećim kongresima:

- 4th Congress of Croatian Geneticists with International Participation, 25. – 28. rujna, 2018
- Simpozij „Prvih 10 godina HDIR-a“, 3. lipnja, 2019
- European Cooperation in Science and Technology (COST) STRATAGEM CA17104 Conference, 27. – 28. veljače, 2020
- European Association of Cancer Research (EACR) 2022 Congress, 20. – 23. lipnja, 2022 - Sevilla, Španjolska