

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,  
Sveučilište u Dubrovniku,  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Margareta Pernar Kovač

**Promjene u ekspresiji mikroRNA  
u otpornosti na karboplatinu i metastatskom potencijalu  
stanica epitelnog raka jajnika**

Doktorski rad

Osijek, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti  
**Znanstvena polja:** Biologija, Temeljne medicinske znanosti

**Promjene u ekspresiji mikroRNA u otpornosti na karboplatinu i metastatskom potencijalu stanica epitelnog raka jajnika**

Margareta Pernar Kovač

**Doktorski rad je izrađen u:** Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavodu za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković

**Mentor/i:** doc. dr. sc. Anamaria Brozović, znanstvena savjetnica

### **Kratki sažetak doktorskog rada:**

Promijenjena ekspresija 77 miRNA utvrđena je u stanicama epitelnog raka jajnika MES-OV CBP stabilno otpornim na CBP i mezenhimskog fenotipa u odnosu na roditeljske, epitelne MES-OV stanice. TUBB3, ekspresije regulirane epigenetički reguliranom miR-200c, uključen je u otpornost stanica na CBP sudjelujući u prijenosu proteina popravka DNA iz citoplazme u jezgru. Smanjena ekspresija miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 doprinosi sposobnosti invazije, ali nije uključena u otpornost stanica na CBP.

**Broj stranica:** 142

**Broj slika:** 52

**Broj tablica:** 19

**Broj literaturnih navoda:** 159

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** rak jajnika, otpornost na lijekove, mikroRNA, karboplatina, paklitaksel, migracija, invazija

**Datum javne obrane:**

**Povjerenstvo za javnu obranu:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**Doctoral Study of Molecular Biosciences**

PhD thesis

**Scientific Area:** Interdisciplinary area of science  
**Scientific Fields:** Biology, Basic medical sciences

### **Changes in microRNA expression in carboplatin resistance and metastatic potential of epithelial ovarian cancer cells**

Margareta Pernar Kovač

**Thesis performed at:** Laboratory for Cell Biology and Signalling, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute

**Supervisor/s:** Anamaria Brozovic, PhD, Senior Scientist

#### **Short abstract:**

Altered expression of 77 miRNAs was observed in mesenchymal-like MES-OV CBP cells stably resistant to CBP compared to epithelial-like, parental cells MES-OV. The regulatory axis comprised of epigenetically regulated miR-200c and TUBB3 participates in cell resistance to CBP by transferring DNA repair proteins from the cytoplasm to the nucleus. Reduced expression of miR-17-5p, miR-103a-3p, and miR-107 contributes to the invasion ability of ovarian cancer cell lines but is not involved in cell resistance to CBP.

**Number of pages:** 142

**Number of figures:** 52

**Number of tables:** 19

**Number of references:** 159

**Original in:** Croatian

**Key words:** ovarian cancer, drug resistance, microRNA, carboplatin, paclitaxel, migration, invasion

**Date of the thesis defense:**

#### **Reviewers:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

# Ocjena rada u tisku

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Anamarije Brozović, znanstvene savjetnice, u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Određivanje ključnih molekula epitelno-mezenhimalne tranzicije kao mogućih ciljeva za terapiju raka jajnika (DEvOuT)“ (IP-2016-06-1036).

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. RAK JAJNIKA - EPIDEMIOLOGIJA, OTKRIVANJE I DIJAGNOZA.....	1
1.2. TERAPIJA RAKA JAJNIKA.....	5
1.3. OTPORNOST NA TERAPIJU.....	7
1.3.1. Mehanizmi otpornosti na lijekove na bazi platine i taksane.....	8
1.4. EPITELNO-MEZENHIMSKA TRANZICIJA.....	10
1.4.1. EMT i otpornost na kemoterapiju.....	12
1.5. MikroRNA.....	13
1.5.1. Biogeneza i funkcija miRNA.....	13
1.5.2. Uloga miRNA u karcinogenezi i odgovoru na terapiju.....	16
1.5.3. MiRNA kao dijagnostički i prognostički farmakogenetski biljezi.....	17
1.5.4. Ciljana terapija sintetskim miRNA.....	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. MATERIJALI.....	20
3.1.1. Linije stanica.....	20
3.1.2. Lijekovi i inhibitori.....	20
3.2. METODE.....	21
3.2.1. Rad s kulturama stanica.....	21
3.2.2. Morfološka karakterizacija kolonija stanica.....	22
3.2.3. Test metabolizma resazurina.....	23
3.2.4. Test preživljenja mase stanica.....	24
3.2.5. Test zacjeljivanja rane.....	24
3.2.6. Test invazije.....	25
3.2.7. Određivanje ukupne platinacije.....	27
3.2.8. Izolacija RNA iz stanica.....	27
3.2.9. Reverzna transkripcija (RT).....	28
3.2.10. Profiliranje ekspresije miRNA.....	29
3.2.11. Određivanje ekspresije miRNA/gena metodom RT-qPCR.....	30
3.2.12. Izolacija ukupnih proteina.....	33
3.2.13. Određivanje koncentracije proteina.....	33

3.2.14. Određivanje ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i Western blot .....	34
3.2.15. Analiza ekspresije/lokalizacije proteina metodom imunofluorescencije .....	36
3.2.16. Integracija rezultata profiliranja miRNA i mRNA .....	37
3.2.17. Analiza signalnih puteva .....	39
3.2.18. Prolazna promjena ekspresija miRNA i gena .....	39
3.2.19. Stabilna promjena ekspresije miRNA.....	41
3.2.20. Analiza metilacije promotora .....	42
3.2.21. Analiza miRNA kao farmakogenetskih biljega .....	44
3.2.22. Statistička analiza .....	45
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1. KARAKTERIZACIJA PAROVA STANICA MES-OV, SK-OV-3 I OVCAR-3 PREMA OSJETLJIVOSTI NA CBP I TAX I EPITELNO-MEZENHIMSKOM STATUSU .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2. KARAKTERIZACIJA MEHANIZAMA OTPORNOSTI NA CBP I TAX.....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Uloga transmembranskih pumpi u otpornosti na lijekove.....	49
4.2.2. Određivanje akumulacije platine u stanicama.....	50
4.2.3. Određivanje ekspresije ciljnih molekula paklitaksela.....	51
<b>4.3. ANALIZA EKSPRESIJE MIRNA STANICA OSJETLJIVIH I OTPORNIH NA CBP .....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Identifikacija miRNA promijenjene ekspresije u paru stanica MES-OV .....	54
4.3.2. Uloga epigenetičke regulacije u otpornosti stanica na CBP i njihovom metastatskom potencijalu .....	56
4.3.3. Odabir kandidata za daljnja istraživanja.....	59
<b>4.4. ISTRAŽIVANJE ULOGE OBITELJI MIR-200 U OTPORNOSTI I METASTATSKOM POTENCIJALU STANICA RAKA JAJNIKA– 1. PRAVAC ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>61</b>
4.4.1. Validacija promijenjene ekspresije članova obitelji miR-200.....	61
4.4.2. Regulacija ekspresije miR-200 na razini metilacije promotora.....	62
4.4.3. Istraživanje potencijalne uloge osi regulacije miR-200c/TUBB3 u otpornosti na CBP....	64
4.4.3.1. Epigenetička modulacija ekspresije miR-200c.....	64
4.4.3.2. Stabilna inhibicija ekspresije korištenjem lentiviralnih vektora s inhibitorom miR-200c.....	65
4.4.3.2.1. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na osjetljivost roditeljskih stanica MES-OV na CBP i TAX.....	66
4.4.3.2.2. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na metastatski potencijal roditeljskih stanica MES-OV.....	67
4.4.3.2.3. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na ekspresiju TUBB3/pan TUBB.....	68
4.4.3.3. Uloga TUBB3, mete miR-200c, u otpornosti na CBP .....	69

4.4.3.3.1. Utišavanje ekspresije <i>TUBB3</i> korištenjem siRNA .....	69
4.4.3.3.4. Povećanje ekspresije <i>TUBB3</i> korištenjem plazmida .....	72
4.4.3.3.3. Utjecaj utišavanja <i>TUBB3</i> na mehanizam popravka DNA.....	73
<b>4.5. ISTRAŽIVANJE POTENCIJALNE ULOGE DO SADA NEOPISANIH MIRNA U OTPORNOSTI NA CBP I METASTATKOM POTENCIJALU STANICA RAKA JAJNIKA– 2. PRAVAC ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>77</b>
4.5.1. Višestruka/Mnogostruka selekcija promijenjenih miRNA .....	77
4.5.1.1. Validacija promijenjene ekspresije odabranih miRNA .....	77
4.5.1.2. Utjecaj epigenetičkih modulatora na ekspresiju validiranih miRNA .....	77
4.5.1.3. Selekcija kandidata miRNA korištenjem dodatna dva para stanica epitelnog raka jajnika .....	78
4.5.2. Ispitivanje funkcionalne uloge izdvojenih miRNA u otpornosti stanica na CBP i metastatskom potencijalu.....	79
4.5.2.1. Identifikacija gena promijenjene ekspresije koje ciljaju odabrane promijenjene miRNA .....	79
4.5.2.2. Identifikacija signalnih puteva u koje su uključene odabrane miRNA .....	81
4.5.2.3. Promjena ekspresije korištenjem sekvenci mimik miRNA .....	83
4.5.2.3.1. Provjera uspješnosti promjene ekspresije miRNA korištenjem sekvenci mimik miRNA .....	83
4.5.2.3.2. Utjecaj povišenja ekspresije na otpornost stanica na CBP .....	84
4.5.2.3.3. Utjecaj povišenja ekspresije na metastatski potencijal stanica otpornih na CBP .....	85
4.5.2.4. Regulacija ekspresije miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 u stanicama otpornim na CBP.....	88
4.5.2.5. Promjena ekspresije korištenjem inhibitora miRNA .....	89
4.5.2.5.1. Utjecaj smanjenja ekspresije miR-103a-3p na otpornost roditeljskih stanica na CBP i njihov metastatski potencijal .....	90
4.5.3. MiR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 kao farmakogenetski biljezi .....	91
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>93</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>105</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>106</b>
<b>8. SUMMERY .....</b>	<b>107</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>109</b>
<b>10. PRIVITCI.....</b>	<b>132</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA.....</b>	<b>140</b>

# 1. UVOD

## 1.1. RAK JAJNIKA - EPIDEMIOLOGIJA, OTKRIVANJE I DIJAGNOZA

Rak jajnika obuhvaća heterogenu skupinu malignih oboljenja koja proizlaze iz jajnika ili su uključena u njega. Iako nije najučestaliji, rak jajnika nalazi se na drugom mjestu prema stopi incidencije (iza raka tijela i vrata maternice) te na prvom mjestu prema smrtnosti od svih ginekoloških maligniteta (Siegel et al., 2022). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2021. godini od raka jajnika oboljelo je 418 žena, a umrlo njih 298. Ovakva visoka stopa mortaliteta (71%) usporediva je i sa stopom mortaliteta u svjetskim razmjerima. Tako na primjer u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) ona iznosi nešto nižih 64,4% za 2022. godinu. Visoku smrtnost raka jajnika apostrofira i usporedba s rakom dojke, najzastupljenijim malignitetom kod žena u Hrvatskoj (2928 slučajeva), kod kojega je stopa smrtnosti za 2021. godinu iznosila 24,3%.

Nekoliko čimbenika utječe na navedenu negativnu statistiku. Rak jajnika dugo se nazivao „tihi ubojica“ jer se smatralo da se simptomi javljaju tek u kasnoj fazi bolesti kada je šansa za izlječenje mala. Međutim, istraživanja napravljena 2004. i 2007. godine uspjela su povezati simptome kao što su bol u području zdjelice i trbuha, napuhnutost, poremećaji prehrane i problemi s mokrenjem s rakom jajnika, čime su postavljeni temelji za indeksiranje simptoma za raniji probir bolesnica (Goff et al., 2004, 2007). Međutim, navedeni simptomi ostaju nedovoljno specifični te se lako mogu povezati s benignijim stanjima, kao što su poremećaji probave ili menstrualnog ciklusa.

Osim navedenih simptoma, prepoznati su i faktori koji ukazuju na veći rizik za razvoj raka jajnika. Među njima su obiteljska povijest bolesti i nasljedne mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2*. Točnije, pokazano je kako žene s mutacijom u *BRCA1* imaju 44%, a one s mutacijom u *BRCA2* 17% veću šansu za razvoj raka jajnika do 80. godine. Mutacije u drugim genima kao što su *TP53* i *RAD51* također mogu povećati rizik, međutim njihova značajnost je daleko manja u odnosu na gene *BRCA1* i *BRCA2* (Kuchenbaecker et al., 2017). Dob je također jedan od bitnih čimbenika, jer incidencija raste sa starenjem. Tako je srednja dob za razvoj svih tipova raka jajnika između 54 i 66 godina, s iznimkom raka zametnih stanica kod kojeg je srednja dob 36 godina (Matz et al., 2017). S druge strane, korištenje oralne kontracepcije, broj trudnoća, trudnoća u kasnijoj dobi,



dojenje, salpingektomija (kirurško otklanjanje jajovoda, najčešće prilikom histerektomije) neki su od faktora koji smanjuju rizik od razvoja raka jajnika (Hanley et al., 2022; Malvezzi et al., 2016; Momenimovahed et al., 2019; Y. Zhang et al., 2019).

Visoka smrtnost rezultat je i nedostatka efikasnijih metoda probira koje bi omogućile otkrivanje bolesti u ranijim stadijima. Transvaginalni ultrazvuk i određivanje količine tumorskog biljega CA125 standard su za postavljanje početne dijagnoze. CA125, veliki membranski glikoprotein, identificiran je kao tumorski biljeg epitelnog raka jajnika (EOC, eng. *epithelial ovarian cancer*) 1983. Iako je u širokoj upotrebi, njegova dijagnostička vrijednost vrlo je limitirana. Naime, povišena koncentracija detektira se u 90% slučajeva EOC kasnog stadija, dok je u ranoj fazi povišen u manje od 50% slučajeva, što ukazuje na nisku osjetljivost detekcije ranih stadija bolesti koji su povezani i s boljim preživljenjem (Lheureux et al., 2019). Također, prisutnost povišene vrijednosti CA125 u serumu nije specifična samo za EOC, već može biti uzrokovana i stanjima kao što su endometriozna ili druge vrste raka. Također, nemaju svi slučajevi raka jajnika povišenu razinu CA125. Istraživanje provedeno na uzorku od 50780 žena koje su testirane na CA125 u Ujedinjenom Kraljevstvu (UK) pokazalo je da je 10,1% s povišenom razinom CA125 dijagnosticirano s rakom jajnika, dok je 12,3% s povišenom razinom CA125 dijagnosticirano nekom drugom formom raka (Funston et al., 2020). Ipak, CA125 koristan je u predviđanju odgovora na terapiju i praćenja remisije. Pad serumskog CA125 upućuje na pozitivan odgovor na terapiju, dok zadržavanje visoke koncentracije može ukazati na otpornost na terapiju. Također, ponovni porast koncentracije ukazuje na povratak bolesti prije same kliničke potvrde (Rustin et al., 2004).

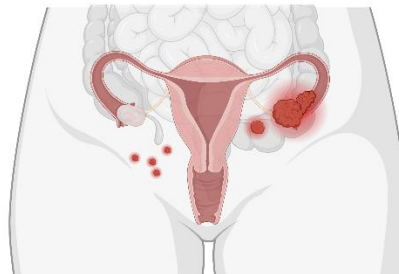
Nakon postavljanja dijagnoze, pristupa se određivanju stadija bolesti prema sustavu FIGO (*engl. International Federation of Gynecology and Obstetrics*). Sustav koristi 3 parametra: veličinu/raširenost tumora, zahvaćenost bliskih limfnih čvorova te prisutnost udaljenih metastaza. Rak jajnika prema sustavu FIGO svrstava se u 4 stadija (Slika 1) (Berek et al., 2021). Stadij se određuje prilikom laparoskopije (minimalno invazivna endoskopska metoda) ili prilikom kirurškog odstranjenja tumora. Biopsija tumorske mase izbjegava se zbog mogućnosti rasipa stanica raka u trbušnu šupljinu. Nažalost, većini bolesnica, zbog prethodno navedenih problema, rak jajnika dijagnosticira se u kasnim stadijima (IIB na više) kad se bolest već proširila po

peritonealnoj šupljini i na druge organe. S većim stadijem značajno se smanjuje i stopa preživljenja unutar 5 godina od dijagnoze koja, s 92,6% za rane stadije, pada na 30,3% (Reid et al., 2017).

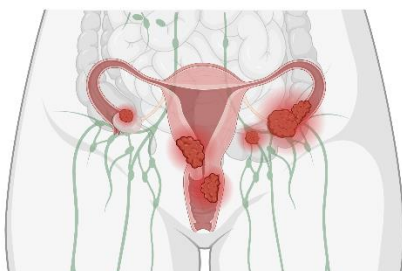
**Stadij I | Rak ograničen na jajnike**  
 A - zahvaćen jedan jajnik  
 B - zahvaćena oba jajnika  
 C - rak unutar i na površini jajnika



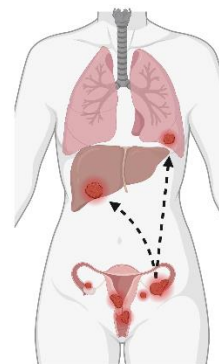
**Stadij II | Rak proširen unutar zdjelice, uz pojavu ascitesa**  
 A - širenje na maternicu, jajnike, jajovode  
 B - širenje na tkiva peritonealne šupljine (mokraćni mjehur, debelo crijevo)



**Stadij III | Širenje izvan zdjelice, uz potvrđene metastaze u limfnim čvorovima**  
 A - metastaze do 10 mm  
 B - metastaze do 2 cm  
 C - metastaze veće od 2 cm



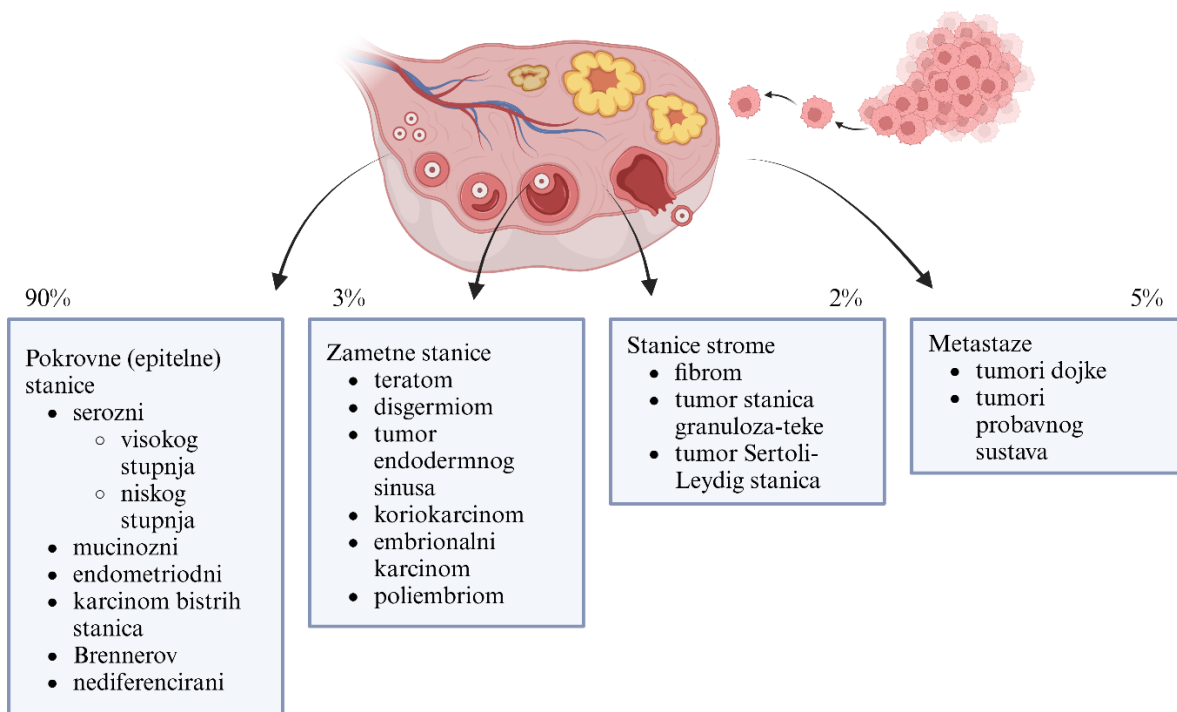
**Stadij IV | Širenje izvan abdominalne šupljine**  
 A - maligne stanice u plućima  
 B - metastaze u jetri, slezeni, udaljenim limfnim čvorovima



**Slika 1. Klasifikacija raka jajnika.** Rak jajnika se prema sustavu FIGO klasificira u 4 stadija, ovisno o zahvaćenosti tkiva van jajnika (Berek et al., 2021). Ilustracija je napravljena u programu BioRender.

Histološka podjela raka jajnika temelji se na ishodišnoj stanici (Slika 2). Najčešći je rak pokrovnih (epitelnih) stanica jajnika (epitelni rak jajnika; *engl. epithelial ovarian cancer*, EOC) na koji otpada 90% slučajeva. Uz njega, vrlo rijetki su rak zametnih stanica jajnika (3%) i rak stanica strome jajnika (2%). Dodatno, prepoznat je i sekundarni rak jajnika nastao kao rezultat metastaza, najčešće raka dojke ili probavnog sustava. Najčešći podtip epitelnog raka jajnika, serozni adenokarcinom, klasificira se na manje agresivan LGSOC (*engl. low-grade serous ovarian carcinoma*) na koji se odnosi <5% slučajeva, i HGSOC (*eng. high-grade serous ovarian*

*carcinoma*) visokog stupnja malignosti, koji je zastupljen u 70% slučajeva (Desai et al., 2014). Osim seroznog adenokarcinoma, u manjoj mjeri zastupljeni su mucinozni, endometriodni, rak bistrnih stanica, Brennerov te nediferencirani tumori. Moguća je i podjela EOC na tip I i tip II, prema kojoj bi tip I obuhvaćao sve navedene podtipove osim HGSOE, koji bi spadao u tip II. Za razliku od tumora tipa I, tip II, odnosno HGSOE, je karakteriziran visokom nestabilnošću genoma i prisutnošću stečenih ili naslijeđenih mutacija sudionika različitih signalnih putova popravka DNA, kao što su *TP53* i *BRCA1/2*. Mutacije gena *NRAS*, *KRAS*, *PIK3CA*, *HER2* zabilježene su kod tumora tipa II (Ahmed et al., 2010; De Leo et al., 2021; Kurman & Shih, 2016; Labidi-Galy et al., 2017). Zanimljivo, u posljednje vrijeme sve se više smatra da HGSOE potječe iz područja fimbrija jajovoda, a ne iz samih jajnika. Fimbrije, koje su u neposrednoj blizini jajnika, bogate su krvnim žilama koje putem krvotoka olakšavaju metastaziranje u jajnik (De Leo et al., 2021).



**Slika 2. Klasifikacija tumora jajnika prema ishodišnoj stanici.** Najveći postotak dijagnosticiranih slučajeva odnosi se na rak pokrovnih (epitelnih) stanica, dok su u malom postotku zastupljeni rak zametnih stanica (3%) i rak stromalnih stanica (2%). Posebnu kategoriju čini rak jajnika nastao kao rezultat metastaziranja (5%), najčešće tumora dojke i probavnog sustava.

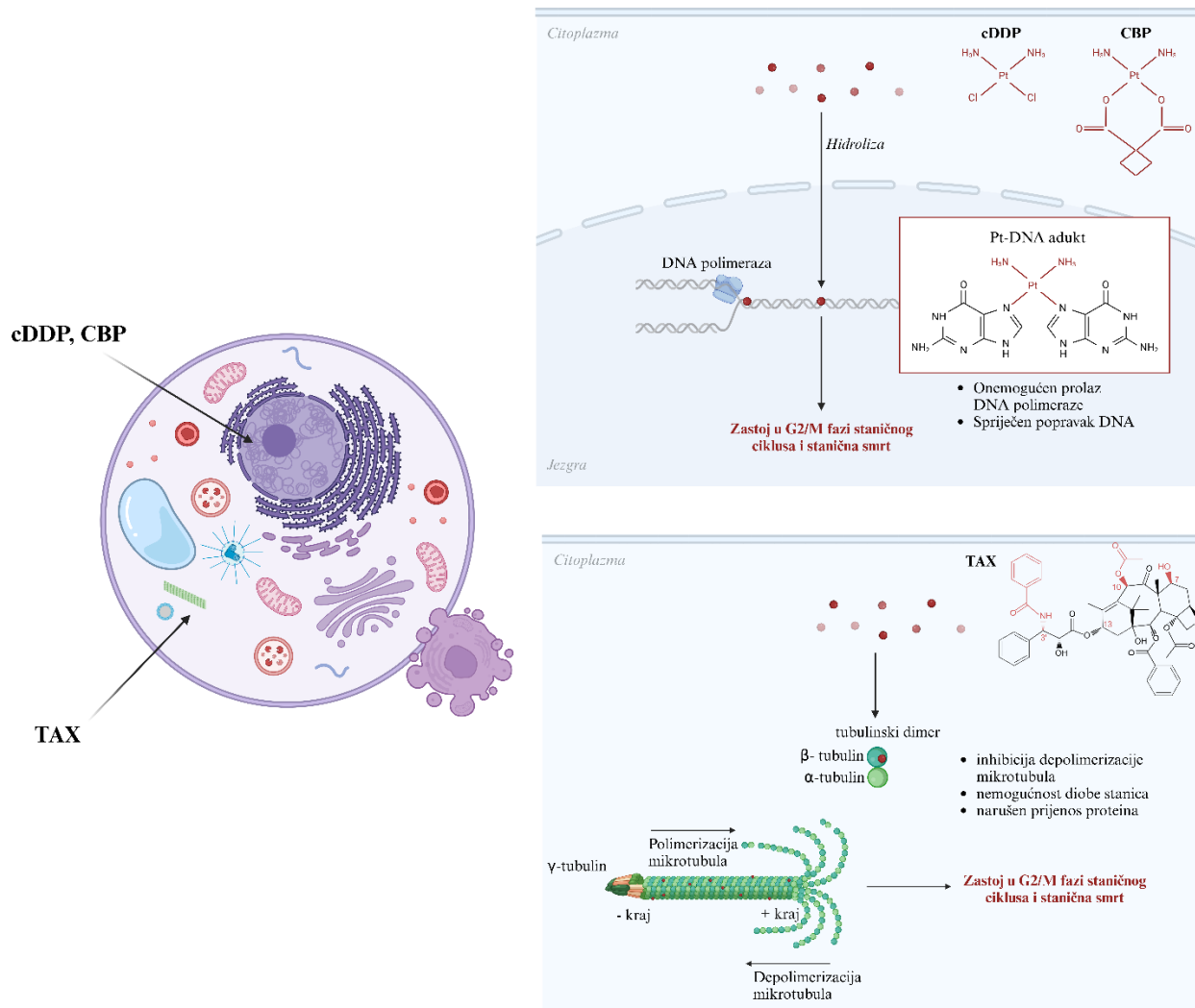
## 1.2. TERAPIJA RAKA JAJNIKA

Liječenje raka jajnika može se podijeliti u dvije kategorije – lokalno i sistemsko. Lokalno liječenje uključuje operaciju i rjeđe radioterapiju. Sistemsko liječenje uključuje kemoterapiju, hormonsku i ciljanu terapiju. Tip i stadij raka jajnika, kao i cjelokupno zdravstveno stanje bolesnice, određuju koja vrsta terapije će se primijeniti.

Zlatni standard liječenja najčešćeg oblika epitelnog raka jajnika, HGSOE, je operativno uklanjanje tumorske mase i eventualno zahvaćenog okolnog tkiva, nakon čega slijedi šest ciklusa kemoterapije, raspoređenih svaka 3 tjedna. U posljednje vrijeme, sve više se primjenjuje i 3-4 ciklusa neoajuvantne kemoterapije u svrhu smanjenja tumorske mase prije same operacije (Berek et al., 2021). Uglavnom se za kemoterapiju koriste lijekovi na bazi platine (cisplatina i karboplatina), samostalno ili u kombinaciji s taksanima (paklitaksel ili docetaksel).

Prvi u upotrebi lijek na bazi platine bila je cisplatina (cDDP), koja je naknadno zamijenjena s manje toksičnom karboplatinom (CBP) (Marchetti et al., 2021). Mehanizam ovih spojeva temelji se na ciljanju DNA. Prilikom ulaska u stanicu dolazi do hidrolize i odvajanja kloridnih skupina (cDDP) ili ciklobutandikarboksilne skupine (CBP), čime se oslobađa reaktivni kompleks. Pozitivan naboj omogućava kompleksu interakciju s nukleofilnim molekulama kao što su DNA, RNA, proteini. Ulaskom kompleksa u jezgru dolazi do alkiliranja N7 pozicije purinskih baza DNA te nastanka adukata između gvanina istog lanca ili dva lanca DNA. Adukti nastali između dva lanca DNA uzrokuju najveću toksičnost jer sprječavaju replikaciju DNA, što rezultira nakupljanjem stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa i indukcijom apoptoze (Slika 3). Ovi spojevi eliminiraju se iz organizma renalnom ekskrecijom, zbog čega je nefrotoksičnost veliki problem terapije (Sousa et al., 2014; Tian et al., 2021).

Paklitaksel (TAX), koji spada u skupinu taksana, najčešće se koristi uz karboplatinu prilikom liječenja HGSOE-a. Ova dva lijeka kombiniraju se zbog različitog mehanizma djelovanja, u svrhu poboljšanja uspješnosti terapije. TAX se veže za podjedinicu tubulina  $\beta$ , koji zajedno s tubulinom  $\alpha$  izgrađuje mikrotubule (Slika 3). Njegovo vezanje dovodi do inhibicije depolimerizacije odnosno do stabilizacije mikrotubula čime je onemogućena dioba stanice (zastoj u G2/M fazi ciklusa) i stanica ulazi u apoptozu. Također, narušavanje dinamike mikrotubula ometa prijenos proteina, na primjer transkripcijskih faktor, iz citoplazme do jezgre (Nawara et al., 2021; Tian et al., 2021).



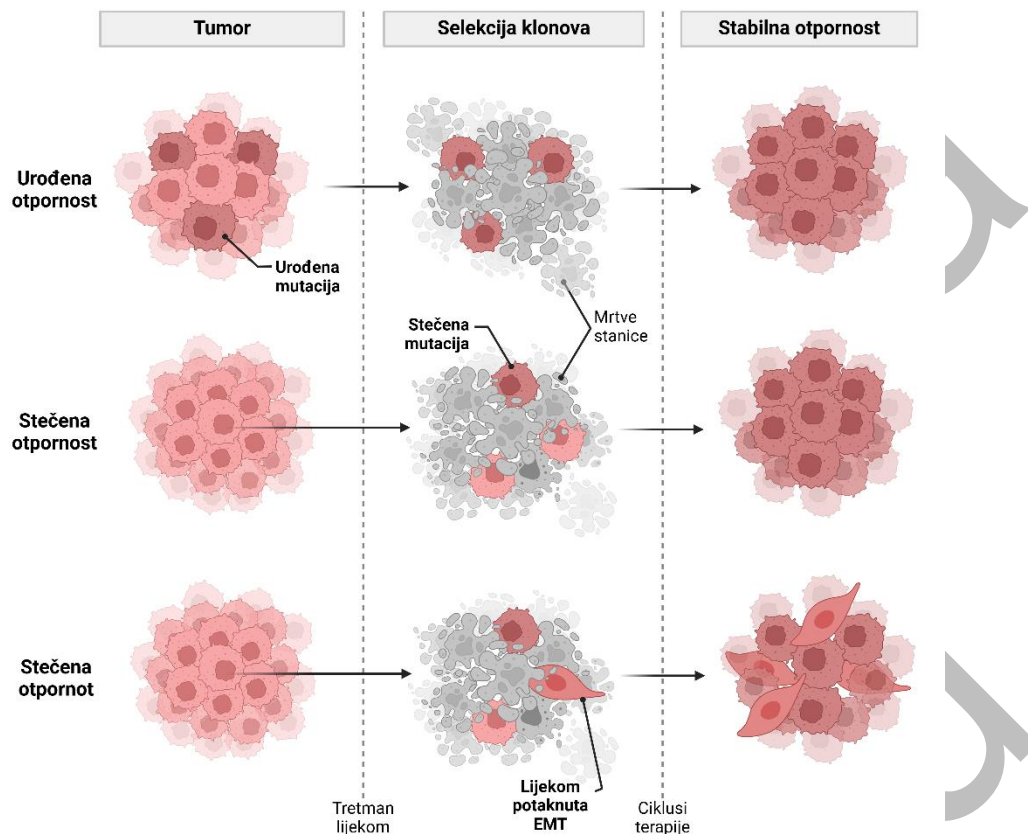
**Slika 3. Usporedba mehanizma djelovanja lijekova na bazi platine i paklitaksela.** Toksičnost cisplatine (cDDP) i karboplatine (CBP) se prvenstveno temelji na njihovom ulasku u jezgru gdje tvore Pt-DNA adukte između gvanina jednog ili dva lanca DNA. Glavna meta paklitaksela (TAX) je β-tubulin, čime se inhibira depolimerizacija mikrotubula (Tian et al., 2021). Ilustracija je napravljena u programu BioRender.

U posljednje vrijeme, u liječenju raka jajnika koristi se i ciljana terapija. Inhibitori PARP-a, enzima koji ima ulogu u popravku izrezivanjem baza kojim se uklanjaju jednolančani lomovi DNA, olaparib (Lynparza), niraparib (Zejula) i rucaparib (Rubraca) odobreni su od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (*engl. US Food and Drug Administration, FDA*) za tretman raka jajnika kod bolesnica s potvrđenom mutacijom gena *BRCA1/2*. Nadalje, 2014. godine odobren je bevacizumab (Avastin), monoklono protutijelo koje cilja vaskularni endotelni faktor rasta

(VEGF), za tretman tumora jajnika otpornih na spojeve na bazi platine. Vežanjem za VEGF onemogućava njegovo vežanje na receptor VEGFR, čime se sprječava proliferacija endotelnih stanica i angiogeneza, proces stvaranja novih krvnih žila potrebnih za rast tumora. Zbog mogućih težih nuspojava (hipertenzija, oštećenja bubrega, krvarenje, perforacije crijeva) potreban je valjan probir bolesnica koje bi uistinu profitirale uvođenjem bevacizumaba kao dopunske terapije. Drugi inhibitori angiogeneze koji se istražuju za terapiju EOC su pazopanib i nintedanib (Govindarajan et al., 2020; Marchetti et al., 2021). Iz smjernica Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje vidljivo je da se u Hrvatskoj koriste olaparib, niraparib i bevacizumab.

### **1.3. OTPORNOST NA TERAPIJU**

Iako više od dvije trećine bolesnica odgovori pozitivno na prvu liniju terapije, kod 80% njih bolest se vraća u roku od 3 godine i najčešće je otporna na terapiju. Kad se govori o otpornosti na kemoterapiju, ona može biti urođena i stečena (Slika 4). Urođena otpornost podrazumijeva da određene stanice heterogene tumorske mase već nose mutacije, nastale tijekom karcinogeneze, koje im omogućuju preživljenje terapije i obnovu populacije po prestanku terapije. Stečena otpornost podrazumijeva nastanak mutacija uslijed pritiska terapije, koje onda stanicama omogućue preživljenje. Urođena otpornost odgovorna je za primarno negativan odgovor na terapiju, dok se stečena povezuje s ponovnom pojavom tumora (relaps). U zadnje vrijeme uz stečenu otpornost se veže lijekom-potaknuta epitelno-mezenhimska tranzicija prilikom koje stanice gube epitelna svojstva, a poprimaju svojstva stanica mezenhima, odnosno postaju migratorne. Nadalje, uočeno je da takve stanice ujedno postaju manje osjetljive na terapiju (Brozovic, 2017). Ovaj proces zapravo rezultira otpornim metastazama (Marchetti et al., 2021; Stordal et al., 2007).



**Slika 4. Tipovi otpornosti stanica tumora na kemoterapiju.** Ilustracija je napravljena u programu BioRender.

### 1.3.1. Mehanizmi otpornosti na lijekove na bazi platine i taksane

Različiti mehanizmi otpornosti opisani su za lijekove na bazi platine i taksane. U njih spadaju promjene u prijenosu lijeka u/van stanice, aktivacije i metabolizma lijeka, ciljnih molekula lijeka, popravka oštećenja DNA, promjene u regulaciji staničnog ciklusa i stanične smrti. Razumijevanje ovih mehanizama ključno je za razvoj strategija za prevladavanje otpornosti i poboljšanje učinkovitosti karboplatine i paklitaksela u terapiji raka jajnika.

Smanjena ekspresija pumpi odgovornih za unos lijeka, odnosno povećana ekspresija pumpi za izbacivanje lijeka izvan stanice zabilježena je kod tumorskih stanica otpornih na terapiju. Smanjena ekspresija pumpe za unos bakra CTR1 (*engl. copper transporter 1; SLC31A1*) povezana je s otpornosti na cisplatinu (Holzer & Howell, 2006). S druge strane, povećana ekspresija pumpi

ATP7A (*engl. adenosine triphosphate copper transporter  $\alpha$* ) i ATP7B (*engl. adenosine triphosphate copper transporter  $\beta$* ), odgovornih za izbacivanje lijeka van stanice, uključena je u otpornost na cDDP (Calandrini et al., 2014). Jedna od glavnih prepreka kemoterapiji je prekomjerna ekspresija pripadnika superobitelji transportera ABC (*engl. ATP-binding cassette*) koji su odgovorni za izbacivanje lijekova iz stanica te su povezani s otpornosti stanica raka na više kemoterapeutika različitog mehanizma djelovanja (*engl. multidrug resistance*, MDR) (Assaraf et al., 2019; Szakács et al., 2006). Tako je povećana ekspresija proteina MRP2 (*engl. Multidrug resistance associated protein 2*; gen *ABCC2*), povezana s otpornosti na cDDP (Valinezhad Sani et al., 2020). Nadalje, povećana ekspresija P-glikoproteina (P-gp, MDR1, gen *ABCB1*) uključena je u otpornost raka jajnika na TAX (Maloney et al., 2020), a povećana ekspresija proteina BCRP (*engl. breast cancer resistance protein*, gen *ABCG2*) u otpornost na cDDP i TAX (Chen et al., 2014).

Unutar stanice, lijekovi dolaze u kontakt s različitim molekulama koje mogu utjecati na njihovu aktivnost. Enzimi citokrom P450 (CYP) odgovorni su za razgradnju više od 60% lijekova. Tako je TAX prvenstveno metaboliziran od strane CYP3A4 i CYP2C8 te njihova povećana ekspresija doprinosi otpornosti raka jajnika na TAX (van Eijk et al., 2019). Što se tiče lijekova na bazi platine, povećana ekspresija glutation-S-transferaze (GST) pospješuje konjugaciju cDDP na glutation i posljedičnu inaktivaciju, te na taj način doprinosi otpornosti tumora na lijek (Brozovic et al., 2010; Pan et al., 2018).

Osjetljivost stanica raka na DNA-alkilirajuće spojeve, kao što su cDDP i CBP, smanjuje se što je bolje prepoznavanje te popravak oštećenja DNA. Drugim riječima, što bolje stanica može popraviti DNA, manja je vjerojatnost za uspješnost kemoterapije. Mutacije u genima popravka homolognom rekombinacijom (*engl. homologous recombination repair*, HRR) *BRCA1/2*, *RAD51*, *ATM*, *ATR* i *Chk2* zabilježene su u 30% slučajeva HGSOE. Posljedično, zbog poremećenog popravka DNA, takav rak jajnika osjetljiv je na terapiju lijekovima na bazi platine (Frey & Pothuri, 2017; Konstantinopoulos et al., 2015). Međutim, i kod bolesnica s mutiranim *BRCA* može doći do razvoja otpornosti reverznom mutacijom gena ili povećanjem ekspresije *BRCA1* preko smanjenja metilacije promotora (Cho & Shih, 2009; Patch et al., 2015). Također, pojačana aktivnost proteina koji sudjeluju u popravku izrezivanjem nukleotida (*engl. nucleotide excision repair*, NER), poput ERCC1 (*engl. excision repair cross-complementation group 1*), poboljšava sposobnost stanica



raka da poprave adukte DNA (unutar istog lanca) uzrokovane karboplatinom, te smanjuje njenu učinkovitost (Assaraf et al., 2019; Steffensen et al., 2009).

Promjene u molekulama koje lijek cilja mogu utjecati na osjetljivost stanica raka na terapiju. Mutacije veznog mjesta za TAX na  $\beta$ I tubulinu npr. (Borisy et al., 2016) ili promjene dinamike mikrotubula, povećanjem ekspresije  $\beta$ III tubulina koji ima smanjeni afinitet vezanja TAX (C.-P. H. Yang et al., 2016), smanjuju efikasnost terapije.

Promjene u regulaciji staničnog ciklusa, kako bi se izbjegle kontrolne točke, također su zabilježene u tumorima otpornim na terapiju. Smanjenje ekspresije ciklina B i proteina BUB1, čime se sprječava zastoj mitoze, zabilježeno je kod raka jajnika otpornog na TAX (Maloney et al., 2020). Nadalje, izbjegavanje stanične smrti, apoptoze, povećanjem ekspresije protu-apoptotskih proteina kao što su Bcl-2 i Bcl-XL, te smanjenjem ekspresije pro-apoptotskih proteina BAX i BAK dijeljeni je mehanizam otpornosti lijekova na bazi platine i paklitaksela (Maloney et al., 2020; Marchetti et al., 2021).

Uz navedene mehanizme otpornosti, dodatno je prepoznata uloga epitelno-mezenhimske tranzicije i mikroRNA (miRNA) u otpornosti tumora na lijek, što je opisano u zasebnim poglavljima.

#### **1.4. EPITELNO-MEZENHIMSKA TRANZICIJA**

Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) reverzibilan je proces u kojem stanice epitela gube epitelna i poprimaju mezenhimska svojstva. Stanice gube apikalno-bazalnu polarnost, slabe čvrste veze između stanica i veze s bazalnom membranom, dolazi do reorganizacije citoskeleta, stanice postaju pokretljivije i invazivnije, otporne na apoptozu i anoikis, te luče enzime za razgradnju izvanstaničnog matriksa (matriks metaloproteinaze, MMP). Gubitak E-kadherina uz smanjenu ekspresiju epitelnih proteina kao što su citokeratini i kladini, te povećana ekspresija mezenhimalnih biljega vimentina, fibronektina i N-kadherina neke su od značajki EMT.

EMT je reguliran složenom mrežom signalnih putova i transkripcijskih faktora. Neki od signalnih putova s prepoznatom ulogom u EMT su TGF- $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -katenin, Notch, Hedgehog (J. Yang et al., 2020). Njihova aktivacija vodi do regulacije transkripcije gena potrebnih za EMT, reorganizaciju citoskeleta i pokretljivost stanica. Krovni transkripcijski faktori koji reguliraju EMT kroz kontrolu

izmeđustaničnih veza, migracije i razgradnju izvanstaničnog matriksa su iz obitelji Snail (Snai1/Snail and Snai2/Slug), Zeb (Zeb1 i Zeb2) i Twist (Twist1) (J. Yang et al., 2020). Snail i Zeb direktno vežu E-kadherin, dok Twist indirektno regulira njegovu ekspresiju (Lamouille et al., 2014). Uz navedeno, mikroRNA su također prepoznate kao regulatori EMT. Najbolje istražene su miRNA iz obitelji miR-200 koje, između ostalog, reguliraju ekspresiju *ZEB* (Brozovic et al., 2015).

EMT se može kategorizirati u tri glavna tipa. Tip 1 javlja se tijekom embriogeneze i ključan je u organogenezi prilikom formiranja različitih tkiva i organa. Ova vrsta EMT-a normalan je fiziološki proces koji je strogo reguliran. Tako tijekom ranog razvoja, EMT omogućuje formiranje primarnog mezenhima iz kojeg nastaje mezoderm. Ovaj proces je ključan za gastrulaciju, formiranje neuralnog grebena i razvoj srca, bubrega i drugih organa. Također, EMT Tip 1 omogućuje diferencijaciju stanica u različite vrste tkiva potrebne za pravilno formiranje tjelesne strukture. Tip 2 povezan je sa zacjeljivanjem rana, regeneracijom tkiva i fibrozom. Nakon ozljede, epitelne stanice prolaze EMT kako bi postale mezenhimalne stanice, koje migriraju na mjesto rane, proliferiraju i proizvode komponente izvanstaničnog matriksa koje pomažu u obnovi tkiva. Kod kronične ozljede ili upale, dugotrajan EMT može dovesti do prekomjernog nakupljanja mezenhimalnih stanica i izvanstaničnog matriksa, što rezultira fibrozom tkiva (plućna fibroza, ciroza jetre i bubrežna fibroza). Tip 3 javlja se u kontekstu raka i povezan je s progresijom tumora, invazijom i metastazama. Ova vrsta EMT-a omogućuje stanicama raka diseminaciju iz primarnog tumora i uspostavu sekundarnih tumora na udaljenim mjestima. Zamjenom epitelnih s mezenhimskim svojstvima, stanice stječu migratornu i invazivnu sposobnost, što im omogućuje prodiranje kroz bazalnu membranu i invadiranje okolnog tkiva. Nakon invazije, stanice ulaze u krvotok ili limfni sustav i putuju do udaljenih organa. Na tim sekundarnim mjestima, mezenhimalne stanice raka prolaze reverzni proces, MET, kako bi formirale metastatske kolonije. Također, EMT daje stanicama raka osobine slične matičnim stanicama (*engl. cancer stem cell, CSC*), doprinoseći heterogenosti tumora, otpornosti na terapiju i sposobnosti iniciranja novih tumora (Brozovic, 2017; J. Yang et al., 2020).

### 1.4.1. EMT i otpornost na kemoterapiju

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) sve se više prepoznaje kao ključni čimbenik u razvoju otpornosti na kemoterapiju. Tako na primjer EMT može povećati ekspresiju pumpi ABC, kao što je P-gp, koje aktivno izbacuju kemoterapeutike iz stanica raka, smanjujući njihovu unutarstaničnu koncentraciju i učinkovitost. Nadalje, stanice koje prolaze kroz EMT često pokazuju pojačanu sposobnost popravka oštećenja DNA izazvanih kemoterapijom. EMT je također povezan s aktivacijom različitih protu-apoptotskih putova. Transkripcijski faktori kao što su Snail, Slug i Twist, koji pokreću EMT, također mogu povećati ekspresiju protu-apoptotskih proteina (npr. Bcl-2, Bcl-xL), čime sprječavaju smrt stanica izazvanu kemoterapijom. EMT može stanicama raka dati svojstva slična matičnim stanicama, što dovodi do pojave subpopulacije stanica sličnih matičnim stanicama (*engl. cancer stem cells, CSC*). CSC su inherentno otpornije na kemoterapiju zbog svoje dormantne prirode (smanjena stopa proliferacije), učinkovitih mehanizama popravka DNA i visoke ekspresije pumpi za izbacivanje lijekova. Te stanice mogu preživjeti kemoterapiju i obnoviti populaciju tumorskih stanica (Phi et al., 2018; Shibue & Weinberg, 2017).

Sve je više prepoznat i pojam lijekom-potaknute EMT (Slika 4), procesa u kojem izloženost određenim lijekovima, kemoterapeutcima, potiče EMT u stanicama raka. Ovaj fenomen doprinosi otpornosti na lijekove i progresiji raka (Brozovic, 2017). Ova pojava opisana je i u slučaju raka jajnika. Tako stanice OVCAR-3/TP otporne na TAX i križno otporne na CBP pokazuju mezenhimske karakteristike u odnosu na roditeljske stanice OVCAR-3 (Brozovic et al., 2015). Također, i kod stanica adenokarcinoma jajnika otpornih na cisplatinu A2780cis zabilježen je EMT, kroz povećanu ekspresiju Snail, Slug i vimentina te smanjenu ekspresiju E-kadherina u odnosu na roditeljske stanice (Haslehurst et al., 2012). EMT je pokazan i u slučaju sferoida stanica OVCAR-8R otpornih na cisplatinu (Chowanadisai et al., 2016).

Usprkos brojnim istraživanjima koja pokazuju vezu između EMT i otpornosti na terapiju, još uvijek nije potpuno razjašnjeno jesu li ovi procesi ovisni jedan o drugom ili se radi o dva procesa koja se odvijaju paralelno unutar stanica raka.

## 1.5. MikroRNA

MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće RNA veličine 18-25 nukleotida (nt) koje sudjeluju u post-transkripcijskoj regulaciji ekspresije gena, kontroliranjem procesa prevođenja (translacije) mRNA u proteine, direktnim vezanjem na 3' UTR (*engl. untranslated region*) kraj ciljane mRNA (He & Hannon, 2004; Mendell, 2005). Trenutno je u bazi miRWalk zabilježeno 2656 ljudskih, zrelih sekvenci miRNA (Sticht et al., 2018). Procijenjeno je da miRNA reguliraju oko 60-70% ljudskog genoma, te su uključene u regulaciju procesa proliferacije, diferencijacije, apoptoze. Neke miRNA su vrlo specifične, ciljajući pojedinačne gene, dok druge djeluju kao krovni regulatori, utječući na cijele mreže gena i signalnih puteve. Također, mnoge miRNA rade zajedno u svrhu precizne regulacije ekspresije gena. Tako se nekoliko miRNA može vezati na različita mjesta na jednoj mRNA ili različite miRNA mogu ciljati više komponenti istog puta. Ova kooperativna regulacija osigurava robusnu kontrolu ključnih bioloških procesa (Esteller, 2011).

### 1.5.1. Biogeneza i funkcija miRNA

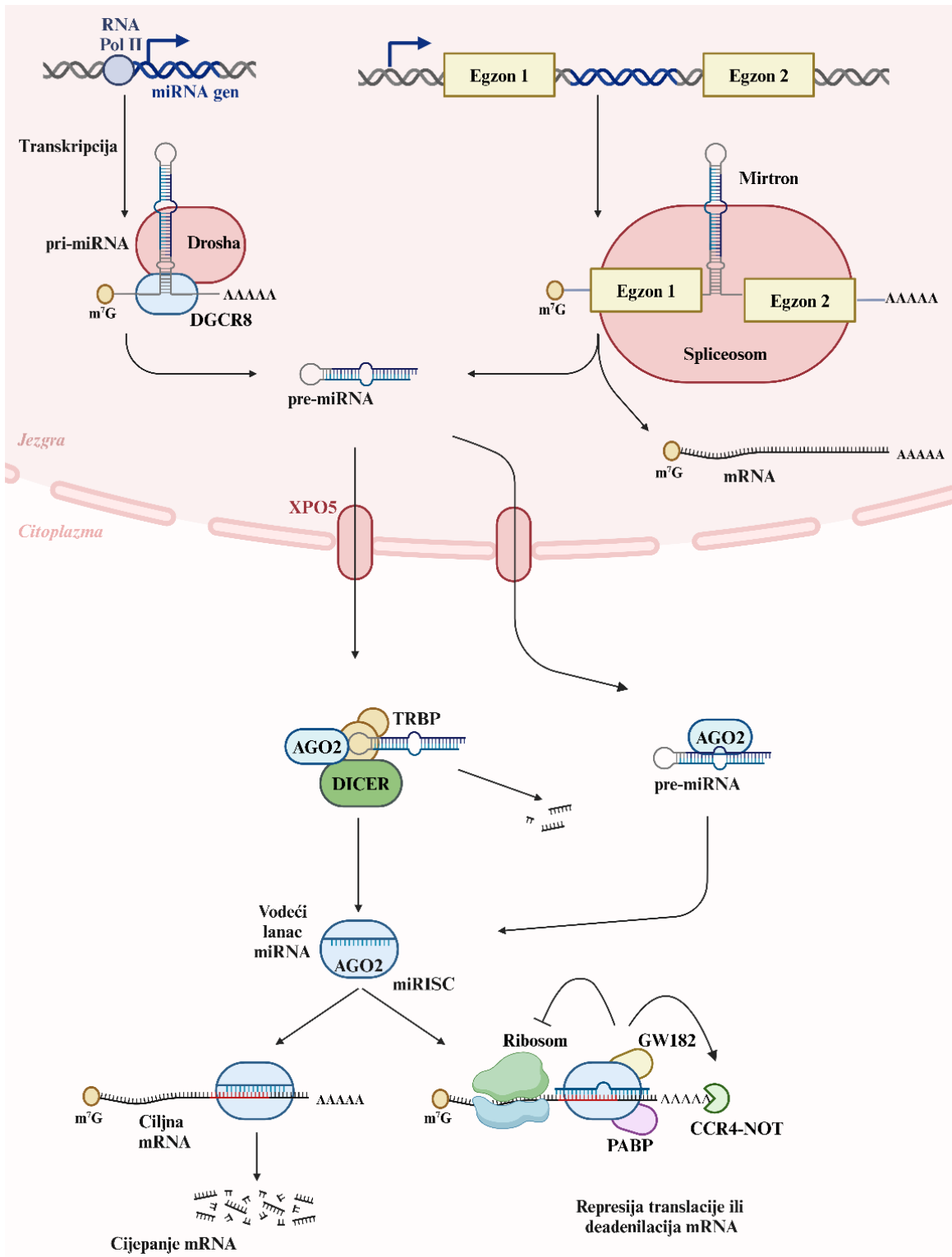
Biogeneza miRNA odvija se u nekoliko koraka kroz kanonski (*engl. canonical*) ili nekanonski (*engl. non-canonical*) put (slika 6). Kanonski put koriste miRNA koje su pozicionirane između gena (intergenske) te su pod kontrolom vlastitog promotora. Prepisivanje gena miRNA vrši RNA polimeraza II. Nastala pri-miRNA ima m<sup>7</sup>G kapu (*engl. 5'-terminal 7-methylguanosine*) na koju se nastavlja struktura slična ukosnici s trupom od 32 nt nesavršenog sparivanja, te 3' poli(A) rep. Pri-miRNA ukosnicu pri bazi cijepa enzima endonukleaze III Drosha uz pomoć RNA-vezujućeg proteina DGCR8 (*engl. DiGeorge Syndrome Critical Region 8*). Rezultat je pre-miRNA (prekursor miRNA) dugačka oko 70 nt s 3' visećim krajem dužine 2 nt. Viseći kraj prepoznaje eksportin 5 (*engl. exportin 5, XPO5*) koju prenosi pre-miRNA iz jezgre u citoplazmu. Tamo kompleks endonukleaze III Dicer, proteina Ago2 (*engl. Argonaute protein 2*) i TRBP (*engl. transactivation-responsive RNA-binding protein*) cijepa pre-miRNA u dvolančanu miRNA dugačku oko 22 nt. Ovisno o tome radi li se o lancu nastalom s 5' kraja ili 3' kraja pre-miRNA, razlikuju se lanac 5p i 3p. Odluka o tome koji lanac će biti vodeći (*engl. guide strand*), a koji sporedan, naknadno razgradiv (*engl. passenger strand*), varira ovisno o vrsti stanice ili staničnom okruženju, krećući

se od gotovo jednakih proporcija do pretežno jednog ili drugog. Vodeći lanac s AGO2 čini kompleks miRISC (*engl. miRNA-induced silencing complex*). Pomoću komplementarnosti regije 'seed' lanca miRNA, veličine 6-8 nt, smještene blizu 5' kraja, kompleks prepoznaje ciljnu mRNA. Najčešće se radi o vezanju na 3' UTR regiju mRNA, iako moguća su vezanja i na 5' UTR te kodirajuću regiju CDS (*engl. coding sequence*). Stupanj komplementarnosti sparivanja regije 'seed' lanca miRNA i ciljne mRNA određuje o sudbini mRNA. Ukoliko je sparivanje savršeno, što je uglavnom slučaj u biljaka, ciljna mRNA se cijepa. Kod nesavršenog sparivanja, kompleks miRISC zajedno s GW182 i PABP vrši represiju translacije ili deadenilaciju pomoću deadenilaze CCR4-NOT, uklanjanje kape m<sup>7</sup>G (kompleks DCP1-DCP2) i degradaciju ciljne mRNA (egzoribonukleaza XRN1) (J. O'Brien et al., 2018; Schmitz et al., 2022). Upravo zbog mogućnosti nesavršenog sparivanja, pojedina miRNA može regulirati mnogo različitih ciljnih mRNA (Adams et al., 2014).

Valja napomenuti da, osim pojedinačnih intergenskih i intragenskih, geni za miRNA mogu biti grupirani u klasterne.

Alternativni put biogeneze miRNA, nekanonski, može biti neovisan o Drosha/DGCR8 i neovisan o Dicer. Nekanonski put neovisan o kompleksu Drosha/DGCR8 koriste miRNA koje su u genome pozicionirane unutar gena (gen domaćin) (intra genske miRNA), između egzona odnosno unutar introna gena (oko 30% miRNA). Prepisivanje ovakvih miRNA pod kontrolom je promotora gena domaćina. Pre-miRNA nastaje splicingom iz introna mRNA (mirtrona) te dalje slijedi gore opisani put. Kod puta neovisnog o Dicer, nakon uobičajenog procesiranja u jezgri, pre-miRNA u citoplazmi ne cijepa Dicer, već katalitički centar proteina Ago2 (Lin & Gregory, 2015; J. O'Brien et al., 2018; Schmitz et al., 2022).

Osim gore opisanog mehanizma, koji se uzima kao zlatni standard djelovanja miRNA, novija istraživanja otkrivaju da je regulacija od strane ovih malih nekodirajućih RNA još složenija. Naime, pokazano je da miRNA mogu translocirati u jezgru gdje, kroz interakciju s promotorom, aktiviraju ekspresiju ciljnih gena, odstupajući tako od paradigme negativne regulacije (J. O'Brien et al., 2018; Xiao et al., 2016).



Slika 6. Biogeneza miRNA. Ilustracija je napravljena u programu BioRender, prema (Schmitz et al., 2022).

### 1.5.2. Uloga miRNA u karcinogenezi i odgovoru na terapiju

U prošla dva desetljeća zabilježene su brojne promjene ekspresije miRNA u različitim malignim stanjima. Mehanizmi uključuju kromosomske aberacije, promjene u regulaciji transkripcije, epigenetske promjene i mutacije sastavnica puta biogeneze. S obzirom na promjenu ekspresije miRNA (povišena ili snižena) te funkciju njihovih ciljnih gena, miRNA se klasificiraju kao onkogene (onkomiri) ili tumor-supresivne. Promjene u ekspresiji miRNA omogućuju stanicama raka povećanu proliferaciju, izbjegavanje apoptoze, invaziju, migraciju, otpornost na terapiju (Schmitz et al., 2022).

Gubitak gena za klaster miR-15a/16-1 na kromosomu 13q14 kod B-stanične kronične limfocitne leukemije prva je promjena ekspresije miRNA povezana s rakom. Gubitak ili smanjena ekspresija ovih dviju miRNA, koje inače kontroliraju apoptozu kroz regulaciju ekspresije *BCL-2* te se zbog toga klasificiraju kao tumor-supresorske, zabilježena je u oko 70% slučajeva ove bolesti (Calin et al., 2002; Cimmino et al., 2005). Ovo otkriće potaklo je detaljnija istraživanja uloge miRNA u malignim bolestima. Tako na primjer amplifikacija gena za klaster miR-17-92 kod B-staničnog limfoma i raka pluća, te translokacija istog kod T-stanične akutne limfoblastne leukemije povezana s povećanom ekspresijom miRNA članova klastera u ovim oboljenjima (Peng & Croce, 2016).

Promjena regulacije transkripcije gena miRNA također je uočena kod raka. Onkogen c-Myc, koji je često povišen u malignim oblicima tumora, potiče ekspresiju onkogenog klastera miR-17-92 vezanjem na njegov promotor, te na taj način suprimira ekspresiju poznatog tumor-supresora PTEN (*engl. Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10*), što rezultira abnormalnom proliferacijom stanica (Fuziwara & Kimura, 2015). S druge strane, tumor-supresor p53, često mutiran kod raka, potiče transkripciju tumor-supresivne miR-34a direktnim vezanjem promotora, što rezultira indukcijom apoptoze (Peng & Croce, 2016). Još jedan primjer je transkripcijski faktor p73 koji promovira ekspresiju miR-205 uključene u represiju nekoliko protu-apoptotskih gena iz obitelji BCL2. Deregulacija ekspresije p73 kod raka rezultira smanjenom ekspresijom miR-205, te povišenom ekspresijom BCL2, čime stanice izbjegavaju apoptozu nakon oštećenja DNA. Osim toga, miR-205 također regulira ekspresiju transportera ABC, stoga njena smanjena ekspresija rezultira povećanom ekspresijom transportera ABC. Otpornost na

genotoksične lijekove kumulativni je efekt promijenjene ekspresije osi regulacije p73/miR-205 (Alla et al., 2012).

Epigenetičke alteracije, kao što su globalna hipometiliranost genoma, hipermetiliranost promotora tumor-supresorskih gena te histonske modifikacije, poznata su karakteristika raka. MiRNA su također podložne epigenetičkim modulacijama. Jedan od najpoznatijih primjera je hipermetilacija otočića CpG u promotoru članova obitelji miR-200 koja rezultira njihovom smanjenom ekspresijom, dok se povećava ekspresija ciljnog gena ZEB1 (*engl. Zing finger E-box-binding homeobox (HOX) 1*) i ZEB2. Oni dalje suprimiraju ekspresiju E-kadherina (*CDH1*), te na taj način promoviraju EMT kod raka crijeva, pluća i dojke (Davalos et al., 2012). Još jedan primjer epigenetičkog utišavanja kroz hipermetilaciju promotora su miR-148a, miR-34b/c i miR-9, čime se promovira rast i metastaziranje tumora crijeva, glave i vrate i melanoma (Lujambio & Lowe, 2012).

Osim promjena samih miRNA, zabilježene su i promjene ekspresije većine proteina koji sudjeluju u putu biogeneze. Brojne mutacije potvrđene su kod Drosha, DGCR8, XPO5, Dicer, TRBP kod različitih tipova tumora. Ove mutacije smatraju se onkogenima pošto uzrokuju globalnu promjenu ekspresije onkogenih i tumor-supresorskih miRNA (Lin & Gregory, 2015; Schmitz et al., 2022).

Dvostruka uloga miRNA kao onkogeni i tumor-supresori u procesima vezanim za rast i progresiju tumora, metastaziranje, odgovor na terapiju ističe složenost njihove regulacije i važnost daljnjeg istraživanja.

### **1.5.3. MiRNA kao dijagnostički i prognostički farmakogenetski biljezi**

U posljednje vrijeme intenzivno se istražuje mogućnost korištenja miRNA kao farmakogenetskih biljega za ishod bolesti i uspješnost terapije. MiRNA su vrlo stabilne u tjelesnim tekućinama kao što su krv, urin i slina zbog svoje inkapsulacije u egzozomima ili zbog povezanosti s proteinima koji vežu RNA, što ih čini otpornim na aktivnost RNaza. Ova stabilnost ih čini izvrsnim kandidatima za analizu iz tekućih biopsija (Schmitz et al., 2022). Korištenje cirkulirajućih miRNA za dijagnozu i prognozu pruža mogućnost personaliziranog, redovitog praćenja napredovanja raka i odgovora na terapiju bez potrebe za invazivnim biopsijama. Razina cirkulirajuće miR-21 lako se



može pratiti tekućom biopsijom, te je njena ekspresija dosljedno povišena u krvi bolesnica s raznim vrstama raka, uključujući rak dojke, pluća i debelog crijeva. Povišene razine miR-21 povezane su s lošom prognozom, agresivnom bolešću i smanjenom stopom preživljavanja (Rhim et al., 2022). Također, profili ekspresije miRNA značajno variraju između različitih tipova tkiva i podtipova raka. Ova varijabilnost može se iskoristiti za određivanje primarnog tkiva za metastatske tumore. Osim toga, bioinformatičkim analizama dostupnih podataka i primjenom strojnog učenja (*engl. machine learning*) pokušavaju se identificirati paneli više različitih miRNA koje kontroliraju različite procese (angiogeneza, metastaziranje, otpornost na terapiju), kako bi se omogućila što točnija dijagnostika (Schmitz et al., 2022).

#### **1.5.4. Ciljana terapija sintetskim miRNA**

Uključenost miRNA u procese karcinogeneze, progresije i metastaziranja tumora čini ih zanimljivim kandidatima za ciljanu terapiju. Ovisno radi li se o onkogenoj ili tumor-supresorskoj miRNA kao meti terapije, terapija se vrši na dva različita pristupa. Ukoliko je potrebno inhibirati ekspresiju onkogene miRNA, moguće je koristiti antisense oligonukleotide, antagomire ili miRNA spužve. Ove sintetske molekule dizajnirane su tako da su komplementarne onkogenoj miRNA, te vezanjem za nju onemogućuju miRNA da se veže za Ago2. Ukoliko je potrebno nadomjestiti tumor-supresorsku miRNA čija je ekspresija potisnuta u tumoru, mogu se koristiti sekvence mimik miRNA. Međutim, kod ovakvih terapija treba imati na umu moguće neželjene efekte zbog činjenice da svaka miRNA može regulirati veliki broj gena (Schmitz et al., 2022).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je identificirati miRNA promijenjene ekspresije u novouspostavljenim linijama stanicama epitelnog raka jajnika otpornim na karboplatinu u odnosu na odgovarajuće roditeljske linije stanica i utvrditi njihovu moguću ulogu u razvoju otpornosti i/ili metastatskom potencijalu.

U tu svrhu najprije je bilo potrebno istražiti mehanizme otpornosti na karboplatinu i paklitaksel novouspostavljenih linija stanica raka jajnika. Nadalje, identificirati miRNA promijenjene ekspresije u stanicama otpornim na karboplatinu u odnosu na roditeljske stanice. Zatim, manipulacijom ekspresije promijenjenih miRNA cilj je bio istražiti njihovu moguću ulogu u razvoju otpornosti i/ili sposobnosti migracije i invazije linija stanica epitelnog raka jajnika otpornih na karboplatinu. Krajnji cilj bio je predložiti potencijalni mehanizam regulacije miRNA s lijekom potaknutih promijenjenih ekspresija kroz identifikaciju njihovih ciljnih mRNA, integrativnom analizom ekspresije miRNA i mRNA. Osim toga, cilj je bio ispitati ulogu izdvojenih miRNA kao farmakogenetskih biljega za predviđanje preživljenja bolesnica i odgovora na terapiju.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Linije stanica

U sklopu doktorske disertacije korištene su tri linije stanica epitelnog raka jajnika MES-OV, OVCAR-3 i SK-OV-3 i iz njih razvijene linije stanica otporne na karboplatinu MES-OV CBP, OVCAR-3 CBP i SK-OV-3 CBP. Stanice MES-OV uspostavljene su i donirane od strane laboratorija prof. Šikića sa Sveučilišta Stanford (SAD). Linije stanica OVCAR-3 i SK-OV-3 dobavljene su iz zbirke ATCC (*engl. American Type Culture Collection*). Porijeklo linija stanica s obzirom na vrstu tumora prikazano je u Tablici 1. Analiza STR profiliranja (Microsynth AG, Švicarska) korištena je za provjeru izvornosti roditeljskih i otpornih linija stanica.

**Tablica 1. Porijeklo linija stanica korištenih u istraživanju**

Linija stanica	ATCC	Tkivo
MES-OV	CRL-3272	cistadenokarcinom jajnika
OVCAR-3	HTB-161	adenokarcinom jajnika
SK-OV-3	HTB-77	adenokarcinom jajnika

##### 3.1.2. Lijekovi i inhibitori

Korišteni lijekovi i inhibitori s odgovarajućim otapalima i koncentracijama primarne otopine prikazani su u Tablici 2. Pripremljene otopine čuvane su pri -20 °C.

**Tablica 2. Popis korištenih lijekova i inhibitora**

Lijekovi i inhibitori	Otapalo	Koncentracija štok otopine	Proizvođač
Karboplatina (CBP)	miliQ H <sub>2</sub> O	26,94 mM	Sigma-Aldrich, SAD
Paklitaksel (TAX)	EtOH	7,03 mM	Milipore, Njemačka
5-Aza-2'-deoksicitidin (5-aza)	Octena kiselina: H <sub>2</sub> O (1:1)	100 µM	Sigma-Aldrich, SAD
Trihostatin A (TSA)	miliQ H <sub>2</sub> O	10 mM	Sigma-Aldrich, SAD
MK571	miliQ H <sub>2</sub> O	10 mM	Sigma-Aldrich, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Rad s kulturama stanica

Sve korištene linije stanica uzgajane su u McCoy modifikaciji 5A medija (Capricorn Scientific, Njemačka) s dodatkom mješavine antibiotika Pen/Strep (Gibco, SAD) (0,1%) i seruma fetusa goveda (Sigma-Aldrich, SAD) (10%). Održavane su kao jednoslojne kulture u bočicama za uzgoj stanica (Falcon® T-25 ili T-75; Corning, SAD) u inkubatoru (HERAcell 150, Heraeus, Njemačka) u kontroliranim uvjetima pri 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>.

Prilikom stavljanja u kulturu, stanice su odmrznute naglim zagrijavanjem ampule u vodenoj kupelji pri 37 °C. Sadržaj ampule potom je resuspendiran u zagrijanom mediju u bočici za uzgoj stanica. Nakon 24 h, stanicama je promijenjen medij kako bi se uklonio dimetilsulfoksid (DMSO; Gram Mol, Hrvatska) korišten prilikom smrzavanja.

Stanice su rasađivane prilikom postizanja gustoće od oko 80%, prije nego bi prekrile površinu za rast. U tu svrhu, uklanjen je medij, a stanice su isprane fosfatnim puferom (PBS; 0,2 g KCl + 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 8,0 g NaCl + 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1000 ml diH<sub>2</sub>O). Nakon ispiranja na stanice je stavljena otopina Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, SAD) koja odvaja stanice od podloge i jedne od drugih (tripsinizacija). Odvajanje stanica provjeravano je pod svjetlosnim mikroskopom.

Odvojene stanice resuspendirane su u 4x većem volumenu medija kako bi se zaustavilo djelovanje Tripsin-EDTA. Dio suspenzije stanica stavljen je u novu bočicu za uzgoj u koju se dodan i potreban volumen medija.

Za potrebe eksperimenata, točno određen broj stanica je nasaden u pločice različitih formata (pločice za uzgoj stanica sa 6, 12, 24, 96 bunarića Falcon®; Corning, SAD). Broj stanica u suspenziji je mjereno na način da je suspenzija stanica razrijeđena 50x u tekućini za brojanje stanica (IsoFlow Sheat Fluid; Beckman Coulter, SAD), a stanice su izbrojane korištenjem brojača stanica (Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer; Beckman Coulter, SAD), na temelju veličine čestica (10-20 µm). Kalkulacijom srednje vrijednosti najmanje tri brojenja i njenim množenjem s vrijednosti razrijeđenja i faktorom volumena izbrojane suspenzije stanica dobiven je broj stanica u mililitru suspenzije.

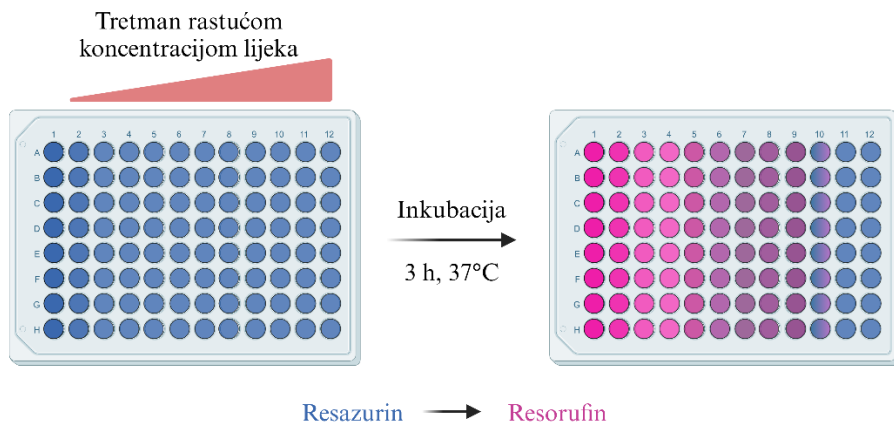
Za dugotrajno čuvanje, stanice su zamrzavane na način da je suspenzija tripsiniziranih stanica centrifugirana 10 min pri 1000 x g. Talog stanica resuspendiran je u 1 mL FBS-a i prebačen u ampulicu za zamrzavanje (Greiner bio-one, Austrija). Nakon 30 min hlađenja na ledu, u ampulu je dodano 200 µL DMSO. Ampula je potom stavljena na prsten spremnika s tekućim dušikom. Zamrznute stanice čuvane su u zamrzivaču pri -80 °C ili u tekućem dušiku pri -196 °C.

### **3.2.2. Morfološka karakterizacija kolonija stanica**

Stanice su nasadene u Petrijeve zdjelice promjera 3,5 cm (Falcon®; Corning, SAD) u koncentraciji  $1-3 \times 10^3$  stanica u 2 mL, kako bi se procijenila sposobnost pojedinačnih stanica da stvore kolonije. Nakon 10 dana, uklonjen je medij, stanice su isprane dva puta PBS-om i zatim fiksirane u metanolu 10 min. Fiksirane kolonije stanica obojane su otopinom kristal ljubičastog preko noći. Nakon ispiranja vodom i sušenja, kolonije stanica fotografirane su korištenjem svjetlosnog mikroskopa pod povećanjem 100x.

### 3.2.3. Test metabolizma resazurina

Test metabolizma resazurina (Alamar Blue) korišten je za praćenje preživljenja roditeljskih i otpornih stanica nakon tretmana lijekovima. Test se temelji na promjeni plave boje resazurin u ružičasto obojeni resorufin, što ukazuje na metaboličku aktivnost (aktivnost mitohondrijskih reduktaza) stanica (slika 7). Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića u koncentraciji  $2-5 \times 10^3$  stanica u  $180 \mu\text{L}$  medija. Dvadeset četiri sata nakon nasađivanja, stanice su ostavljene kao netretirane kontrole ili tretirane s rastućim koncentracijama lijekova (kvadriplikat za svaku koncentraciju), dodavanjem  $20 \mu\text{L}$  unaprijed pripremljenih razrjeđenja. Nakon 72 ili 120 h, uklonjen je medij s lijekovima, te je dodano  $110 \mu\text{L}$  0,1% otopine resazurina (otopina resazurina i pufera NaCl/PI u omjeru 1:1000) i medija McCoy bez fenol crvenog u omjeru 1:10. Pločice su inkubirane 3,5 h pri  $37^\circ\text{C}$  u inkubatoru. ApSORBANCija otopine u svakom bunariću očitana je na valnoj duljini od 564 nm korištenjem spektrofotometra Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd, Švicarska).



**Slika 7. Shematski prikaz testa metabolizma resazurina.**

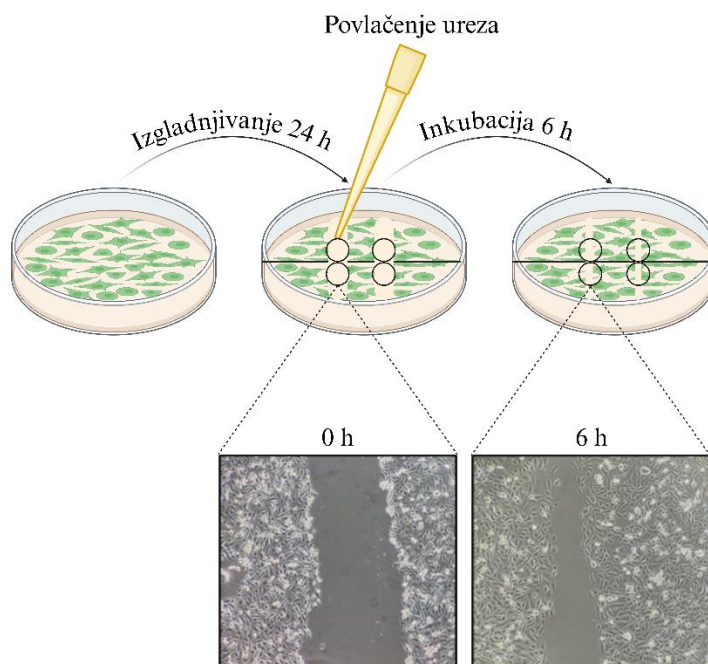
Tretirane stanice inkubiraju se otopinom plavo obojenog resazurina, koja se prilikom inkubacije, ovisno o metaboličkoj aktivnosti stanica, pretvara u ružičasto obojeni resorufin. Intenzitet ružičastog obojenja proporcionalan je preživljenju stanica.

### 3.2.4. Test preživljenja mase stanica

Test preživljenja mase stanica korišten je za procjenu preživljenja stanica nakon tretmana s epigenetičkim inhibitorima 5-Aza-2'-deoksicitidinom (5-aza) i Trihostatinom A (TSA) ili njihovom kombinacijom i CBP. Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji  $5 \times 10^4$  stanica u 2 mL medija. Nakon 24 h, stanice su ostavljene kao netretirane kontrole ili tretirane s  $1 \mu\text{M}$  5-aza,  $33,3 \text{ nM}$  TSA ili njihovom kombinacijom, bez ili s različitim koncentracijama CBP. Medij sa svježe pripremljenim inhibitorima i CBP mijenjan je svaka 24 h. Nakon 72 h, uklonjen je medij, stanice su isprane dva puta s PBS-om i fiksirane 10 min u metanolu. Fiksirane stanice obojane su otopinom kristal ljubičastog preko noći. Nakon ispiranja vodom i sušenja, pločice su skenirane (ScanMaker 5900; Microtek, Tajvan). Program ImageJ (1.52a, National Institutes of Health, SAD) je korišten za mjerenje intenziteta boje (proporcionalna pokrivenosti bunarića stanicama) i određivanje vrijednosti AUC (engl. *area under curve*), proporcionalne preživljenju.

### 3.2.5. Test zacjeljivanja rane

Test zacjeljivanja rane korišten je za ispitivanje sposobnosti migracije stanica. Stanice su nasadene u pločice s 24 bunarića kako bi nakon 24 h ili nakon završetka određenog tretmana potpuno prekrile površinu bunarića, odnosno bile konfluentne. Stanicama je uklonjen medij, a dodan je medij za izgladnjivanje (McCoy modifikacija 5A medija s 2% FBS-a). Nakon 24 h, nastavkom pipete (volumen  $20 \mu\text{L}$ ) povučeni su čvrsti urezi (rane) kako bi se uklonile stanice s podloge (slika 8). Promijenjen je medij kako bi se isprale odvojene stanice. Mjesta ureza fotografirana su odmah (0 h) i nakon 6 h korištenjem fluorescentnog svjetlosnog mikroskopa pod povećanjem 100x. Zatvaranje površine ureza nakon 6 h inkubacije, koje predstavlja stopu migracije, analizirano je i kvantificirano u programu ImageJ (National Institutes of Health, SAD).



**Slika 8. Shematski prikaz testa zacjeljivanja rana.**

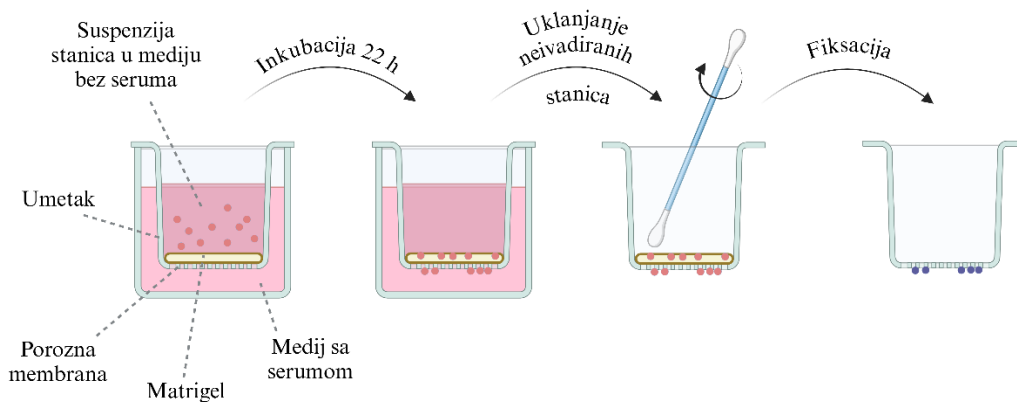
Stanice su nasadene tako da postignu potpunu konfluentnost. S donje strane bunarića povučena je s markerom horizontalna linija (crne boje), nakon čega su nastavkom pipete napravljeni urezi (rane) okomiti na liniju. Fotografije su napravljene odmah nakon uklanjanja stanica i nakon 6 h inkubacije, iznad i ispod sjecišta ureza i linije markera (krugovi crne boje).

### 3.2.6. Test invazije

Ispitivanje invazivne sposobnosti roditeljskih i otpornih stanica provedeno je testom invazije u Matrigel<sup>®</sup>-u (Corning, SAD). Potreban broj pločica s 24 bunarića i umetaka (Permabile Support for 24 Well Plate Falcon<sup>®</sup>; Falcon Becton Dickinson, SAD), nastavci za pipete i medij za izgladnjivanje ohlađeni su na 4 °C prije početka eksperimenta. Matrigel<sup>®</sup> je također postepeno otopljen pri 4 °C, nakon čega je pripravljena radna otopina, razrjeđivanjem otopine Matrigel<sup>®</sup> s ohlađenim medijem za izgladnjivanje u omjeru 1:5. Na gornju stranu umetka postavljenog u bunarić naneseo je 40 µL pripravljene otopine Matrigel<sup>®</sup>-a, te je pločica s umetcima stavljena u inkubator 4 h pri 37 °C kako bi Matrigel<sup>®</sup> polimerizirao. Stanice su tripsinizirane i resuspendirane



u mediju za izgladnjivanje. U umetke je dodan 1 mL suspenzije stanica pripremljene u koncentraciji  $1 \times 10^5$  stanica u mL, dok je u bunariće dodan 1 mL medija s 10% FBS-a. Na taj način stvoren je koncentracijski gradijent koji potiče kretanje stanica iz područja niske koncentracije FBS-a (umetak) u područje više koncentracije (bunarić) (slika 9). Da bi to postigle, stanice moraju imati sposobnost razgradnje izvanstaničnog matriksa (Matrigel<sup>®</sup>) i migracije kroz poroznu membranu na dnu umetka. Nakon inkubacije od 22 h, stanice koje nisu invadirale pokupljene su s pamučnim štapićem s gornje strane umetka zajedno s ostatkom Matrigel<sup>®</sup>-a. Stanice koje su invadirale kroz Matrigel<sup>®</sup> i prošle kroz membranu na donju stranu umetka isprane su 2x u PBS-u. Stanice su fiksirane 2 min u 3,7% otopini paraformaldehida (PFA), isprane 2x u PBS-u, te fiksirane 20 min u metanolu. Nakon još jednog ispiranja u PBS-u, stanice su obojane otopinom kristal ljubičastog. Nakon 30 min, umetak je ispran vodom, te su stanice fotografirane pod svjetlosnim mikroskopom. Prekrivenost membrane stanicama koje su invadirale kvantificirana je korištenjem programa ImageJ.



**Slika 9. Shematski prikaz testa invazije.**

Test invazije temelji se na koncentracijskom gradijentu između otopine u umetku i otopine u bunariću. Stanice sa sposobnošću invazije uspješno će razgraditi Matrigel na dnu umetka i proći kroz poroznu membranu kako bi došle iz medija za izgladnjivanje s nižom koncentracijom FBS-a u medij s višom koncentracijom FBS-a u bunariću.

### 3.2.7. Određivanje ukupne platinacije

Za određivanje količine platine unutar stanica nakon tretmana CBP-om, stanice su nasadene u pločice sa šest bunarića u koncentraciji  $3 \times 10^5$  stanica u 2 mL medija. Stanice su 24 h nakon nasadivanja tretirane 40, 160, 320  $\mu\text{M}$  CBP u trajanju od 4 h ili 160  $\mu\text{M}$  CBP u trajanju od 2, 4 i 6 h. Nakon završenog tretmana, medij je uklonjen, a pločice sa stanicama stavljene su na led. Stanice su dva puta isprane PBS-om, nakon čega je u svaki bunarić sa stanicama dodano 430  $\mu\text{L}$  70%  $\text{HNO}_3$ . Dodatni bunarić bez stanica korišten je kao prazna kontrola (*engl. blank*). Stanice su sastrugane iz bunarića strugačen stanica i sakupljene u epruvete za mjerenje platinacije (čuvanje na sobnoj temperaturi do idućeg koraka). Uzorci su zatim zagrijavani 2 h na 65 °C, nakon čega su centrifugirani 1 min na 1200 rpm te razrijeđeni do koncentracije 5%  $\text{HNO}_3$ . Pripremljeni uzorci čuvani su pri 4 °C do mjerenja. Mjerenje je napravljeno na spektrometru masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu (HR ICP-MS), u suradnji s laboratorijem dr.sc. Željke Fiket. Količina platine u stanici određena je pomoću relativne molekulske mase Pt i broja stanica.

### 3.2.8. Izolacija RNA iz stanica

Za izolaciju RNA korišten je komercijalno dostupan komplet AllPrep DNA/RNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, SAD). Stanice nasadene nakon određenog tretmana ili nakon 48 h su tripsinizirane, resuspendirane u mediju, centrifugirane 10 min pri 1000 x g. Tako dobiven talog resuspendiran je u PBS-u i centrifugiran pod istim uvjetima. Nakon uklanjanja supernatanta, suhi talog stanica korišten je za izolaciju ukupne RNA. Izolacija je napravljena prema protokolu proizvođača, izuzev činjenice da je prilikom izolacije korišten 96%-tni etanol kako bi se izolirala ukupna RNA. Također, prema preporuci proizvođača, tijekom izolacije je korišten komercijalno dostupan komplet RNase-Free DNase Set (Qiagen, SAD) kako bi se uklonila DNA iz uzorka. RNA je izolirana u vodi bez RNaza i čuvana pri -80 °C.

Čistoća i koncentracija izolirane RNA određena je na spektrofotometru (NanoPhotometer<sup>®</sup> N60; Implen GmbH, Njemačka). Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama 230, 260 i 280 nm, te izračunava omjere A260/280 (ukazuje na kontaminaciju proteinima, fenolom) i A260/230

(ukazuje na kontaminaciju organskim spojevima zaostalim tijekom izolacije). Izolirana RNA smatrana je čistom ukoliko je omjer A260/280 iznosio oko 2, a omjer A260/230 2,0 – 2,2.

### 3.2.9. Reverzna transkripcija (RT)

Izolirana RNA korištena je za dobivanje cDNA metodom obrnutog prepisivanja (reverzna transkripcija, RT). U tu svrhu upotrebljen je komercijalno dostupan komplet miScript II RNA Kit (Qiagen, Njemačka), odabran jer uključuje dva pufera, 5x miScript HiSpec Buffer i 5x miScript HiFlex Buffer. Za sintezu cDNA koja se koristila isključivo za provjeru ekspresije miRNA, u reakcijsku smjesu dodan je 5x miScript HiSpec Buffer. U slučaju da se cDNA koristila za istovremenu provjeru ekspresije miRNA i njihovih ciljnih gena, dodan je 5x miScript HiFlex Buffer. Reakcijska smjesa volumena 20  $\mu$ L i uvjeti reakcije napravljeni su prema uputama proizvođača (Tablica 3). Reakcija je provedena korištenjem uređaja za PCR Eppendorf Thermal Cycler (Eppendorf, Njemačka). Dobivena cDNA čuvana je pri -20 °C do korištenja.

**Tablica 3. Prikaz komponenti reakcijske smjese i uvjeti reakcije za reverznu transkripciju**

Sastav reakcijske smjese			
Komponenta	Volumen		
5x miScript HiSpec Buffer ili 5x miScript HiFlex Buffer	4 $\mu$ L		
10x miScript Nucleics Mix	2 $\mu$ L		
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 $\mu$ L		
RNA	1 $\mu$ g		
Voda bez RNaza	12 $\mu$ L – V(RNA)		
Uvjeti reakcije			
	1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus
Temperatura	37 °C	95 °C	4 °C
Trajanje	60 min	5 min	$\infty$

### 3.2.10. Profiliranje ekspresije miRNA

Profiliranje miRNA stanica MES-OV i MES-OV CBP napravljeno je u suradničkom laboratoriju prof. dr. Zorana Čuliga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Innsbrucku. Izolirana ukupna RNA (dvije nezavisne biološke replike) je korištena za sintezu cDNA (miRCURY LNA RT kit; Qiagen), prema uputama proizvođača. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu je napravljena korištenjem kompleta miRCURY LNA SYBR Green PCR (Qiagen) i prilagođenih panela početnica miRNA Human panel I+II, V5, miRCURY LNA miRNA miRNome PCR Panel (Qiagen). Izabrani paneli sadržavali su početnice za 752 miRNA za koje je poznato da su općenito više prisutne u stanici te se pretpostavlja da će kao takve vjerojatnije biti promijenjene tijekom bolesti ili se češće citiraju u literaturi. Panel II sadrži skupove primera za najvažnije miRNA koje nisu dostupne na panelu I.

Obrada podataka napravljena je u sklopu ove doktorske disertacije korištenjem programa Microsoft Office Excel. Rezultati su dobiveni kao ispis vrijednosti Ct (*engl. threshold cycle*). Prije samog izračuna relativne promjene ekspresije između stanica MES-OV i MES-OV CBP, napravljeno je pročišćavanje rezultata koje je podrazumijevalo uklanjanje onih miRNA čija ekspresija nije zabilježena u obje replike. Vrijednosti Ct zatim su normalizirane s vrijednosti Ct referentnog gena *RNU6B* ( $\Delta Ct$ ). Relativna promjena ekspresije miRNA između roditeljske i otporne linije izračunata je prema jednadžbi:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{MES-OV CBP}) - \Delta Ct(\text{MES-OV})$$

Prije izračuna srednje vrijednosti  $\Delta\Delta Ct$  dviju replika, izuzete su miRNA koje su pokazale obrnutu promjenu ekspresije između dviju replika (povećanje ekspresije u jednoj, smanjenje ekspresije u drugoj). MiRNA je smatrana promijenjenom ako je relativna promjena ekspresije između roditeljskih stanica MES-OV i otpornih stanica MES-OV CBP bila veća od 1,25. Identificirane promijenjene miRNA anotirane su na kromosome i pripojene odgovarajućim klasterima korištenjem baze miRBase (Kozomara et al., 2019).

### 3.2.11. Određivanje ekspresije miRNA/gena metodom RT-qPCR

Metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*engl. Real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) korištena je za određivanje ekspresije miRNA i gena od interesa u roditeljskim i otpornim stanicama. Ekspresija miRNA i gena detektirana je korištenjem boje SYBR<sup>®</sup> Green koja nespecifično veže dvolančanu DNA. Vrijednosti ciklusa Ct, u kojem je intenzitet fluorescencije bio dostatan da prijeđe liniju pozadinskog šuma (*engl. threshold*), analizirane su metodom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Metoda podrazumijeva normalizaciju Ct vrijednosti prema referentnom genu, te izračun relativne promjene ekspresije, prema jednadžbama:

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

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tretmana}) - \Delta Ct(\text{kontrola})$$

Korišten je komercijalno dostupan komplet miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, SAD). Analiza je provedena na uređaju za RT-qPCR 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD).

Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije korišteni za analizu ekspresije gena prikazani su u Tablici 4. Liofilizirane početnice otopljene su u vodi bez RNaza do konačne koncentracije od 100  $\mu\text{M}$  i čuvane pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do korištenja (Tablica 5). cDNA dobivena metodom reverzne transkripcije, korištenjem pufera 5x miScript HiFlex Buffer, razrijeđena je 15x u vodi bez nukleaza (Qiagen, SAD) za pripremu reakcijske smjese za RT-qPCR. Pripremljena smjesa ukupnog volumena 10  $\mu\text{L}$  pipetirana je u pločice s 96 bunarića u triplikatu za svaki gen po uzorku.

**Tablica 4. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije za analizu ekspresije gena**

Sastav reakcijske smjese		
Komponenta	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	
SYBR <sup>®</sup> Green	5	Master Mix
Početnica fw	1	
Početnica rv	1	
cDNA (razrijeđena 15x)	3	
<b>Ukupni volumen reakcije po bunariću</b>	<b>10</b>	
Uvjeti reakcije		

Broj ciklusa	1	40		1			
Korak	Početna aktivacija	Denaturacija DNA	Prianjanje početnica/ sinteza	Disocijacijska krivulja			
T/°C	95	95	60*	95	60	95	60
t/min	10:00	0:15	1:00	0:15	1:00	0:15	0:15

\*korak u kojem se bilježi jačina fluorescentnog signala

**Tablica 5. Nukleotidni sljedovi početnica korištenih za RT-qPCR**

Gene	5' – 3' smjer ( <i>forward, fw</i> )	3' – 5' smjer ( <i>reverse, rv</i> )
<i>ABCB1</i>	CGTGTCCCAGGAGCCCAT	CTGCCCTCACAATCTCTTCCTGT
<i>ABCC2</i>	GCTGGAAAGTCATCCCTCACAA	TGGAGCCCAATGGAAGCA
<i>ABCG2</i>	TTGAAGCCAAAGGCAGATGC	CTCTGACCTGCTGCTATGGCC
<i>ABL2</i>	GTGATGAGACTACTGCAGCATCC	TAGTACCTGCTGTGCCATTGGC
<i>DNMT1</i>	GATGAGAAGAAGCACAGAAGT	TCTTTGGGGGTCGTTTTGCG
<i>DNMT3A</i>	GGTGCTGTCTCTCTTTGATG	ATGCTTCTGTGTGACGCTG
<i>DNMT3B</i>	GGAAGGAGTTTGGAAATAGGG	CCAGTGCCACCAGTTTGTC
<i>GAPDH</i>	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
<i>PAK3</i>	CCAGGCTTCGCTCTATCTTCC	TCAAACCCACATGAATCGTATG
<i>PIK3R1</i>	CAGCAACCTGGCAGAATTACGA	TGACAGGATTTGGTAAGTCCAGGAG
<i>TUBB3</i>	CGAAGCCAGCAGTGTCTAAA	GCCTGGAGCTGCAATAAGAC

Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije korišteni za analizu ekspresije miRNA prikazani su u Tablici 6. Liofilizirane početnice otopljene su u 550  $\mu$ L pufera 1x TE ( 10 mM Tris, 1 mM EDTA) do konačne koncentracije od 5  $\mu$ M i čuvane pri -20 °C do korištenja (Tablica 7). cDNA dobivena metodom reverzne transkripcije, korištenjem pufera 5x miScript HiSpec Buffer, razrijeđena je 100x u vodi bez nukleaza (Qiagen, SAD) za pripremu reakcijske smjese za RT-qPCR. Pripremljena smjesa ukupnog volumena 10  $\mu$ L pipetirana je u pločice s 96 bunarića u triplikatu za svaku miRNA po uzorku.

**Tablica 6. Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije za analizu ekspresije miRNA**

Sastav reakcijske smjese								
Komponenta					Volumen (µL)			
SYBR <sup>®</sup> Green					5	Master Mix		
Specifična početnica					1			
Univerzalna početnica					1			
cDNA (razrijeđena 100x)					3			
<b>Ukupni volumen reakcije po bunariću</b>					<b>10</b>			
Uvjeti reakcije								
Broj ciklusa	1	40			1			
Korak	Početna aktivacija	Denaturacija	Prianjanje početnica	Sinteza	Disocijacijska krivulja			
T/°C	95	95	55	70*	95	55	95	60
t/min	15	0:15	0:30	0:40	0:15	1	0:15	1

\*korak u kojem se bilježi jačina fluorescentnog signala

**Tablica 7. Popis kompleta početnica miRNA korištenih za RT-qPCR**

MiRNA	Proizvođač
Hsa-miR-15a	miScript Primer Assay, Qiagen, SAD
Hsa-miR-17-5p	
Hsa-miR-18b	
Hsa-miR-31	
Hsa-miR-93	
Hsa-miR-103a-3p	
Hsa-miR-106b	
Hsa-miR-107	
Hsa-miR-183	
Hsa-miR-186	
Hsa-miR-196b	
Hsa-miR-339	
Hsa-miR-1271	
Hsa-miR-200a	
Hsa-miR-200b	
Hsa-miR-429	
Hsa-miR-200c	
Hsa-miR-141	

### 3.2.12. Izolacija ukupnih proteina

U svrhu analize ekspresije proteina na konstitutivnoj razini ili nakon tretmana, iz stanica su izolirani ukupni proteini. Stanice su tripsinizirane, resuspendirane u mediju i centrifugirane 10 min pri 1000 x g. Talog je zatim resuspendiran u PBS-u i ponovno centrifugiran. Dobiveni suhi talog stanica čuvan je pri -20 °C ili je resuspendiran u 100 µL PBS-a i soniciran na uređaju za razbijanje stanica ultrazvukom (Ultrasonic Processor; Cole Palmer, SAD) kako bi se oslobodili proteini iz stanica. Dobiveni proteinski izolat stanica čuvan je pri -20 °C.

Za odvajanje citoplazmatske i nuklearne frakcije iz svježe prikupljenog (nezamrznutog) ukupnog proteinskog izolata korišten je komercijalno dostupan komplet NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača.

### 3.2.13. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u uzorku, korišten je komercijalno dostupan komplet Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Metoda koristi BCA (*engl. bicinchoninic acid*) koji u dvostupanjskoj reakciji veže  $\text{Cu}^+$  nastao pretvorbom iz  $\text{Cu}^{2+}$  u prisutnosti proteina u alkalnim uvjetima. Vezanje rezultira formiranjem kompleksa BCA/Cu koji boje otopinu ljubičasto. Apsorbancija dobivene otopine mjerena je pri 562 nm korištenjem spektrofotometra. Analiza rezultata napravljena je u programu Microsoft Office Excel. Iz vrijednosti apsorbancija razrjeđenja standarda poznate koncentracije (albumin seruma goveda, BSA) dobivena je jednadžba pravca pomoću koje su preračunate koncentracije uzoraka. Koncentracije proteina u uzorcima ujednačene su s uzorkom najmanje koncentracije dodavanjem odgovarajućeg volumena PBS-a.



### 3.2.14. Određivanje ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i Western blot

Za određivanje relativne ekspresije proteini su prvo razdvojeni po veličini na temelju razlike u molekularnoj masi metodom denaturirajuće diskontinuirane elektroforeze u poliakrilamidnom gelu pomoću natrij dodecil sulfata (*engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Poliakrilamidni gelovi pripremljeni su netom prije korištenja prema Tablici 8. Najprije je između stakalaca izliven donji gel (gel za razdvajanje) i oprezno pokriven slojem diH<sub>2</sub>O kako bi polimerizirao. Zatim je pripremljen gornji gel (gel za sabijanje). Uklonjena je diH<sub>2</sub>O s polimeriziranog donjeg gela, a na njega je izliven gornji gel, koji je zatvoren češljicom za formiranje 10 ili 15 bunarića, ovisno o broju uzoraka. Nakon polimerizacije, stakalce s gelovima stavljeno je u kadicu za elektroforezu (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell Systems; Bio-Rad, SAD) koja je bila napunjena 1x tris-glicinski pufer (10x tris-glicinski pufer (15,1 g tris baza + 72,1 g glicin + 5 g SDS + diH<sub>2</sub>O do 1 L (pH 8,3)) razrijeđen s diH<sub>2</sub>O), te je uklonjen češljic. Uzorci proteinskih izolata pomiješani su sa 6x puferom za uzorke (1,2 g SDS + 2 mL diH<sub>2</sub>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<sub>2</sub>O do 10 mL) u omjeru 6:1 i zagrijani 5 min na 96 °C prije nanošenja na gel. U bunariće je nanošen volumen uzorka ekvivalentan koncentraciji proteina 30 μg (izračunate metodom BCA). Na gel je nanoseno i 2 μL standarda za elektroforezu PageRuler<sup>®</sup> Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) koji omogućuje vizualizaciju molekularskih masa. Elektroforeza je najprije postavljena na jakost struje 80 V 30 min, nakon čega je pojačana na 100 V. Trajanje je ovisilo o molekularnoj masi proteina od interesa.

**Tablica 8. Sastav gelova za SDS-PAGE**

Komponenta	Gel za sabijanje (5%)	Gel za razdvajanje (10%)
	Volumen (mL)	
diH <sub>2</sub> O	2,1	4,0
smjesa akrilamida/bisakrilamida (30%)	0,5	3,3
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	0,38	-
Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	-	2,5
10% SDS	0,03	0,1
10% APS	0,03	0,1
TEMED	0,003	0,006
<b>Ukupni volumen</b>	<b>3</b>	<b>10</b>

Proteini razdvojeni u poliakrilamidnom gelu su zatim preneseni na nitroceluloznu membranu Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad, SAD) korištenjem uređaja za polusuhi prijenos proteina Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, SAD) prema uputama proizvođača. Prijenos proteina odvijao se pri 1,5 V i 1,5 A u trajanju od 8 – 12 min, ovisno o molekularnoj masi proteina od interesa. Membrana je nakon prijenosa isprana puferom TBS-T (50 mL pufer 10x TBS (500 mL tris-HCl (pH 7,5) + 300 mL 5 M NaCl + 200 mL diH<sub>2</sub>O) + 450 mL diH<sub>2</sub>O + 450 µL Tween-20), nakon čega je obojana bojom Ponceau S (Sigma-Aldrich, SAD) kako bi se provjerila uspješnost prijenosa proteina i nanošenje uzoraka te olakšalo rezanje membrane, u slučaju da se na istoj membrani provjeravala ekspresija više različitih proteina. Nakon fotografiranja membrane, boja je isprana u TBS-T-u.

Membrana je zatim inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka (Roth, Njemačka) u TBS-T-u ili u 5%-tnoj otopini BSA (Macherey-Nagel, Njemačka) u TBS-T-u (ukoliko je proizvođač to naveo kao uvjet kod korištenja primarnog protutijela) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon ispiranja u TBS-T-u (3x po 5 min), membrana je inkubirana preko noći pri 4 °C u otopini primarnog protutijela pripremljenoj u određenoj koncentraciji u 5%-tnoj otopini BSA u TBS-T-u ili 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u TBS-T, prema uputama proizvođača. Korištena protutijela navedena su u Tablici 9. Sljedeći dan membrana je isprana 3x po 5 min u TBS-T-u, nakon čega je inkubirana 2 h na sobnoj temperaturi u otopini sekundarnog protutijela pripremljenoj u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u TBS-T-u. Membrana je isprana 3x po 5 min u TBS-T-u. Za detekciju signala korišten je komercijalno dostupan komplet Western Lightning™ Plus-ECL (PerkinElmer, SAD) i uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, SAD). Detektirani signali analizirani su u programu ImageJ, te je relativna promjena ekspresije proteina izračunata u programu Microsoft Office Excel.

**Tablica 9. Popis korištenih protutijela**

Protutijelo	Organizam	Razrjeđenje	Proizvođač
<b>Primarna protutijela</b>			
pan $\beta$ -tubulin, monoklonalno	miš	1:1000	Sigma-Aldrich, SAD

$\beta$ -tubulin class I, poliklonalno	zec	1:500	Antibodies.com, UK
$\beta$ -tubulin class IIA, poliklonalno	zec	1:1000	Cusabio, Kina
$\beta$ -tubulin class III, monoklonalno	miš	1:1000	Covance, SAD
$\beta$ -tubulin class IVA, poliklonalno	zec	1:1000	Cusabio, Kina
$\beta$ -tubulin class VI, poliklonalno	zec	1:1000	Cusabio, Kina
$\beta$ -tubulin class VIII, poliklonalno	zec	1:1000	Antibodies.com, UK
ERK1/2, poliklonalno	zec	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, SAD
MRE11, poliklonalno	zec	1:500	Cusabio, Kina
NBN (p95/NBS1; Ab-343), poliklonalno	zec	1:500	Cusabio, Kina
PARP-1, monoklonalno	miš	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, SAD
PCNA, monoklonalno	miš	1:1000	Abcam, UK
XRCC5, monoklonalno	zec	1:500	Cusabio, Kina
RAD50, poliklonalno	zec	1:500	Cusabio, Kina
histone H2AX, monoklonalno	zec	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD
$\gamma$ H2AX, monoklonalno	zec	1:5000	Cell Signaling Technology, SAD
E-kadherin (24E10)	zec	1:1000	
Vimentin (D21H3)	zec	1:1000	Cell Signaling Technology, SAD
N-kadherin	miš	1:1000	BD Biosciences, SAD
Fibronektin	zec	1:1000	Abcam, UK
<b>Sekundarna protutijela</b>			
HRP protu-zečje IgG (H+L), poliklonalno	koza	1:5000	Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, SAD
HRP protu-mišje IgG (H+L), poliklonalno	koza	1:10000	Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, SAD

### 3.2.15. Analiza ekspresije/lokalizacije proteina metodom imunofluorescencije

Za vizualizaciju ekspresije TUBB3 te za lokalizaciju proteina RAD50 korištena je metoda imunofluorescencije (IF). Stanice MES-OV i MES-OV CBP ( $3 \times 10^4$ ), te SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP ( $2 \times 10^4$ ) su nasadene na sterilizirana stakalca postavljena u pločice s 24 bunarića. Nakon 24 h, stanice su fiksirane 10 min hladnim metanolom ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ). Stakalca su isprana 3x u PBS-u te inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi u 3%-tnoj otopini BSA u PBS-u kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Stakalca su zatim inkubirana sat vremena na sobnoj temperaturi

u otopini primarnih protutijela pripremljenih u 5%-tnoj otopini BSA u PBS-u. Korištena protutijela navedena su u Tablici 10. Nakon ispiranja 3x u PBS-u, stakalca su inkubirana sat vremena na sobnoj temperaturi s odgovarajućom otopinom sekundarnog protutijela obilježenog fluoroforom pripremljenog u 5%-tnoj otopini BSA u PBS-u. Nakon ispiranja u PBS-u, stakalca su uklopljena u medij za uklapanje koji sadrži DAPI (Sigma-Aldrich, SAD), čime su fluorescentno obilježene jezgre stanica. Pripremljeni uzorci snimani su pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Njemačka). Snimljene slike analizirane su u programu Leica Application Suite X (LAS X; Leica Microsystems, Njemačka).

**Tablica 10. Popis korištenih protutijela**

Protutijelo	Organizam	Razrjeđenje	Proizvođač
<b>Primarna protutijela</b>			
$\beta$ -tubulin class III, monoklonalno	miš		Covance, SAD
RAD50, poliklonalno	zec		Cusabio, Kina
<b>Sekundarna protutijela</b>			
protu-mišje, Alexa Fluor 488	koza		Cell Signaling Technology, SAD
Protu-zečje, Alexa Fluor 555	magarac		Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, SAD

### 3.2.16. Integracija rezultata profiliranja miRNA i mRNA

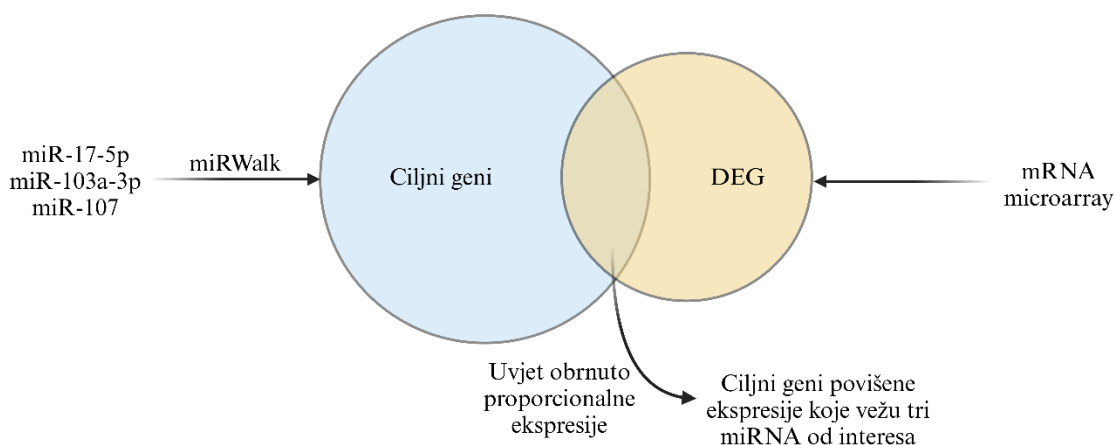
U svrhu ciljanog ispitivanja uloge miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107, najprije su pronađeni njihovi ciljni geni korištenjem online baze miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>). Pretraživanje je fokusirano na vezanje miRNA za regiju 3' UTR (*engl. untranslated region*) ciljnih mRNA, koje je najviše istraženo i zastupljeno. MiRWalk povlači podatke iz baze eksperimentalno validiranih ciljnih gena miRNA (miRTarBase) i dvije baze koje predviđaju ciljne gene prema homologiji sekvence mRNA sa 'seed' sekvencom miRNA (TargetScan i miRDB) (slika 10). Dvije prediktivne baze koriste različite algoritme za identifikaciju ciljnih mRNA što daje i različite rezultate. Dobivena lista ciljnih gena stoga je filtrirana tako da su uzeti samo oni geni koji su predviđeni kao ciljni u obje prediktivne baze i/ili eksperimentalno potvrđeni.

mirmaid	refseqid	gene symbol	start	end	number of pairings	binding region length	longest consecutive pairings	position	validated	TargetScan	miRDB
hsa-miR-17-5p	NM_181523	PIK3R1	6104	6135	20	31	9	3UTR		1	1

**Slika 10. Izvadak iz baze miRWalk na primjeru miR-17-5p i PIK3R1.**

Baza daje podatke o sparivanju 'seed' sekvence miRNA s regijom '3 UTR ciljne mRNA. Također, daje podatke da li je sparivanje eksperimentalno potvrđeno (validated) i/ili predviđeno (TargetScan, miRDB). Na ovom primjeru, gen PIK3R1 nije eksperimentalno potvrđen kao ciljani gen miR-17-5p, ali je prošao selekciju jer je predviđen kao ciljani gen prema homologiji sekvence u dvije baze.

U idućem koraku napravljen je presjek dobivene liste eksperimentalno potvrđenih i/ili predviđenih ciljnih gena s listom gena promijenjene ekspresije (*engl. Differentially expressed genes, DEG*), koji su rezultat analize ekspresije mRNA metode hibridizacije DNA mikročipova kojom je analizirano preko 21 000 gena stanica MES-OV i MES-OV CBP (Kralj et al., 2023) (slika 11). Integracija lista napravljena je u programskom jeziku Python (skriptu napisao Matej Kovač). Posljednji korak filtracije temeljio se na prihvaćenom načinu djelovanja miRNA koji podrazumijeva negativnu korelaciju ekspresije miRNA i ciljnih gena. Prema tome, krajnja lista obuhvatila je gene povišene ekspresije u MES-OV CBP u odnosu na MES-OV koji su ujedno eksperimentalno potvrđeni i/ili predviđeni ciljani geni tri miRNA snižene ekspresije u MES-OV CBP u odnosu na MES-OV.



**Slika 11. Shematski prikaz integracije rezultata profiliranja miRNA i mRNA.**

### 3.2.17. Analiza signalnih puteva

Skupna lista gena proizašla kao rezultat analize opisane u prethodnom poglavlju korištena je za analizu signalnih puteva. Korištena je baza podataka *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>) i alat unutar nje *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Vrijednost  $p < 0,05$  i minimum od tri gena pridružena određenom signalnom putu, korišteni su za filtraciju rezultata.

### 3.2.18. Prolazna promjena ekspresija miRNA i gena

Kako bi se istražila uloga miRNA i gena od interesa u otpornosti i metastatskom potencijalu stanica korištena je metoda prolazne transfekcije i transfekcijskog reagensa DharmaFECT Transfection reagent (Dharmacon, SAD).

Za kratkoročno povećanje ekspresije miRNA-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 u stanicama otpornim na CBP korištene su specifične sekvence mimik miRNA miRIDIAN microRNA Mimic uz odgovarajuću negativnu kontrolu (Horizon Discovery, UK), dok je za kratkoročnu inhibiciju ekspresije miR-103a-3p u roditeljskim stanicama korištena inhibitorna sekvenca miRIDIAN miRNA Hairpin Inhibitor uz odgovarajuću negativnu kontrolu (Horizon Discovery, UK). Za kratkoročno snižavanje ekspresije TUBB3 u stanicama otpornim na CBP korištena je mala inhibitorna molekula RNA, siRNA (*engl. small interfering*) ON-TARGETplus siRNA-SMART pool i odgovarajuća negativna kontrola (Horizon Discovery, UK). Sve molekule korištene za prolaznu transfekciju navedene su u Tablici 11. Liofilizirane forme molekula otopljene su u vodi bez RNaza (Qiagen, SAD) u koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  i čuvani pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jednak protokol korišten je za sve navedene transfekcije, prema uputama proizvođača. Ukratko, stanice su nasadene u koncentraciji  $2 \times 10^5$  stanica u 2 mL u pločice sa 6 bunarića, tako da idući dan postignu prekrivenost površine za rast od 70%. Nakon 24 h, stanicama je medij zamijenjen s 1600  $\mu\text{L}$  medija bez antibiotika, na što je dodano 400  $\mu\text{L}$  pripremljenih transfekcijskih smjesa (Tablica 12). Transfekcijske smjese priređene su u minimalnom mediju za uzgoj stanica Opti-MEM (*engl. Optimal minimum essential media*) (Gibco, SAD). Stanice su inkubirane 48 h nakon čega su sakupljene i rasađene za daljnje eksperimente.

**Tablica 11. Popis korištenih molekula.**

	<b>Kataloški broj</b>
<b>miRIDIAN microRNA Mimic</b>	
miR-17-5p	C-300485-05-0002
miR-103a-3p	C-300522-03-0002
miR-107	C-300527-03-0002
Negativna kontrola, mi(-)	CN-001000-01-05
<b>miRIDIAN miRNA Hairpin Inhibitor</b>	
miR-103a-3p	IH-300522-05-0002
Negativna kontrola, (nc)	IN-001005-01-05
<b>ON-TARGETplus siRNA-SMART pool</b>	
TUBB3	L-002000-00-0005
Negativna kontrola, si(-)	D-001810-10-20

**Tablica 12. Priprema smjese za prolaznu transfekciju korištenjem sekvenci mimik, inhibitora ili siRNA.**

<b>Otopina A</b>		<b>Otopina B</b>	
mimik/inhibitor/si (5 $\mu$ M)	10 $\mu$ L	DharmaFECT	2 $\mu$ L
Opti-MEM	190 $\mu$ L	Opti-MEM	198 $\mu$ L
Inkubacija 5 min pri sobnoj temperaturi			
Miješanje 200 $\mu$ L otopine A i 200 $\mu$ L otopine B			
Inkubacija 20 min pri sobnoj temperaturi			

Za kratkotrajno povećanje ekspresije TUBB3 u roditeljskim stanicama korišten je ekspresijski, plazmidni vektor koji nosi sekvencu *TUBB3* pCMV3-TUBB3 uz odgovarajući prazni vektor pCMV3-NCV (Sino Biological Inc., Njemačka) (Tablica 13). Liofilizirani plazmidi otopljeni su u vodi bez RNaza do koncentracije 100  $\mu$ M i čuvani pri -20 °C. Za transfekciju je korišten reagens

jetPEI<sup>®</sup> DNA Transfection reagent (Polyplus Sartorius, Francuska). Transfekcijska smjesa pripremljena je prema uputama proizvođača (Tablica 14). Ukratko, stanice su tripsinizirane te je pripremljena suspenzija u koncentraciji 2500 stanica u 180  $\mu$ L medija bez antibiotika (za jedan bunarić pločice s 96 bunarića). Pripremljena transfekcijska smjesa volumena 50  $\mu$ L dodana je u suspenziju stanica i prebačena u pločicu s 96 bunarića. Nakon 48 h inkubacije, stanice su tretirane s karboplatinom ili sakupljene za analizu ekspresije proteina metodom Western blot.

**Tablica 13. Popis korištenih plazmidnih vektora**

	Kataloški broj
pCMV3-TUBB3	HG13121-UT
pCMV3-NCV	CV-011

**Tablica 14. Priprema smjese za prolaznu transfekciju plazmidnim vektorom.**

Otopina A		Otopina B	
Plazmidna DNA	0,15 $\mu$ g	jetPEI <sup>®</sup>	0,3 $\mu$ L
150 nM NaCl	do 25 $\mu$ L	150 nM NaCl	do 25 $\mu$ L
Inkubacija 5 min pri sobnoj temperaturi			
Miješanje 25 $\mu$ L otopine A i 25 $\mu$ L otopine B			
Inkubacija 15 min pri sobnoj temperaturi			

### 3.2.19. Stabilna promjena ekspresije miRNA

Za stabilnu inhibiciju ekspresije miR-200c-3p u roditeljskim stanicama korišten je lentiviralni vektor pEZX-AM03 (GeneCopoeia, SAD) koji nosi specifični inhibitor miR-200c-3p, uz odgovarajuću negativnu kontrolu. Vektor nosi gen za crveni fluorescentni protein mCherry koji omogućava brzu vizualizaciju uspješno transduciranih stanica. Također, vektor nosi gen za otpornost na antibiotik higromicin B, čime omogućuje selekciju transduciranih stanica. Stanice su



nasadene u pločice s 24 bunarića u koncentraciji  $2 \times 10^4$  stanica po bunariću. Nakon 24 h, stanice su inficirane s lentiviralnim česticama u prisutnosti heksadimetrin bromida (Polybrene; Abbott Laboratories, SAD), nakon čega su centrifugirane 90 min brzinom 2000 rpm pri 37 °C. Stanice su ostavljene u inkubatoru nekoliko dana uz praćenje pod svjetlosnim mikroskopom te promjenom medija 24 h nakon transdukcije. Zastupljenost stanica s fluorescentnim signalom mCherry, koji potvrđuje uspješnost transdukcije, provjerena je mikroskopom EVOS FLoid (Thermo Fisher Scientific, SAD). Stanice sa stabilnom ekspresijom inhibitora selektirane su tretmanom higromicinom B (Sigma-Aldrich, SAD).

### 3.2.20. Analiza metilacije promotora

U svrhu određivanja metilacijskog statusa promotora miRNA korišten je metilacijsko-specifičan PCR (*engl. methylation specific PCR, MSP*). Stanice su tripsinizirane i sakupljene kao suhi talog koji je korišten za izolaciju DNA korištenjem komercijalno dostupnog kompleta DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, SAD), prema uputama proizvođača. Čistoća i koncentracija izolirane DNA određena je korištenjem spektrofotometra. Izolirana DNA (500 ng) korištena je za bisulfitnu konverziju, proces koji podrazumijeva deaminaciju nemetiliranih citozina u uracil u prisutnosti natrijevog bisulfita, dok metilirani citozini (5-metilcitozin) ostaju nepromijenjeni. Ishod reakcije su različite sekvence metilirane i nemetilirane DNA. Za bisulfitnu konverziju korišten je komercijalno dostupan komplet EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Njemačka) prema uputama proizvođača. Protokol se sastoji od tri koraka. Prvi korak obuhvaća pripremu reagensa i dodavanje DNA u reakciju. U drugom koraku DNA se denaturira pri visokoj temperaturi koja, uz visoku koncentraciju natrijevog bisulfita, omogućava potpunu konverziju citozina u uracil. Zadnji korak uključuje pročišćavanje i eluciju DNA. DNA je čuvana pri -20 °C do korištenja.

Bisulfitno konvertirana DNA (100 ng) korištena je za MSP. Korišten je komercijalno dostupan komplet PyroMark PCR Kit (Qiagen, SAD), prema uputama proizvođača. Dizajn početnica i optimizaciju PCR reakcije napravila je dr. sc. Vanja Tadić (Pernar Kovač, Tadić, Kralj, Milković Periša, et al., 2023). U Tablici 15 navedene su sekvence početnica korištenih za MSP s odgovarajućim temperaturama prianjanja (*engl. annealing temperature, Ta*). MSP je napravljen

na uređaju Veriti™ 96-well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD), pod uvjetima navedenim u Tablici 16.

**Tablica 15. Popis korištenih početnica i njihovih Ta za MSP.**

Počelnica	Sekvenca	Ta
103a-3p-MetF	GTCGTCGTATTGAGAAATAGTTCGT	52°C
103a-3p-MetR	TCTACGAAAACCTAAAAACCTCGAA	
103a-3p-UnMetF	GTTGTTGTATTGAGAAATAGTTTGT	50°C
103a-3p-UnMetR	TCTACAAAACCTAAAAACCTCAAA	
17-5p-MetF	CGTTTTAGAAATAAAGCGGC	42°C
17-5p-MetR	GTACAAAATTTAAAAACCGCGA	
17-5p-UnMetF	GTAAAGTGTTTTAGAAATAAAGTGGTG	50°C
17-5p-UnMetR	CATACAAAATTTAAAAACCCACAAA	
107-MetF	TGTGTAGTAGTTCGTTTATAGC	48°C
107-MetR	GACTCTACGACTACTAAATCG	
107-UnMetF	TGTGTAGTAGTTTGTTTATAGTG	54°C
107-UnMetR	CCAACCTCTACAACACTAAATC	
200b-MetF	GCGGGGTTTCGGGTTTGCGTTATC	58°C
200b-MetR	GCCCCACACAAATACGAACTCCCG	
200b-UnMetF	GTTTGTGGGGTTTGGGTTTGTGTTATT	58°C
200b-UnMetR	CACCCACACAAATACAACTCCCA	
200c-MetF	GCGTTGGTTGTTTCGGTAGGC	70°C
200c-MetR	GACAACCTTTCCCGACCCG	

200c-UnMetF	GTGTTGGTTGTTTGGTAGGT	60°C
200c-UnMetR	AACAACCTTTCCCAACCCA	

Met – metiliran; UnMet – nemetiliran; F – *forward*; R – *reverse*

**Tablica 16. Uvjeti korišteni za MSP**

Uvjeti reakcije					
Broj ciklusa	1	45			1
Korak	Početna aktivacija	Denaturacija	Prianjanje početnica	Sinteza	Završna sinteza
T/°C	95	95	Ta*	72	72
t/min	15	0:30	0:30	0:30	10

\*specifična Ta za svaku početnicu

Umnoženi produkti PCR reakcije analizirani su razdvajanjem prema težini horizontalnom elektroforezom u agaroznom gelu. U tu svrhu pripremljen je 2%-tni gel agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) s dodatkom boje Midori Green Advance DNA dye (Nippon Genetics, Japan) koja omogućava vizualizaciju kretanja DNA u gelu. Gel je izliven u odgovarajući kalup te je umetnut češljic za formiranje bunarića. Nakon polimerizacije, gel je stavljen u kadicu za elektroforezu Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD) koja je napunjena puferom 1x TAE (50x TAE (242 g tris baza, 57,1 mL ledena octena kiselina, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) u 1 L diH<sub>2</sub>O)). Uzorci su nanoseni na gel u volumenu od 10 µL, te je u dodatni bunarić nanesen marker 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, SAD). Elektroforeza je namještena na 50 V i trajanje 45 min. Razdvojena DNA vizualizirana je na uređaju Alliance 4.7 Fluorescence and Chemiluminescence Systems (Uvitec Ltd, UK).

### 3.2.21. Analiza miRNA kao farmakogenetskih biljega

Kako bi se procijenila vrijednost izdvojenih miRNA kao farmakogenetskih biljega za previđanje ukupnog preživljenja (*engl. overall survival, OS*) bolesnica, korišten je besplatno dostupan alat

*Kaplan-Meier plotter (KM plotter)* (Györfy, 2024). Prognostička vrijednost miRNA procijenjena je na ukupnom uzorku raka jajnika te na uzorcima raka jajnika s visokim udjelom mezenhimskih matičnih stanica (*engl. mesenchymal stem cells, MSC*). Rezultati su prikazani grafikonom *Kaplan-Meier*, s naznačenim vrijednostima HR (*engl. hazard ratio*) i p-vrijednosti izračunatih metodom *log-rank*. Također, prikazana je i razlika u medijanu preživljenja između ukupnog uzorka i MSC-obogaćenog uzorka. Ekspresija miRNA u različitim stadijima (I-IV) seroznog cistadenokarcinoma jajnika istražena je korištenjem besplatno dostupnog portala UALCAN (*engl. University of Alabama at Birmingham cancer data analysis portal*) i njegovog alata TCGA miRNA (Chandrashekar et al., 2022). Rezultati su prikazani grafikonom *jitter plot*, s p-vrijednostima izračunatim Studentovim t-testom.

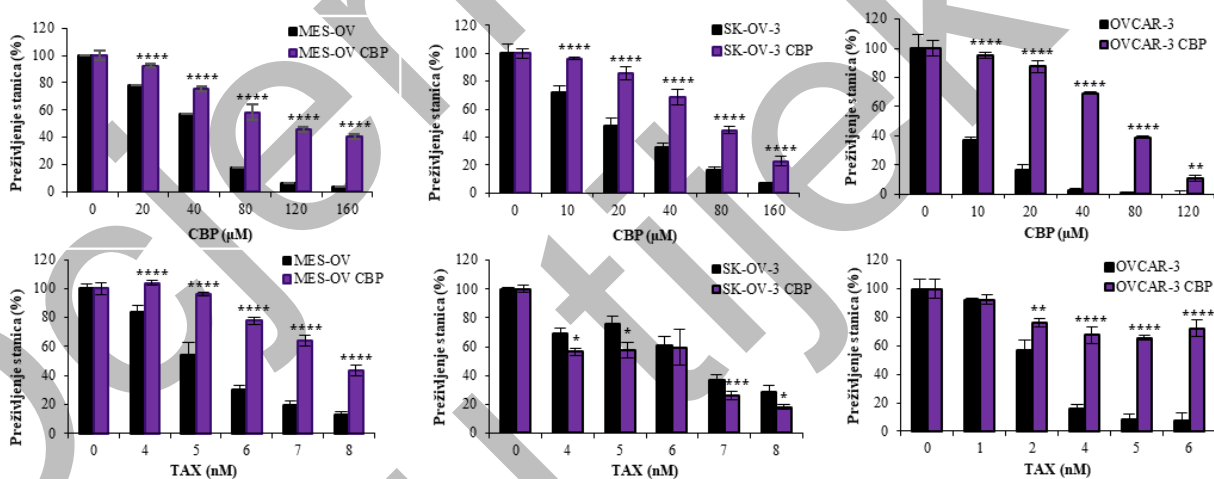
### **3.2.22. Statistička analiza**

Statistička analiza podataka provedena je u programu GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, SAD). Rezultati testova vijabilnosti stanica, gdje je rađena usporedba tri ili više uzoraka, analizirani su dvosmjernom analizom varijance (*engl. two-way analysis of variance, ANOVA*) s Bonferronijevim testovima post hoc. Rezultati dobiveni metodom qPCR, kao i rezultati testova migracije i invazije, kod kojih je rađena usporedba dvije grupe podataka, analizirani su Studentovim t-testom ili jednosmjernom analizom varijance s Dunnetovim testovima post hoc. Vrijednosti p manje od 0.05 smatrane su statistički značajnima.

## 4. REZULTATI

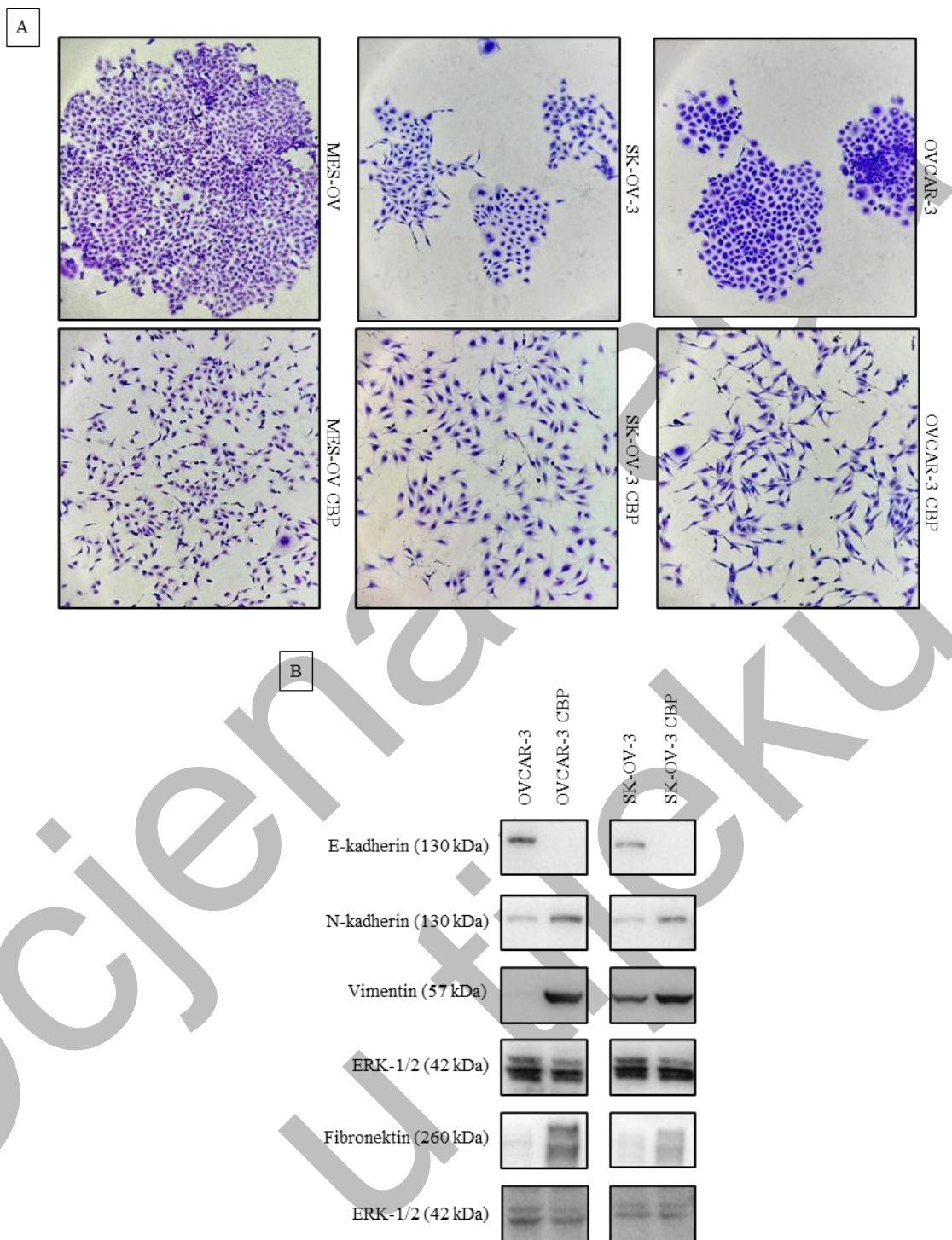
### 4.1. KARAKTERIZACIJA PAROVA STANICA MES-OV, SK-OV-3 I OVCAR-3 PREMA OSJETLJIVOSTI NA CBP I TAX I EPITELNO-MEZENHIMSKOM STATUSU

Roditeljske linije stanica epitelnog raka jajnika MES-OV, SK-OV-3 i OVCAR-3 tretirane su rastućim koncentracijama CBP u svrhu razvoja stabilno otpornih linija MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP. Preživljenje stanica nakon tretmana sa citostaticima praćeno je testom metabolizma resazurina. Proces je rezultirao stanicama MES-OV CBP 2x, SK-OV-3 CBP 3,5x i OVCAR-3 CBP 10x manje osjetljivim na CBP u odnosu na roditeljske stanice (prema vrijednosti IC<sub>50</sub>) (slika 12). Osim toga, stanice MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP razvile su i križnu otpornost na TAX, točnije pokazale su 1,6x i 4x manju osjetljivost (prema vrijednosti IC<sub>50</sub>), dok su stanice SK-OV-3 CBP ostale jednako osjetljive u odnosu na roditeljske.



**Slika 12. Preživljenje novorazvijenih stanica epitelnog raka jajnika.** Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP i TAX. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 72 sata. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadruplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$

Razvoj otpornosti bio je praćen i promjenom morfologije stanica, iz epitelnog prema fenotipu sličnom mezenhivskom. Otporne stanice poprimile su izražen izdužen oblik u odnosu na roditeljske i time postale invazivnije (Kralj et al., 2023). Ova razlika posebno je izražena između stanica OVCAR-3 i OVCAR-3 CBP, koje imaju i najveću razliku u osjetljivosti. Također, stanice više nisu imale potrebu rasta u kolonijama jasnih rubova, već su stekle mogućnost raspršenog rasta s puno više međustaničnog prostora (slika 13A). Epitelno-mezenhivska tranzicija potvrđena je promjenom ekspresije prihvaćenih markera; smanjenom ekspresijom E-kadherina i povećanom ekspresijom N-kadherina, vimentina i fibronektina (slika 13B) (Kralj et al., 2023). Mala razlika u epitelno-mezenhivskom statusu između MES-OV i MES-OV CBP posljedica je posjedovanja mezenhivskih karakteristika roditeljskih stanica usprkos njihovom epitelnom porijeklu. Promjena morfologije i EMT popraćene su s porastom migratorne i invazivne sposobnosti stanica otpornih na CBP (Kralj et al., 2023). Varijabilnost epitelno-mezenhivskog statusa, stupnja otpornosti na CBP, kao i prisutnost križne otpornosti na TAX značajne su vrijednosti ova tri eksperimentalna modela korištena u daljnjim istraživanjima.



**Slika 13. Morfološke karakteristike kolonija novorazvijenih stanica otpornih na CBP i ekspresija biljega EMT-ja.** (A) Stanice su nasadene u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm. Nakon 10 dana, kolonije stanica su fiksirane u metanolu, obojane otopinom kristal ljubičastog i fotografirane korištenjem svjetlosnog mikroskopa pod povećanjem 100x. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazana je reprezentativna fotografija. (B) Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h, nakon čega su izolirani

ukupni proteini. Određena je ekspresija E-kadherina, N-kadherina, vimentina i fibronektina metodom Western blot. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. Prikazane su molekularne težine na kojima je zabilježen signal.

## **4.2. KARAKTERIZACIJA MEHANIZAMA OTPORNOSTI NA CBP I TAX**

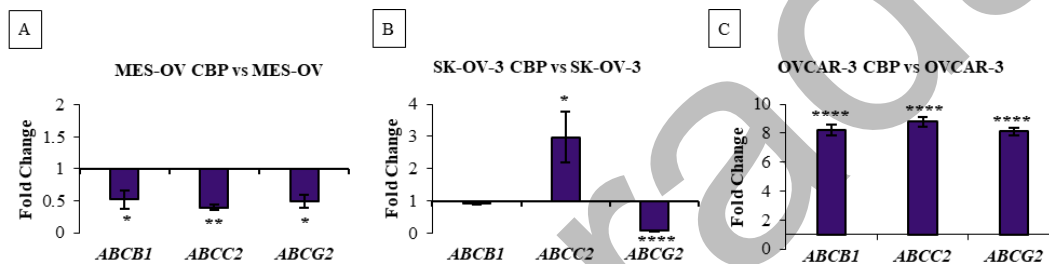
Kako bi se odredile potencijalne nove molekule s ulogom u otpornosti na CBP i lijekom potaknutom EMT-u, stanice su najprije okarakterizirane s obzirom na svoj odgovor na tretman CBP-om, odnosno TAX-olom. U svrhu toga izmjerena je ekspresija nekoliko membranskih pumpi za koje je poznato da sudjeluju u izbacivanju kemoterapeutika iz stanice te su na taj način odgovorne za otpornost na različite lijekove (*engl. Multidrug resistance, MDR*) (Tamaki et al., 2011). Nadalje, napravljena je usporedba ukupne količine platine unutar otpornih stanica u odnosu na roditeljske nakon tretmana CBP-om. Također, provjerena je ekspresija ciljne molekule TAX,  $\beta$  tubulina (Maloney et al., 2020).

### **4.2.1. Uloga transmembranskih pumpi u otpornosti na lijekove**

Metodom RT-qPCR određena je ekspresija gena *ABCB1*, *ABCC2* i *ABCG2* koji kodiraju za tri glavna transportera ABC, uključena u MDR. Smanjena ekspresija sva tri gena *ABCB1*, *ABCC2* i *ABCG2* izmjerena je kod stanica MES-OV CBP u odnosu na roditeljske stanice MES-OV (slika 14A). S druge strane, kod stanica SK-OV-3 CBP utvrđena je povišena ekspresija gena *ABCC2* i smanjena ekspresija *ABCG2* (slika 14B). Kod stanica OVCAR-3 CBP zabilježena je povećana ekspresija sva tri gena u odnosu na roditeljske stanice (slika 14C). Zbog povišene ekspresije gena *ABCC2*, par stanica SK-OV-3 tretiran je inhibitorom proteina MRP2, MK571 kako bi se utvrdilo da li je ova pumpa uključena u odgovor stanica na CBP. Tretman je na sličan način utjecao na osjetljivost roditeljskih i otpornih stanica na tretman CBP, ukazujući na sličnu aktivnost ove pumpe kod osjetljivih i otpornih stanica SK-OV-3 (slika P1A). Kod para stanica OVCAR-3, tretman s inhibitorom MK571 nije imao utjecaj na osjetljivost roditeljskih ni otpornih stanica na CBP (slika P1B). Nadalje, zbog povećane ekspresije *ABCB1*, stanice OVCAR-3 i OVCAR-3 CBP



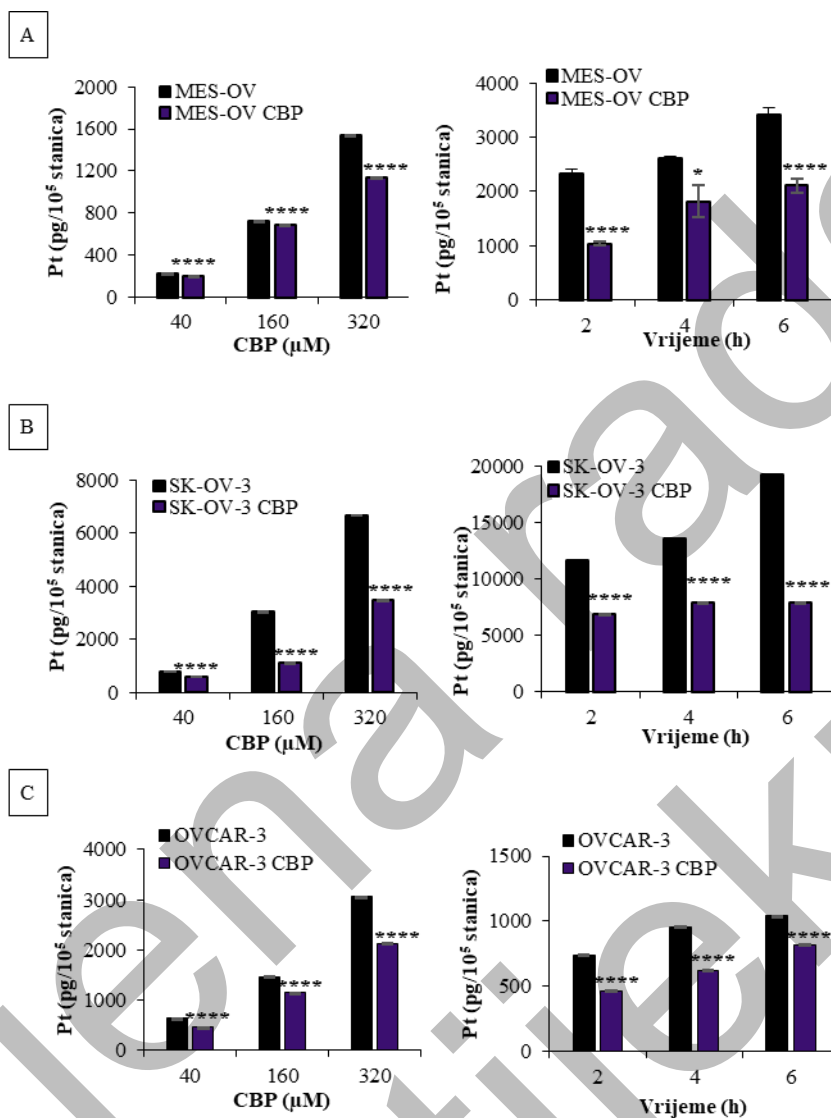
tretirane su s inhibitorom P-gp, valspodarom (PSC-833), što je rezultiralo istom tendencijom povećanja osjetljivosti roditeljskih i otpornih stanica na TAX, upućujući da ova pumpa vjerojatno nije uključena u otpornost OVCAR-3 CBP na TAX (slika P1C). Rezultati su pokazali kako povećana ekspresija *ABCC2* kod SK-OV-3 CBP te *ABCB1* i *ABCC2* kod OVCAR-3 CBP nije odgovorna za smanjenu osjetljivost tih stanica na CBP i TAX.



**Slika 14. Ekspresija transmembranskih pumpi u stanicama otpornim na CBP.** (A)(B)(C) Stanice su nasađene i prikupljene nakon 48 h. Za određivanje ekspresije *ABCB1*, *ABCC2* i *ABCG2*, izolirana je ukupna RNA te je ekspresija određena metodom RT-qPCR. *GAPDH* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije (srednja vrijednost triplikata) (*Fold Change*;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) u odnosu na roditeljske stanice, s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.2. Određivanje akumulacije platine u stanicama

Akumulacija lijeka u stanicama određena je mjerenjem ukupne platinacije stanice spektrometrom masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu. Kod sve tri linije stanica otporne na CBP, MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP, zabilježena je smanjena količina platinacije u ovisnosti o dozi i vremenu u odnosu na roditeljske stanice (slika 15). Također je u otpornim stanicama određena i smanjena platinacija DNA (neprikazani rezultati).

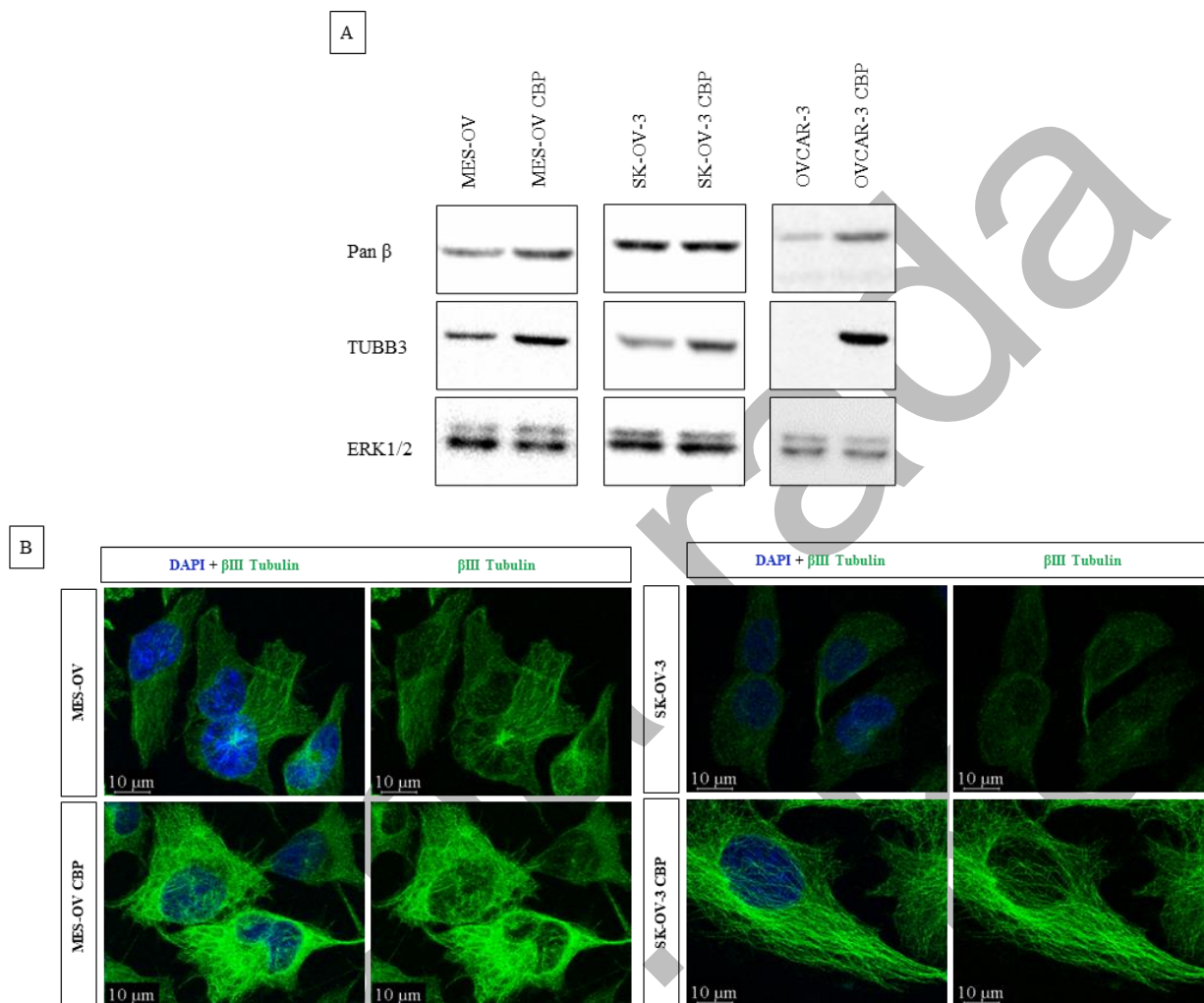


**Slika 15. Ukupna platinacija stanica osjetljivih i otpornih na CBP.** Stanice su nasade u pločice sa 6 bunarića i nakon 24 h tretirane s 40, 160 ili 320  $\mu\text{M}$  CBP u trajanju od 4 h za odgovor ovisan o dozi, odnosno sa 160  $\mu\text{M}$  CBP u trajanju od 2, 4 ili 6 h za odgovor u ovisnosti o vremenu. Ukupna platinacija para stanica (A) MES-OV, (B) SK-OV-3 i (C) OVCAR-3 određena je spektrometrom masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.2.3. Određivanje ekspresije ciljnih molekula paklitaksela

Prema dobiven rezultatima ekspresije gena *ABCBI*, moglo se zaključiti da P-gp nije odgovoran za razvoj križne otpornosti na TAX kod stanica MES-OV CBP. Sljedeći najčešće opisani mehanizam

otpornosti stanica na TAX je povišena ekspresija tubulina  $\beta$  (Sazonova et al., 2021). Stoga je metodom Western blot izmjerena ekspresija tubulina  $\beta$ , koji zajedno s tubulinom  $\alpha$  predstavlja građevne podjedinice mikrotubula (Janke & Magiera, 2020) i vezno je mjesto za TAX (Kampan et al., 2015). Nadalje, provjerena je i ekspresija tubulin  $\beta$ III (TUBB3), prediktivnog farmakogenetskog biljega za ishod terapije raka jajnika na bazi TAX (Roque et al., 2013; Sève & Dumontet, 2008). Ukupni tubulin  $\beta$  (pan  $\beta$ ) bio je značajno povećan u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV i stanicama OVCAR-3 CBP u odnosu na OVCAR-3, dok je u stanicama SK-OV-3 CBP ostao nepromijenjen (slika 16A). Zanimljivo, ekspresija TUBB3 bila je povećana u sve tri linije stanica otporne na CBP. Povećana razina TUBB3 u stanicama MES-OV CBP, kao jedne od linija s križnom otpornosti na TAX, i SK-OV-3 CBP, kao linije koja ne pokazuje križnu otpornost na TAX, u odnosu na njihove roditeljske linije potvrđena je i fluorescentnom mikroskopijom (slika 16D). Međutim, ono što je još vidljivo je drugačija organizacija tubulinskih vlakana između ova dva stanična para. Točnije, tubulinska vlakna u stanicama MES-OV granaju se u različitim smjerovima, prekrivajući jezgru gotovo u potpunosti. Kod stanica SK-OV-3 prisutna je urednija organizacija vlakana, koja se gotovo paralelno šire prema vanjskim rubovima stanica. Ovi rezultati dali su naslutiti da je povećana količina TUBB uz povećan TUBB3 odgovorna za otpornost MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP na TAX. U slučaju SK-OV-3 CBP, povećanje razine TUBB3 nije bilo popraćeno povećanjem TUBB, što bi moglo biti objašnjenje izostanka križne otpornosti u ovim stanicama.



**Slika 16. Ekspresija tubulina u stanicama osjetljivim i otpornim na CBP.** (A) Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h, nakon čega su izolirani ukupni proteini. Određena je ekspresija tubulina pan  $\beta$  i  $\beta$ III metodom Western blot. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta. (B) Stanice su nasadene na stakalca i nakon 48 h fiksirane te obilježene protutijelom za TUBB3 (zeleno). Jezgre su obojane bojom DAPI (plavo). Prikazana su reprezentativna vidna polja. Prikazane su maksimalne projekcije konfokalnih snimaka u slojevima. Skala = 10  $\mu$ m

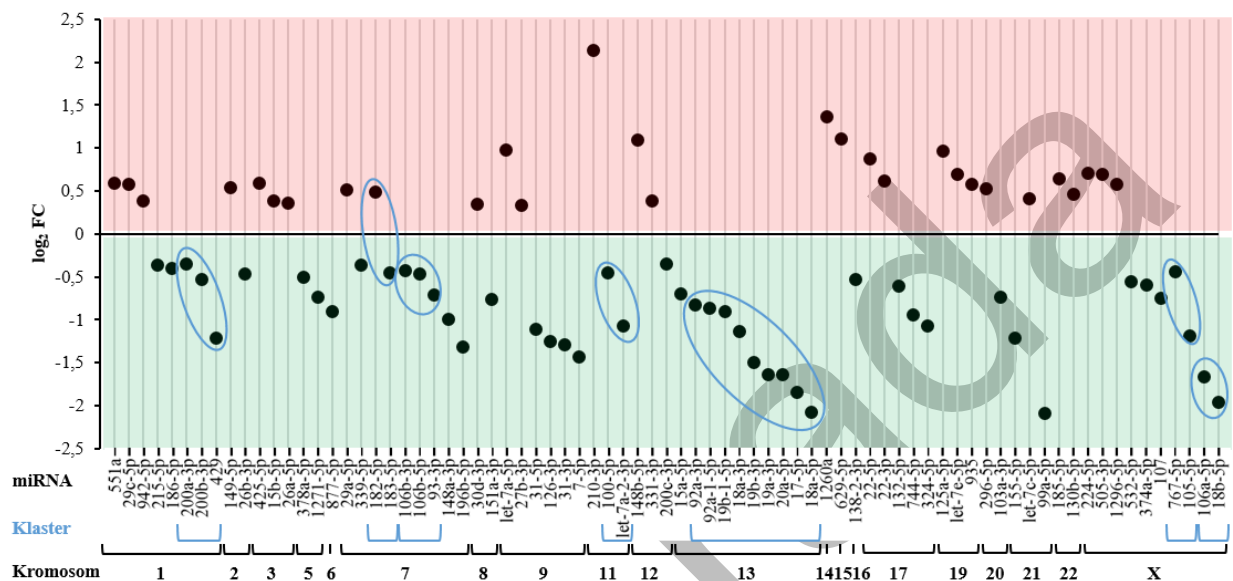
### **4.3. ANALIZA EKSPRESIJE MIRNA STANICA OSJETLJIVIH I OTPORNIH NA CBP**

Nakon osnovne karakterizacije tri eksperimentalna modela stanica raka jajnika s obzirom na primarne mehanizame otpornosti stanica na lijekove, te s obzirom na njihov EMT status, pristupljeno je analizi razlika u ekspresiji miRNA unutar parova stanica.

Stanice MES-OV i MES-OV CBP odabrane su kao primarni model istraživanja iako je razlika u epitelno-mezenhimskom statusu između stanica tog para najmanja. Odabir opravdava nekoliko činjenica. Stanice MES-OV izolirane su iz ascitesa bolesnice koja prethodno nije primila nikakvu terapiju. Nadalje, stanice MES-OV nisu često korišten eksperimentalni sustav. Također, moguće je pretpostaviti da će značajne promjene detektirane unutar ovog para biti izraženije u druga dva para stanica, koje karakterizira i veća razlika epitelno-mezenhimskog statusa i osjetljivosti na CBP, a koji će se koristiti za potvrdu rezultata odnosno isključivanje promjena specifičnih za jednu liniju stanica odnosno, jedan tip raka jajnika.

#### **4.3.1. Identifikacija miRNA promijenjene ekspresije u paru stanica MES-OV**

Metodom hibridizacije DNA mikročipova analizirana je ekspresija 752 miRNA uključenih u različite procese u stanici, među njima otpornost na lijekove, epitelno-mezenhimska tranzicija, migracija, invazija. Obrada rezultata dovela je do identifikacije 77 miRNA promijenjene ekspresije ( $FC > 1,25$ ) u MES-OV CBP u odnosu na roditeljske stanice MES-OV. Točnije, identificirano je 29 miRNA povećane i 48 miRNA smanjene ekspresije (slika 17, tablica P1). MiRNA promijenjene ekspresije anotirane su na gotovo sve kromosome, uz iznimku kromosoma 4, 10 i 18. Također, identificirano je 7 klastera kojima pripadaju dvije ili više promijenjene miRNA (prikazani na slici 17), dok su u tablici 17 prikazani svi zahvaćeni klasteri s pripadajućim promijenjenim miRNA.



**Slika 17. MiRNA promijenjene ekspresije u stanicama otpornim na CBP.** Stanice su nasadene i sakupljene nakon 48 h. Izolirana RNA korištena je za analizu ekspresije miRNA. Prikazane su vrijednosti  $\log_2$  relativne prosječne (srednja vrijednost duplikata) stope promjene ekspresije (FC;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV. Plavo su zaokružene miRNA pripadnice istog klastera. Naznačena je lokacija promijenjenih miRNA na kromosomima.

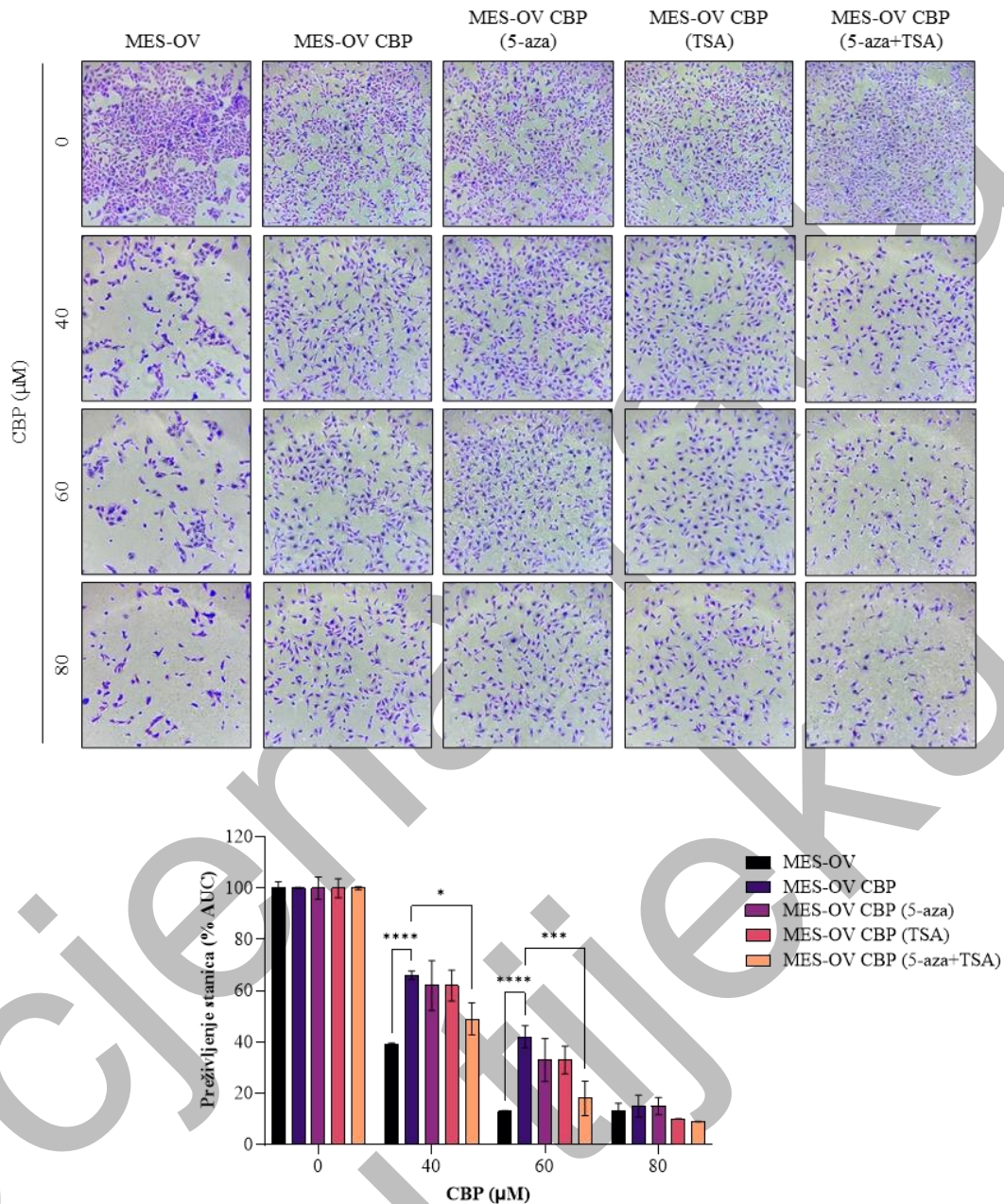
**Tablica 17. Lista promijenjenih miRNA i pripadajućih klastera.**

Klaster	Kromosom	Položaj	Gen domaćin
<b><u>let-7a-2, miR-100</u></b> , miR-125b-1	11	Intergenski	
<b><u>let-7c, miR-99a</u></b> , miR-125b-2	21	Intergenski	
<b><u>let-7e</u></b> , miR-99b, <b><u>miR-125a</u></b>	19	Intergenski	
miR-452, <b><u>miR-224</u></b>	X	Intronski	<i>GABRE</i>
miR-191, <b><u>miR-425</u></b>	3	Intronski	<i>DALRD3</i>
miR-29b-2, <b><u>miR-29c</u></b>	1	Intergenski	
miR-298, <b><u>miR-296</u></b>	20	Intergenski	
miR-29b-1, <b><u>miR-29a</u></b>	7	Intergenski	
<b><u>miR-183</u></b> , miR-96, <b><u>miR-182</u></b>	7	Intergenski	
miR-301b, <b><u>miR-130b</u></b>	22	Intergenski	
<b><u>miR-331</u></b> , miR-3685	12	Intergenski	
<b><u>miR-15b</u></b> , miR-16-2	3	Intronski	<i>SMC4</i>
<b><u>miR-30d</u></b> , miR-30b	8	Intergenski	
miR-23b, <b><u>miR-27b</u></b> , miR-3074, miR-24-1	9	Intronski	<i>AOPEP</i>
<b><u>miR-200a, miR-200b, miR-429</u></b>	1	Intergenski	

<b>miR-200c</b> , miR-141	12	Intergenski	
miR-194-1, <b>miR-215</b>	1	Intronski	<i>IARS2</i>
<b>miR-106b</b> , <b>miR-93</b> , miR-25	7	Intronski	<i>MCM7</i>
miR-105-2, miR-105-1, <b>miR-767</b>	X	Intronski	<i>GABRA3</i>
<b>miR-532</b> , miR-188, miR-500a, miR-362, miR-501, miR-500b, miR-660, miR-502	X	Intronski	<i>CLCN5</i>
<b>miR-374a</b> , miR-545	X	Intergenski	
miR-212, <b>miR-132</b>	17	Intergenski	
<b>miR-15a</b> , miR-16-1	13	Intergenski	
<b>miR-17</b> , <b>miR-18a</b> , <b>miR-19a</b> , <b>miR-20a</b> , <b>miR-19b-1</b> , <b>miR-92a-1</b>	13	Intergenski	
<b>miR-106a</b> , <b>miR-18b</b> , miR-20b, miR-19b-2, miR-92a-2, miR-363	X	Intergenski	

#### 4.3.2. Uloga epigenetičke regulacije u otpornosti stanica na CBP i njihovom metastatskom potencijalu

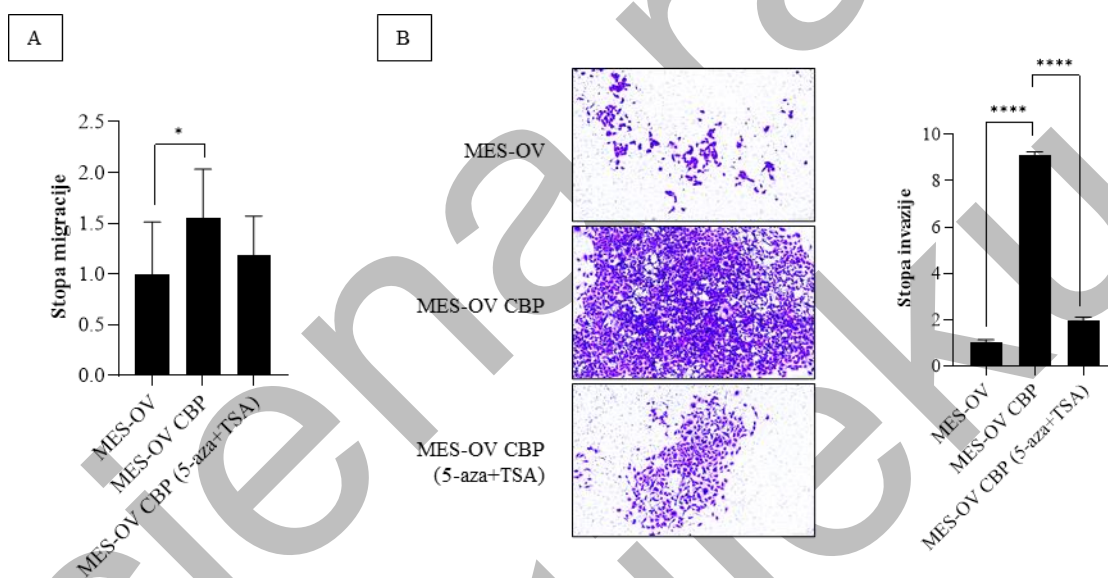
Promjene u epigenetičkoj regulaciji opisane su kao bitne ne samo u karcinogenezi već i u razvoju otpornosti tumora na terapiju kroz utišavanje gena/miRNA. Stoga je u idućem koraku provjeren utjecaj dva često korištena epigenetička modulatora, 5-aza i TSA, na osjetljivost stanica na CBP i njihovu migratornu/invazivnu sposobnost. Utjecaj inhibitora na osjetljivost na CBP praćen je metodom preživljenja mase stanica. Dok inhibitori pojedinačno nisu imali utjecaj na osjetljivost, kombinacija oba inhibitora značajno je povećala osjetljivost stanica MES-OV CBP na CBP (1,5x prema IC<sub>50</sub>) (slika 18).



**Slika 18. Utjecaj epigenetičkih modulatora na osjetljivost stanica na CBP.** Stanice su nasadene u pločice sa 6 bunarića, te nakon 24 h tretirane 1 μM 5-aza ili 33,3 nM TSA ili njihovom kombinacijom, te različitim koncentracijama CBP (medij sa svježim spojevima mijenjan svaki dan). Nakon 72 h, stanice su fiksirane u metanolu, obojane otopinom kristal ljubičastog i fotografirane korištenjem svjetlosnog mikroskopa. Prikazane su reprezentativne fotografije (gore). ImageJ je korišten za mjerenje intenziteta boje i određivanje vrijednosti AUC (*area under curve*), proporcionalne preživljenju. Netretirane kontrole su postavljene kao 100% (dolje). Eksperiment je ponovljen tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

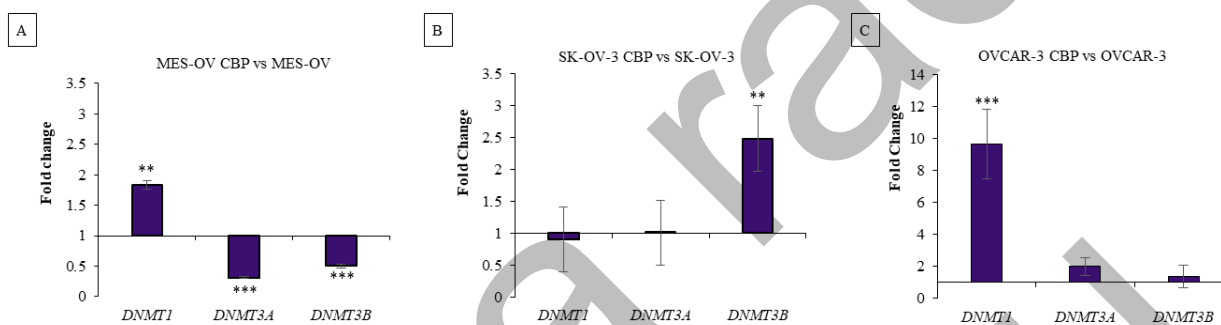


Utjecaj kombinacije inhibitora na migratornu sposobnost stanica ispitan je testom zacjeljivanja rane. Rezultati su potvrdili hipotezu da su stanice MES-OV CBP migratornije od roditeljskih stanica MES-OV. Nadalje, primijećena je tendencija smanjenja sposobnosti migracije MES-OV CBP uz tretman inhibitorima u odnosu na kontrolne netretirane MES-OV CBP (slika 19A). Test invazije u matrigelu potvrdio je veliku razliku u invazivnosti roditeljskih i otpornih stanica. Također, tretman inhibitorima značajno je smanjio invazivnu sposobnost stanica MES-OV CBP, na razinu usporedivu onoj izmjerenoj kod roditeljskih stanica (slika 19B). Ovi rezultati ukazali su da su promjene u metilaciji DNA i deacetilaciji histona potencijalno imale utjecaj na ekspresiju različitih gena/miRNA što je doprinijelo otpornosti stanica na CBP i na njihovu invazivnost.



**Slika 19. Utjecaj epigenetičkih modulatora na pokretljivost stanica.** Stanice su nasadene te nakon 24 h tretirane s 1  $\mu$ M 5-aza i 33,3 nM TSA. (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 stanice MES-OV, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. (B) Invazija stanica izmjerena je testom invazije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. Rezultati su prikazani kao reprezentativne fotografije i kao izračunate relativne prosječne stope invazije u odnosu na stanice MES-OV, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Nadalje, u sva tri para OC stanica izmjerena je ekspresija gena *DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B*. *DNMT1*, koji kodira za enzim DNA metil transferazu 1, zadužen za održavanje uzorka metilacije nakon replikacije DNA, povišen je u stanicama MES-OV CBP (slika 20A) i OVCAR-3 CBP (slika 20C) u odnosu na odgovarajuće roditeljske stanice, dok u SK-OV-3 CBP nije bio značajno promijenjen (slika 20B). Dodatno, izmjerena je smanjena ekspresija *DNMT3A* i *DNMT3B* u stanicama MES-OV CBP, te povećana ekspresija *DNMT3B* u SK-OV-3 CBP. Produkti ovih gena su enzimi odgovorni za *de novo* metilaciju.

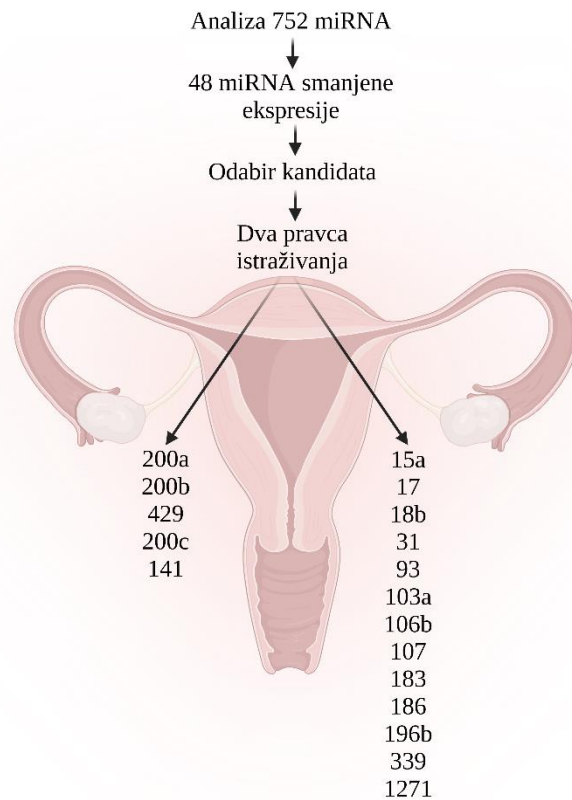


**Slika 20. Ekspresija DNA metil-transferaza u stanicama otpornim na CBP.** (D)(E)(F) Stanice su nasadene i sakupljene nakon 48 h. Određena je ekspresija gena *DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B* metodom RT-qPCR. *GAPDH* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije (srednja vrijednost triplikata) u odnosu na roditeljske stanice, s pripadajućim standardnim devijacijama. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.3.3. Odabir kandidata za daljnja istraživanja

Na temelju dobivenih rezultata i činjenice da su metilacija DNA i deacetilacija histona odgovorne za utišavanje ekspresije gena/miRNA, u sklopu ovog istraživanja fokus je stavljen na miRNA smanjene ekspresije uz pretpostavku da bi i njihova ekspresija mogla biti epigenetički regulirana. Napravljeno je detaljno pretraživanje literature za 48 miRNA snižene ekspresije, poglavito u kontekstu otpornosti na terapiju i epitelno-mezenhimsku tranziciju. Također, za daljnje sužavanje liste kandidata uzeta je u obzir činjenica da su miRNA koje su dio klastera pod kontrolom istog promotora, te je stoga dovoljno odabrati jednu miRNA kao predstavnicu cijelog klastera. Samo istraživanje podijeljeno je u dva dijela. U jednom pravcu istraživanja fokus je stavljen na članove

obitelji miR-200, poznate regulatore epitelno-mezenhimske tranzicije s ulogom u migraciji, invaziji i odgovoru stanica na lijekove (Brozovic et al., 2015; Cavallari et al., 2021). U drugom pravcu izdvojeno je 14 miRNA sa svrhom istraživanja njihove moguće uloge u osjetljivosti i metastatskom potencijalu stanica epitelnog raka jajnika *ab ovo* (slika 21).



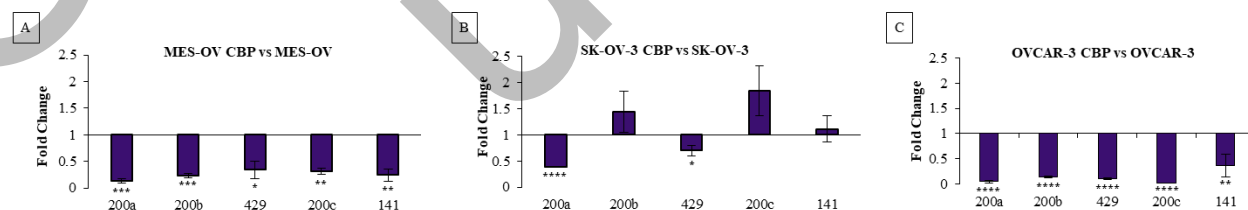
Slika 21. Dva pravca istraživanja.

#### 4.4. ISTRAŽIVANJE ULOGE OBITELJI MIR-200 U OTPORNOSTI I METASTATSKOM POTENCIJALU STANICA RAKA JAJNIKA– 1. PRAVAC ISTRAŽIVANJA

Analiza ekspresije miRNA u stanicama MES-OV i MES-OV CBP ukazala je na smanjenu ekspresiju članova obitelji miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-429 i miR-200c) u MES-OV CBP u odnosu na roditeljske stanice (slika 17). Iako je uloga obitelji miR-200 u otpornosti stanica na različite vrste lijekova poznata (Brozovic et al., 2015; S. J. O'Brien et al., 2018), odlučeno je detaljnije istražiti njihovu ulogu u novo uspostavljenim modelnim sustavima stanica stabilno otpornim na CBP s izraženim karakteristikama mezenhimskih stanica (slika 13) od kojih samo dva eksperimentalna modela stanica, MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP, pokazuju i križnu otpornost na TAX za razliku od na TAX osjetljivog modela SK-OV-3 CBP stanica (slika 12).

##### 4.4.1. Validacija promijenjene ekspresije članova obitelji miR-200

Promjena ekspresije svih pet članova obitelji miRNA-200 (miR-200a, miR-200b, miR-429, miR-200c, miR-141) validirana je u stanicama MES-OV CBP u odnosu na roditeljske MES-OV, te provjerena u dodatna dva para stanica SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP te OVCAR-3 i OVCAR-3 CBP, metodom RT-qPCR, korištenjem boje Sybr Green i specifičnog kita za pojedinu miRNA (Tablica 7). Potvrđena je smanjena ekspresija svih pet miRNA u stanicama MES-OV CBP u odnosu na roditeljske stanice (slika 22A). Nadalje, kod OVCAR-3 CBP također je zabilježena smanjena ekspresija svih pet članova (Slika 22C), dok je u slučaju SK-OV-3 CBP zabilježeno samo značajno smanjenje ekspresije miR-200a i miR-429 u odnosu na stanice SK-OV-3 (slika 22B).

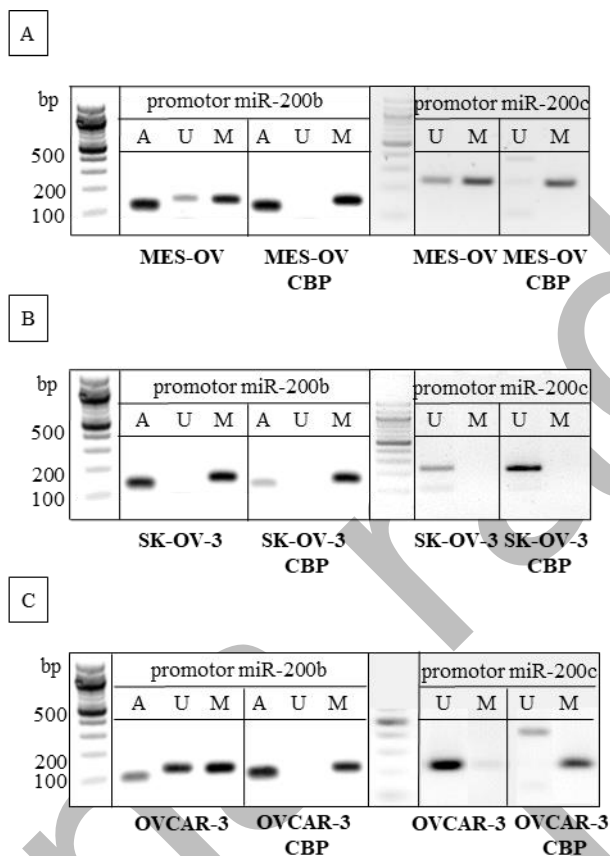


**Slika 22. Ekspresija članova obitelji miR-200 u stanicama otpornim na CBP.** Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h. Za određivanje ekspresije članova obitelji miR-200, izolirana je ukupna RNA te je ekspresija određena metodom RT-qPCR. *RNU6B* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani

kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije (srednja vrijednost triplikata) ( $\text{Fold Change; } 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) u odnosu na roditeljske stanice, s pripadajućim standardnim devijacijama. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### **4.4.2. Regulacija ekspresije miR-200 na razini metilacije promotora**

Budući je poznato da ekspresija članova obitelji miR-200 u tumorskim stanicama može biti regulirana epigenetički (Davalos et al., 2012), te zbog činjenice da kombinirani tretman 5-aza i TSA čini stanice osjetljivijima na CBP i smanjuje njihov metastatski potencijal (slika 18), odlučeno je provjeriti metilacijski status promotora miR-200b (promotor klastera koji obuhvaća miR-200a, miR-200b i miR-429) i miR-200c (promotor klastera koji obuhvaća miR-200c i miR-141). Nemetilirana (U) DNA zabilježena je kod promotora miR-200b i miR-200c u stanicama MES-OV, dok je kod stanica MES-OV CBP bio prisutan samo metilirani oblik, što je u skladu sa smanjenom ekspresijom pet miRNA (miR-200a, 200b, 429, 200c, 141) u stanicama otpornim na CBP (slika 23A). Slična situacija potvrđena je i u OVCAR-3 paru stanica. Kod promotora miR-200b u roditeljskim stanicama zabilježena je nemetilirana i metilirana DNA, a u OVCAR-3 CBP samo metilirana. Za promotor miR-200c, nemetilirana DNA zabilježena je u OVCAR-3, a metilirana u stanicama OVCAR-3 CBP (slika 23C). Međutim, nije uočena razlika u metilacijskom statusu promotora miR-200b i miR-200c između stanica SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP (slika 23B). Točnije, za oba promotora u roditeljskim i stanicama otpornim na CBP zabilježen je samo nemetilirani oblik DNA. Dobiveni rezultati koreliraju sa zabilježenom ekspresijom pet članova obitelji miR-200 u stanicama MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP u odnosu na roditeljske linije (Slika 22).



**Slika 23. Metilacijski status promotora miR-200b i miR-200c u stanicama otpornim na CBP.** (A)(B)(C) Stanice su nasadene i sakupljene nakon 48 h. Izolirana DNA je bisulfitno konvertirana te je korištena za analizu metilacijskog statusa promotora miR-200b i miR-200c metodom MSP. Eksperiment je ponovljen dva puta. Prikazane su reprezentativne slike gelova. A –  $\beta$ -aktin, U – nemetilirana DNA, M – metilirana DNA

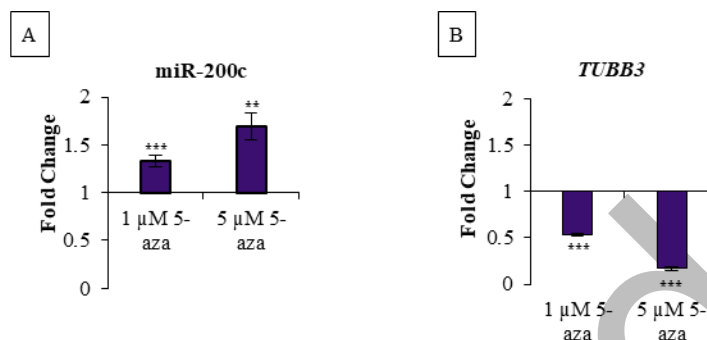
Ovi rezultati sugerirali su da je izlaganje stanica MES-OV i OVCAR-3 karboplatini prilikom razvoja stabilne otpornosti uzrokovalo promjene u epigenetičkoj regulaciji, u ovom slučaju promjene metilacijskog statusa promotora miR-200b i miR-200c, moguće preko povećane ekspresije *DNMT1*. U ovom momentu nije poznato koja je uloga povećane ekspresije *DNMT3B* u SK-OV-3 CBP u odnosu na SK-OV-3 liniju stanica.

#### 4.4.3. Istraživanje potencijalne uloge osi regulacije miR-200c/TUBB3 u otpornosti na CBP

Kao što je gore spomenuto, tri para stanica raka jajnika, korištenih kao eksperimentalni modeli, razlikuju se u osjetljivosti na lijekove koji se najčešće koriste u liječenju ove bolesti. Naime, MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP, osim smanjene osjetljivosti na CBP, pokazuju i križnu otpornost na TAX, dok to nije slučaj sa SK-OV-3 CBP koje su jednako osjetljive na TAX kao i roditeljske stanice (slika 12). Također, poznato je da je povećana razina TUBB3, ovdje izmjerena u sve tri linije stanica otporne na CBP (slika 16), uključena u otpornost na TAX, te da je njegova ekspresija obrnuto-proporcionalna ekspresiji miR-200c u stanicama s primarnom otpornosti na TAX (Brozovic et al., 2015). Međutim, nije istraženo, te se nametnulo kao pitanje, zašto bi stanice kao odgovor na tretman CBP reagirale stabilnim povećanjem razine TUBB3 te da li TUBB3 možda ima ulogu u odgovoru stanica na CBP. Nadalje, postavilo se i pitanje da li u CBP otpornim stanicama araka jajnika postoji korelacija ekspresije miR-200c i TUBB3. Naime, iz literature nije poznato da TUBB3 ima ulogu u odgovoru stanica na tretman CBP-om kao što nije poznata eventualna CBP-om potaknuta povezanost ekspresije miR-200c i TUBB3. U svrhu pronalaženja odgovora na nametnuto pitanje korišten je model MES-OV para stanica.

##### 4.4.3.1. Epigenetička modulacija ekspresije miR-200c

Kako bi se potvrdila epigenetička regulacija ekspresije miR-200c u sustavu MES-OV CBP, stanice su tretirane inhibitorom 5-aza, nakon čega je mjerena ekspresija miR-200c metodom RT-qPCR. Rezultati su pokazali kako se ekspresija miR-200c povećava u ovisnosti o dozi 5-aza (slika 24A). Pri istim uvjetima, provjerena je i ekspresija *TUBB3*, koja je pokazala smanjenje ovisno o dozi 5-aza (slika 24B). Ovaj rezultat uputio je po prvi puta na postojanje obrnuto-proporcionalne sprege miR-200c/*TUBB3* u stanicama stabilno otpornim na CBP.



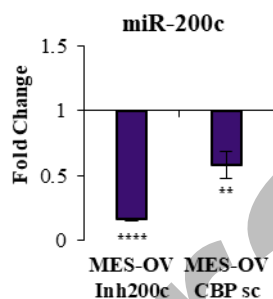
**Slika 24. Utjecaj epigenetičkog inhibitora 5-aza na ekspresiju miR-200c i TUBB3.** Stanice su 24 h nakon nasađivanja tretirane s 1  $\mu\text{M}$  ili 5  $\mu\text{M}$  5-aza (medij sa svježim inhibitorom mijenjan svaki dan). Nakon 72 h, stanice su sakupljene te je izolirana ukupna RNA. (A) Metodom RT-qPCR određena je ekspresija miR-200c. *RNU6B* je korišten kao unutarnja kontrola. (B) Metodom RT-qPCR određena je ekspresija *TUBB3*. *GAPDH* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije (srednja vrijednost triplikata) u odnosu na netretirane stanice MES-OV CBP, s pripadajućim standardnim devijacijama. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.4.3.2. Stabilna inhibicija ekspresije korištenjem lentiviralnih vektora s inhibitorom miR-200c

Kako bi se detaljnije istražila uloga miR-200c u otpornosti i metastatskom potencijalu stanica otpornih na CBP, napravljena je stabilna transfekcija roditeljskih stanica MES-OV lentiviralnim vektorom koji nosi inhibitornu sekvencu za miR-200c (*Inh200c*), u svrhu oponašanja uvjeta u stanicama otpornim na CBP. Ovom eksperimentu prethodila je prijelazna transfekcija stanica MES-OV CBP sekvencom mimik miR-200c, međutim utjecaj na osjetljivost na CBP, iako statistički značajan, bio je minimalan. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim iskustvom rada s prolaznim transfekcijama mimik sekvencama (Brozovic et al., 2015) koje su rezultirale statistički značajnim, ali minimalnim razlikama u odgovoru transficiranih stanica sa sekvencama mimik miRNA na citostatik u odnosu na stanice transficirane kontrolnim sekvencama (Brozovic et al., 2015). Nakon selekcije transficiranih stanica antibiotikom higromicinom B, provjerena je ekspresija miR-200c metodom RT-qPCR. Potvrđena je snižena ekspresija miR-200c u kontrolnim stanicama MES-OV CBP sc u odnosu na kontrolne stanice MES-OV sc. Stanice MES-OV sa



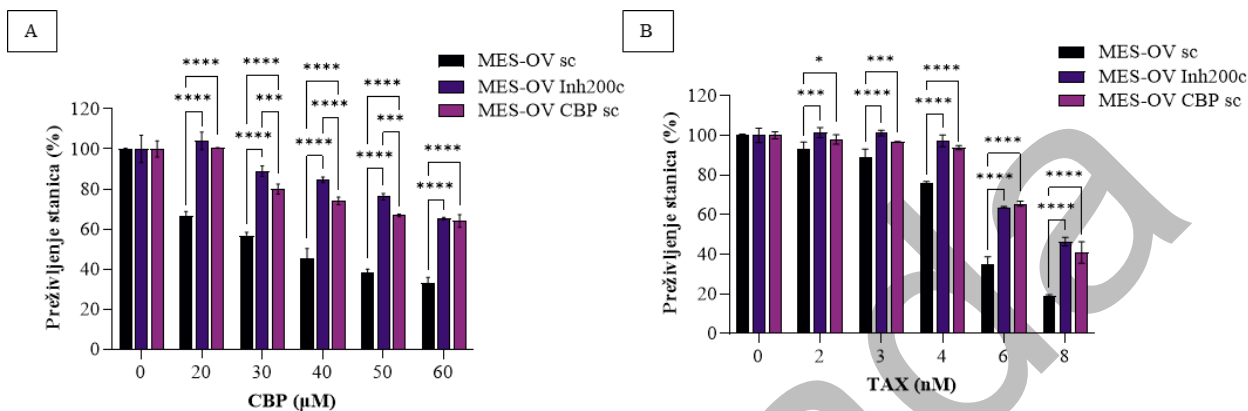
stabilnom inhibicijom miR-200c (MES-OV Inh200c) pokazale su značajno smanjenu ekspresiju miR-200c u odnosu na MES-OV sc (slika 25) čime je potvrđena uspostava novog eksperimentalnog modela.



**Slika 25. Provjera inhibicije ekspresije miR-200c u roditeljskim stanicama MES-OV.** Stanice su nasadene te je nakon 48 h izolirana ukupna RNA. Ekspresija miR-200c određena je metodom RT-qPCR. *RNU6B* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije (srednja vrijednost triplikata) u odnosu na stanice MES-OV sc, s pripadajućim standardnim devijacijama. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

#### 4.4.3.2.1. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na osjetljivost roditeljskih stanica MES-OV na CBP i TAX

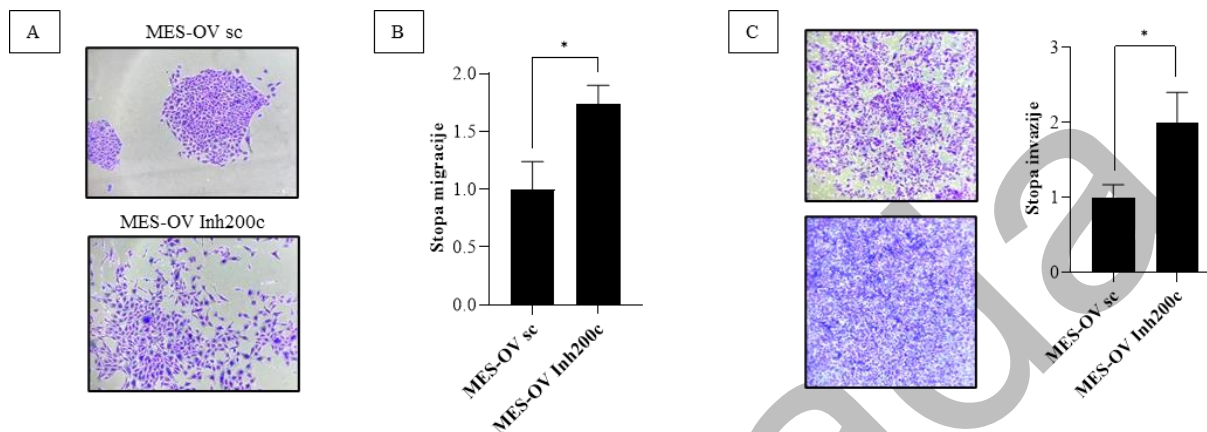
Utjecaj stabilne transfekcije lentiviralnim vektorom s inhibitorom za miR-200c na osjetljivost stanica na CBP i TAX analizirana je testom metabolizma resazurina. Stanice MES-OV transficirane praznim vektorom ili onim s inhibitorom miR-200c te MES-OV CBP transficirane praznim vektorom tretirane su različitim koncentracijama CBP i TAX. Rezultati su pokazali kako su stanice MES-OV sa stabilno utišanom miR-200c značajno manje osjetljive na CBP (slika 26A) i TAX (slika 26B) u odnosu na kontrolne stanice MES-OV sc, te da je njihova osjetljivost usporediva s onom izmjerenom za MES-OV CBP sc.



**Slika 26. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na preživljenje roditeljskih stanica MES-OV.** Stanice su nasađene u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP i TAX. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 72 sata. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadruplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.4.3.2.2. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na metastatski potencijal roditeljskih stanica MES-OV

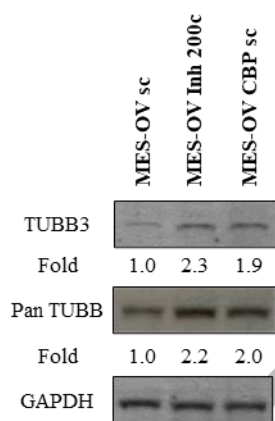
Testom klonalnog rasta potvrđena je promjena morfologije roditeljskih MES-OV stanica pod utjecajem stabilno utišane ekspresije miR-200c (slika 27A). Stanice MES-OV Inh200c nisu više formirale guste kolonije jasnih rubova kao MES-OV sc. Testom zacjeljivanja rana pokazano je da su MES-OV Inh200c stanice značajno pokretljivije u odnosu na kontrolne MES-OV sc (slika 27B). Nadalje, stanice s utišanom ekspresijom miR-200c imaju veću stopu invazije od kontrolnih stanica (slika 27C).



**Slika 27. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na morfologiju i pokretljivost roditeljskih stanica MES-OV.** (A) Stanice su nasadene u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm. Nakon 10 dana, kolonije stanica su fiksirane u metanolu, obojane otopinom kristal ljubičastog i fotografirane korištenjem svjetlosnog mikroskopa pod povećanjem 100x. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazana je reprezentativna fotografija. (B) Stanice su nasadene u pločice s 24 bunarića. Migracija stanica izmjerena je testom zacjeljivanja rana. Rezultati su prikazani kao relativne prosječne stope migracije u odnosu na stanice MES-OV sc, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. (C) Invazija stanica izmjerena je testom invazije. Rezultati su prikazani kao reprezentativne fotografije i kao relativne prosječne stope invazije u odnosu na stanice MES-OV sc, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$

#### 4.4.3.2.3. Utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na ekspresiju TUBB3/pan TUBB

Kako bi se potvrdila uloga miR-200c kao regulatora ekspresije TUBB3, utjecaj stabilne inhibicije miR-200c na ekspresiju TUBB3 provjeren je metodom Western blot. Uz TUBB3, provjeren je i ekspresija ukupnog TUBB. Stabilno utišavanje miR-200c u roditeljskim stanicama MES-OV uzrokovalo je povećanje ekspresije TUBB3, ali i pan TUBB u odnosu na kontrolne stanice MES-OV sc (slika 28). Ta povećana ekspresija je usporediva ekspresiji zabilježenoj u stanicama MES-OV CBP sc. Ovaj rezultat, zajedno s prethodnima, po prvi puta je pokazano da je os regulacije miR-200c/TUBB3, pokrenuta CBP-uzrokovanom stabilnom promjenom metilacije promotora miR-200c, uključena u odgovor stanice na stres uzrokovan CBP.



**Slika 28. Ekspresija TUBB3 i pan TUBB nakon stabilne inhibicije miR-200c u roditeljskim stanicama MES-OV.** Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h. Ekspresija TUBB3 i pan TUBB određena je metodom Western blot iz ukupnog proteinskog izolata. GAPDH je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta zajedno s relativnim omjerima ekspresije proteina u odnosu na stanice MES-OV sc.

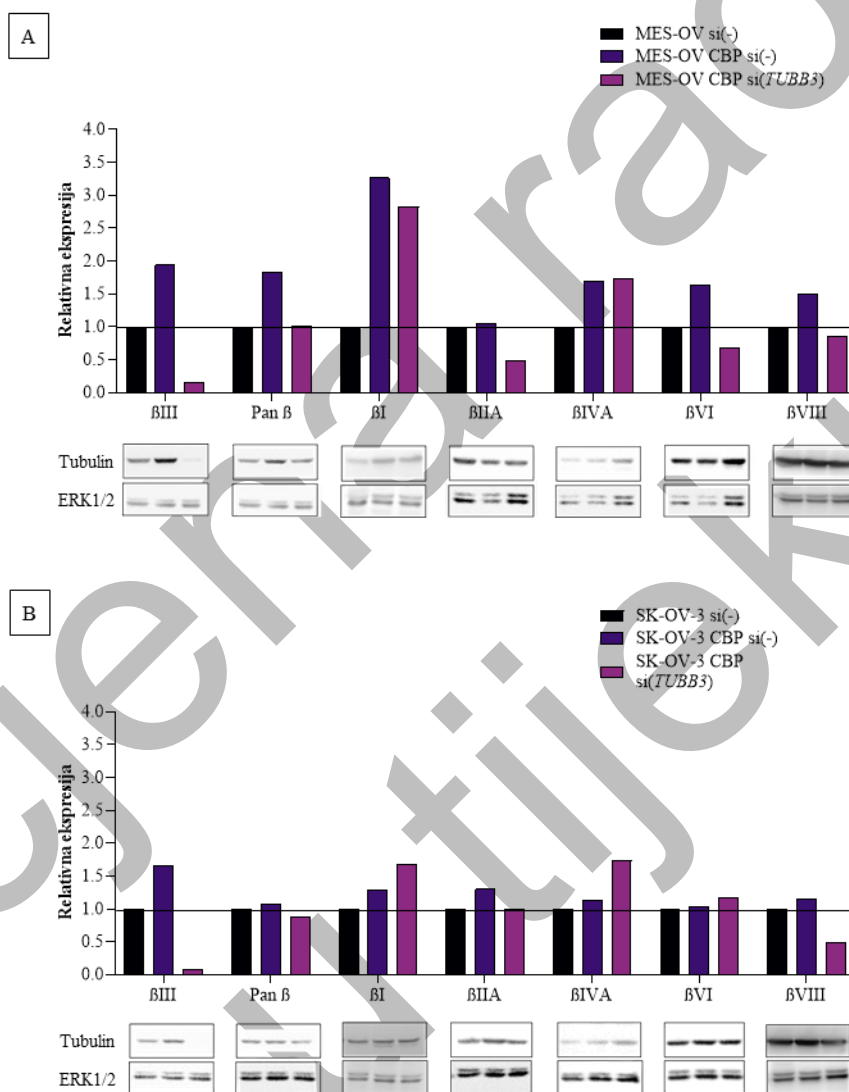
#### 4.4.3.3. Uloga TUBB3, mete miR-200c, u otpornosti na CBP

Poznato je da je povećana razina TUBB3 uključena u otpornost na TAX, te da je regulirana od strane obitelji miR-200 (Brozovic et al., 2015; Leskelä et al., 2011). Ovo istraživanje je pokazalo da os regulacije miR-200c/TUBB3 ima ulogu i u odgovoru stanica na tretman CBP (Slika 26 i 28). Međutim, i dalje je ostalo neodgovoreno pitanje da li stabilno povećanje razine TUBB3 na konstitutivnoj razini doprinosi smanjenoj osjetljivosti MES-OV CBP stanica na CBP.

##### 4.4.3.3.1. Utišavanje ekspresije *TUBB3* korištenjem siRNA

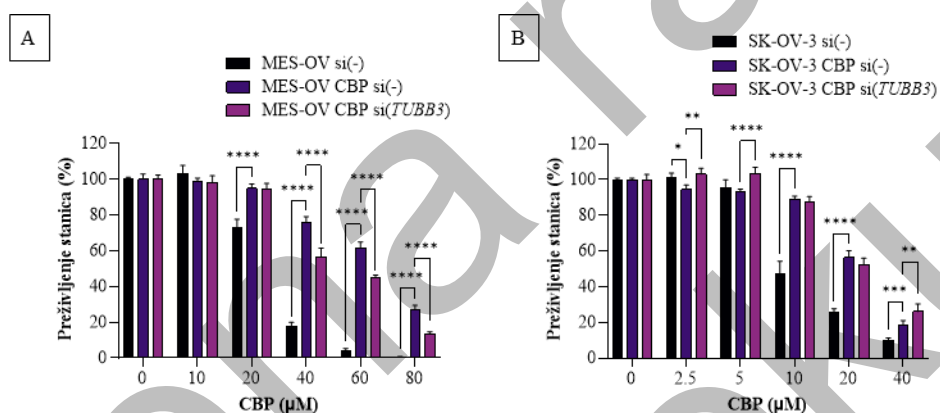
Kako bi se istražila moguća uloga TUBB3 u odgovoru na CBP, stanice otporne na CBP, MES-OV CBP i SK-OV-3 CBP, transficirane su sa si(*TUBB3*). Uspješnost transfekcije provjerena je na razini proteina metodom Western blot. U obje stanične linije uspješno je utišana ekspresija TUBB3 u odnosu na odgovarajuće kontrolne stanice. Dodatno, provjerena je ekspresija pan TUBB, kao i ostalih izotipova TUBB. Kod stanica MES-OV CBP nakon utišavanja TUBB3 uočen je i pad razine pan TUBB, kao i izostanak kompenzacije gubitka TUBB3 od strane neke druge izoforme

TUBB (slika 29A). Štoviše, izoforme TUBB ostale su nepromijenjene ili su pratile pad ekspresije TUBB3. S druge strane, kod stanica SK-OV-3 CBP utišavanje TUBB3 nije uzrokovalo značajnu promjenu ekspresije pan TUBB, moguće zbog kompenzacije s TUBB1 i TUBB4A, čija se ekspresija povećala nakon utišavanja TUBB3 (slika 29B).



**Slika 29. Utjecaj utišavanja ekspresije TUBB3 na ekspresiju ukupnog TUBB i drugih izotipova TUBB u stanicama otpornim na CBP.** Ekspresija ukupnog TUBB i njegovih izotipova određena je metodom Western blot iz ukupnog proteinskog izolata. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta zajedno s relativnim omjerima ekspresije proteina u odnosu na stanice (A) MES-OV si(-) i (B) SK-OV-3 si(-).

Nadalje, utjecaj utišavanja TUBB3 provjeren je testom metabolizma resazurina. Utišavanje TUBB3 povećalo je osjetljivost stanica MES-OV CBP u odnosu na neutišanu kontrolu, potvrdivši ulogu TUBB3 u odgovoru stanica MES-OV CBP na CBP (slika 30A). Također, potvrđeno je i očekivano povećanje osjetljivosti stanica MES-OV CBP na TAX nakon utišavanja TUBB3 (slika P2). Suprotno tome, kod stanica SK-OV-3 CBP, koje usprkos stabilno povećanoj ekspresiji TUBB3 nisu razvile križnu otpornost na TAX, nije zabilježeno povećanje osjetljivosti na CBP nakon utišavanja TUBB3 (slika 30B). Izostanak kompenzacije gubitka TUBB3 od strane drugih izotipova TUBB, te povećanje osjetljivosti na CBP (i TAX) nakon utišavanja potvrđeno je i kod stanica OVCAR-3 CBP (slika P3).



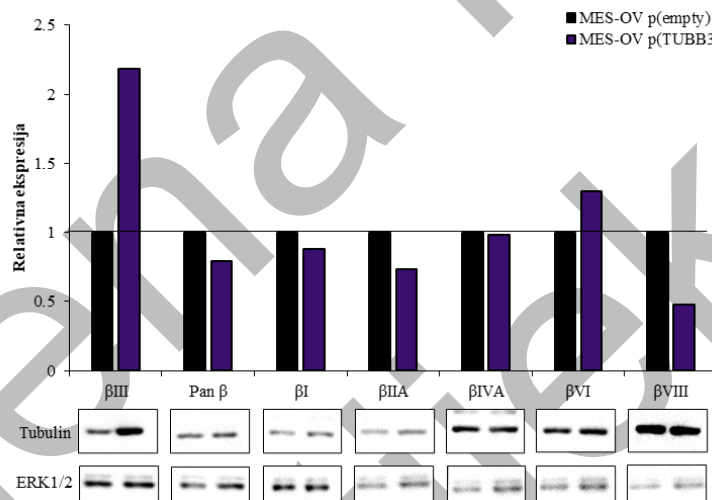
**Slika 30. Utjecaj utišavanja TUBB3 na osjetljivost stanica otpornih na CBP.** (A)(B) Stanice su nasade u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 120 sati. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadrplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Ovaj fenomen potvrđen je i kod stanica otpornih na TAX, OVCAR-3/TP (Brozovic et al., 2015), koje pokazuju križnu otpornost na CBP. Naime, i kod ovih stanica utišavanje TUBB3 nije bilo popraćeno kompenzacijom s drugim izotipovima TUBB, te su stanice pokazale veću osjetljivost na CBP (slika P4). Također, isto je pokazano i *ex vivo* na stanicama OVCAR-3/TP (Moisan et al., 2014) injektiranim i naknadno izoliranim iz ascitesa miševa. Stanice #8, izolirane iz miševa koji su primili terapiju TAX, imale su smanjenu ekspresiju TUBB3 te izostanak kompenzacije drugim

izotipovima TUBB u odnosu na stanice #6 izolirane iz miševa bez terapije. Osim toga, stanice #8 su pokazale veću osjetljivost na CBP u odnosu na stanice #6 i na izvorišne stanice OVCAR-3/TP (slika P5).

#### 4.4.3.3.4. Povećanje ekspresije TUBB3 korištenjem plazmida

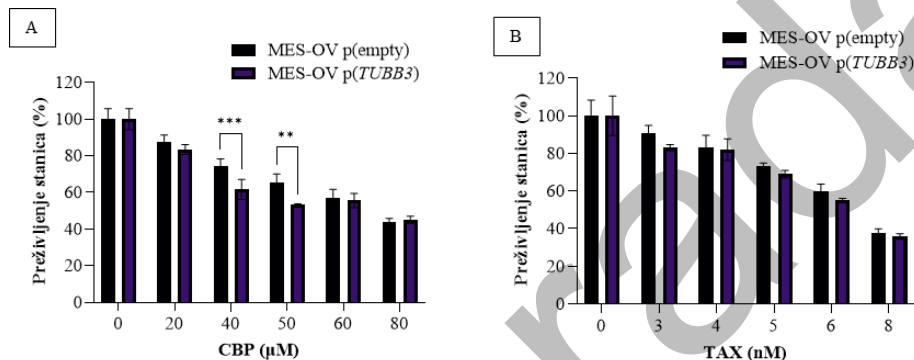
Kako bi se provjerilo može li povećanje ekspresije TUBB3 smanjiti osjetljivost roditeljskih stanica na CBP, stanice MES-OV transficirane su plazmidom koji nosi sekvencu za TUBB3. Metodom Western blot potvrđena je uspješnost transfekcije. Međutim, povećanje ekspresije TUBB3 u stanicama MES-OV nije uzrokovalo povećanje pan TUBB (slika 31).



**Slika 31. Utjecaj povećane ekspresije TUBB3 na ekspresiju ukupnog TUBB i drugih izotipova TUBB u roditeljskim stanicama MES-OV.** Ekspresija ukupnog TUBB i njegovih izotipova određena je metodom Western blot iz ukupnog proteinskog izolata. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen dva puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta zajedno s relativnim omjerima ekspresije proteina u odnosu na stanice MES-OV p(empty).

Testom metabolizma resazurina provjeren je utjecaj povišene ekspresije TUBB3 na osjetljivost stanica MES-OV. Povećanje ekspresije TUBB3 nije smanjilo osjetljivost stanica MES-OV na CBP (slika 32A) ni TAX (slika 32B). Ovakav rezultat potvrdio je važnost korelacije između ekspresije

TUBB3 i ukupnog TUBB i osjetljivosti na CBP i TAX te da samo povećanje ekspresije TUBB3 ne znači nužno i povećanje ekspresije ukupnog TUBB.



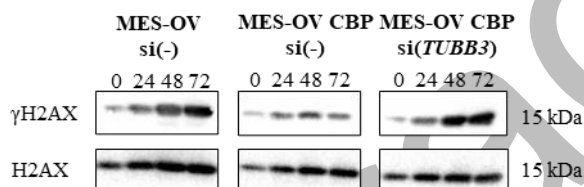
**Slika 32. Utjecaj povećane ekspresije TUBB3 na osjetljivost roditeljskih stanica MES-OV.** (A)(B) Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP i TAX. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 72 sata. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadruplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$

#### 4.4.3.3.3. Utjecaj utišavanja TUBB3 na mehanizam popravka DNA

Smatra se da su lezije DNA uzrokovane vezanjem platine na DNA najtoksičnije za stanicu. Prepoznavanje i popravak oštećenja DNA nužan je za preživljenje stanica, a povećan kapacitet popravka opisan je kao jedan od molekularnih mehanizama otpornosti na terapiju (Cheung-Ong et al., 2013). Saznanje da utišavanje TUBB3 dovodi do povećanja osjetljivosti stanica MES-OV na CBP potaknulo je daljnje eksperimente kojima je cilj bio provjeriti moguću vezu između povećane ekspresije TUBB3 i popravka oštećenja DNA uzrokovanih karboplatinom, odnosno može li utišavanje TUBB3 produljiti zadržavanje/nepopravljanje oštećenja DNA uzrokovanih CBP. Naime, količina nastalih adukata između DNA i CBP odgovara samojoj osjetljivosti stanica (S. Wang et al., 2018). Metodom Western blot praćena je ekspresija  $\gamma$ H2AX, fosforiliranog oblika H2AX koji je priznati indikator oštećenja DNA (dvolančanih lomova) (Prabhu et al., 2024), kroz vrijeme nakon tretmana stanica 4 sata subtoksičnom dozom CBP. Tretman je kod stanica MES-

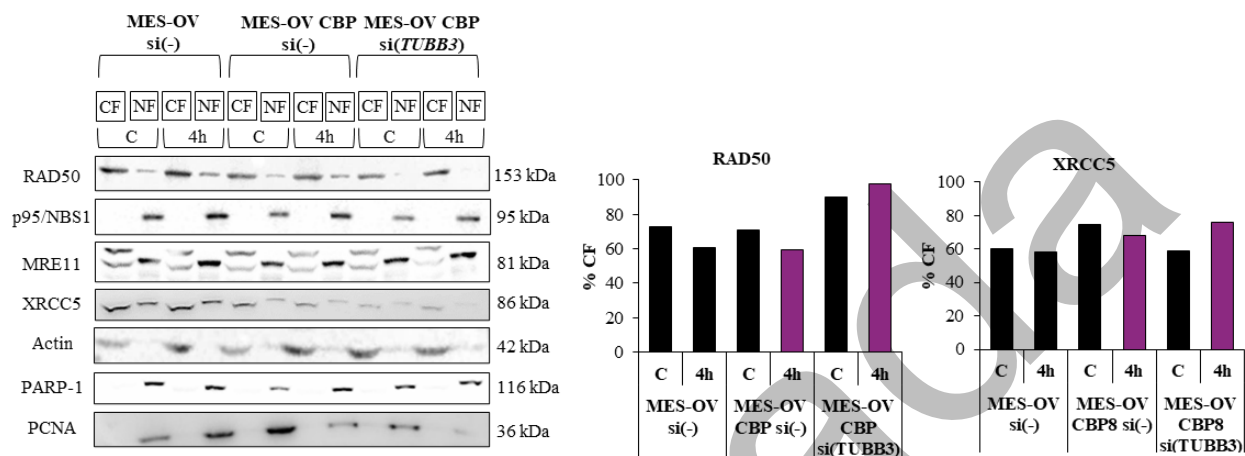


OV si(-) uzrokovao pojavu signala  $\gamma$ H2AX koji se pojačavao kroz vrijeme praćenja. U kontrolnim stanicama MES-OV CBP si(-), primijećeno je da se signal  $\gamma$ H2AX smanjuje s vremenom, dok se u stanicama MES-OV CBP si(TUBB3) signal zadržao te je bio usporediv s jačinom signala u roditeljskim stanicama MES-OV si(-) (slika 33). Ovaj rezultat potvrdio je hipotezu da bi utišavanje TUBB3 moglo ometati popravak oštećenja DNA nastalih nakon tretmana CBP.



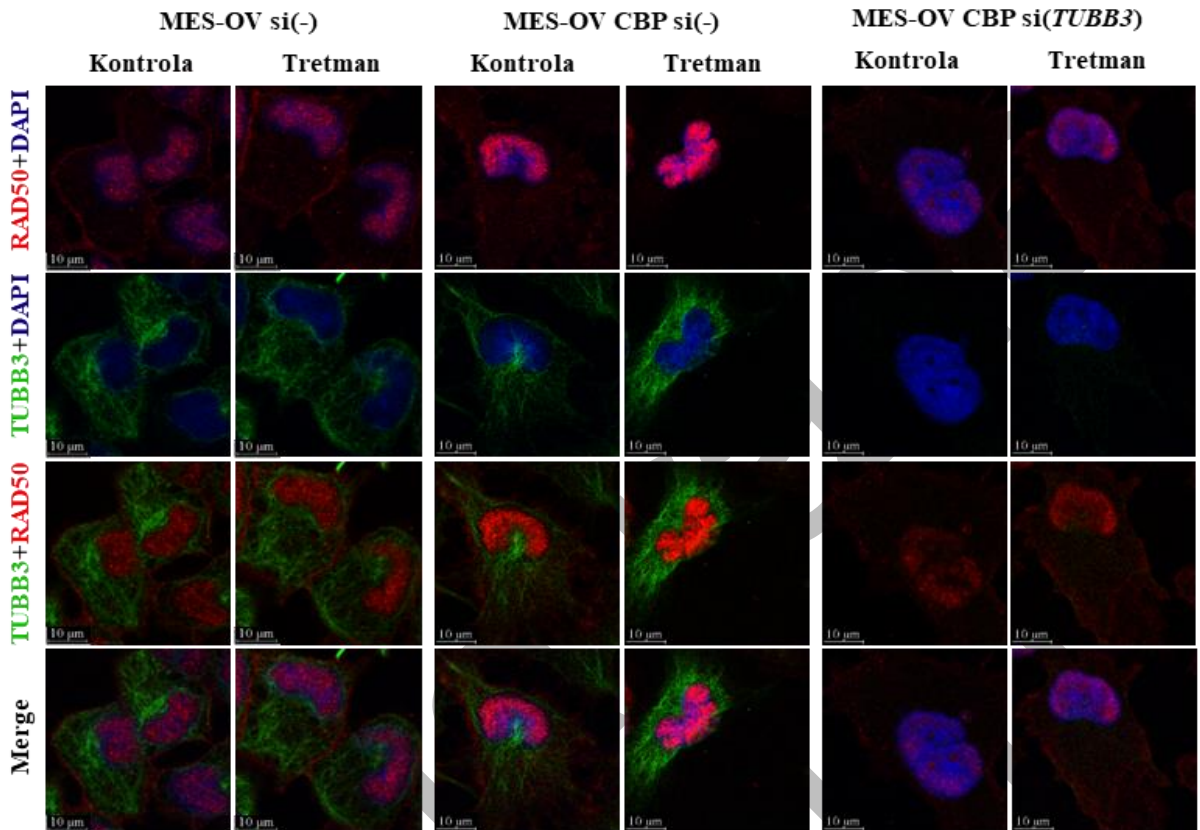
**Slika 33.** Stanice su nasadene i nakon 24 h tretirane 320  $\mu$ M CBP u trajanju 4 h. Medij je promijenjen i stanice su prikupljene nakon 0, 24, 48 i 72 h oporavka. Ekspresija  $\gamma$ H2AX i H2AX određena je metodom Western blot iz ukupnog proteinskog izolata. H2AX je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen dva puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta.

Na temelju dobivenih rezultata postavljena je hipoteza da bi TUBB3, kao dio mikrotubula, mogao biti uključen u prijenos proteina uključenih u popravak DNA iz citoplazme prema jezgri. Naime, prethodno je u stanicama raka pluća A549 pokazano da narušena dinamika mikrotubula, uzrokovana tretmanom stanica vinkristinom, onemogućava prijenos proteina popravka DNA iz citoplazme u jezgru, kao odgovor na tretman doksorubicinom (Poruchynsky et al., 2015). Kako bi se provjerilo ima li utišavanje TUBB3 utjecaj na prijenos proteina popravka DNA u stanicama MES-OV CBP, metodom Western blot mjerena je ekspresija nekoliko proteina popravka uključenih u prepoznavanje dvolančanih lomova DNA (RAD50, p95/NBS1, MRE11, XRCC5) u izoliranim frakcijama citoplazme i jezgre (slika 34). Očekivano je smanjenje citoplazmatske frakcije proteina u tretiranim stanicama u odnosu na netretirane kontrolne stanice zbog prijenosa proteina popravka iz citoplazme u jezgru, u sklopu odgovora stanica na tretman CBP (Poruchynsky et al., 2015). Međutim, kod stanica MES-OV CBP s utišanim TUBB3, nakon tretmana s CBP zabilježeno je smanjenje nuklearne frakcije te posljedično povećanje citoplazmatske frakcije proteina RAD50 i XRCC5. Utišavanje TUBB3 nije utjecalo na prijenos proteina MRE11 i p95/NBS1.



**Slika 34. Utjecaj utišavanja TUBB3 na prijenos proteina popravka DNA.** Transficerane stanice nasadene su u duplikatu i nakon 24 h tretirane 60  $\mu$ M CBP 4 h ili ostavljene kao netretirane kontrole. Iz sakupljenih uzoraka izolirane su citoplazmatska (CF) i jezgrina (NF) frakcija. Ekspresija RAD50, p95/NBS1, MRE11 i XRCC5 određena je metodom Western blot. Isti postotak frakcija CF i NF (25%) je nanesen na gel (8%). Aktin je korišten kao kontrola frakcije CF, a PARP-1 i PCNA kao kontrola frakcije NF. Prikazani su reprezentativni rezultati dva ponovljena eksperimenta, s molekularnim težinama na kojima je signal detektiran (lijevo). Postotak RAD50 i XRCC5 u citoplazmatskoj frakciji izračunat je kao  $[\text{CF}/(\text{CF}+\text{NF})] \times 100$  (desno).

Kako bi se vizualizirao prijenos proteina popravka DNA, konfokalnom mikroskopijom praćen je RAD50 u kontrolnim stanicama i stanicama s utišanim TUBB3. U netretiranim stanicama MES-OV si(-) i MES-OV CBP si(-) signal RAD50 detektiran je na rubovima stanične membrane i u jezgri, dok je nakon tretmana s CBP detektiran jači signal unutar jezgre (slika 35). Međutim, utišavanje TUBB3 u stanicama MES-OV CBP uzrokovalo je značajno smanjenje RAD50 signala u jezgri te njegovo nakupljanje u citoplazmi, čime su potvrđeni rezultati Western blota. Iz dobivenih rezultata moglo se zaključiti kako utišavanje TUBB3 uzrokuje narušavanje strukture mikrotubula i na taj način onemogućava prijenos proteina RAD50 iz citoplazme do jezgre.



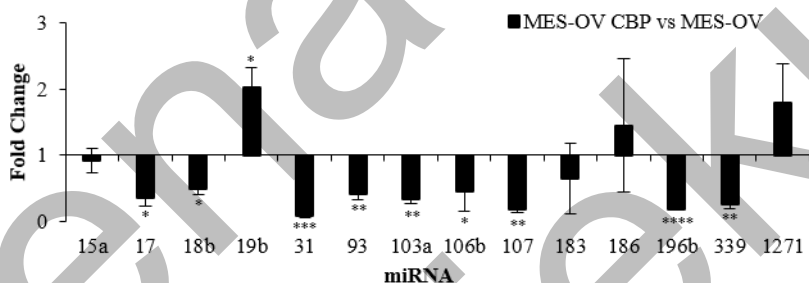
**Slika 35. Utjecaj utišavanja TUBB3 na lokalizaciju signala RAD50.** Transficirane stanice su nasadene u duplikatu na stakalca i nakon 24 h tretirane 60  $\mu\text{M}$  CBP 4 h ili ostavljene kao netretirane kontrole. Stanice su fiksirane te obilježene protutijelom za TUBB3 (zeleno) i RAD50 (crveno). Jezgre su obojane bojom DAPI (plavo). Prikazana su pojedinačna i preklopljena (*eng. Merge*) reprezentativna vidna polja. Eksperiment je ponovljen dva puta. Skala = 10  $\mu\text{m}$

## 4.5. ISTRAŽIVANJE POTENCIJALNE ULOGE DO SADA NEOPIISANIH MIRNA U OTPORNOSTI NA CBP I METASTATKOM POTENCIJALU STANICA RAKA JAJNIKA– 2. PRAVAC ISTRAŽIVANJA

### 4.5.1. Višestruka/Mnogostruka selekcija promijenjenih miRNA

#### 4.5.1.1. Validacija promijenjene ekspresije odabranih miRNA

Promjena ekspresije 14 izdvojenih miRNA u stanicama MES-OV CBP u odnosu na roditeljske MES-OV provjerena je metodom RT-qPCR, korištenjem boje Sybr Green i specifičnog kita za svaku pojedinu miRNA (Tablica 7). U odnosu na roditeljske stanice MES-OV potvrđena je smanjena ekspresija 9 miRNA: 17, 18b, 31, 93, 103a, 106b, 107, 196b i 339 (slika 35).

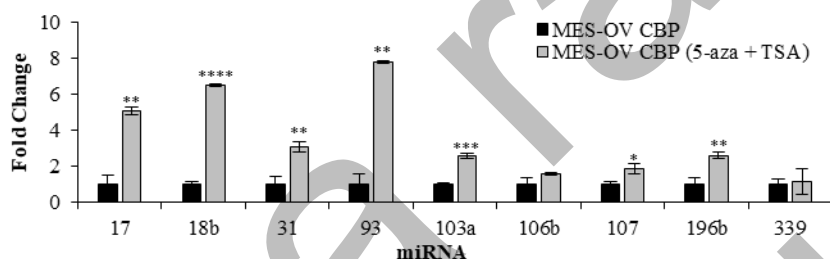


**Slika 35. Validacija promijenjene ekspresije odabranih miRNA.** Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h. Izolirana je ukupna RNA te je određena ekspresija 14 odabranih miRNA u stanicama MES-OV i MES-OV CBP metodom RT-qPCR. *RNU6B* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (srednja vrijednost triplikata) u odnosu na roditeljske stanice, s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.5.1.2. Utjecaj epigenetičkih modulatora na ekspresiju validiranih miRNA

Budući da tretman MES-OV CBP stanica kombinacijom dva epigenetička inhibitora, 5-aza i TSA, povećava njihovu osjetljivost na CBP te smanjuje sposobnost migracije i invazije stanica (Slika 18 i 19), idući korak bio je provjeriti može li ekspresija devet izdvojenih miRNA biti epigenetički

regulirana preko metilacije DNA, odnosno deacetilacije histona. U tu svrhu je metodom RT-qPCR mjerena njihova ekspresija u stanicama MES-OV CBP tretiranim kombinacijom inhibitora 5-aza i TSA. Rezultati su pokazali da kombinirani tretman naznačenim inhibitorima uzrokuje povećanje ekspresije sedam od ispitivanih devet miRNA (slika 36). Najveći utjecaj inhibitora na ekspresiju zamijećen je kod miR-17, miR-18b i miR-93. Zanimljivo je da se radi o članovima klastera miR-17-92 i njegova dva paraloga miR-106b/25 i miR-106a/363 (Tablica 17) (Mogilyansky & Rigoutsos, 2013).

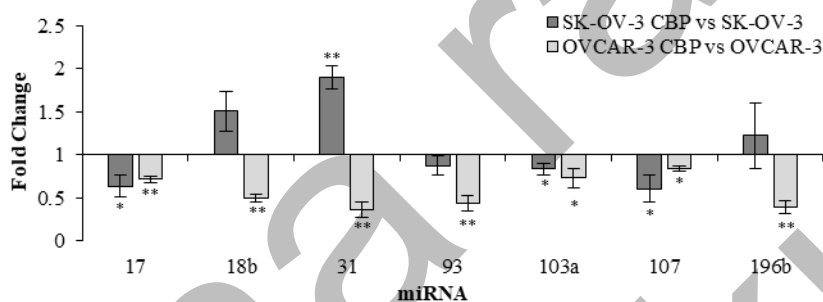


**Slika 36. Utjecaj epigenetičkih inhibitora na ekspresiju kandidata miRNA.** Ekspresija odabranih miRNA u netretiranim stanicama MES-OV CBP i stanicama MES-OV CBP nakon 72 h tretmana 1  $\mu$ M 5-aza i 33,3 nM TSA (medij sa svježim inhibitorima je mijenjan svaki dan) određen je metodom RT-qPCR. *RNU6B* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost (srednja vrijednost triplikata) promjene ekspresije (Fold Change,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) u odnosu na netretirane stanice, s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.5.1.3. Selekcija kandidata miRNA korištenjem dodatna dva para stanica epitelnog raka jajnika

Kako bi se izbjegao odabir miRNA čija je promjena značajna samo za jednu liniju stanica, napravljena je validacija prethodno izdvojenih miRNA korištenjem dodatna dva para stanica raka jajnika, SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP te OVCAR-3 i OVCAR-3 CBP. Kako je već prije istaknuto, korišteni parovi stanica razlikuju se u stupnju osjetljivosti na CBP i TAX, kao i u stupnju epitelno-mezenhimske tranzicije, stoga ovakva višestruka selekcija osigurava odabir miRNA koje nisu specifične za određenu liniju stanica/tip raka. Izolirana je ukupna RNA te je ekspresija miRNA

ispitana metodom RT-qPCR. Iako je smanjena ekspresija svih miRNA potvrđena u OVCAR-3 CBP u odnosu na OVCAR-3, upućujući na sličan odgovor stanica MES-OV na CBP tijekom razvoja otpornih stanica MES-OV CBP, samo su tri miRNA, miR-17, miR-103a i miR-107, pokazale uzorak ekspresije u oba dodatna para stanica usporediv onome u paru stanica MES-OV, točnije smanjenu ekspresiju u odnosu na roditeljske stanice (slika 37). Ovi rezultati ukazali su na moguću ulogu/upotrebu upravo ove tri miRNA kao biljega za stanice raka jajnika otpornih na CBP s lijekom-potaknutim mezenhimskim fenotipom.



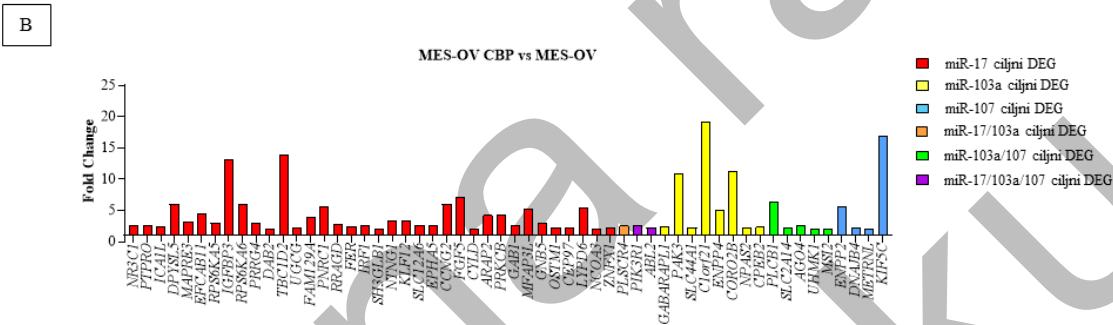
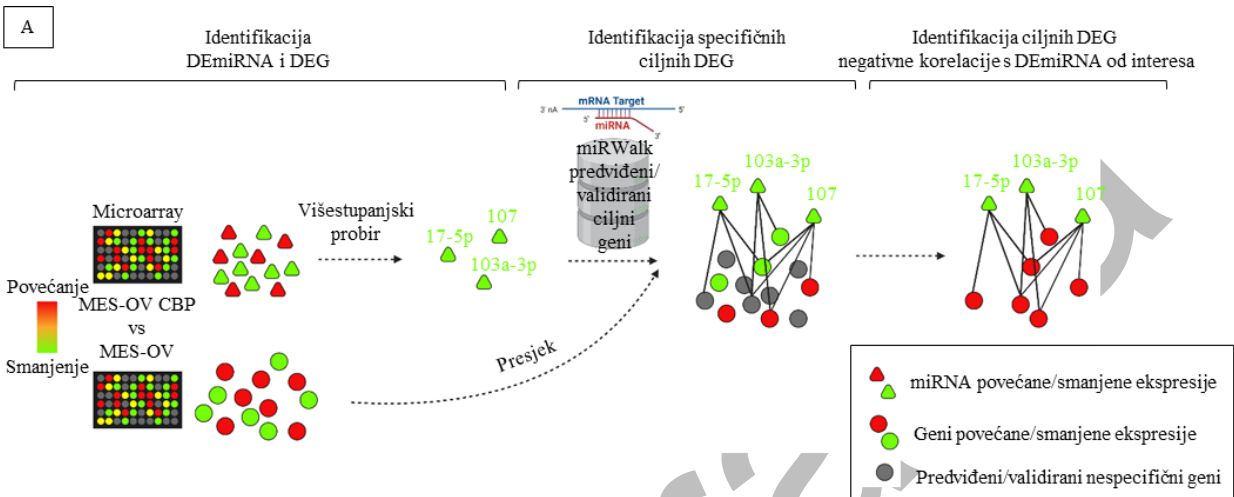
**Slika 37. Validacija promijenjene ekspresije odabranih miRNA u dodatna dva modela epitelnog raka jajnika.** Stanice su nasadene i prikupljene nakon 48 h. Izolirana je ukupna RNA te je određena ekspresija odabranih miRNA metodom RT-qPCR. *RNU6B* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost (srednja vrijednost triplikata) promjene ekspresije (Fold Change,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) u odnosu na odgovarajuće roditeljske stanice, s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

#### 4.5.2. Ispitivanje funkcionalne uloge izdvojenih miRNA u otpornosti stanica na CBP i metastatskom potencijalu

##### 4.5.2.1. Identifikacija gena promijenjene ekspresije koje ciljaju odabrane promijenjene miRNA

U svrhu ispitivanja funkcionalne uloge tri miRNA od interesa napravljeno je pretraživanje njihovih ciljnih gena u bazi miRWalk (Sticht et al., 2018). Nakon što su uzeti u obzir samo ciljni geni korištenjem dviju baza TargetScan i miRDB i/ili eksperimentalno potvrđeni ciljni geni prema bazi DIANA-TarBase, dobiveno je 389 ciljnih gena za miR-17-5p, 191 za miR-103a-3p i 156 ciljnih

gena za miR-107. Kako bi se suzio fokus istraživanja, odnosno utvrdili ciljni geni relevantni za modele u ovom istraživanju, korišteni su rezultati prethodno napravljene analize ekspresije mRNA metode hibridizacije DNA mikročipova kojom je analizirano preko 21 000 gena stanica MES-OV i MES-OV CBP, a čiji je rezultat bio 2127 gena promijenjene ekspresije (DEG) u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV (Kralj et al., 2023). Presjek predviđenih/validiranih ciljnih gena miRNA i gena promijenjene ekspresije rezultiralo je s 39 promijenjenih ciljnih gena za miR-17-5p, 16 za miR-103a-3p i 11 za miR-107 (slika 38A). Posljednji korak filtracije temeljio se na činjenici da negativna korelacija ekspresije između miRNA i njihovih ciljnih gena odgovara prihvaćenom mehanizmu djelovanja miRNA (Schmitz et al., 2022). Budući da su miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 pokazale smanjenu ekspresiju u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV, u obzir su uzeti samo geni s povišenom ekspresijom u MES-OV CBP u odnosu na MES-OV. Slika 38B prikazuje rezultate dobivene opisanom presjekom lista gena, ciljne gene tri miRNA od interesa čija je ekspresija povećana najmanje dva puta u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV. Osim jedinstvenih ciljnih DEG za svaku pojedinu miRNA, identificirana su dva DEG kao dijeljene mete: *PIK3R1* i *ABL2*.



### Slika 38. Identifikacija ciljnih gena miRNA promijenjene ekspresije u stanicama otpornim na CBP.

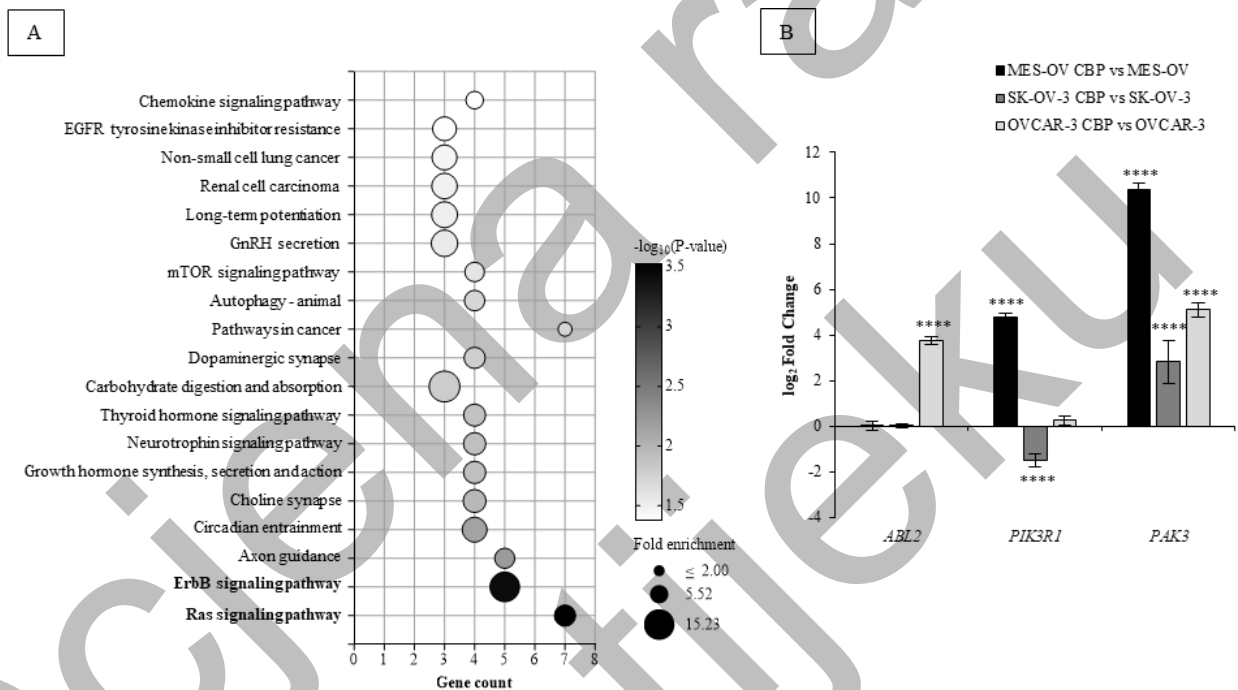
(A) Napravljen je presjek liste gena promijenjene ekspresije ( $FC > 2$ ) dobivenih analizom rezultata metode hibridizacije DNA mikročipova i ciljnih gena izdvojenih promijenjenih miRNA (miR-17-5p, miR-103a-3p, miR-107) dobivenih korištenjem baze miRWalk. Identificirani su ciljni geni tri miRNA od interesa povišene ekspresije u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV. (B) Graf prikazuje jedinstvene i dijeljene ciljne gene miR-17-5p, miR103a-3p i miR-107 povećane ekspresije ( $FC > 2$ ) u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV.

#### 4.5.2.2. Identifikacija signalnih puteva u koje su uključene odabrane miRNA

Skupni set ciljnih DEG analiziran je u programu DAVID kako bi se utvrdilo u kojim signalnim putevima sudjeluju identificirani geni. Analiza signalnih puteva KEGG ukazala je na uključenost gena u različite signalne puteve povezane s rakom, od kojih su najznačajniji bili Ras i ErbB (slika 40A). Kako bi se ovi rezultati potvrdili, odlučeno je provjeriti ekspresiju nekoliko gena iz signalnih puteva Ras i ErbB. U oba signalna puta zastupljeni su bili geni *PIK3R1* i *ABL2*, mete sve tri



miRNA. Osim ta dva gena, za provjeru promjene ekspresije izabran je i gen *PAK3*, jedinstveni ciljani gen miR-103a-3p, također zastupljen u oba signalna puta. Ekspresija tri gena provjerena je u sva tri para linija stanica (slika 40B). Povećana ekspresija *ABL2* potvrđena je u stanicama OVCAR-3 CBP u odnosu na OVCAR-3, dok je u stanicama MES-OV CBP potvrđena povećana ekspresija *PIK3R1*. Najzanimljiviji se ipak pokazao gen *PAK3*, čija je povećana ekspresija potvrđena u sve tri linije stanica otporne na CBP. Ovaj rezultat izdvojio je miR-103a-3p kao najzanimljivijeg kandidata za daljnje istraživanje.

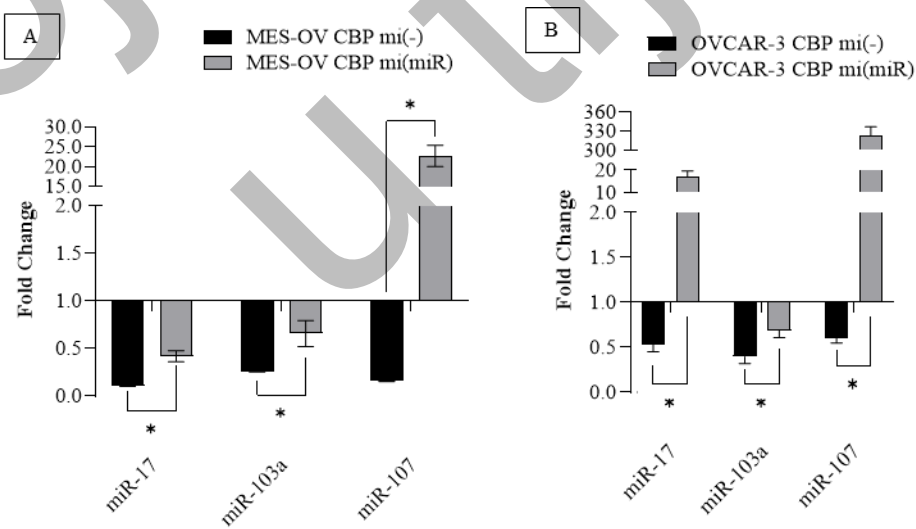


**Slika 40. Analiza signalnih puteva u koje su uključene miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107. (A)** Identificirani ciljani geni tri miRNA od interesa povišene ekspresije u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV klasificirani su u pripadajuće signalne puteve korištenjem programa DAVID (baza KEGG).  $P < 0,05$  i minimum od tri gena za prepoznavanje signalnog puta korišteni su kao kriteriji za probir. **Provjera ekspresije tri ciljna gena miRNA od interesa u stanicama otpornim na CBP.** (B) Metodom RT-qPCR određena je ekspresija *ABL2*, *PIK3R1* i *PAK3*. *GAPDH* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije (srednja vrijednost triplikata) u odnosu na odgovarajuće roditeljske stanice, s pripadajućim standardnim devijacijama. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 4.5.2.3. Promjena ekspresije korištenjem sekvenci mimik miRNA

#### 4.5.2.3.1. Provjera uspješnosti promjene ekspresije miRNA korištenjem sekvenci mimik miRNA

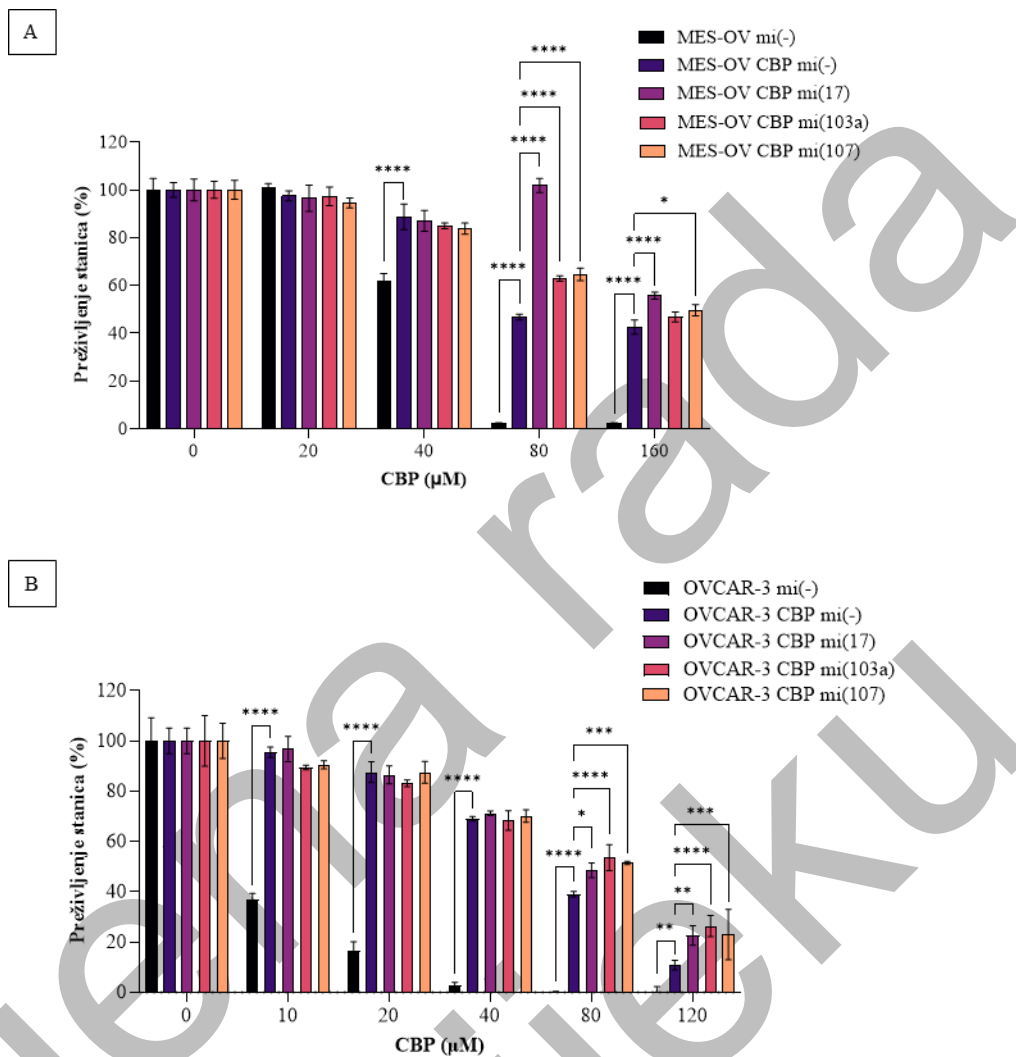
U svrhu ispitivanja uloge tri miRNA od interesa (miR-17-5p, miR-103a-3p, miR-107) u otpornosti stanica na CBP i metastatskom potencijalu, stanice otporne na CBP (tipa HGSOc) su transficirane sa sekvencama mimik miRNA s ciljem povećanja njihove ekspresije. Osim na primarnom modelu MES-OV CBP i odgovarajućim roditeljskim stanicama MES-OV, transfekcija je napravljena i na drugom modelu HGSOc, OVCAR-3 CBP i OVCAR-3, kako bi se isključila mogućnost da se radi o pojavi karakterističnoj za jednu liniju stanica. Povećanje ekspresije tri miRNA u stanicama MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP potvrđeno je metodom RT-qPCR, usporedbom izmjerene ekspresije s odgovarajućim negativnim kontrolama (slika 41). Valja napomenuti kako je uspješnost transfekcije bila znatno veća u slučaju mimik miR-107 u obje linije stanica, iako su korištene jednake koncentracije sekvenci mimik za sve tri miRNA. Također, korištenje širokog raspona koncentracija mimik (od 0,5 nM do 50 nM) rezultiralo je sličnom uspješnošću transfekcije, odnosno sličnom, vrlo visokom, ekspresijom miR-107. Nasuprot tome, korištenjem miR-103a-3p postignut je efekt povišenja ekspresije najbliži željenom, a to je približavanje razina ekspresije miR-103a-3p u stanicama otpornim na CBP na razinu one izmjerene u odgovarajućim roditeljskim stanicama.



**Slika 41. Provjera uspješnosti transfekcije mimik miRNA.** Stanice su transficirane sekvencama mimik miRNA tri izdvojene miRNA te je nakon 48 h izolirana ukupna RNA. Ekspresija miR-17-5p, miR-103a-3p, miR-107 određena je metodom RT-qPCR. *RNU6B* je korišten kao unutarnja kontrola. Rezultati su prikazani kao relativna prosječna vrijednost promjene ekspresije (srednja vrijednost triplikata) u odnosu na stanice (A) MES-OV mi(-) i (B) OVCAR-3 mi(-), s pripadajućim standardnim devijacijama. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### **4.5.2.3.2. Utjecaj povišenja ekspresije na otpornost stanica na CBP**

Iako analiza signalnih puteva nije ukazala na uključenost tri miRNA (miR-17-5p, miR-103a-3p, miR-107) u otpornost stanica na CBP, ipak je provjeren moguć utjecaj povišenja ekspresije na odgovor stanica na tretman CBP, s obzirom na to da je konstitutivno smanjenje ekspresije miRNA molekula od interesa uvjetovano CBP. U tu svrhu, kontrolne stanice i stanice s povišenom ekspresijom miRNA od interesa tretirane su različitim koncentracijama CBP i analizirane testom metabolizma resazurina. Zanimljivo, povećanje ekspresije sekvencama mimik mi(17), mi(103a) i mi(107) rezultiralo je smanjenom osjetljivošću transficiranih stanica MES-OV CBP na CBP u odnosu na kontrolne stanice (slika 42A). Isti slučaj zabilježen je i kod stanica OVCAR-3 CBP (slika 42B).

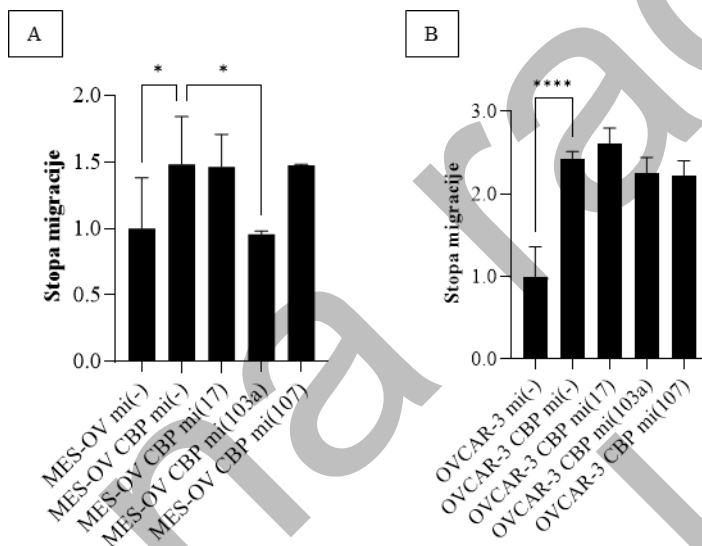


**Slika 42. Preživljenje stanica MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP nakon transfekcije sekvencama mimik miRNA.** Transficirane stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića i idući dan tretirane različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 72 sata. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadrplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001

#### 4.5.2.3.3. Utjecaj povišenja ekspresije na metastatski potencijal stanica otpornih na CBP

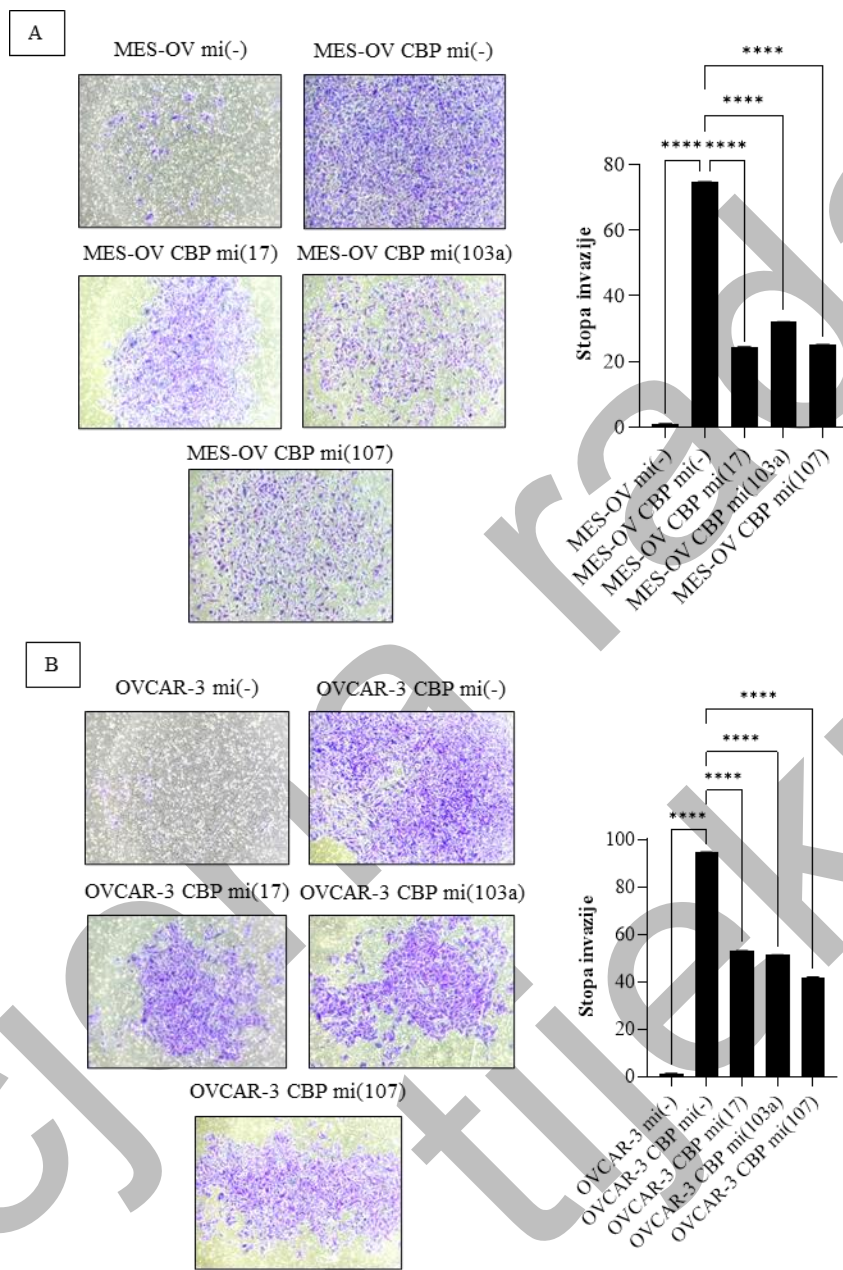
Uloga miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 u metastatkom potencijalu stanica HGSOE otpornih na CBP ispitana je testom zacjeljivanja rana i testom invazije, opisanim u poglavlju metode.

Rezultati su potvrdili veću sposobnost migracije stanica MES-OV CBP transficiranih negativnom kontrolom u odnosu na roditeljske kontrolne stanice MES-OV (slika 43A), te OVCAR-3 CBP transficiranih negativnom kontrolom u odnosu na roditeljske kontrolne stanice OVCAR-3, kod kojih je ta razlika i izraženija (slika 43B). Nadalje, samo je transfekcija sekvencom mimik mi(103a) smanjila sposobnost migracije MES-OV CBP u odnosu na kontrolne MES-OV CBP (slika 43A), dok taj efekt nije zabilježen kod OVCAR-3 CBP.



**Slika 43. Migracija stanica MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP nakon transfekcije sekvencama mimik miRNA.** Stanice su nasadene u pločice s 24 bunarića. Migracija stanica izmjerena je testom zacjeljivanja rana. Rezultati su prikazani kao relativne prosječne stope migracije u odnosu na stanice (A) MES-OV mi(-) i (B) OVCAR-3 mi(-), zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. Eksperiment je ponovljen tri puta. \*,  $p < 0,05$ , \*\*\*\*,  $p < 0,0001$

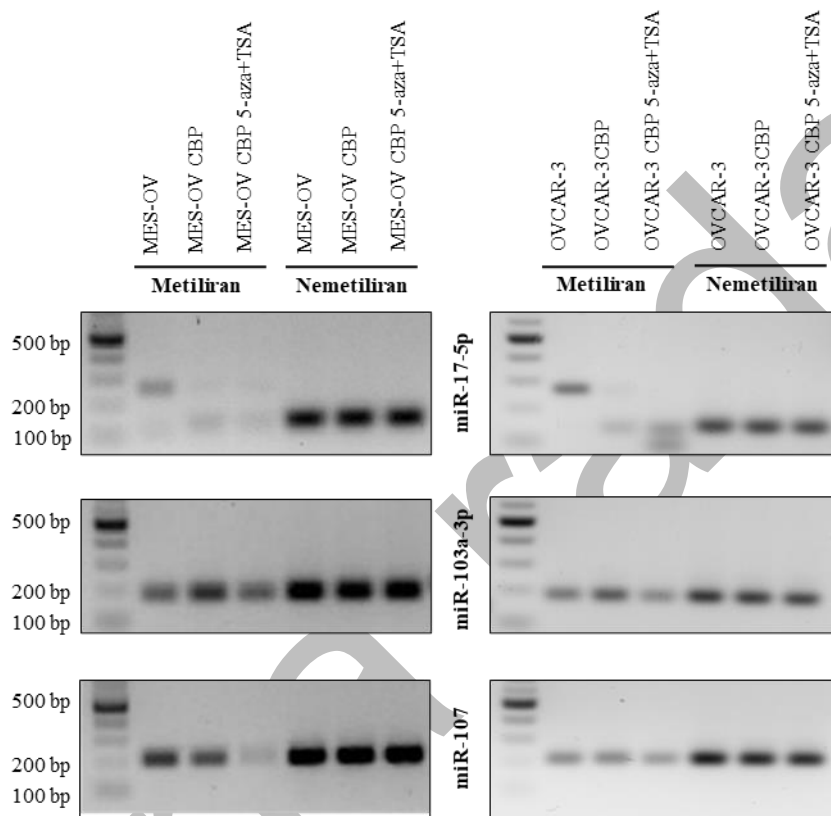
Stanice transficirane sekvencama mimik miRNA nasadene su u Boydenove komorice ispunjene matrigelom kako bi se pratila sposobnost invazije. Kao i u slučaju migracije, potvrđena je značajno veća sposobnost invazije kontrolnih stanica otpornih na CBP u odnosu na odgovarajuće roditeljske kontrolne stanice, izraženija kod para OVCAR-3. Nadalje, povećanje ekspresije sve tri miRNA rezultiralo je smanjenom invazijom stanica MES-OV CBP (slika 44A) i OVCAR-3 CBP (slika 44B) u odnosu na odgovarajuće negativne kontrole, čime je potvrđena uloga ovih miRNA u metastatskom potencijalu stanica HGSOE otpornih na CBP.



**Slika 44. Sposobnost invazije stanica MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP nakon transfekcije sekvencama mimik miRNA.** Invazija stanica izmjerena je testom invazije. Rezultati su prikazani kao reprezentativne fotografije i kao relativne prosječne stope invazije u odnosu na stanice (A) MES-OV mi(-) i (B) OVCAR-3 mi(-), zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta.\*\*\*\*,  $p < 0,0001$

#### 4.5.2.4. Regulacija ekspresije miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 u stanicama otpornim na CBP

Potvrdivši ulogu tri miRNA od interesa u procesu invazije stanica HGSOC otpornih na CBP, nametnulo se pitanje kako je njihova ekspresija regulirana u tim stanicama, odnosno na koji način je izlaganje rastućim koncentracijama CBP rezultiralo njihovom stabilnom smanjenom ekspresijom. Sukladno rezultatima koji su pokazali kako tretman epigenetskim inhibitorima 5-azom i TSA ima negativan učinak na invazivnu sposobnost stanica MES-OV CBP (slika 18), te da se pri istim uvjetima povećava ekspresija tri miRNA od interesa (slika 36), postavljena je hipoteza da je ekspresija ovih miRNA u stanicama otpornim na CBP regulirana epigenetički. Kako bi se ova tvrdnja provjerila, provjeren je metilacijski status njihovih promotora (slika 45). Nemetilirana DNA CG otočića promotorskih regija zabilježena je za sve tri miRNA u slučaju para stanica MES-OV i OVCAR-3, dok je metilirana DNA detektirana za miR-103a-3p i miR-107, ali ne i za miR-17-5p. Nadalje, metilacija miR-103a-3p promotora izraženija je kod stanica MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP u odnosu na roditeljske stanice MES-OV i OVCAR-3, te se smanjuje na razinu usporedivu onoj u roditeljskim stanicama nakon tretmana s inhibitorima 5-aza i TSA. Ovi rezultati sugerirali su da bi miR-103a-3p mogla biti epigenetički utišana na konstitutivnoj razini u stanicama HGSOC otpornim na CBP, kao prilagodba na uzastopne tretmane CBP prilikom razvoja otpornosti na lijek kod ovih stanica. Što se tiče miR-17-5p i miR-107, ovi rezultati pokazuju kako njihova smanjena ekspresija na konstitutivnoj razini nije vezana za status metilacije promotora (slika 45).



**Slika 45. Metilacijski status promotora miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 u stanicama otpornim na CBP.** Stanice su nasade i idući dan tretirane 72 h s kombinacijom inhibitora 5-aza (1  $\mu$ M) i TSA (33,3 nM) ili ostavljene kao netretirane kontrole. Izolirana DNA je bisulfitno konvertirana te je korištena za analizu metilacijskog statusa promotora metodom MSP.

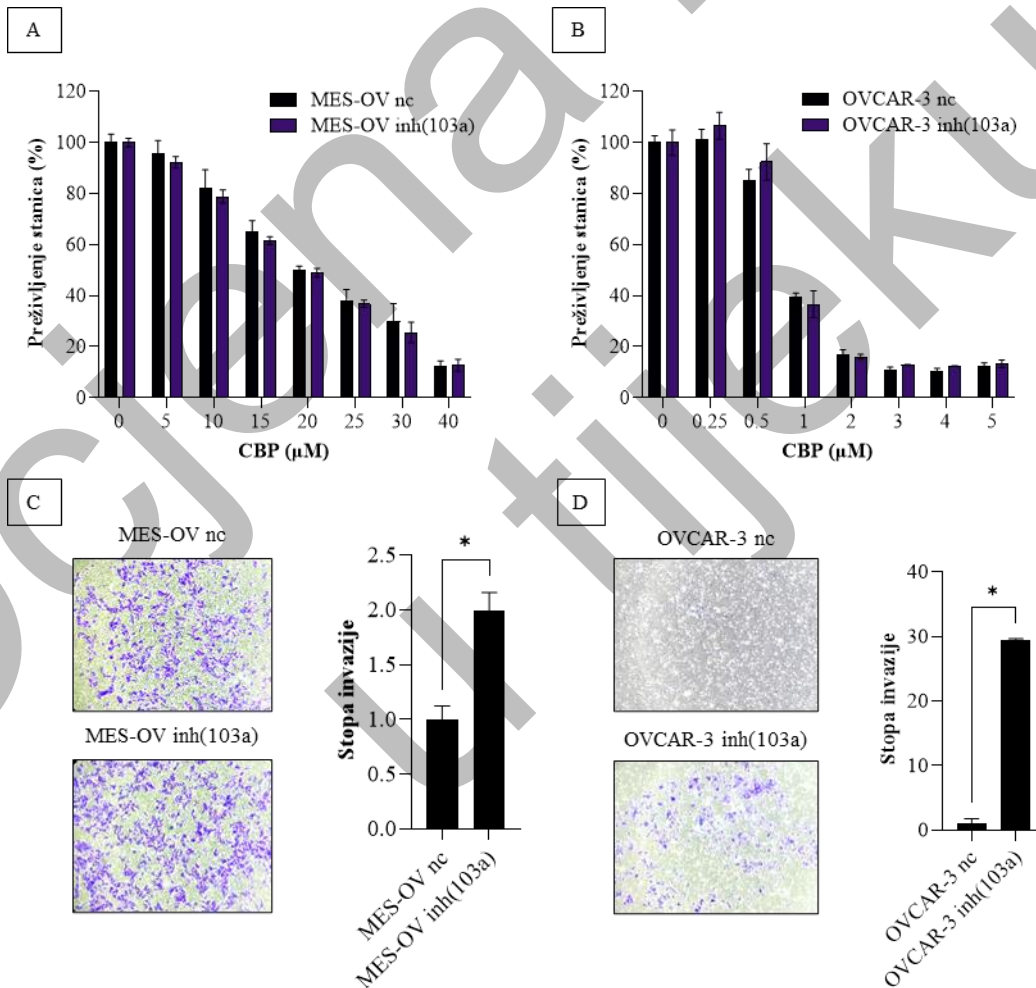
#### 4.5.2.5. Promjena ekspresije korištenjem inhibitora miRNA

MiRNA-103a-3p, čija smanjena ekspresija u stanicama HGSOV MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP na konstitutivnom nivou, ima ulogu u metastatskom potencijalu ovih stanica, pokazala se kao najzanimljivija od tri istraživane miRNA. U svrhu dodatne potvrde njene uloge u metastatskom kapacitetu stanica, napravljena je manipulacija njene ekspresije u roditeljskim stanicama MES-OV i OVCAR-3 korištenjem inhibitorne sekvence za miRNA-103a.



#### 4.5.2.5.1. Utjecaj smanjenja ekspresije miR-103a-3p na otpornost roditeljskih stanica na CBP i njihov metastatski potencijal

U svrhu procjene utjecaja smanjenja ekspresije miR-103a-3p na osjetljivost na CBP, roditeljske stanice MES-OV i OVCAR-3 transficirane negativnom kontrolom i inhibitorom miR-103a-3p tretirane su različitim koncentracijama CBP te analizirane testom metabolizma resazurina. Prema očekivanju, inhibicija miR-103a-3p nije imala utjecaj na odgovor stanica MES-OV (slika 46A) niti OVCAR-3 (slika 46B) na tretman CBP, potvrdivši prethodne rezultate (slika 42) da ova miRNA nema ulogu u navedenom procesu. Međutim, inhibicija ekspresije miR-103a-3p značajno je povećala sposobnost invazije stanica MES-OV (slika 46C). Povećanje stope invazije nakon inhibicije miR-103a-3p bilo je još značajnije kod stanica OVCAR-3 (slika 46D).



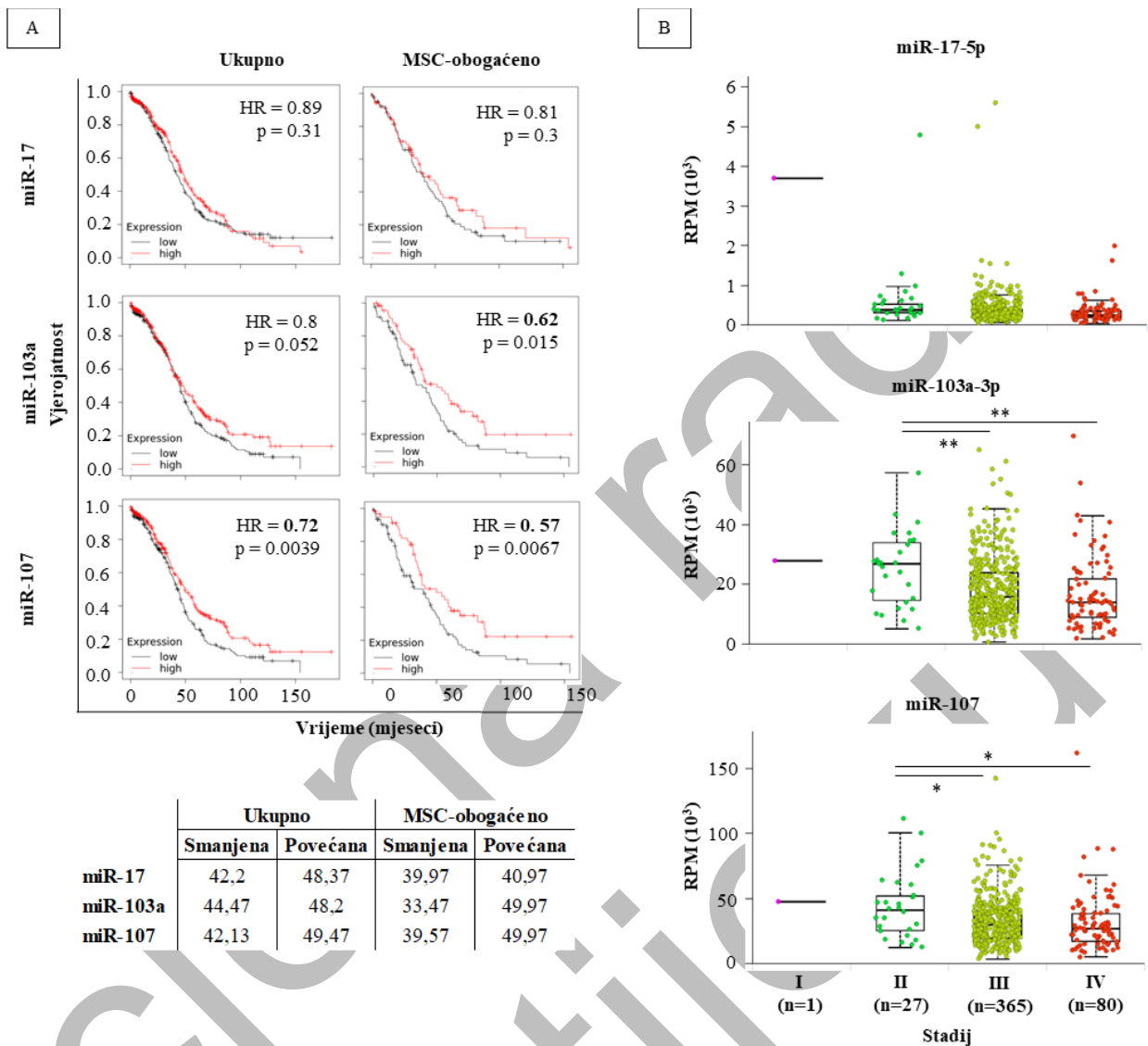
#### **Slika 46. Preživljene roditeljskih stanica MES-OV i OVCAR-3 nakon inhibicije miR-103a-3p.**

Transficirane stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića i idući dan tretirane različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 72 sata. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadrplikata) u odnosu na stanice (A) MES-OV nc i (B) OVCAR-3 nc s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta.

**Pokretljivost roditeljskih stanica MES-OV i OVCAR-3 nakon inhibicije miR-103a-3p.** Invazija stanica izmjerena je testom invazije. Rezultati su prikazani kao reprezentativne fotografije i kao relativne prosječne stope invazije u odnosu na stanice (C) MES-OV nc i (D) OVCAR-3 nc, zajedno s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$

#### **4.5.3. MiR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 kao farmakogenetski biljezi**

Krajnji cilj bio je istražiti moguću vrijednost miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 kao farmakogenetskih biljega za predviđanje preživljenja. U tu svrhu korišten je alat KM Plotter s ugrađenom funkcijom miRpower (Györfy, 2024). Analiza ukupne skupine uzoraka raka jajnika ukazala je da samo miR-107 ima statistički značajnu prediktivnu vrijednost, s najvećom razlikom u medijanu preživljenja između niske i visoke ekspresije (42,13 prema 49,47 mjeseci) (Slika 47A). Zasebno je analizirana i skupina uzoraka s visokim udjelom mezenhimskih matičnih stanica (MSC-obogaćeno) zbog povećane ekspresije nekoliko gena povezanih s matičnosti u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV (Tablica P2) (Kralj et al., 2023). Mir-17-5p nije pokazala značajnu prediktivnu vrijednost ni u ovom slučaju. Međutim, miR-103a-3p pokazala je statistički značajnu prediktivnu vrijednost na ovom uzorku (MSC-obogaćeno), s velikom razlikom u medijanu preživljenja (33,47 mjeseci za nisku, 49,97 mjeseci za visoku ekspresiju). Nadalje, miR-107 potvrdila je svoju statistički značajnu prediktivnu vrijednost i na ovom uzorku, s još većom razlikom u medijanu preživljenja (39,57 mjeseci za nisku, 49,97 mjeseci za visoku ekspresiju). Dodatno, analizirana je ekspresija tri miRNA po stadijima seroznog cistadenokarcinoma jajnika pomoću programa UALCAN (Chandrashekar et al., 2022) (Slika 47B). Rezultati su ukazali na postojanje značajne razlike u ekspresiji između nižeg stadija II i viših stadija III i IV za miR-103a-3p i miR-107. Rezultati sugeriraju da miR-103a-3p i miR-107 imaju prognostičku vrijednost za rak jajnika.



**Slika 47. Analiza prognostičke vrijednosti miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107.** (A) Analiza ukupnog preživljenja (OS) napravljena je korištenjem alata Kaplan-Meier plotter na cjelokupnom uzorku pacijentica s rakom jajnika (Ukupno; n=485) i na uzorcima raka jajnika s visokim udjelom mezenhimskih matičnih stanica (MSC-obogaćeno; n=151). Prikazane su vrijednosti HR i p-vrijednosti. Značajne vrijednosti su zadebljane (gore). Prikazan je i medijan preživljenja (u mjesecima) unutar dvije skupine za smanjenu i povećanu ekspresiju određene miRNA (dolje). (B) Ekspresija miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 analizirana je na 473 uzorka (TCGA) seroznog cistadenokarcinoma jajnika, po stadijima I-IV. Rezultati su prikazani kao očitavanja po milijunu (*engl. reads per million*, RPM) u određenom stadiju raka (I-IV). Naznačen je broj uzoraka po svakom stadiju (n). \*, p<0,05; \*\*, p<0,001

## 5. RASPRAVA

Rak jajnika najsmrtonosnije je ginekološko oboljenje kod žena. Unatoč napretku ciljanih terapija, kemoterapija ostaje temelj liječenja raka jajnika. Otpornost na terapiju predstavlja jedan od glavnih limitirajućih faktora uspješnog liječenja raka, pa tako i raka jajnika, kod kojeg usprkos početnom pozitivnom odgovoru na terapiju, pacijentice dožive povrat bolesti unutar tri godine (Xie et al., 2021). Kao rješenje za otpornost na jednokomponentnu kemoterapiju uvedeno je kombiniranje lijekova s nepreklapajućim mehanizmima, kako bi se poboljšao ishod liječenja (Vasan et al., 2019). Standardni kemoterapijski režim stoga uključuje spojeve na bazi platine, kao što je karboplatina, u kombinaciji s taksanima poput paklitaksela. Iako su inicijalno učinkoviti, na kraju dolazi do razvoja otpornosti na jedan ili oba lijeka (višestruka otpornost, MDR), što dovodi do neuspjeha liječenja i napredovanja bolesti (Cortez et al., 2018). Bolje razumijevanje mehanizama otpornosti ključno je kako bi se pacijenticama ponudile uspješnije opcije liječenja.

Sa ciljem da se detaljnije istraže molekularni mehanizmi otpornosti raka jajnika na terapiju, u sklopu ovog istraživanja korištene su tri linije stanica epitelnog raka jajnika MES-OV, SK-OV-3 i OVCAR-3 te iz njih razvijene linije stanica stabilno otporne na CBP, MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP (Kralj et al., 2023). Budući da najveći postotak dijagnoza otpada na epitelni rak jajnika, koji ujedno ima i najlošiju statistiku što se tiče preživljenja, ove linije predstavljaju vrijedne modele za istraživanje otpornosti raka jajnika (Desai et al., 2014). Kako bi eksperimentalni model bio klinički relevantan, mora što bolje oponašati uvjete koje pacijenti prolaze tijekom kemoterapije. Stoga smjernice obuhvaćaju korištenje niske koncentracije lijeka, te pulsne tretmane s vremenom oporavka stanica u mediju bez lijeka između dva tretmana, čime se simuliraju ciklusi kemoterapije. Stabilna otpornost na kliničku dozu CBP ključna je značajka modela korištenih u ovom istraživanju, jer je čest nedostatak modela razvijenih na ovaj način nestabilna otpornost koja se mora održavati ponavljanjem tretmana čime se u eksperimentalni model unose nove promjene, odnosno mutacije (McDermott et al., 2014). Za razliku od stanica MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP, stanice SK-OV-3 CBP nisu razvile križnu otpornost na TAX. Ovakva heterogenost u razvoju otpornosti između linija stanica tretiranih istim spojem odražava heterogenost koja se javlja u kliničkoj otpornosti na lijekove (McDermott et al., 2014; Stordal et al., 2007). Nadalje, gotovo 70% dijagnosticiranih solidnih i hematoloških tumora karakterizira višestruka otpornost prema mehanistički nepovezanim lijekovima (Riganti & Contino, 2019).

Ipak, važno je napomenuti kako postepeni razvoj otpornosti *in vitro* ne može u potpunosti predstavljati razvoj otpornosti *in vivo*, gdje se taj proces odvija pod utjecaj mikrookoliša tumora (engl. *tumor microenvironment*, TME) (Erin et al., 2020; Kilmister et al., 2022).

Istražujući molekularne mehanizme koji se uglavnom spominju u kontekstu otpornosti na CBP (sposobnost izbacivanja lijeka van stanice) (Sazonova et al., 2021), pokazali smo da su otporne linije stanica akumulirale manje platine u odnosu na odgovarajuće roditeljske linije. Provjerom ekspresije transportera ABC (ABCB1, ABCC1, ABCG2), povezanih s višestrukom otpornosti (MDR) (Tamaki et al., 2011), te tretmanom specifičnim inhibitorima, isključena je uloga ovih pumpi u otpornosti stanica MES-OV CBP i SK-OV-3 CBP te pumpi ABCB1 i ABCC1 kod OVCAR-3 CBP. Povišena ekspresija druge dvije pumpe, ATP7A i ATP7B, kod MES-OV CBP odnosno SK-OV-3 CBP stanica mogla bi biti odgovorna za smanjenu akumulaciju platine kod ovih stanica (Pernar Kovač et al., 2023). Uloga povišene ekspresije ABCG2 kod stanica OVCAR-3 CBP u ovom trenutku nije jasna. Naime, CBP se ne smatra supstratom ove pumpe (Westover & Li, 2015). Međutim, ABCG2 sudjeluje u izbacivanju TAX, te je povišena ekspresija ove pumpe zabilježena u OVCAR-3 stanicama otpornim na TAX (Chung et al., 2019), pa se može pretpostaviti da sudjeluje u odgovoru stanica OVCAR-3 CBP na TAX. Nadalje, isključivši ABCB1 iz odgovora stanica MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP na tretman TAX-om, ispitan je drugi najčešće u literaturi opisan mehanizam otpornosti na TAX, povišena ekspresija TUBB3 (Aldonza et al., 2016; Sazonova et al., 2021; Stengel et al., 2010). Dobiveni rezultati su sugerirali da je povećani TUBB3 imao utjecaj na odgovor MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP na TAX, ali ne i u slučaju SK-OV-3 CBP.

Metastaziranje, koje uključuje pojavu ascitesa u peritonealnoj šupljini i dovodi do diseminacije stanica unutar abdomena, dodatno komplicira liječenje raka jajnika. Epitelno-mezenhimska tranzicija igra ključnu ulogu u prvim koracima metastaziranja, omogućujući stanicama raka stjecanje migratornih i invazivnih svojstava (Kilmister et al., 2022). Sva tri modela stanica otpornih na CBP, korištena u ovom radu, karakterizira fenotip sličan mezenhimskim stanicama, što je potvrđeno smanjenom ekspresijom epitelnih (E-kadherin) i povećanom ekspresijom mezenhimskih markera (vimentin, N-kadherin, fibronektin). Osim toga, razvijene linije stanica pokazale su veću sposobnost migracije i invazije u odnosu na roditeljske stanice epitelnih karakteristika (Kralj et al., 2023). Međudjelovanje između otpornosti na kemoterapiju i

metastaziranja/EMT-a predmet je istraživanja već dugi niz godina, međutim i dalje ostaje nerazjašnjeno. Bolje razumijevanje njihove sprege ključno je za razvoj učinkovitijih terapijskih strategija. Ciljanje molekula uključenih u EMT moglo bi potpomoći u eliminaciji stanica koje su preživjele terapiju te spriječiti razvoj recidiva (Creighton et al., 2009; Su et al., 2023; Zheng et al., 2015).

Brojne miRNA do sada su identificirane s ulogom u širenju raka jajnika i odgovoru na terapiju, međutim i dalje postoji stalna potreba za otkrivanjem novih s dobrim prognostičkim i prediktivnim karakteristikama (Xie et al., 2021). Jedan od primjera uspješnog profiliranja ekspresije miRNA je MIROvaR, prediktivni panel koji uključuje 35 miRNA identificiranih analizom 894 uzorka epitelnog raka jajnika, s mogućnošću razvrstavanja pacijenata u grupe s niskim ili visokim rizikom za progresiju bolesti (Bagnoli et al., 2016). U sklopu ovog istraživanja napravljeno profiliranje ekspresije 752 miRNA rezultiralo je identifikacijom 29 miRNA povećane i 48 smanjene ekspresije u stanicama MES-OV CBP u odnosu na roditeljske stanice MES-OV.

Deacetilacija histona i metilacija DNA dvije su najvažnije modifikacije koje utječu na pojačanu ili smanjenu ekspresiju gena, te tako dovode do napredovanja raka, metastaza i razvoja otpornosti u raznim vrstama raka, uključujući rak jajnika (Feinberg et al., 2016; Sookram et al., 2019). Ekspresija brojnih miRNA također je regulirana putem metilacije i deacetilacije, kao što i brojne miRNA reguliraju ekspresiju DNA metiltransferaza (DNMT) i histonskih deacetilaza (HDAC), enzima odgovornih za metilaciju DNA i deacetilaciju histona (Arif et al., 2020; Hanahan, 2022; Xie et al., 2021). Važnost epigenetičke regulacije naglašava velik broj istraživanja usmjerenih na upotrebu epigenetičkih regulatora, kao što su 5-aza i TSA, kao dodatka konvencionalnoj kemoterapiji (Sookram et al., 2019; Wajapeyee & Gupta, 2021). Rezultati dobiveni tretmanom stanica MES-OV CBP kombinacijom inhibitora 5-aza i TSA te CBP-om u skladu su s navedenim, budući je tretman rezultirao povećanjem osjetljivosti na CBP i smanjenom sposobnosti invazije. Na temelju rezultata, fokus je stavljen na miRNA smanjene ekspresije u stanicama MES-OV CBP u odnosu na roditeljske MES-OV, zbog pretpostavke da bi ova smanjena ekspresija mogla biti upravo posljedica promijenjene epigenetičke regulacije.

Na temelju pretraživanja literature, dobivenih rezultata te prethodnog iskustava, odabrano je 14 miRNA za istraživanje potencijalne uloge u otpornosti stanica na lijekove i metastatski potencijal. Uz njih, istražena je i uloga obitelji miR-200 u otpornosti na CBP i metastatskom potencijalu

stanica MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP, čime je istraživanje podijeljeno u dva pravca.

Članovi obitelji miRNA-200, prepoznati kao krovni regulatori EMT-a, igraju važnu ulogu u migraciji stanica, invaziji i otpornosti na lijekove, kroz regulaciju ekspresije različitih proteina, uključujući TUBB3 (Cavallari et al., 2021; Koutsaki et al., 2017; S. J. O'Brien et al., 2018). Članovi su lokalizirani u dva klastera, miR-200b/200a/429 na kromosomu 1p36.33 i miR-200c/141 na kromosomu 12p13.31. Također, ovisno o prisutnosti nukleotida U ili C u sekvenci „seed“, dijele se u dvije skupine: miR-200b, miR-200c i miR-429 te miR-200a i miR-141. Ova razlika u samo jednom nukleotidu omogućuje posjedovanje jedinstvenih ciljnih molekula pojedinih miRNA istog klastera (Cavallari et al., 2021). Provjerom ekspresije svih pet članova obitelji miR-200 u tri linije stanica otporne na CBP, primijećena je korelacija obrasca ekspresije miR-200 s prisutnošću križne otpornosti: snižena ekspresija obitelji miR-200 u stanicama MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP s križnom otpornosti na TAX, dok kod stanica SK-OV-3 CBP, koje nisu otporne na TAX, to nije bio slučaj. Različita istraživanja pokazala su ulogu povišene i snižene ekspresije miRNA-200 u odgovoru na terapiju stanica različitih vrsta raka (Wen et al., 2021). Članovi obitelji miR-200 negativno utječu na otpornost oralnog karcinoma pločastih stanica na cDDP preko regulacije gena Notch1, Jun, CTNNB1, CEBPA i ETS1 (H.-T. Wu et al., 2020). Nadalje, povećana ekspresija miR-141-3p zabilježena je kod pločastih stanica ezofagealnog karcinoma otpornih na 5-fluorouracil i oksaliplatinu EC9706R u odnosu na roditeljske, te njena inhibicija dovodi do reverzije stečene otpornosti (Jin et al., 2016). Kemoterapeutici mogu djelovati na ekspresiju miRNA; cDDP vezanjem na pre-miR-200b onemogućuje cijepanje prekursora od strane enzima Dicer čime smanjuje ekspresiju miR-200b u stanicama OVCAR-3 (Mezencev & Wartell, 2018). Ova interakcija navodi se kao moguće objašnjenje kako tretman cDDP-om potiče EMT, međutim isto nije detaljnije istraženo. Nadalje, povećana ekspresija miR-200c pridonosi otpornosti na cDDP kod raka žučnog trakta (Posch et al., 2021), te je u korelaciji s otpornošću na cDDP u bolesnika s rakom jednjaka, putem indukcije Akt signalizacije i inhibicije PP2A (protein fosfataze 2A) (Hamano et al., 2011). Niske razine miR-200c i miR-200b zabilježene su u tkivu raka jajnika otpornog na terapiju cDDP, te je povećanje ekspresije u stanicama raka jajnika A2780CP dovelo do povećanja osjetljivosti ovih stanica na cDDP *in vitro* kao i tumora *in vivo*. Kao mehanizam djelovanja autori iznose direktnu regulaciju ekspresije DNMT3A i DNMT3B vezanjem ove dvije miRNA na njihove regije 3'UTR, te indirektnu regulaciju ekspresije DNMT1

preko regulacije ekspresije Sp1 (pozitivan regulator ekspresije DNMT1). Ova inverzna korelacija ekspresije miR-200b i miR-200c potvrđena je i na uzorcima tkiva raka jajnika (J. Liu et al., 2019). Rezultati prikazani u sklopu ovog istraživanja također pokazuju inverznu korelaciju ekspresije DNMT1 s članovima miR-200 u stanicama MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP, dok je kod SK-OV-3 CBP ekspresija DNMT1 nepromijenjena. Povećana ekspresija DNMT3B u SK-OV-3 CBP trenutno nije objašnjena, međutim treba imati na umu da drugi članovi miR-200, kao što su miR-200a i miR-429, snižene ekspresije u SK-OV-3 CBP u odnosu na roditeljske stanice, prema bazama za predviđanje ciljnih gena miRNA miRDB i TargetScan, također mogu vezati regiju 3'UTR DNMT3B (Chen & Wang, 2020; McGeary et al., 2019). Osim što miR-200 kontroliraju ekspresiju DNMT, poznato je da ekspresija miR-200 može biti kontrolirana preko metilacije promotora, što je pokazano u stanicama raka crijeva (RKO), pluća (H157) i dojke (MDAMB231) (Davalos et al., 2012), te dokazuje postojanje komplekse regulacijske petlje između miR-200 i DNMT. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s navedenim, te pokazuju po prvi puta da je u stanicama MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP izloženost CBP-u dovela do konstitutivne promjene u ekspresiji miR-200, praćene promjenama u epigenetskoj regulaciji, vidljivih na razini metilacije promotora miR-200b i miR-200c.

Kako je glavna razlika između korištene tri linije stanica otporne na CBP postojanje (MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP) odnosno ne postojanje križne otpornosti na TAX (SK-OV-3 CBP), dok istovremeno sve tri linije pokazuju povećanu ekspresiju TUBB3 ali različitu ekspresiju TUBB, te različit uzorak ekspresije članova miR-200, nametnulo se pitanje na koji je način miR-200c, prepoznata kao regulator ekspresije TUBB3 s ulogom u otpornosti na TAX (Brozovic et al., 2015), uključena u odgovor stanica na CBP, te funkcionira li kao spojnica ova dva mehanizma otpornosti koja na očigled nemaju preklapajuće točke. Tretman stanica inhibitorom 5-aza potvrdio je epigenetsku regulaciju ekspresije miR-200c u stanicama sa stečenom otpornosti na CBP, što je u skladu s drugim istraživanjima (Ceppi et al., 2010; Neves et al., 2010; Vrba et al., 2010), te je potvrdio postojanje osi regulacije miR-200c/TUBB3 induciranu tretmanom CBP-om po prvi puta. Nadalje, stabilna inhibicija ekspresije miR-200c u roditeljskim stanicama MES-OV dovela je do smanjenja osjetljivosti ovih stanica na CBP i TAX, te povećala njihov metastatski potencijal. Najvažnije, inhibicija ekspresije miR-200c bila je popraćena povećanjem ekspresije TUBB3 i ukupnog TUBB na razini proteina, odražavajući tako situaciju opisanu u otpornim stanicama MES-OV CBP.



Dobiveni rezultati potaknuli su zanimanje za detaljnije istraživanje uloge TUBB3, ciljne molekule miR-200c, u odgovoru stanica MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP na CBP. Većina istraživačkih grupa istraživala je TUBB3 isključivo u kontekstu njegove uloge u odgovoru stanica na stres uzrokovan mikrotubularnim toksinima, kao što je TAX (Leskelä et al., 2011; Stengel et al., 2010). Postoje i kontradiktorni dokazi koji pokazuju da prekomjerna ekspresija TUBB3 ima zanemariv učinak na osjetljivost tumorskih stanica na TAX (Tame et al., 2017), što smo također potvrdili ovdje pokazujući da povećana ekspresija TUBB3 u SK-OV-3 CBP u usporedbi sa SK-OV-3 nema utjecaja na osjetljivost na TAX. Isto tako, povećanje ekspresije TUBB3 u stanicama MES-OV nije smanjilo osjetljivost stanica na TAX. Vrlo mali broj studija istražuje ulogu TUBB3 u odgovoru stanica na lijekove koji oštećuju DNA. Jedno istraživanje pokazalo je da utišavanje TUBB3 čini stanice H460 (rak pluća nemalih stanica) osjetljivijima na cisplatinu, doksorubicin i etopozid (Gan et al., 2007). Ovaj fenomen pokazan je i ovdje gdje je utišavanje TUBB3 dovelo do povećane osjetljivosti MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP na CBP, te gubitak TUBB3 nije kompenziran od strane drugih izotipova TUBB. Međutim, kod stanica SK-OV-3 CBP utišavanje TUBB3 nije uzrokovalo senzibilizaciju na tretman CBP-om te je gubitak TUBB3 kompenziran. Eksperimentalni model dobiven povećanjem TUBB3 u roditeljskim stanicama MES-OV korištenjem plazmida korelira s modelom stanica SK-OV-3 CBP. Naime, povećanje TUBB3 nije dovelo do povećanja ukupnog TUBB te nije imalo utjecaj na osjetljivost stanica MES-OV na tretman TAX-om ni CBP-om. Model kompenzacije odnosno ravnoteže izotipova TUBB, uočen kod SK-OV-3 CBP, opisan je u odgovoru stanica na taksane, kolhicin i *vinca* alkaloida (Huzil et al., 2007; Parker et al., 2017), ali ne i u kontekstu lijekova na bazi platine. Izostanak kompenzacije utišavanja TUBB3 drugim izotipovima TUBB te povećanje osjetljivosti na tretman CBP-om zabilježen je i u stanicama stabilno otpornim na TAX s križnom otpornošću na CBP, MES-OV TP i OVCAR-3/TP GFP. Promijenjeni sastav izotipova TUBB, odnosno narušena ravnoteža, prepoznata je kao obilježje agresivnih tumora otpornih na terapiju. Naime, promjene u sastavu izotipova TUBB utječu na dinamiku mikrotubula te mogu osigurati proliferativnu prednost stanicama raka ili potpomoći u procesu metastaziranja (Parker et al., 2017). Ravnoteža izotipova TUBB pokazana je i *in vivo*: TUBB3<sup>-/-</sup> miševi kompenziraju nedostatak TUBB3 s drugim izotipovima TUBB, čime izjednačuju razinu TUBB s razinom TUBB divljeg tipa (Latremoliere et al., 2018). Povećana osjetljivost stanica #8 na CBP, cDDP i TAX u odnosu na ishodišne stanice OVCAR-3/TP GFP i #6 popraćena je smanjenom razinom ukupnog TUBB i kao i pojedinačnih

izotipova TUBB, što je podcrtalo važnost ravnoteže izotipova TUBB u odgovoru stanica raka na kemoterapeutike.

Ostalo je otvoreno pitanje na koji točno način povišena ekspresija TUBB3 doprinosi otpornosti stanica MES-OV CBP na CBP. CBP svoju citotoksičnu aktivnost poglavito ispoljava vezanjem na DNA, stvarajući veze unutar istog ili između dva lanca. Veze između dva lanca DNA (engl. *interstrand cross-links*; ICL) smatraju se najtoksičnijima. Dvolančani lomovi (engl. *double-strand breaks*; DSB), nastali izrezivanjem oštećenja, popravljaju se homolognom rekombinacijom. Signalnu kaskadu predvodi fosforilacija histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) koja potpomaže lokalizaciju i vezanje kompleksa MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) i XRCC6/XRCC5 (Ku86) za krajeve DNA (Mah et al., 2010). Temeljeno na opisanom mehanizmu djelovanja CBP, te istraživanju koje je pokazalo kako mikrotubuli sudjeluju u prijenosu proteina uključenih u popravak DNA (Poruchynsky et al., 2015), istražen je utjecaj utišavanja TUBB3 na popravak oštećenja DNA uslijed tretmana CBP. Utišavanje TUBB3 u stanicama stabilno otpornim na CBP uzrokovalo je zadržavanje signala  $\gamma$ H2AX ukazujući na usporen odgovor na oštećenja DNA. Nadalje, po prvi puta je pokazano kako utišavanje TUBB3, koje narušava strukturu mikrotubula, remeti prijenos proteina popravka RAD50 i XRCC5 iz citoplazme do jezgre, te smanjuje lokalizaciju RAD50 unutar jezgre nakon tretmana CBP-om.

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnili molekularni mehanizmi koji čine osnovu korelacije kompenzacije izotipova TUBB i obrasca ekspresije članova obitelji miRNA-200, uočene u linijama stanica raka jajnika stabilno otpornih na CBP, te uloge ovih procesa u odgovoru tumora na različite kemoterapeutike.

U drugom pravcu istraživanja, ispitana je uloga 14 izdvojenih miRNA smanjene ekspresije u otpornosti i metastatskom potencijalu stanica stabilno otpornih na CBP i fenotipa mezenhimskih karakteristika. Promijenjena ekspresija devet miRNA validirana je u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV. Zbog već istaknute uloge metilacije DNA i deacetilacije histona u promijenjenoj regulaciji ekspresije miRNA u različitim tipovima raka (Arif et al., 2020; Xie et al., 2021), ovdje prikazanom utjecaju tretmana 5-azom i TSA na osjetljivost i sposobnost invazije stanica MES-OV CBP, te slijedeći pretpostavku da bi epigenetička deregulacija mogla biti razlog smanjene ekspresije ovdje identificiranih miRNA, idući korak selekcije uključivao je tretman kombinacijom inhibitora 5-aza i TSA. Tretman je rekonstituirao ekspresiju sedam od devet

ispitanih miRNA, što je u skladu s objavljenim istraživanjima koja također navode oporavak ekspresije miRNA nakon tretmana ovim epigenetičkim inhibitorima (Adi Harel et al., 2015; Arif et al., 2020; Dakhllallah et al., 2013; Dohi et al., 2013; Hassan et al., 2021). Provjera ekspresije u druge dvije linije stanica stabilno otporne na CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP, osigurala je izbjegavanje identifikacije promjena specifičnih za jednu liniju stanica. Heterogenost ove tri linije stanica vezana za odgovor na CBP i TAX ukazuje na različit obrazac ekspresije gena, što čini pronalazak tri miRNA, miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107, sličnog obrasca ekspresije u sve tri linije još značajnijim i ukazuje da bi ove miRNA mogle predstavljati potencijalne prediktivne biljege za epitelni rak jajnika kao i potencijalne ciljeve za terapiju.

Prvi korak analize funkcionalne uloge odabranih, potencijalno epigenetički reguliranih miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 obuhvaćao je pronalazak mRNA koje ciljaju ove miRNA. Kako jedna miRNA može ciljati velik broj mRNA, često je uključena u velik broj bioloških procesa i signalnih puteva (Adams et al., 2014), stoga je vrlo teško odrediti primarnu funkciju određene miRNA. Dostupan je velik broj baza za predviđanje interakcija miRNA-mRNA (Min & Yoon, 2010), međutim ovakva predviđanja temeljena na komplementarnosti sekvenci miRNA i mRNA nisu specifična za određena stanja ili bolesti. Ovo može dovesti do lažno-pozitivnih predviđanja zbog činjenice da je funkcija miRNA uvjetovana vrstom stanica (izvorišno tkivo), o čemu govore oprečni rezultati koji pojedinoj miRNA, ovisno o vrsti raka, pripisuju tumor-supresorska i onkogeno svojstva (J. O'Brien et al., 2018). Integracijska analiza ekspresije mRNA i miRNA istog eksperimentalnog modela preporuča se kako bi se izbjegao navedeni problem. Za analizu ciljnih mRNA triju miRNA od interesa odabrana je baza miRWalk jer kombinira bazu podataka eksperimentalno potvrđenih ciljnih mRNA (DIANA-TarBase) i alate za predviđanje ciljnih mRNA temeljenih na komplementarnosti sekvenci (TargetScan i miRDB). Dobivena lista gena integrirana je s listom gena promijenjene ekspresije (DEG) ( $FC > 2$ ,  $p < 0,05$ ) u MES-OV CBP stanicama u odnosu na roditeljske stanice MES-OV dobivene analizom ekspresije gena metodom hibridizacije DNA mikročipova (Kralj et al., 2023). Skup dobivenih ciljnih DEG, od kojih su neki jedinstveni za jednu od tri miRNA interesa a neki dijeljeni, korišten je za analizu signalnih puteva. Za anotaciju ciljnih DEG u pojedine signalne puteve korištena je baza podataka DAVID i alat KEGG. Analiza ciljnih DEG pokazala je kako bi miR-17-5p, miR103a-3p i miR-107 mogle biti uključene u signalne puteve Ras i ErbB. Tri gena anotirana su u oba signalna puta, *ABL2*, *PIK3R1* i *PAK3*. Geni *ABL2* i *PIK3R1* dijeljene su mete sve tri miRNA od interesa, dok je *PAK3*

jedinstvena meta miR-103a-3p. Signalni put Ras povezan je s brojnim procesima koji potpomažu napretku raka. Preko aktivacije signalnog puta MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*), te signalne kaskade Raf/MEK/ERK, potiče transkripciju onkogeno čime se promovira proliferacija, angiogeneza i preživljenje stanica. Nadalje, aktivacijom signalnog puta PI3K-Akt također se potiče transkripcija onkogeno što rezultira izbjegavanjem apoptoze i poticanjem staničnog rasta i metabolizma (Gimple & Wang, 2019). Osim toga, aktivacijom PI3K suprimira se os regulacije Reelin (RELN)/E-kadherin čime slabe međustanične veze i potiče se migracija (Castellano et al., 2016). Također, migraciju i invaziju signalni put Ras potiče preko aktivacije TIAM1 (engl. *T-Lymphoma Invasion And Metastasis-Inducing Protein 1*) (Gimple & Wang, 2019). Aktivacija receptora obitelji ErbB, koja obuhvaća četiri člana (ErbB1/EGFR, ErbB2/Her2, ErbB3 i ErbB4), također je povezana s putom PI3K/Akt i Ras/Raf/MEK/ERK. Nadalje, signalna kaskada koju predvodi aktivacija receptora ErbB povezana je s početnim koracima epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) budući da integrini, FAK (engl. *focal adhesion kinase*) i Rho GTPaze, važni regulatori u migraciji stanica, mogu biti pod utjecajem ovog puta (Appert-Collin et al., 2015; Yarden & Pines, 2012). Ovdje prikazani rezultati su potvrdili povećanu ekspresiju *PIK3R1* kod MES-OV CBP, *ABL2* kod OVCAR-3 CBP, te *PAK3* u sve tri linije stanica raka jajnika otporne na CBP i fenotipa s mezenhimalnim karakteristikama u odnosu na odgovarajuće roditeljske stanice epitelnih karakteristika. Serin/treonin protein kinaze PAK (engl. *p21-activated kinase*) često su prekomjerno eksprimirane ili aktivirane u različitim tumorima. Njihova aktivnost, stimulirana od strane GTPaza Cdc42 i Rac, doprinosi proliferaciji, izbjegavanju stanične smrti, aktivaciji invazije i metastaziranja, te angiogenezi zbog čega se smatraju onkogenima (Ye & Field, 2012). PAK3 je u normalnim uvjetima eksprimiran u središnjem živčanom sustavu, gdje je odgovoran za neuralnu plastičnost. Tijekom tumorigeneze dolazi do njegove aberantne ekspresije i aktivacije. Tako je pokazano da PAK3 promovira progresiju raka želuca (G.-J. Wang et al., 2020), metastaziranje hepatocelularnog karcinoma preko regulacija EMT-a (Gao et al., 2022), metastaziranje raka pluća što je povezano s gubitkom *Smad4* (Tan et al., 2021), a kod stanica raka gušterače potiče fenotip sličan matičnim stanicama (H.-Y. Wu et al., 2019). Uloga PAK3 u otpornosti i metastaziranju raka jajnika nije opisana, te ju je potrebno detaljnije istražiti.

Rezultati funkcionalnih analiza provedenih u sklopu ovog istraživanja, korištenjem sekvenci mimic miRNA, pokazali su po prvi put da povećanje ekspresije miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 smanjuje sposobnost invazije stanica HGSOE otpornih na CBP. Dodatno, inhibicija ekspresije

miR-103a-3p u roditeljskim stanicama MES-OV i OVCAR-3 značajno je povećala njihovu sposobnost invazije, čime je potvrđena uloga miR-103a-3p u metastatskom potencijalu ovih stanica. Smanjenje osjetljivosti stanica MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP na tretman CBP-om nakon transfekcije sekvencama mimik miRNA u ovom trenutku nije objašnjen. Iako je očekivan suprotan efekt, ovaj rezultat nije iznenađujuć zbog prijašnjeg iskustva, gdje je povećanje miR-200 u stanicama OVCAR-3/TP GFP također dodatno smanjilo osjetljivost na TAX i CBP (Brozovic et al., 2015). Uloga ovih miRNA u metastatskom potencijalu ovdje korištenih modela stanica u skladu su s napravljenom analizom signalnih putova koji su sugerirali da bi CBP-ompotaknute promjene u ekspresiji tri miRNA i njihovih ciljnih gena mogle biti uključene u metastatski potencijal stanica raka jajnika otpornih na CBP. Literaturni navodi za tri miRNA od interesa također ističu njihovu ulogu u procesu metastaziranja. MiR-17-5p, najpoznatiji član klastera miR-17/92, prva je miRNA opisana kao onkogen, te je prema njoj cijeli klaster dobio naziv oncomiR-1 (Dellago et al., 2017). MiR-17-5p opisana je u kontekstu metastaziranja raka, međutim, ovisno o porijeklu stanica odnosno vrsti raka, može imati onkogeni ili tumor-supresorsku ulogu. Ova miRNA promiče agresivni fenotip stanica raka crijeva (Ji & Fu, 2023) i potiče migraciju i invaziju stanica kolorektalnog carcinoma (Yu et al., 2022). Suprotno tome, povećanje ekspresije miR-17-5p, vezanjem 3' UTR *ITGA5* (integrin  $\alpha 5$ ) i *ITGB1* (integrin  $\beta 1$ ), značajno smanjuje sposobnost adhezije i invazije stanica raka jajnika *in vitro*, te smanjuje metastatske nodule unutar peritonealne šupljine u *in vivo* SK-OV-3 ksenograft modelu (Gong et al., 2016), što je u skladu s ovdje prikazanim rezultatima. Povećana ekspresije miR-103a-3p potiče migraciju, invaziju i proliferaciju stanica hepatocelularnog carcinoma (Y. Liu et al., 2021; Xu et al., 2022). Nadalje, direktnim vezanjem na 3' UTR *PTEN*, miR-103a-3p potiče proliferaciju i invaziju stanica NSCLC (Li et al., 2021). Inhibicija miR-103a-3p u linijama stanica oralnog karcinoma pločastih stanica smanjuje proliferaciju i potiče apoptozu *in vitro*, te suprimira rast tumora *in vivo* (G. Zhang et al., 2020). Zanimljivo je istaknuti kako navedena istraživanja ukazuju na onkogeni funkciju miR-103a-3p, što je u suprotnosti s ovdje prikazanom tumor-supresorskom ulogom. MiR-107 potiče proliferaciju, EMT, migraciju i invaziju stanica raka želuca preko signalnog puta PI3K/Akt *in vitro*, te rast ksenografta *in vivo* (L. Wang et al., 2019). Također, miR-107 potiče EMT, migraciju i invaziju u stanicama dukalnog adenocarcinoma gušterače (Xiong et al., 2017). Suprotno tome, povećanje ekspresije miR-107 inhibira proliferaciju, migraciju i invaziju stanica raka dojke *in vitro*, te invaziju i metastaziranje *in vivo* (Zhou et al., 2022). Također, miR-107 inhibira

proliferaciju, formiranje kolonija, migraciju i invaziju stanica melanoma (Zhao et al., 2020). Istraživanje *in vitro* na stanicama raka jajnika SK-OV-3 i Hey pokazalo je da povećanje ekspresije miR-107 inhibira proliferaciju preko direktnog vezanja ciklina E1, te suprimira progresiju tumora *in vivo* (Tang et al., 2019).

Nadalje, analiza metilacije promotora pokazala je epigenetičko utišavanje miR-103a-3p u stanicama MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP u odnosu na odgovarajuće roditeljske stanice. Također, iako nema razlike u metiliranosti promotorske regije miR-107 između otpornih i roditeljskih stanica, rezultati su ukazali da ekspresija i ove miRNA može biti modulirana epigenetičkim inhibitorima 5-aza i TSA, što može biti zanimljivo s terapijskog gledišta, u kontekstu kombinacije kemoterapije i epigenetskih modifikatora (Majchrzak-Celińska et al., 2021). Za promotor miR-17-5p zabilježen je samo nemetilirani oblik u roditeljskim i stanicama otpornim na CBP. Treba imati na umu da ekspresija miRNA može biti regulirana i različitim transkripcijskim faktorima ili promjenama u nekom od koraka biogeneze (Gulyaeva & Kushlinskiy, 2016).

U konačnici, provedena je analiza vrijednosti miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 kao farmakogenetskih biljega. Brza progresija bolesti i metastaziranje, jedan od razloga visoke smrtnosti od raka jajnika, sve se više povezuje s mezenhimskim matičnim stanicama (MSC). Ove stanice, koje imaju sposobnost samoobnove i diferencijacije, migriraju u tumorsko tkivo gdje potiču proliferaciju i metastaziranje stanica raka jajnika promoviranjem ekspresije matriks-metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 (Motohara et al., 2019). Uzimajući u obzir ovdje korišten model stanica MES-OV CBP, s promijenjenom ekspresijom nekoliko gena povezanih s matičnosti u odnosu na MES-OV, analiza vrijednosti je provedena na ukupnom uzorku raka jajnika, kao i na uzorku s visokim udjelom MSC. Doista, rezultati su ukazali kako miR-103a-3p i miR-107 imaju prognostičku vrijednost za pacijentice s rakom jajnika, osobito one s visokim udjelom MSC. MiR-103a-3p već je naznačena kao dobar dijagnostički i prognostički biljeg za rak dojke (H. Liu et al., 2022), dok se miR-107 pokazala kao dobar prognostički biljeg u slučaju raka gušterače (Imamura et al., 2017).

Na temelju provedenih istraživanja, moguće je pretpostaviti da je os regulacije koju definira epigenetički utišana miR-103a-3p i njen ciljni gen *PAK3* uključena u povećanu sposobnost migracije i invazije stanica HGSOE otpornih na CBP i fenotipa s mezenhimskim karakteristikama,

ali nije uključena u otpornost, ukazujući da ova miRNA nije molekularna direktna poveznica između procesa otpornosti na terapiju i metastaziranja (EMT-a). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se identificirala moguća uloga signalnih putova Ras i ErbB, kao i *PIK3R1*, *ABL2* i *PAK3* kao mogućih nizvodnih ciljeva odabranih miRNA, te njihova potencijalna uloga u metastatskom potencijalu stanica epitelnog raka jajnika otpornih na CBP.

Ocjena rada  
u tijeku

## 6. ZAKLJUČCI

Razvoj otpornosti na CBP kod stanica epitelnog raka jajnika MES-OV, SK-OV-3 i OVCAR-3 bio je praćen promjenom fenotipskih karakteristika stanica iz epitelnih u mezenhimske.

Analizom ekspresije 752 miRNA identificirano je 29 s povišenom, odnosno 48 miRNA sa sniženom ekspresijom, u stanicama stabilno otpornim na CBP MES-OV CBP, u odnosu na roditeljske MES-OV stanice.

Tretman epigenetičkim inhibitorima, 5-aza i TSA, imao je negativan učinak na otpornost i metastatski potencijal (migraciju i invaziju) stanica MES-OV CBP.

Stečena otpornost na CBP rezultirala je povećanom ekspresijom TUBB3 u sve tri linije stanica epitelnog raka jajnika.

Snižena ekspresija članova obitelji miR-200 u stanicama MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP korelira s pojavom križne otpornosti na TAX te izostankom kompenzacije gubitka TUBB3 drugim izotipovima TUBB, dok to nije slučaj kod SK-OV-3 CBP.

Os regulacije koja obuhvaća epigenetički reguliranu miR-200c i TUBB3 uključena je u odgovor stanica epitelnog raka jajnika na tretman CBP-om.

Utišavanje TUBB3 u stanicama bez mogućnosti kompenzacije drugim izotipovima TUBB narušava strukturu mikrotubula i onemogućava prijenos proteina popravka DNA iz citoplazme prema jezgri.

Snižena ekspresija miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 zajednička je karakteristika sve tri linije stanica epitelnog raka jajnika stabilno otpornih na CBP i fenotipa mezenhimskih karakteristika, MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP i OVCAR-3 CBP.

Integrativna analiza miRNA-mRNA rezultirala je identifikacijom 56 ciljnih gena miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107, promijenjene ekspresije u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV (FC > 2), koji su analizom signalnih puteva anotirani u signalne puteve Ras i ErbB, prepoznate uloge u metastaziranju.

Epigenetički regulirana miR-103a-3p uključena je u migraciju i invaziju, ali ne u odgovor na terapiju stanica epitelnog raka jajnika.



## 7. SAŽETAK

Kombinacija lijekova na bazi platine i taksana još uvijek je primarna opcija u liječenju epitelnog raka jajnika, najčešćeg tipa ove bolesti. Uz kasnu dijagnostiku i nespecifičnost simptoma razvoj otpornosti na terapiju na jedan ili oba lijeka i brzo metastaziranje bolesti glavni su razlozi loše statistike vezane za preživljenje bolesnica. Kako bi se ova dva problema bolje istražila, korišteni su modeli stanica epitelnog raka jajnika stabilno otporni na karboplatinu (CBP), kod kojih je razvoj otpornosti popraćen porastom metastatskog potencijala, odnosno razvojem fenotipa mezenhimskih karakteristika. Osim otpornosti na karboplatinu dva modela, MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP razvila su i križnu otpornost na paklitaksel (TAX), dok to nije bio slučaj kod SK-OV-3 CBP. Smanjena platinacija te povećana ekspresija tubulina  $\beta$ III (TUBB3) zabilježena je kod otpornih stanica u odnosu na roditeljske. Analizom ekspresije 752 mikroRNA (miRNA) identificirano je 29 miRNA povećane i 48 miRNA smanjene ekspresije u stanicama MES-OV CBP u odnosu na MES-OV. Zbog uočenog negativnog utjecaja epigenetičkih modulatora na otpornost i metastatski potencijal ovih stanica, fokus je stavljen na miRNA smanjene ekspresije, pod pretpostavkom da bi njihova ekspresija mogla biti epigenetički regulirana na konstitutivnom nivou. U prvom pravcu istraživanja proučena je uloga obitelji miR-200 u odgovoru stanica na CBP. Uočena je korelacija smanjene ekspresije pet članova obitelji u MES-OV CBP i OVCAR-3 CBP s pojavom križne otpornosti na TAX, povećane ekspresije ukupnog tubulina  $\beta$  (TUBB) i TUBB3, te izostanka kompenzacije gubitka TUBB3 drugim izotipovima TUBB. Također, po prvi puta je pokazano da os regulacije epigenetički regulirane miR-200c i TUBB3 ima ulogu u odgovoru stanica na CBP. U drugom pravcu istražena je uloga tri miRNA, miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107, u otpornosti stanica na CBP i metastatskom potencijalu integracijom predviđenih ciljnih gena ovih miRNA s genima promijenjene ekspresije (DEG) u MES-OV CBP u odnosu na MES-OV, što je rezultiralo identifikacijom 56 ciljnih DEG. Analiza signalnih puteva ukazala je na uključenost ovih gena u signalnim putevima Ras i ErbB, povezanim s metastaziranjem. Funkcionalne analize potvrdile su da miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 imaju ulogu u metastatskom potencijalu, ali ne i u otpornosti stanica. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnilo na koji način os regulacije miR-200c/TUBB3 doprinosi odgovoru stanica na CBP, odnosno miR-17-5p, miR-103a-3p i miR-107 doprinose metastatskom potencijalu stanica epitelnog raka jajnika otpornih na CBP.

## 8. SUMMERY

The combination of platinum-based drugs and taxanes is still the primary option in the treatment of epithelial ovarian cancer, the most common type of this disease. In addition to late diagnosis and non-specific symptoms, the development of resistance to therapy to one or both drugs and the rapid metastasis of the disease are the main reasons for the poor statistics related to the survival of patients. To better understand these two problems, epithelial ovarian cancer cell models stably resistant to carboplatin (CBP) were used, in which the development of resistance is accompanied by an increase in metastatic potential, i.e. the development of a mesenchymal-like phenotype. In addition to carboplatin resistance, MES-OV CBP and OVCAR-3 CBP also developed cross-resistance to paclitaxel (TAX), while this was not the case in SK-OV-3 CBP. Reduced platination and increased expression of tubulin  $\beta$ III (TUBB3) were determined in resistant compared to parental cells. Analysis of the expression of 752 microRNAs (miRNAs) identified 29 miRNAs with increased and 48 miRNAs with decreased expression in MES-OV CBP cells compared to MES-OV. Due to the observed negative impact of epigenetic modulators on the resistance and metastatic potential of these cells, the focus was placed on downregulated miRNAs, assuming that their expression could be epigenetically regulated. In one line of research, the role of the miR-200 family in the response of cells to CBP was studied. Correlation of reduced expression of five family members in MES-OV CBP and OVCAR-3 CBP with the emergence of cross-resistance to TAX, increased expression of total tubulin  $\beta$  (TUBB) and TUBB3, and absence of compensation of loss of TUBB3 by other TUBB isotypes was observed. Also, it was shown for the first time that the regulatory axis of epigenetically regulated miR-200c and TUBB3 plays a role in the response of cells to CBP. In another direction, the role of three miRNAs, miR-17-5p, miR-103a-3p and miR-107, in cell resistance to CBP and metastatic potential was investigated by integrating the predicted target genes of these miRNAs with differentially expressed genes (DEGs) in MES-OV CBP versus MES-OV, resulting in the identification of 56 target DEGs. The analysis of the signaling pathways indicated the involvement of these genes in the Ras and ErbB signaling pathways, associated with metastasis. Functional analyzes confirmed that miR-17-5p, miR-103a-3p and miR-107 play a role in metastatic potential but not cell resistance. Further studies are needed to elucidate how the miR-200c/TUBB3 regulatory axis contributes to the response of cells to CBP, that is, miR-17-5p, miR-

103a-3p and miR-107 contribute to the metastatic potential of CBP-resistant epithelial ovarian cancer cells.

Ocjena rada  
u tijeku

## 9. LITERATURA

1. Adams, B. D., Kasinski, A. L., & Slack, F. J. (2014). Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Current Biology: CB*, 24(16), R762-776. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.043>
2. Adi Harel, S., Bossel Ben-Moshe, N., Aylon, Y., Bublik, D. R., Moskovits, N., Toperoff, G., Azaiza, D., Biagoni, F., Fuchs, G., Wilder, S., Hellman, A., Blandino, G., Domany, E., & Oren, M. (2015). Reactivation of epigenetically silenced miR-512 and miR-373 sensitizes lung cancer cells to cisplatin and restricts tumor growth. *Cell Death & Differentiation*, 22(8), 1328–1340. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.221>
3. Ahmed, A. A., Etemadmoghadam, D., Temple, J., Lynch, A. G., Riad, M., Sharma, R., Stewart, C., Fereday, S., Caldas, C., Defazio, A., Bowtell, D., & Brenton, J. D. (2010). Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *The Journal of Pathology*, 221(1), 49–56. <https://doi.org/10.1002/path.2696>
4. Aldonza, M. B. D., Hong, J.-Y., Alinsug, M. V., Song, J., & Lee, S. K. (2016). Multiplicity of acquired cross-resistance in paclitaxel-resistant cancer cells is associated with feedback control of TUBB3 via FOXO3a-mediated ABCB1 regulation. *Oncotarget*, 7(23), 34395–34419. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9118>
5. Alla, V., Kowtharapu, B. S., Engelmann, D., Emmrich, S., Schmitz, U., Steder, M., & Pützer, B. M. (2012). E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. *Cell Cycle*, 11(16), 3067–3078. <https://doi.org/10.4161/cc.21476>
6. Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G., & Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 283. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00283>
7. Arif, K. M. T., Elliott, E. K., Haupt, L. M., & Griffiths, L. R. (2020). Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers*, 12(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/cancers12102922>

8. Assaraf, Y. G., Brozovic, A., Gonçalves, A. C., Jurkovicova, D., Linē, A., Machuqueiro, M., Saponara, S., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Xavier, C. P. R., & Vasconcelos, M. H. (2019). The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*, 46, 100645. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100645>
9. Bagnoli, M., Canevari, S., Califano, D., Losito, S., Maio, M. D., Raspagliesi, F., Carcangiu, M. L., Toffoli, G., Cecchin, E., Sorio, R., Canzonieri, V., Russo, D., Scognamiglio, G., Chiappetta, G., Baldassarre, G., Lorusso, D., Scambia, G., Zannoni, G. F., Savarese, A., ... Mezzanzanica, D. (2016). Development and validation of a microRNA-based signature (MiROvaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: A cohort study. *The Lancet Oncology*, 17(8), 1137–1146. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30108-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30108-5)
10. Berek, J. S., Renz, M., Kehoe, S., Kumar, L., & Friedlander, M. (2021). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 155 Suppl 1(Suppl 1), 61–85. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13878>
11. Borisy, G., Heald, R., Howard, J., Janke, C., Musacchio, A., & Nogales, E. (2016). Microtubules: 50 years on from the discovery of tubulin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(5), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.45>
12. Brozovic, A. (2017). The relationship between platinum drug resistance and epithelial–mesenchymal transition. *Archives of Toxicology*, 91(2), 605–619. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1912-7>
13. Brozovic, A., Ambriović-Ristov, A., & Osmak, M. (2010). The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), 347–359. <https://doi.org/10.3109/10408441003601836>
14. Brozovic, A., Duran, G. E., Wang, Y. C., Francisco, E. B., & Sikic, B. I. (2015). The miR-200 family differentially regulates sensitivity to paclitaxel and carboplatin in human ovarian carcinoma OVCAR-3

and MES-OV cells. *Molecular Oncology*, 9(8), 1678–1693.

<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.04.015>

15. Calandrini, V., Arnesano, F., Galliani, A., Nguyen, T. H., Ippoliti, E., Carloni, P., & Natile, G. (2014). Platination of the copper transporter ATP7A involved in anticancer drug resistance. *Dalton Transactions*, 43(31), 12085–12094. <https://doi.org/10.1039/C4DT01339E>
16. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
17. Castellano, E., Molina-Arcas, M., Krygowska, A. A., East, P., Warne, P., Nicol, A., & Downward, J. (2016). RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. *Nature Communications*, 7, 11245. <https://doi.org/10.1038/ncomms11245>
18. Cavallari, I., Ciccarese, F., Sharova, E., Urso, L., Raimondi, V., Silic-Benussi, M., D'Agostino, D. M., & Ciminale, V. (2021). The miR-200 Family of microRNAs: Fine Tuners of Epithelial-Mesenchymal Transition and Circulating Cancer Biomarkers. *Cancers*, 13(23), 5874. <https://doi.org/10.3390/cancers13235874>
19. Ceppi, P., Mudduluru, G., Kumarswamy, R., Rapa, I., Scagliotti, G. V., Papotti, M., & Allgayer, H. (2010). Loss of miR-200c Expression Induces an Aggressive, Invasive, and Chemoresistant Phenotype in Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecular Cancer Research*, 8(9), 1207–1216. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0052>
20. Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Creighton, C. J., & Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the

- integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 25, 18–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>
21. Chen, Y., Bieber, M. M., & Teng, N. N. H. (2014). Hedgehog signaling regulates drug sensitivity by targeting ABC transporters ABCB1 and ABCG2 in epithelial ovarian cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 53(8), 625–634. <https://doi.org/10.1002/mc.22015>
22. Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
23. Cheung-Ong, K., Giaever, G., & Nislow, C. (2013). DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, 20(5), 648–659. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.007>
24. Cho, K. R., & Shih, I.-M. (2009). Ovarian Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(Volume 4, 2009), 287–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>
25. Chowanadisai, W., Messerli, S. M., Miller, D. H., Medina, J. E., Hamilton, J. W., Messerli, M. A., & Brodsky, A. S. (2016). Cisplatin Resistant Spheroids Model Clinically Relevant Survival Mechanisms in Ovarian Tumors. *PloS One*, 11(3), e0151089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151089>
26. Chung, W.-M., Ho, Y.-P., Chang, W.-C., Dai, Y.-C., Chen, L., Hung, Y.-C., & Ma, W.-L. (2019). Increase Paclitaxel Sensitivity to Better Suppress Serous Epithelial Ovarian Cancer via Ablating Androgen Receptor/Aryl Hydrocarbon Receptor-ABCG2 Axis. *Cancers*, 11(4), 463. <https://doi.org/10.3390/cancers11040463>
27. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T. J., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944–13949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>

28. Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A., & Lisowska, K. M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *81*(1), 17–38. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8>
29. Creighton, C. J., Li, X., Landis, M., Dixon, J. M., Neumeister, V. M., Sjolund, A., Rimm, D. L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J. I., Fan, C., Zhang, X., He, X., Pavlick, A., Gutierrez, M. C., Renshaw, L., Larionov, A. A., Faratian, D., Hilsenbeck, S. G., ... Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33), 13820–13825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905718106>
30. Dakhllallah, D., K, B., Y, W., Cz, C.-S., P, Y., G, N., A, M., Cl, H., Vp, W., Sp, N.-S., Mg, P., & Cb, M. (2013). Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *187*(4). <https://doi.org/10.1164/rccm.201205-0888OC>
31. Davalos, V., Moutinho, C., Villanueva, A., Boque, R., Silva, P., Carneiro, F., & Esteller, M. (2012). Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*, *31*(16), 2062–2074. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.383>
32. De Leo, A., Santini, D., Ceccarelli, C., Santandrea, G., Palicelli, A., Acquaviva, G., Chiarucci, F., Rosini, F., Ravegnini, G., Pession, A., Turchetti, D., Zamagni, C., Perrone, A. M., De Iaco, P., Tallini, G., & de Biase, D. (2021). What Is New on Ovarian Carcinoma: Integrated Morphologic and Molecular Analysis Following the New 2020 World Health Organization Classification of Female Genital Tumors. *Diagnostics*, *11*(4), 697. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11040697>
33. Dellago, H., Bobbili, M. R., & Grillari, J. (2017). MicroRNA-17-5p: At the Crossroads of Cancer and Aging - A Mini-Review. *Gerontology*, *63*(1), 20–28. <https://doi.org/10.1159/000447773>



34. 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., & Rao, V. N. (2014). Epithelial ovarian cancer: An overview. *World Journal of Translational Medicine*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v3.i1.1>
35. Dohi, O., Yasui, K., Gen, Y., Takada, H., Endo, M., Tsuji, K., Konishi, C., Yamada, N., Mitsuyoshi, H., Yagi, N., Naito, Y., Tanaka, S., Arai, S., & Yoshikawa, T. (2013). Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, 42(2), 411–418. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1724>
36. Erin, N., Grahovac, J., Brozovic, A., & Efferth, T. (2020). Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 53, 100715. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100715>
37. Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
38. Feinberg, A. P., Koldobskiy, M. A., & Göndör, A. (2016). Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nature Reviews. Genetics*, 17(5), 284–299. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.13>
39. Frey, M. K., & Pothuri, B. (2017). Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: A review of the literature. *Gynecologic Oncology Research and Practice*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40661-017-0039-8>
40. Funston, G., Hamilton, W., Abel, G., Crosbie, E. J., Rous, B., & Walter, F. M. (2020). The diagnostic performance of CA125 for the detection of ovarian and non-ovarian cancer in primary care: A population-based cohort study. *PLoS Medicine*, 17(10), e1003295. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003295>

41. Fuziwara, C. S., & Kimura, E. T. (2015). Insights into Regulation of the miR-17-92 Cluster of miRNAs in Cancer. *Frontiers in Medicine*, 2, 64. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00064>
42. Gan, P. P., Pasquier, E., & Kavallaris, M. (2007). Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer. *Cancer Research*, 67(19), 9356–9363. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0509>
43. Gao, Z., Zhong, M., Ye, Z., Wu, Z., Xiong, Y., Ma, J., Chen, H., Zhu, Y., Yang, Y., Zhao, Y., & Zhang, Z. (2022). PAK3 promotes the metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating EMT process. *Journal of Cancer*, 13(1), 153–161. <https://doi.org/10.7150/jca.61918>
44. Gimple, R. C., & Wang, X. (2019). RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00965>
45. Goff, B. A., Mandel, L. S., Drescher, C. W., Urban, N., Gough, S., Schurman, K. M., Patras, J., Mahony, B. S., & Andersen, M. R. (2007). Development of an ovarian cancer symptom index. *Cancer*, 109(2), 221–227. <https://doi.org/10.1002/cncr.22371>
46. Goff, B. A., Mandel, L. S., Melancon, C. H., & Muntz, H. G. (2004). Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA*, 291(22), 2705–2712. <https://doi.org/10.1001/jama.291.22.2705>
47. Gong, C., Yang, Z., Wu, F., Han, L., Liu, Y., & Gong, W. (2016). miR-17 inhibits ovarian cancer cell peritoneal metastasis by targeting ITGA5 and ITGB1. *Oncology Reports*, 36(4), 2177–2183. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4985>
48. Govindarajan, M., Wohlmuth, C., Waas, M., Bernardini, M. Q., & Kislinger, T. (2020). High-throughput approaches for precision medicine in high-grade serous ovarian cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00971-6>
49. Gulyaeva, L. F., & Kushlinskiy, N. E. (2016). Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of Translational Medicine*, 14, 143. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>

50. Györfly, B. (2024). Transcriptome-level discovery of survival-associated biomarkers and therapy targets in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Pharmacology*, *181*(3), 362–374. <https://doi.org/10.1111/bph.16257>
51. Hamano, R., Miyata, H., Yamasaki, M., Kurokawa, Y., Hara, J., Moon, J. H., Nakajima, K., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Mori, M., & Doki, Y. (2011). Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(9), 3029–3038. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2532>
52. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
53. Hanley, G. E., Pearce, C. L., Talhouk, A., Kwon, J. S., Finlayson, S. J., McAlpine, J. N., Huntsman, D. G., & Miller, D. (2022). Outcomes From Opportunistic Salpingectomy for Ovarian Cancer Prevention. *JAMA Network Open*, *5*(2), e2147343. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.47343>
54. Haslehurst, A. M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., Childs, T., Chen, J., Li, J., Weberpals, J., Davey, S., Squire, J., Park, P. C., & Feilotter, H. (2012). EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*, *12*, 91. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-91>
55. Hassan, M. K., Waly, A. A., Elsayed, W., Keshk, S., Allam, W. R., & El-khamisy, S. F. (2021). Integrative microRNA and gene expression analysis identifies new epigenetically regulated microRNAs mediating taxane resistance in ovarian cancer. *Scientific Reports*, *11*(1), 562. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78596-5>
56. He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, *5*(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>

57. Holzer, A. K., & Howell, S. B. (2006). The Internalization and Degradation of Human Copper Transporter 1 following Cisplatin Exposure. *Cancer Research*, 66(22), 10944–10952. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1710>
58. Huzil, J. T., Chen, K., Kurgan, L., & Tuszynski, J. A. (2007). The roles of beta-tubulin mutations and isotype expression in acquired drug resistance. *Cancer Informatics*, 3, 159–181.
59. Imamura, T., Komatsu, S., Ichikawa, D., Miyamae, M., Okajima, W., Ohashi, T., Kiuchi, J., Nishibeppu, K., Konishi, H., Shiozaki, A., Morimura, R., Ikoma, H., Ochiai, T., Okamoto, K., Taniguchi, H., & Otsuji, E. (2017). Depleted tumor suppressor miR-107 in plasma relates to tumor progression and is a novel therapeutic target in pancreatic cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 5708. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06137-8>
60. Janke, C., & Magiera, M. M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6), 307–326. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0214-3>
61. Ji, J., & Fu, J. (2023). MiR-17-3p Facilitates Aggressive Cell Phenotypes in Colon Cancer by Targeting PLCD1 Through Affecting KIF14. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(3), 1723–1735. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04218-7>
62. Jin, Y., Chen, Q., Xu, K., Ren, H., Bao, X., Ma, Y., Wei, Y., & Ma, H. (2016). Involvement of microRNA-141-3p in 5-fluorouracil and oxaliplatin chemo-resistance in esophageal cancer cells via regulation of PTEN. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 422. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2816-9>
63. Kampan, N. C., Madondo, M. T., McNally, O. M., Quinn, M., & Plebanski, M. (2015). Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed Research International*, 2015, 413076. <https://doi.org/10.1155/2015/413076>

64. Kilmister, E. J., Koh, S. P., Weth, F. R., Gray, C., & Tan, S. T. (2022). Cancer Metastasis and Treatment Resistance: Mechanistic Insights and Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells and the Tumor Microenvironment. *Biomedicines*, *10*(11), 2988. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112988>
65. Konstantinopoulos, P. A., Ceccaldi, R., Shapiro, G. I., & D'Andrea, A. D. (2015). Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discovery*, *5*(11), 1137–1154. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0714>
66. Koutsaki, M., Libra, M., Spandidos, D. A., & Zaravinos, A. (2017). The miR-200 family in ovarian cancer. *Oncotarget*, *8*(39), 66629–66640. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18343>
67. Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
68. Kralj, J., Pernar Kovač, M., Dabelić, S., Polančec, D. S., Wachtmeister, T., Köhrer, K., & Brozovic, A. (2023). Transcriptome analysis of newly established carboplatin-resistant ovarian cancer cell model reveals genes shared by drug resistance and drug-induced EMT. *British Journal of Cancer*, *128*(7), 1344–1359. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02140-1>
69. Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K.-A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium, McGuffog, L., Evans, D. G., Barrowdale, D., ... Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, *317*(23), 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
70. Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *The American Journal of Pathology*, *186*(4), 733–747. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.011>
71. Labidi-Galy, S. I., Papp, E., Hallberg, D., Niknafs, N., Adleff, V., Noe, M., Bhattacharya, R., Novak, M., Jones, S., Phallen, J., Hruban, C. A., Hirsch, M. S., Lin, D. I., Schwartz, L., Maire, C. L., Tille, J.-C., Bowden,

- M., Ayhan, A., Wood, L. D., ... Velculescu, V. E. (2017). High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nature Communications*, *8*(1), 1093. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00962-1>
72. Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
73. Latremoliere, A., Cheng, L., DeLisle, M., Wu, C., Chew, S., Hutchinson, E. B., Sheridan, A., Alexandre, C., Latremoliere, F., Sheu, S.-H., Golidy, S., Omura, T., Huebner, E. A., Fan, Y., Whitman, M. C., Nguyen, E., Hermawan, C., Pierpaoli, C., Tischfield, M. A., ... Engle, E. C. (2018). Neuronal-Specific TUBB3 Is Not Required for Normal Neuronal Function but Is Essential for Timely Axon Regeneration. *Cell Reports*, *24*(7), 1865-1879.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.029>
74. Leskelä, S., Leandro-García, L. J., Mendiola, M., Barriuso, J., Inglada-Pérez, L., Muñoz, I., Martínez-Delgado, B., Redondo, A., Santiago, J. de, Robledo, M., Hardisson, D., & Rodríguez-Antona, C. (2011). The miR-200 family controls  $\beta$ -tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients. *Endocrine-Related Cancer*, *18*(1), 85–95. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0148>
75. Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. *Lancet (London, England)*, *393*(10177), 1240–1253. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32552-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2)
76. Li, H., Huhe, M., & Lou, J. (2021). MicroRNA-103a-3p Promotes Cell Proliferation and Invasion in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells through Akt Pathway by Targeting PTEN. *BioMed Research International*, *2021*, 7590976. <https://doi.org/10.1155/2021/7590976>
77. Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>

78. Liu, H., Bian, Q.-Z., Zhang, W., & Cui, H.-B. (2022). Circulating microRNA-103a-3p could be a diagnostic and prognostic biomarker for breast cancer. *Oncology Letters*, 23(1), 38. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13156>
79. Liu, J., Zhang, X., Huang, Y., Zhang, Q., Zhou, J., Zhang, X., & Wang, X. (2019). miR-200b and miR-200c co-contribute to the cisplatin sensitivity of ovarian cancer cells by targeting DNA methyltransferases. *Oncology Letters*, 17(2), 1453–1460. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9745>
80. Liu, Y., Zhang, Y., Xiao, B., Tang, N., Hu, J., Liang, S., Pang, Y., Xu, H., Ao, J., Yang, J., Liang, X., Wei, L., Wang, Y., & Luo, X. (2021). MiR-103a promotes tumour growth and influences glucose metabolism in hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease*, 12(6), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03905-3>
81. Lujambio, A., & Lowe, S. W. (2012). The microcosmos of cancer. *Nature*, 482(7385), 347–355. <https://doi.org/10.1038/nature10888>
82. Mah, L.-J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010).  $\gamma$ H2AX: A sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), 679–686. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>
83. Majchrzak-Celińska, A., Warych, A., & Szoszkiewicz, M. (2021). Novel Approaches to Epigenetic Therapies: From Drug Combinations to Epigenetic Editing. *Genes*, 12(2), 208. <https://doi.org/10.3390/genes12020208>
84. Maloney, S. M., Hoover, C. A., Morejon-Lasso, L. V., & Prospero, J. R. (2020). Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers*, 12(11), 3323. <https://doi.org/10.3390/cancers12113323>
85. Malvezzi, M., Carioli, G., Rodriguez, T., Negri, E., & La Vecchia, C. (2016). Global trends and predictions in ovarian cancer mortality. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(11), 2017–2025. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw306>
86. Marchetti, C., De Felice, F., Romito, A., Iacobelli, V., Sassu, C. M., Corrado, G., Ricci, C., Scambia, G., & Fagotti, A. (2021). Chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer: Mechanisms and emerging

treatments. *Seminars in Cancer Biology*, 77, 144–166.

<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.08.011>

87. Matz, M., Coleman, M. P., Carreira, H., Salmerón, D., Chirlaque, M. D., & Allemani, C. (2017). Worldwide comparison of ovarian cancer survival: Histological group and stage at diagnosis (CONCORD-2). *Gynecologic Oncology*, 144(2), 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.11.019>
88. McDermott, M., Eustace, A. J., Busschots, S., Breen, L., Crown, J., Clynes, M., O'Donovan, N., & Stordal, B. (2014). In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in Oncology*, 4, 40. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00040>
89. McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6472), eaav1741. <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>
90. Mendell, J. T. (2005). MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(9), 1179–1184. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.2032>
91. Mezencev, R., & Wartell, R. M. (2018). Cisplatin binds to pre-miR-200b and impairs its processing to mature microRNA. *Neoplasma*, 65(2), 222–227. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2018\\_170116N37](https://doi.org/10.4149/neo_2018_170116N37)
92. Min, H., & Yoon, S. (2010). Got target?: Computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Experimental & Molecular Medicine*, 42(4), 233–244. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.4.032>
93. Mogilyansky, E., & Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: A comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death and Differentiation*, 20(12), 1603–1614. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.125>
94. Moisan, F., Francisco, E. B., Brozovic, A., Duran, G. E., Wang, Y. C., Chaturvedi, S., Seetharam, S., Snyder, L. A., Doshi, P., & Sikic, B. I. (2014). Enhancement of paclitaxel and carboplatin therapies by



- CCL2 blockade in ovarian cancers. *Molecular Oncology*, 8(7), 1231–1239.  
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.016>
95. Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., & Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*, 11, 287–299.  
<https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>
96. Motohara, T., Masuda, K., Morotti, M., Zheng, Y., El-Sahhar, S., Chong, K. Y., Wietek, N., Alsaadi, A., Carrami, E. M., Hu, Z., Artibani, M., Gonzalez, L. S., Katabuchi, H., Saya, H., & Ahmed, A. A. (2019). An evolving story of the metastatic voyage of ovarian cancer cells: Cellular and molecular orchestration of the adipose-rich metastatic microenvironment. *Oncogene*, 38(16), 2885–2898.  
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0637-x>
97. Nawara, H. M., Afify, S. M., Hassan, G., Zahra, M., Seno, A., & Seno, M. (2021). Paclitaxel-Based Chemotherapy Targeting Cancer Stem Cells from Mono- to Combination Therapy. *Biomedicines*, 9.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9050500>
98. Neves, R., Scheel, C., Weinhold, S., Honisch, E., Iwaniuk, K. M., Trompeter, H.-I., Niederacher, D., Wernet, P., Santourlidis, S., & Uhrberg, M. (2010). Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC Research Notes*, 3(1), 219.  
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-219>
99. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
100. O'Brien, S. J., Carter, J. V., Burton, J. F., Oxford, B. G., Schmidt, M. N., Hallion, J. C., & Galandiuk, S. (2018). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer: A systematic review. *International Journal of Cancer*, 142(12), 2501–2511.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.31282>

101. Pan, H., Kim, E., Rankin, G. O., Rojanasakul, Y., Tu, Y., & Chen, Y. C. (2018). Theaflavin-3,3'-Digallate Enhances the Inhibitory Effect of Cisplatin by Regulating the Copper Transporter 1 and Glutathione in Human Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms19010117>
102. Parker, A. L., Teo, W. S., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2017). An Emerging Role for Tubulin Isoforms in Modulating Cancer Biology and Chemotherapy Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 1434. <https://doi.org/10.3390/ijms18071434>
103. Patch, A.-M., Christie, E. L., Etemadmoghadam, D., Garsed, D. W., George, J., Fereday, S., Nones, K., Cowin, P., Alsop, K., Bailey, P. J., Kassahn, K. S., Newell, F., Quinn, M. C. J., Kazakoff, S., Quek, K., Wilhelm-Benartzi, C., Curry, E., Leong, H. S., Hamilton, A., ... Bowtell, D. D. L. (2015). Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*, *521*(7553), 489–494. <https://doi.org/10.1038/nature14410>
104. Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *1*, 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
105. Pernar Kovač, M., Tadić, V., Kralj, J., Duran, G. E., Stefanelli, A., Stupin Polančec, D., Dabelić, S., Bačić, N., Tomicic, M. T., Heffeter, P., Sikic, B. I., & Brozovic, A. (2023). Carboplatin-induced upregulation of pan  $\beta$ -tubulin and class III  $\beta$ -tubulin is implicated in acquired resistance and cross-resistance of ovarian cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *80*(10), 294. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04943-0>
106. Pernar Kovač, M., Tadić, V., Kralj, J., Milković Periša, M., Orešković, S., Babić, I., Banović, V., Zhang, W., Culig, Z., & Brozovic, A. (2023). MiRNA-mRNA integrative analysis reveals epigenetically regulated and prognostic miR-103a with a role in migration and invasion of carboplatin-resistant ovarian cancer cells that acquired mesenchymal-like phenotype. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *166*, 115349. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115349>

107. Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y.-G., Lee, S.-H., Jun, N., Kim, K. S., Lee, Y. K., & Kwon, H. Y. (2018). Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International*, 2018, 5416923. <https://doi.org/10.1155/2018/5416923>
108. Poruchynsky, M. S., Komlodi-Pasztor, E., Trostel, S., Wilkerson, J., Regairaz, M., Pommier, Y., Zhang, X., Kumar Maity, T., Robey, R., Burotto, M., Sackett, D., Guha, U., & Fojo, A. T. (2015). Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5), 1571–1576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416418112>
109. Posch, F., Prinz, F., Balihodzic, A., Mayr, C., Kiesslich, T., Klec, C., Jonas, K., Barth, D. A., Riedl, J. M., Gerger, A., & Pichler, M. (2021). MiR-200c-3p Modulates Cisplatin Resistance in Biliary Tract Cancer by ZEB1-Independent Mechanisms. *Cancers*, 13(16), 3996. <https://doi.org/10.3390/cancers13163996>
110. Prabhu, K. S., Kuttikrishnan, S., Ahmad, N., Habeeba, U., Mariyam, Z., Suleman, M., Bhat, A. A., & Uddin, S. (2024). H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 175, 116663. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116663>
111. Reid, B. M., Permut, J. B., & Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
112. Rhim, J., Baek, W., Seo, Y., & Kim, J. H. (2022). From Molecular Mechanisms to Therapeutics: Understanding MicroRNA-21 in Cancer. *Cells*, 11(18), 2791. <https://doi.org/10.3390/cells11182791>
113. Riganti, C., & Contino, M. (2019). New Strategies to Overcome Resistance to Chemotherapy and Immune System in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4783. <https://doi.org/10.3390/ijms20194783>
114. Roque, D. M., Bellone, S., Buza, N., Romani, C., Cocco, E., Bignotti, E., Ravaggi, A., Rutherford, T. J., Schwartz, P. E., Pecorelli, S., & Santin, A. D. (2013). Class III  $\beta$ -tubulin overexpression in ovarian clear

cell and serous carcinoma as a maker for poor overall survival after platinum/taxane chemotherapy and sensitivity to patupilone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 209(1), 62.e1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.04.017>

115. Rustin, G. J. S., Bast, R. C., Kelloff, G. J., Barrett, J. C., Carter, S. K., Nisen, P. D., Sigman, C. C., Parkinson, D. R., & Ruddon, R. W. (2004). Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(11), 3919–3926. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0787>
116. Sazonova, E. V., Kopeina, G. S., Imyanitov, E. N., & Zhivotovsky, B. (2021). Platinum drugs and taxanes: Can we overcome resistance? *Cell Death Discovery*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00554-5>
117. Schmitz, U., Wolkenhauer, O., & Vera-González, J. (Eds.). (2022). *Systems Biology of MicroRNAs in Cancer* (Vol. 1385). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-08356-3>
118. Sève, P., & Dumontet, C. (2008). Is class III  $\beta$ -tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *The Lancet Oncology*, 9(2), 168–175. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70029-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70029-9)
119. Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
120. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
121. Sookram, J., Zheng, A., Linden, K. M., Morgan, A. B., Brown, S. A., & Ostrovsky, O. (2019). Epigenetic therapy can inhibit growth of ovarian cancer cells and reverse chemoresistant properties acquired from metastatic omentum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 145(2), 225–232. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12800>

122. Sousa, G. F. de, Włodarczyk, S. R., & Monteiro, G. (2014). Carboplatin: Molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *50*, 693–701. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400004>
123. Steffensen, K. D., Waldstrøm, M., & Jakobsen, A. (2009). The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, *19*(5), 820–825. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181a12e09>
124. Stengel, C., Newman, S. P., Leese, M. P., Potter, B. V. L., Reed, M. J., & Purohit, A. (2010). Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. *British Journal of Cancer*, *102*(2), 316–324. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605489>
125. Sticht, C., Torre, C. D. L., Parveen, A., & Gretz, N. (2018). miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLOS ONE*, *13*(10), e0206239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>
126. Stordal, B., Pavlakis, N., & Davey, R. (2007). A systematic review of platinum and taxane resistance from bench to clinic: An inverse relationship. *Cancer Treatment Reviews*, *33*(8), 688–703. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.07.013>
127. Su, J., Li, S., Zhou, X., Zhang, Z., Yan, Y., Liu, S., & Qi, Q. (2023). Chemotherapy-induced metastasis: Molecular mechanisms and clinical therapies. *Acta Pharmacologica Sinica*, *44*(9), 1725–1736. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01093-8>
128. Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *5*(3), 219–234. <https://doi.org/10.1038/nrd1984>

129. Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2011). The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays in Biochemistry*, *50*(1), 209–232. <https://doi.org/10.1042/bse0500209>
130. Tame, M. A., Manjón, A. G., Belokhvostova, D., Raaijmakers, J. A., & Medema, R. H. (2017). TUBB3 overexpression has a negligible effect on the sensitivity to taxol in cultured cell lines. *Oncotarget*, *8*(42), 71536–71547. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17740>
131. Tan, X., Tong, L., Li, L., Xu, J., Xie, S., Ji, L., Fu, J., Liu, Q., Shen, S., Liu, Y., Xiao, Y., Gao, F., Moses, R. E., Bardeesy, N., Wang, Y., Zhang, J., Tang, L., Li, L., Wong, K., ... Li, X. (2021). Loss of Smad4 promotes aggressive lung cancer metastasis by de-repression of PAK3 via miRNA regulation. *Nature Communications*, *12*(1), 4853. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24898-9>
132. Tang, Z., Fang, Y., & Du, R. (2019). MicroRNA-107 induces cell cycle arrests by directly targeting cyclin E1 in ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *512*(2), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.009>
133. Tian, H., Ma, D., Tan, X., Yan, W., Wu, X., He, C., Zhong, L., Zhang, Y., Yu, B., Zhang, Y., & Qi, X. (2021). Platinum and Taxane Based Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer: A Narrative Review. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.770663>
134. Valinezhad Sani, F., Palizban, A., Mosaffa, F., & Jamialahmadi, K. (2020). Glucosamine reverses drug resistance in MRP2 overexpressing ovarian cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, *868*, 172883. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172883>
135. van Eijk, M., Boosman, R. J., Schinkel, A. H., Huitema, A. D. R., & Beijnen, J. H. (2019). Cytochrome P450 3A4, 3A5, and 2C8 expression in breast, prostate, lung, endometrial, and ovarian tumors: Relevance for resistance to taxanes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *84*(3), 487–499. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03905-3>

136. Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
137. Vrba, L., Jensen, T. J., Garbe, J. C., Heimark, R. L., Cress, A. E., Dickinson, S., Stampfer, M. R., & Futscher, B. W. (2010). Role for DNA Methylation in the Regulation of miR-200c and miR-141 Expression in Normal and Cancer Cells. *PLOS ONE*, 5(1), e8697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008697>
138. Wajapeyee, N., & Gupta, R. (2021). Epigenetic Alterations and Mechanisms That Drive Resistance to Targeted Cancer Therapies. *Cancer Research*, 81(22), 5589–5595. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1606>
139. Wang, G.-J., Yu, T.-Y., Li, Y.-R., Liu, Y.-J., & Deng, B.-B. (2020). Circ\_0000190 suppresses gastric cancer progression potentially via inhibiting miR-1252/PAK3 pathway. *Cancer Cell International*, 20, 351. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01422-5>
140. Wang, L., Li, K., Wang, C., Shi, X., & Yang, H. (2019). miR-107 regulates growth and metastasis of gastric cancer cells via activation of the PI3K-AKT signaling pathway by down-regulating FAT4. *Cancer Medicine*, 8(11), 5264–5273. <https://doi.org/10.1002/cam4.2396>
141. Wang, S., Scharadin, T. M., Zimmermann, M., Malfatti, M. A., Turteltaub, K. W., de Vere White, R., Pan, C.-X., & Henderson, P. T. (2018). Correlation of Platinum Cytotoxicity to Drug-DNA Adduct Levels in a Breast Cancer Cell Line Panel. *Chemical Research in Toxicology*, 31(12), 1293–1304. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00170>
142. Wen, B., Zhu, R., Jin, H., & Zhao, K. (2021). Differential expression and role of miR-200 family in multiple tumors. *Analytical Biochemistry*, 626, 114243. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114243>
143. Westover, D., & Li, F. (2015). New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 34, 159. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0275-x>

144. Wu, H.-T., Chen, W.-T., Li, G.-W., Shen, J.-X., Ye, Q.-Q., Zhang, M.-L., Chen, W.-J., & Liu, J. (2020). Analysis of the Differentially Expressed Genes Induced by Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinomas and Their Interaction. *Frontiers in Genetics*, *10*, 1328. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01328>
145. Wu, H.-Y., Yang, M.-C., Ding, L.-Y., Chen, C. S., & Chu, P.-C. (2019). P21-Activated kinase 3 promotes cancer stem cell phenotypes through activating the Akt-GSK3 $\beta$ - $\beta$ -catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*, *456*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.04.026>
146. Xiao, M., Li, J., Li, W., Wang, Y., Wu, F., Xi, Y., Zhang, L., Ding, C., Luo, H., Li, Y., Peng, L., Zhao, L., Peng, S., Xiao, Y., Dong, S., Cao, J., & Yu, W. (2016). MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biology*, *14*(10), 1326–1334. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1112487>
147. Xie, W., Sun, H., Li, X., Lin, F., Wang, Z., & Wang, X. (2021). Ovarian cancer: Epigenetics, drug resistance, and progression. *Cancer Cell International*, *21*, 434. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02136-y>
148. Xiong, J., Wang, D., Wei, A., Lu, H., Tan, C., Li, A., Tang, J., Wang, Y., He, S., Liu, X., & Hu, W. (2017). Deregulated expression of miR-107 inhibits metastasis of PDAC through inhibition PI3K/Akt signaling via caveolin-1 and PTEN. *Experimental Cell Research*, *361*(2), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.10.033>
149. Xu, Q., Liao, Z., Gong, Z., Liu, X., Yang, Y., Wang, Z., Yang, W., Hou, L., Yang, J., Song, J., Liu, W., Wang, B., Hua, J., Pu, M., & Li, N. (2022). Down-regulation of EVA1A by miR-103a-3p promotes hepatocellular carcinoma cells proliferation and migration. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *27*(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00388-8>



150. Yang, C.-P. H., Yap, E.-H., Xiao, H., Fiser, A., & Horwitz, S. B. (2016). 2-(m-Azidobenzoyl)taxol binds differentially to distinct  $\beta$ -tubulin isotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(40), 11294–11299. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613286113>
151. 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. Y. J., Kalcheim, C., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
152. Yarden, Y., & Pines, G. (2012). The ERBB network: At last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews Cancer*, *12*(8), 553–563. <https://doi.org/10.1038/nrc3309>
153. Ye, D. Z., & Field, J. (2012). PAK signaling in cancer. *Cellular Logistics*, *2*(2), 105–116. <https://doi.org/10.4161/cl.21882>
154. Yu, W., Wang, J., Li, C., Xuan, M., Han, S., Zhang, Y., Liu, P., & Zhao, Z. (2022). miR-17-5p promotes the invasion and migration of colorectal cancer by regulating HSPB2. *Journal of Cancer*, *13*(3), 918–931. <https://doi.org/10.7150/jca.65614>
155. Zhang, G., Chen, Z., Zhang, Y., Li, T., Bao, Y., & Zhang, S. (2020). Inhibition of miR-103a-3p suppresses the proliferation in oral squamous cell carcinoma cells via targeting RCAN1. *Neoplasma*, *67*(3), 461–472. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2020\\_190430N382](https://doi.org/10.4149/neo_2020_190430N382)
156. Zhang, Y., Luo, G., Li, M., Guo, P., Xiao, Y., Ji, H., & Hao, Y. (2019). Global patterns and trends in ovarian cancer incidence: Age, period and birth cohort analysis. *BMC Cancer*, *19*(1), 984. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6139-6>
157. Zhao, G., Wei, Z., & Guo, Y. (2020). MicroRNA-107 is a novel tumor suppressor targeting POU3F2 in melanoma. *Biological Research*, *53*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00278-3>

158. Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), 525–530. <https://doi.org/10.1038/nature16064>
159. Zhou, J., Sun, X., Zhang, X., Yang, H., Jiang, Z., Luo, Q., Liu, Y., & Wang, G. (2022). miR-107 is involved in the regulation of NEDD9-mediated invasion and metastasis in breast cancer. *BMC Cancer*, 22(1), 533. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09603-3>

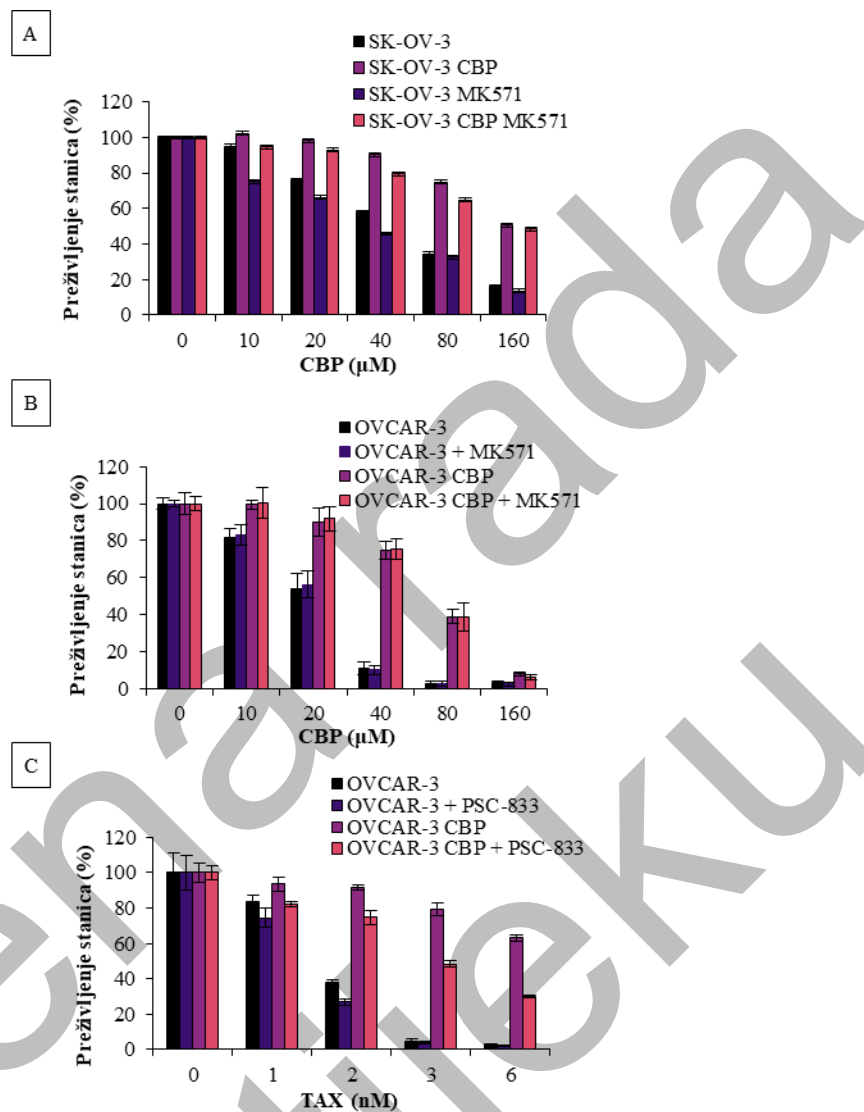
## 10. PRIVITCI

**Tablica P1. Rezultati analize ekspresije miRNA u stanicama MES-OV CBP u odnosu na roditeljske stanice MES-OV.**

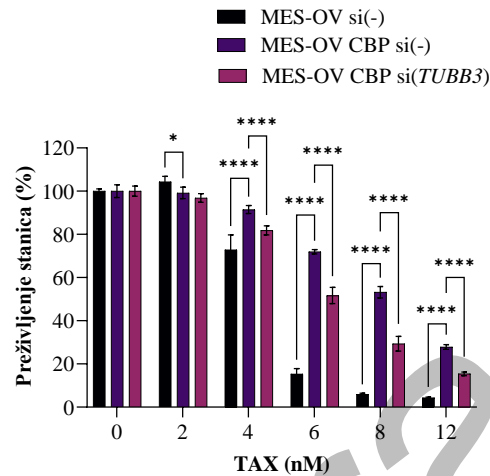
miRNA povišene ekspresije	FC	miRNA snižene ekspresije	FC	miRNA snižene ekspresije	FC
hsa-miR-210-3p	4,38	hsa-miR-200a-3p	0,79	hsa-let-7a-2-3p	0,48
hsa-miR-1260a	2,56	hsa-miR-200c-3p	0,78	hsa-miR-324-5p	0,48
hsa-miR-629-5p	2,15	hsa-miR-339-5p	0,78	hsa-miR-31-5p	0,46
hsa-miR-148b-5p	2,13	hsa-miR-215-5p	0,77	hsa-miR-18a-3p	0,46
hsa-let-7a-5p	1,97	hsa-miR-186-5p	0,75	hsa-miR-105-5p	0,44
hsa-miR-125a-5p	1,95	hsa-miR-106b-3p	0,74	hsa-miR-429	0,43
hsa-miR-22-5p	1,83	hsa-miR-767-5p	0,74	hsa-miR-155-5p	0,43
hsa-miR-224-5p	1,63	hsa-miR-100-5p	0,73	hsa-miR-126-3p	0,42
hsa-miR-505-3p	1,62	hsa-miR-183-5p	0,73	hsa-miR-31-3p	0,41
hsa-let-7e-5p	1,61	hsa-miR-106b-5p	0,72	hsa-miR-196b-5p	0,40
hsa-miR-185-5p	1,55	hsa-miR-26b-3p	0,72	hsa-miR-7-5p	0,37
hsa-miR-22-3p	1,53	hsa-miR-378a-5p	0,70	hsa-miR-19b-3p	0,35
hsa-miR-425-5p	1,51	hsa-miR-200b-3p	0,69	hsa-miR-19a-3p	0,32
hsa-miR-551a	1,51	hsa-miR-138-2-3p	0,69	hsa-miR-20a-5p	0,32
hsa-miR-935	1,49	hsa-miR-532-5p	0,68	hsa-miR-106a-5p	0,32
hsa-miR-1296-5p	1,49	hsa-miR-374a-5p	0,66	hsa-miR-17-5p	0,28
hsa-miR-29c-5p	1,49	hsa-miR-132-5p	0,66	hsa-miR-18b-5p	0,26
hsa-miR-149-5p	1,45	hsa-miR-15a-5p	0,62	hsa-miR-18a-5p	0,24
hsa-miR-296-5p	1,44	hsa-miR-93-3p	0,61	hsa-miR-99a-5p	0,24
hsa-miR-29a-5p	1,43	hsa-miR-1271-5p	0,60		
hsa-miR-182-5p	1,40	hsa-miR-103a-3p	0,60		
hsa-miR-130b-5p	1,38	hsa-miR-107	0,59		
hsa-let-7c-5p	1,32	hsa-miR-151a-3p	0,59		
hsa-miR-942-5p	1,31	hsa-miR-92a-3p	0,56		
hsa-miR-331-3p	1,30	hsa-miR-92a-1-5p	0,55		
hsa-miR-15b-5p	1,30	hsa-miR-877-5p	0,54		
hsa-miR-26a-5p	1,28	hsa-miR-19b-1-5p	0,53		
hsa-miR-30d-3p	1,27	hsa-miR-744-5p	0,52		
hsa-miR-27b-3p	1,25	hsa-miR-148a-3p	0,50		

**Tablica P2. Geni povezani s matičnosti**

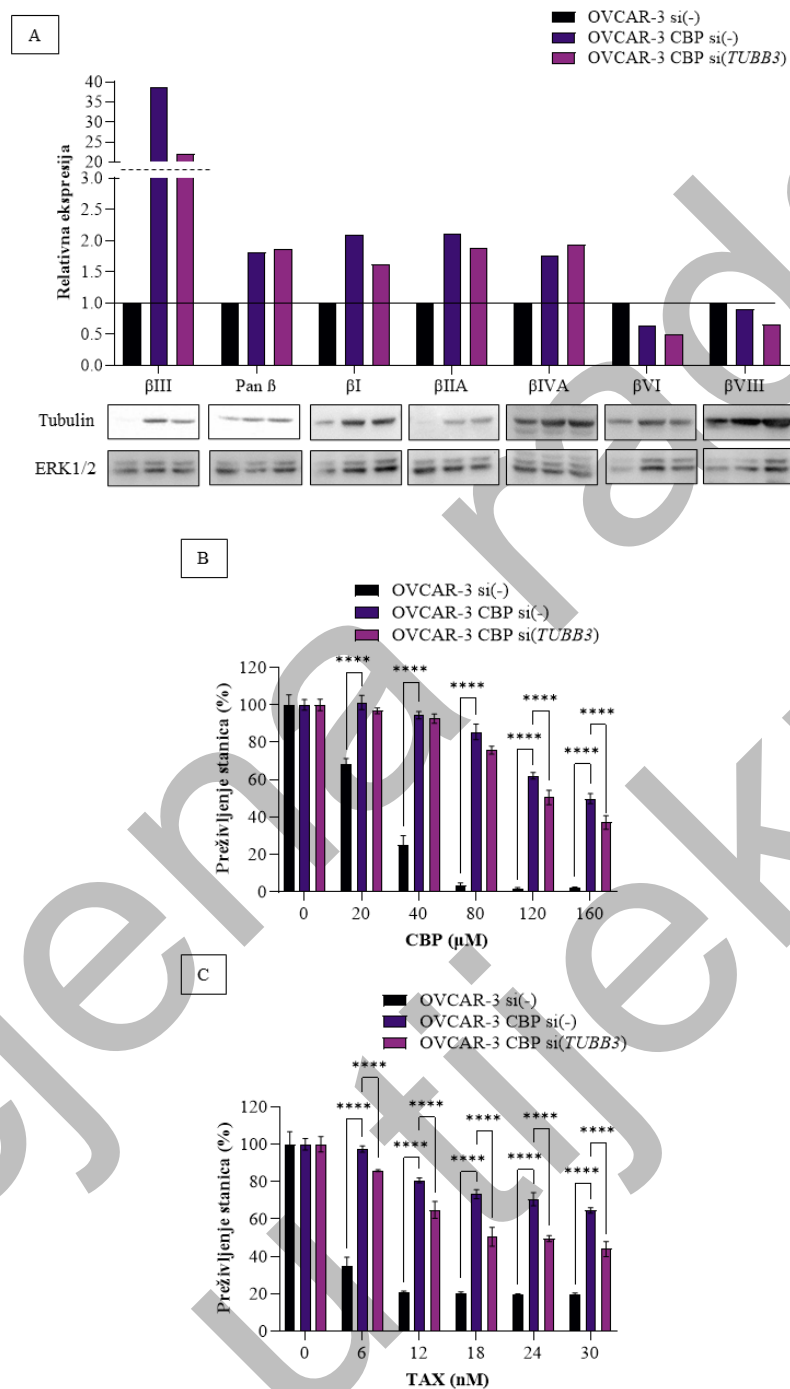
<b>Gene Symbol</b>	<b>F-Test</b>	<b>MES-OV CBP vs MES-OV</b>
ENG	0.0041	-0.195
CD24	1.77E-06	3.595
CD44	1.10E-05	1.545
PROM1	8.68E-07	-4.035
KIT	0.0003	-0.655
POU5F1	0.0076	0.135
NANOG	0.9215	-0.105
SALL4	0.7407	-0.375



**Slika P1. Utjecaj inhibitora MK571 i PSC-833 na preživljenje stanica.** Stanice (A) SK-OV-3 i SK-OV-3 CBP i (B)(C) OVCAR-3 i OVCAR-3 CBP 24 sata nakon nasađivanja tretirane su s 10 μM inhibitorom MK571, odnosno s 10 μM PSC-833. Nakon 2 sata, stanice su tretirane različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 72 sata. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadrplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen dva puta.



**Slika P2. Utjecaj utišavanja TUBB3 na osjetljivost stanica otpornih na TAX.** Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 120 sati. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadruplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

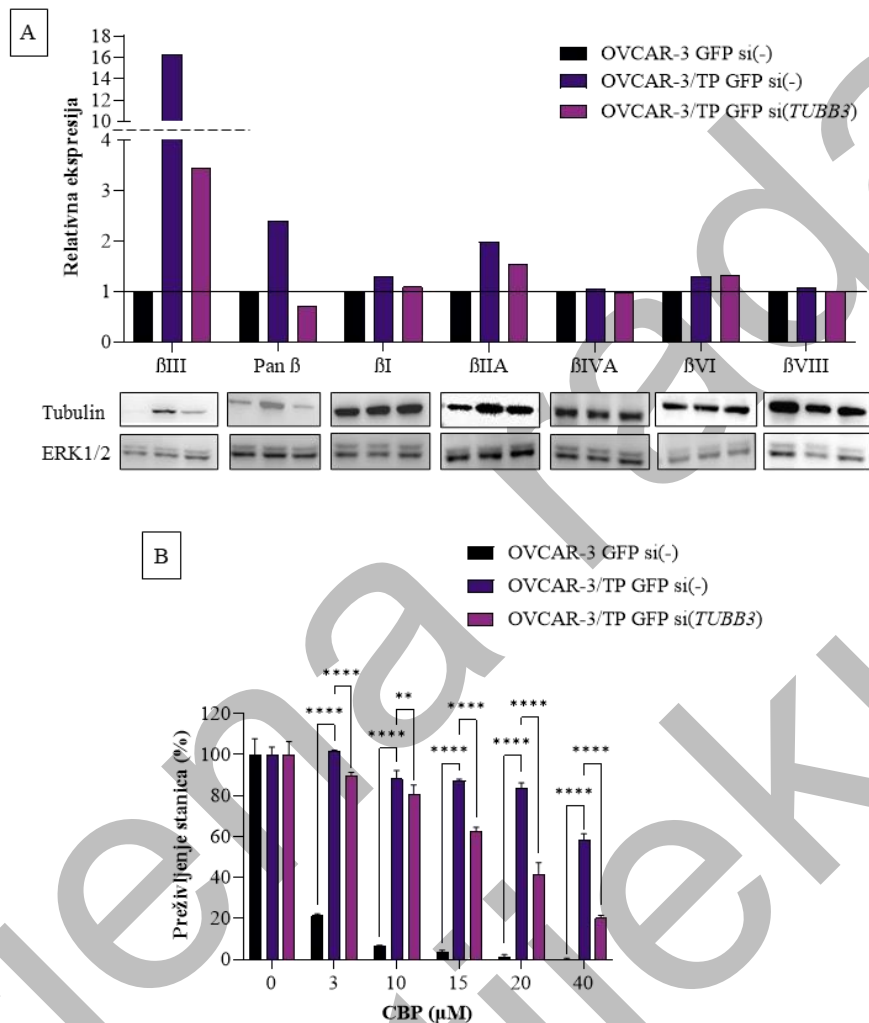


**Slika P3. (A) Utjecaj utišavanja ekspresije TUBB3 na ekspresiju ukupnog TUBB i drugih izotipova TUBB u stanicama otpornim na CBP.** Ekspresija ukupnog TUBB i njegovih izotipova određena je metodom Western blot iz ukupnog proteinskog izolata. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta zajedno s relativnim omjerima ekspresije proteina u odnosu na stanice OVCAR-3 si(-). **(B)(C) Utjecaj utišavanja TUBB3 na**

**osjetljivost stanica otpornih na CBP i TAX.** Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP i TAX. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 120 sati. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadriplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$

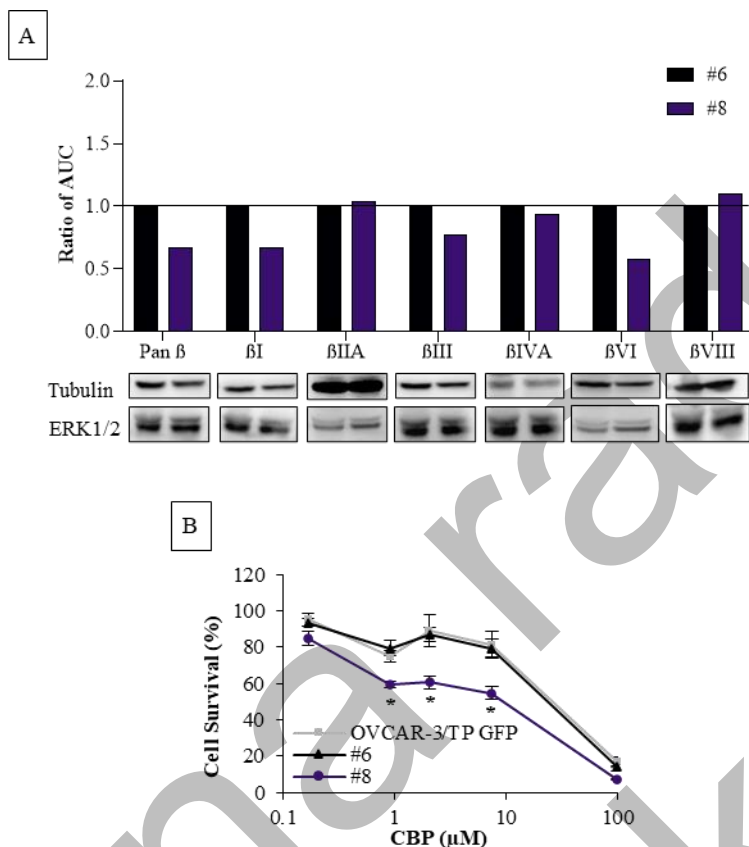
Ocjena rada  
u tisku





**Slika P4. (A) Utjecaj utišavanja ekspresije TUBB3 na ekspresiju ukupnog TUBB i drugih izotipova TUBB u stanicama otpornim na TAX.** Ekspresija ukupnog TUBB i njegovih izotipova određena je metodom Western blot iz ukupnog proteinskog izolata. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta zajedno s relativnim omjerima ekspresije proteina u odnosu na stanice OVCAR-3 GFP si(-). **(B) Utjecaj utišavanja TUBB3 na osjetljivost stanica otpornih na CBP.** Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 120 sati. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadruplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

\*eksperimente je napravila dr.sc. Vanja Tadić



**Slika P5. (A) Utjecaj smanjene ekspresije TUBB3 na ekspresiju ukupnog TUBB i drugih izotipova TUBB *ex vivo*.** Ekspresija ukupnog TUBB i njegovih izotipova određena je metodom Western blot iz ukupnog proteinskog izolata. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazani su rezultati reprezentativnog eksperimenta zajedno s relativnim omjerima ekspresije proteina u odnosu na stanice OVCAR-3/TP GFP si(-). **(B) Utjecaj smanjene ekspresije TUBB3 na osjetljivost stanica na CBP.** Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića te idući dan tretirane s različitim koncentracijama CBP. Preživljenje stanica analizirano je testom metabolizma resazurina nakon 120 sati. Prikazana je srednja vrijednost postotka preživljenja (srednja vrijednost kvadrplikata) u odnosu na netretiranu kontrolu s pripadajućim standardnim devijacijama. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$

## 11. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

Rođena sam 1992. u Zagrebu. Pohađala je osnovnu školu Dobriše Cesarića te II. Gimnaziju u Zagrebu. Nakon preddiplomskog studija molekularne biologije, diplomski studij molekularne biologije završila sam 2018. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.. Sudjelovala sam u Erasmus+ programu studentske prakse, koju sam odradila u Institutu za toksikologiju Medicinskog fakulteta u Düsseldorfu pod vodstvom prof. dr. sc. Gerharda Fritza. Diplomski rad izradila sam pod mentorstvom dr. sc. Anamarije Brozović u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković (IRB). Rezultate diplomskog rada prezentirala sam na kongresu HDIR-4 na kojem mi je dodijeljena nagrada od strane EACR-a za najbolji poster. Također, istraživanje je rezultiralo objavom rada s prvim autorstvom koji je nagrađen Godišnjom nagradom IRB-a za najbolje znanstvene radove 2019. godine. Od listopada 2018. godine zaposlena sam kao asistent na IRB-u u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala gdje pod vodstvom mentorice dr. sc. Anamarije Brozović izrađujem doktorsku disertaciju u sklopu HrZZ projekta „Određivanje ključnih molekula epitelno-mezenhimalne tranzicije kao mogućih ciljeva za terapiju raka jajnika“. Dio istraživanja odradila sam u Zavodu za urologiju Medicinskog sveučilišta u Innsbrucku pod vodstvom prof. dr. sc. Zorana Čuliga u sklopu bilaterale Hrvatska – Austrija. U ožujku 2023. obranila sam temu doktorske disertacije pod naslovom „Promjene u ekspresiji mikroRNA u otpornosti na karboplatinu i metastatskom potencijalu stanica epitelnog raka jajnika“. Rezultate sam predstavila na tri kongresa, dva puta s posterom (HDBMB22, Brela; EACR23, Torino) te jednom s odabranim usmenim izlaganjem (HDIR-6, Zagreb), sva tri puta kao prvi autor. Također, održala sam predavanje u strukovnom društvu (HDIR), te sam sudjelovala na nekoliko tečajeva iz protočne citometrije, metode Western blot, mikroskopije, spektrometrije masa. Za projekt „Utjecaj epigenetički regulirane miRNA-103a-3p na metastatski potencijal stanica epitelnog raka jajnika“ su mi 2023. dodijeljena sredstva od strane HAZU-a u kategoriji Razvijanje znanstvenoistraživačkog i umjetničkog rada. Član sam Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB) (preko društva i član FEBS-a), Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) (preko društva i član EACR-a), Američkog društva za istraživanje raka (AACR) i Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu. Do sada sam objavila sedam znanstvenih radova, od kojih dva kao prvi autor i dva s dijeljenim prvim autorstvom (CroRIS ID 34878). Majka sam dviju djevojčica (rođene 2021. i 2023.).

## Popis radova

1. Kralj, J., **Pernar Kovač, M.**, Dabelić, S., Polančec, D. S., Wachtmeister, T., Köhrer, K., & Brozovic, A. (2023). Transcriptome analysis of newly established carboplatin-resistant ovarian cancer cell model reveals genes shared by drug resistance and drug-induced EMT. *British Journal of Cancer*, 128(7), 1344–1359. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02140-1>
2. Matić, J., Piotrowski, P., Vrban, L., Kobetić, R., Vianello, R., Jurić, I., Fabijanić, I., **Pernar Kovač, M.**, Brozovic, A., Piantanida, I., Schmuck, C., & Radić Stojković, M. (2024). Distinctive Nucleic Acid Recognition by Lysine-Embedded Phenanthridine Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9), 4866. <https://doi.org/10.3390/ijms25094866>
3. Opačak, S.\*, **Pernar Kovač, M.\***, Landais, C., Debeljak, Ž., Golding, T. M., Smith, G. S., Brozovic, A., & Kirin, S. I. (2024). Dissimilar effect of organometallic ruthenium complexes on the viability of MDR and non-MDR experimental models. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 257, 112614. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2024.112614>
4. Opačak, S., **Pernar Kovač, M.**, Brozovic, A., Piantanida, I., & Kirin, S. I. (2023). Turn-on fluorescence of ruthenium pyrene complexes in response to bovine serum albumin. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, 52(33), 11698–11704. <https://doi.org/10.1039/d3dt02289g>
5. **Pernar Kovač, M.**, Tadić, V., Kralj, J., Duran, G. E., Stefanelli, A., Stupin Polančec, D., Dabelić, S., Bačić, N., Tomicic, M. T., Heffeter, P., Sikic, B. I., & Brozovic, A. (2023). Carboplatin-induced upregulation of pan  $\beta$ -tubulin and class III  $\beta$ -tubulin is implicated in acquired resistance and cross-resistance of ovarian cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 80(10), 294. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04943-0>
6. **Pernar Kovač, M.\***, Tadić, V.\*, Kralj, J., Milković Periša, M., Orešković, S., Babić, I., Banović, V., Zhang, W., Culig, Z., & Brozovic, A. (2023). MiRNA-mRNA integrative analysis reveals epigenetically regulated and prognostic miR-103a with a role in migration and invasion of carboplatin-resistant ovarian cancer cells that acquired mesenchymal-like phenotype. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 166, 115349. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115349>
7. **Pernar, M.**, Kokan, Z., Kralj, J., Glasovac, Z., Tumir, L.-M., Piantanida, I., Eljuga, D., Turel, I., Brozovic, A., & Kirin, S. I. (2019). Organometallic ruthenium(II)-arene complexes with

triphenylphosphine amino acid bioconjugates: Synthesis, characterization and biological properties. *Bioorganic Chemistry*, 87, 432–446. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.048>

\*dijeljeno prvo autorstvo

Ocjena rada  
u tijeku