

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Emilija N. Milošević

Karakterizacija gena *ANKRD1* i uticaja violaceina na
ćelije rabdomyosarkoma *in vitro*

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Emilija N. Milošević

Characterization of the *ANKRD1* gene and the effect
of violacein on rhabdomyosarcoma cells *in vitro*

doctoral dissertation

Belgrade, 2024

MENTORI:

dr **Jovana Jasnić**, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo

dr **Miloš Brkušanin**, docent
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA:

dr **Goran Brajušković**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr **Danijela Maksimović-Ivanić**, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković

dr **Snežana Kojić**, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod mentorstvom dr Jovane Jasnić. Zahvalna sam Jovani što me još tokom izrade master rada uvela u laboratoriju i pomogla mi da se lakše nosim sa pritiskom. Jovana, hvala ti što si se zauzimala za mene i bila pozitivna.

Prof. dr Goranu Brajuškoviću zahvaljujem se na značajnim uvidima i ukazivanju na odgovarajuću terminologiju, koji su doprineli poboljanju ove disertacije.

Hvala dr Danijeli Maksimović-Ivanić na detaljnom iščitavanju teze i uvidima koji su pomogli u njenom uobličavanju.

Hvala dr Snežani Kojić što me primila u svoju grupu i dala mi punu podršku za vreme pisanja disertacije.

Zahvaljujem se dr Milošu Brkušaninu na odličnoj komunikaciji i pomoći u snalaženju u fakultetskim procedurama.

Hvala svima koji su bili uz mene tokom izrade ove disertacije:

Kolegama iz Laboratorija 03, 11 i 12. Srećna sam što smo sarađivali i družili se tokom ovih šest godina.

Hvala Kristini, Gogi, Nedi, Jovani i Katarini na prijateljstvu i nezaboravnom studiranju.

Mladenu i Mileni na podršci i razgovorima. Uz vas je sve mnogo lakše.

Svim cimerkama koje su upotpunile moje studentske dane, a najviše Emi, Milici i Tatjani.

Roditeljima jer su me podržavali i dali mi slobodu da izaberem svoj put.

Manji što je uvek bila moj uzor.

Filipu na svoj pomoći, podršci, razumevanju i bodrenju.

Tezu posvećujem vama.

Karakterizacija gena *ANKRD1* i uticaja violaceina na ćelije rhabdomiosarkoma *in vitro*

SAŽETAK

Rhabdomiosarkomi (RMS) su najčešći maligni tumori mekog tkiva kod dece i adolescenata. Zbog uzrasta pacijenata i agresivnosti tumora, lečenje predstavlja veliki izazov. Da bi se doprinelo identifikaciji novih terapijskih targeta i terapijskih sredstava za RMS, u ovoj disertaciji je istražen *ANKRD1* (eng. *ankyrin repeat domain 1*), označen kao potencijalni marker za diferencijalnu dijagnostiku, i antitumorski potencijal prirodnog pigmenta violaceina, koristeći tri ćelijske linije RMS.

Svaka linija je ekspresirala različite količine *ANKRD1* proteina, iako je nivo transkripta bio sličan. Imunocitohemijom je otkrivena jedarna i citoplazmatska lokalizacija *ANKRD1* u svim linijama. Tačkasti obrazac bojenja *ANKRD1* u jedrima RD i HS-729 ćelija poklapao se sa markerom Kahalovih tela. Povećanje ekspresije *ANKRD1* nije bilo moguće, verovatno usled proteazomalne degradacije. Ovo ukazuje na štetne efekte povećanja ekspresije *ANKRD1* na ćelije RMS, sugerišući opravdanost daljih istraživanja njegove uloge u patogenezi RMS i razmatranja kao terapijskog targeta.

Violacein je pokazao citotoksični efekat na ćelije RMS, indukujući apoptozu, dok nije imao značajan uticaj na preživljavanje neizmenjenih ćelija i embriona zebrica pri koncentracijama toksičnim za tumorske ćelije. Uticao je i na migratorni potencijal ćelija RMS. Tokom tretmana se zadržavao na površini ćelija, a njegovo dejstvo nije zavisilo od oksidativnog stresa. Dodavanje violaceina je povećalo toksičnost doksorubicina prema ćelijama RMS.

Ovo istraživanje doprinosi boljem razumevanju funkcije *ANKRD1* u RMS i ukazuje na potencijal violaceina kao dodatne terapijske opcije za lečenje ovog tipa tumora.

KLJUČNE REČI: *ANKRD1*, rhabdomiosarkom, violacein, Kahalova tela, proteazomalna degradacija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

Characterization of the *ANKRD1* gene and the effect of violacein on rhabdomyosarcoma cells in vitro

ABSTRACT

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common soft tissue malignancy in children and adolescents. Due to the age of patients and the tumor aggressiveness, treatment presents a significant challenge. To contribute to the identification of new therapeutic targets and treatment options for RMS, we investigated ANKRD1 (*ankyrin repeat domain 1*), marked as a potential differential diagnostic marker, and the antitumor potential of natural pigment violacein, using three RMS cell lines.

Each line expressed a different amount of ANKRD1 protein, although the transcript levels were similar. Immunocytochemistry revealed nuclear and cytoplasmic localization of ANKRD1 in all examined lines. The punctate pattern of ANKRD1 staining in the nuclei of RD and HS-729 cells overlapped with the marker of Cajal bodies. Overexpression of ANKRD1 was not achieved in the cells, likely due to proteasomal degradation. The unsuccessful overexpression of ANKRD1 indicates its detrimental effects on RMS cells, suggesting the need to investigate its role in RMS pathogenesis and potential as a therapeutic target.

Violacein demonstrated a cytotoxic effect on RMS cells, inducing apoptosis, while it did not significantly affect the survival of non-malignant cells and zebrafish embryos at concentrations toxic to tumor cells. Violacein also affected the migratory potential of RMS cells. It did not penetrate the cells but remained on their surface, and its action was independent of oxidative stress. The addition of violacein increased the toxicity of doxorubicin to RMS cells.

This study contributes to a better understanding of the ANKRD1 function in RMS and highlights the potential of violacein as an additional therapeutic agent for this tumor.

Keywords: ANKRD1, rhabdomyosarcoma, violacein, Cajal bodies, proteasomal degradation

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Poprečno-prugasti mišići.....	1
1.2. Diferencijacija skeletnih mišićnih ćelija.....	2
1.3. Rabdomiosarkomi	4
1.3.1. Dijagnostika rabdomiosarkoma.....	5
1.3.2. Terapija rabdomiosarkoma	7
1.3.2.1. Agensi prirodnog porekla u terapiji rabdomiosarkoma	7
1.4. Protein ANKRD1.....	8
1.4.1. Funkcija proteina ANKRD1 u miogenezi	9
1.4.2. Protein ANKRD1 u patološkim stanjima i uslovima stresa	10
1.4.2.1. Protein ANKRD1 u tumorima	11
1.5. Violacein	12
2. CILJEVI RADA	16
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1. Materijal.....	17
3.1.1. Ćelijske linije.....	17
3.1.2. Laboratorijske životinje	17
3.1.3. Bakterije.....	17
3.1.4. Prajmeri.....	17
3.1.5. Plazmidni konstrukti i vektori.....	18
3.1.6. Antitela	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Ćelijska kultura.....	20
3.2.2. Tranzijentna transfekcija ćelija u kulturi	20
3.2.3. Tretman ćelija inhibitorom proteazoma	20
3.2.4. Analiza ekspresije gena na nivou RNK metodama RT-PCR i qPCR.....	20
3.2.4.1. Izolacija molekula RNK	21
3.2.4.2. Sinteza molekula cDNK.....	21
3.2.4.3. PCR.....	21
3.2.4.4. Kvantitativni PCR u realnom vremenu	22
3.2.5. Sekvenciranje molekula DNK metodom po Sangeru	22
3.2.6. Analiza ekspresije na nivou proteina.....	24
3.2.6.1. Priprema proteinskih ekstrakata.....	24
3.2.6.2. Merenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	24
3.2.6.3. Imunoprecipitacija.....	25

3.2.6.4. Western blot.....	25
3.2.6.5. Imunocitohemija	26
3.2.7. Metode za analizu antitumorskog dejstva violaceina	26
3.2.7.1. Izolacija i prečišćavanje violaceina	26
3.2.7.2. Određivanje vijabilnosti ćelija MTT testom	26
3.2.7.3. Esej zarastanja rane	27
3.2.7.4. Test toksičnosti na embrionima zebrica	27
3.2.7.5. Određivanje tipa ćelijske smrti metodom protočne citofluorimetrije	28
3.2.7.6. Relativna kvantifikacija unutarćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika.....	28
3.2.7.7. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije	29
3.2.8. Konfokalna i DIC mikroskopija.....	29
3.2.9. Statistička analiza	30
4. REZULTATI	31
4.1. Karakterizacija ekspresije gena <i>ANKRD1</i> u ćelijskim linijama RMS.....	31
4.1.1. Potvrda specifičnosti antitela na humani protein ANKRD1.....	31
4.1.2. Ekspresija <i>ANKRD1</i> u ćelijskim linijama RMS	32
4.1.3. Unutarćelijska lokalizacija ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS.....	34
4.1.4. Proteazomalna degradacija ANKRD1 u ćelijama RMS	36
4.1.5. Egzogeno ekspresija ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS.....	36
4.2. Procena antitumorskog efekta violaceina na ćelije poreklom od RMS	37
4.2.1. Citotoksični efekat violaceina na ćelije poreklom od RMS	37
4.2.2. Uticaj violaceina na preživljavanje embriona zebrica.....	38
4.2.3. Tip ćelijske smrti ćelija RD tretiranih violaceinom	40
4.2.4. Interakcija violaceina sa ćelijama RMS	40
4.2.5. Uticaj violaceina na migraciju ćelija RMS	41
4.2.6. Dejstvo violaceina na parametre oksidativnog stresa u ćelijama poreklom od RMS	43
4.2.7. Sadejstvo violaceina sa konvencionalnim hemioterapeuticima	45
4.2.8. Uticaj violaceina na ekspresiju proteina ANKRD1.....	47
5. DISKUSIJA.....	48
6. ZAKLJUČCI.....	59
7. LITERATURA.....	60

1. UVOD

1.1. Poprečno-prugasti mišići

Mišićno tkivo ima ključnu ulogu u održavanju i promeni položaja tela, kretanju i pokretanju unutrašnjih organa. Čine ga specijalizovane ćelije u kojima aktinski i miozinski filamenti omogućavaju kontrakcije koje menjaju veličinu i oblik ćelija (Alberts *et al*, 2015; Jasnić, 2016). Tri osnovna tipa kontraktilnih ćelija su skeletne, srčane i glatke mišićne ćelije. Razlikuju se prema izgledu, strukturi, funkciji, načinu kontrakcije i tipu inervacije (Jasnić, 2016).

Sva mišićna tkiva potiču od istog embrionalnog sloja, mezoderma. U ranim fazama miogeneze, primarni mioblasti migriraju na lokacije gde će formirati mišićnu strukturu. Potom, različiti regulatorni faktori određuju ekspresiju gena specifičnih za mišićne ćelije, a samim tim i njihovu morfologiju i funkciju. Za razliku od glatkih, srčane i skeletne mišićne ćelije imaju specifičnu organizaciju kontraktilnih jedinica, koja im daje karakterističan izgled zbog koga su označene kao poprečno-prugaste (Alberts *et al*, 2015; Jasnić, 2016).

Kao deo lokomotornog sistema, skeletni mišići su odgovorni za gotovo sve pokrete tela koji su pod voljnom kontrolom. Udeo skeletnih mišića u ukupnoj telesnoj masi čoveka iznosi 38% kod muškaraca i 30% kod žena (Janssen *et al*, 2000). Ćelije skeletnih mišića mogu biti veoma velike (dužine 2–3 cm i 100 μ m u prečniku) i nazivaju se mišićnim vlaknima. Svako vlakno je sincicijum, sadrži veliki broj jedara, zajedno sa miofibrilima izgrađenim od niza ponavljajućih sarkomera. U intaktnom mišiću, mišićna vlakna su međusobno čvrsto povezana, a u tkivu se nalaze i drugi elementi poput fibroblasta, krvnih sudova i nervnih vlakana (Alberts *et al*, 2015). Važna odlika skeletnih mišićnih ćelija je sposobnost adaptacije i remodelovanja, što im omogućava odgovor na fiziološke izazove (Ferraro *et al*, 2014; Jasnić, 2016; Franchi *et al*, 2017).

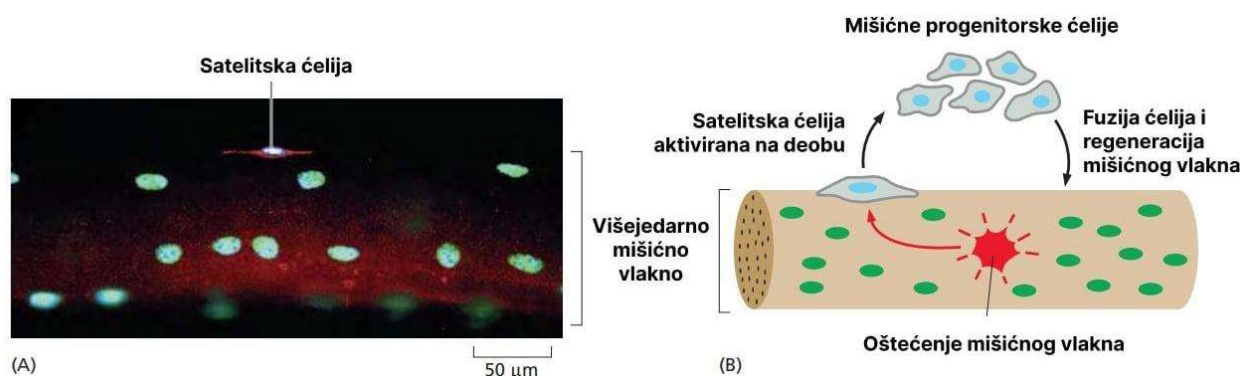
Srčani mišić je odgovoran za pumpanje krvi. Čine ga radna mišićna masa, specijalizovana za kontrakcije, i sprovodna mišićna masa, gde se stvaraju i prenose impulsi do kontraktilnog tkiva. Ritmične kontrakcije srčanih mišićnih ćelija, kardiomiocita, kontroliše autonomni nervni sistem. Za razliku od izduženih skeletnih mišićnih ćelija, kardiomiociti su zvezdastog oblika i poseduju jedno do dva jedra. Poprečno-prugasti izgled nije naglašen, usled prisustva velikog broja mitohondrija, koje obezbeđuju visoku proizvodnju energije, čineći srce veoma otpornim na umor. Kardiomiociti su međusobno povezani interkaliranim diskovima koji omogućavaju brzo prenošenje signala, te je srčani mišić označen kao fiziološki sincicijum (Alberts *et al*, 2015; Jasnić, 2016).

Proces diferencijacije skeletnih i srčanih mišićnih ćelija je različit. Skeletni mišići nastaju fuzijom mioblasta čime se, nakon miofibrilarne diferencijacije, formiraju izdužena mišićna vlakna, dok srčani mišić čine pojedinačni kardiomiociti međusobno povezani interkaliranim diskovima (Kojic, 2016).

1.2. Diferencijacija skeletnih mišićnih ćelija

U ranim fazama embrionalnog razvića kičmenjaka, određene ćelije poreklom iz somita postaju prekursori mišićnih vlakana skeletnih mišića, mioblasti. Nakon perioda intenzivne proliferacije, mioblasti se transformišu u miocite prolazeći kroz dramatičnu promenu: zaustavljaju deobu, aktiviraju ekspresiju niza mišićno-specifičnih gena potrebnih za terminalnu diferencijaciju i međusobno se spajaju, formirajući višejedarne miotube koje sazrevaju u mišićna vlakna. Nakon diferencijacije i fuzije, ćelije se više ne dele, a u jedrima prestaje replikacija DNK (Alberts *et al*, 2015).

U odraslom dobu, stvaranje novih mišićnih vlakana je omogućeno matičnim ćelijama skeletnih mišića, satelitskim ćelijama. One predstavljaju izvor iz koga nastaju nove, terminalno diferencirane mišićne ćelije. Satelitske ćelije su male, spljoštene i neaktivne ćelije koje leže u bliskom kontaktu sa zrelom mišićnom ćelijom, unutar njene ovojnice, bazalne lamine (Slika 1). Aktiviraju se kada je mišić oštećen ili stimulisan na rast. Iscrpljivanje njihove regenerativne sposobnosti odgovorno je za progresiju Dišenove mišićne distrofije (Kodippili i Rudnicki, 2023), kao i za slabljenje mišića u starosti (Alberts *et al*, 2015).

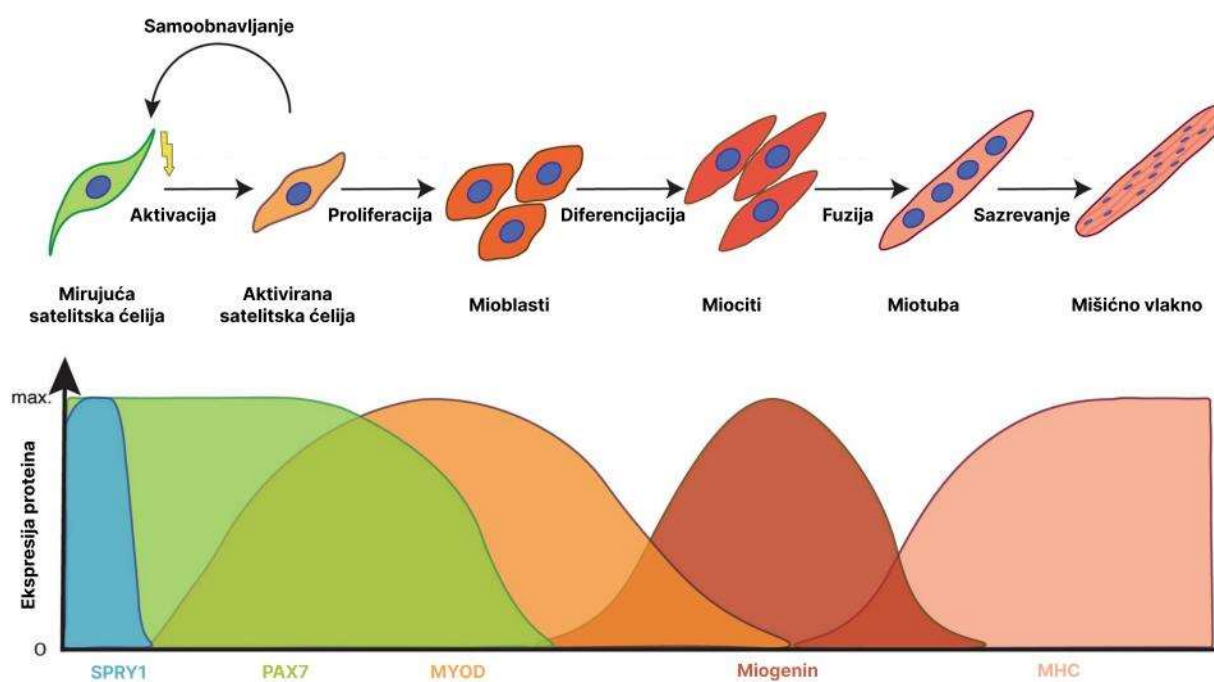


Slika 1. Satelitske ćelije repariraju oštećena mišićna vlakna. A – Satelitska ćelija vizualizovana na izolovanom mišićnom vlaknu detekcijom M-kadherina (crveno) koji je skoncentrisan na mestu kontakta između membrana satelitske ćelije i mišićnog vlakna. B – šematski prikaz procesa reparacije oštećenog mišića proliferacijom satelitskih ćelija i fuzijom mišićnih progenitorskih ćelija. Preuzeto i modifikovano iz Alberts *et al*, 2015.

Grupa homolognih transkripcionih regulatora, nazvanih miogeni regulatorni faktori (MRF), upravlja aktivacijom satelitskih ćelija, proliferacijom mioblasta i njihovim spajanjem u nova mišićna vlakna, pritom održavajući rezervu satelitskih ćelija potrebnih za očuvanje integriteta mišića (Zammit, 2017). U MRF spadaju miogeni faktor diferencijacije 1 (MYOD1), miogenin (MYF4), miogeni faktor 5 (MYF5) i miogeni faktor 6 (MYF6). Smatraju se glavnim regulatorima miogeneze. U neoštećenom mišiću, nivo transkripta *MYF6* je najviši među svim MRF-ovima, dok su nivoi transkriptata *MYOD1* i miogenina niski. MYF5 je eksprimiran u mirujućim satelitskim ćelijama (Gayraud-Morel *et al*, 2007). Pored MRF-ova, za pravilno odvijanje miogeneze zaduženi su i mnogi drugi regulatorni proteini, među kojima su: MEF-2 (eng. *myocyte enhancer factor 2*) koji deluje u interakciji sa MRF proteinima (Molkentin *et al*, 1995), NF- κ B (eng. *nuclear factor kappa B*) koji podstiče proliferaciju mioblasta i sprečava prevremeni ulazak u miogenu diferencijaciju (Peterson *et al*, 2011) i proto-onkogen c-MYB koji inhibira fuziju mioblasta (Kaspar *et al*, 2013). Od velikog značaja su i Notch signalni put, koji održava satelitske ćelije u

stanju mirovanja, kao i signalni put Wnt koji podstiče njihovu diferencijaciju (Schmidt *et al*, 2019).

Tokom života, skeletni mišići pokazuju visok regenerativni potencijal, a njihov rast i reparacija zavise od satelitskih ćelija koje se nalaze u stanju mirovanja i eksprimiraju PAX7 (eng. *paired box 7*) ili, u nekim mišićima, PAX3 (eng. *paired box 3*) (Seale *et al*, 2000; Relaix *et al*, 2006). Nakon povrede mišića, dolazi do aktivacije i proliferacije satelitskih ćelija, usled brze aktivacije MYOD1 (Slika 2). Jedna populacija aktiviranih satelitskih ćelija ne ulazi u diferencijaciju, već postepeno smanjuje ekspresiju MYOD1, čime gubi sposobnost proliferacije i vraća se u stanje mirovanja. Druga populacija (miogeni prekursori ili mioblasti) nastavlja da održava ekspresiju MYOD1, nakon čega se opredeljuje za miogenu diferencijaciju putem indukcije ekspresije miogenina (Pomella *et al*, 2023). Mioblasti potom napuštaju ćelijski ciklus, poravnavaju se i fuzionišu, formirajući višejedarne ćelije, miotube. U miotubama zatim dolazi do sinteze elemenata kontraktalnog aparata i njihove organizacije u sarkomere, čime nastaju potpuno diferencirana mišićna vlakna (Estrella *et al*, 2015). Celokupan proces diferencijacije od satelitskih ćelija do zrelih mišićnih vlakana je pod kontrolom složene epigenetičke regulacije, koja omogućava MRF proteinima da aktiviraju transkripciju tačno određenog seta mišićno-specifičnih gena (Singh i Dilworth, 2013).



Slika 2. Tok transformacije satelitskih ćelija u mišićna vlakna. Mirujuće satelitske ćelije se karakterišu ekspresijom proteina PAX7 i Sprouty1 (SPRY1). Nakon povrede mišića, signali za regeneraciju brzo aktiviraju satelitske ćelije, indukujući ekspresiju MYOD1. Deo aktiviranih satelitskih ćelija, kroz održavanje ekspresije PAX7, i smanjenje ekspresije MYOD1, održava rezervu mirujućih satelitskih ćelija. Druga populacija (mioblasti) nastavlja da proliferiše i smanjuje ekspresiju PAX7, dok održava MYOD1, pre nego što se konačno opredeli na miogenu diferencijaciju indukcijom ekspresije miogenina, čime nastaju miociti, a njihovom fuzijom izdužene višejedarne miotube. Sazrevanjem miotuba nastaju potpuno diferencirana mišićna vlakna. MHC - teški lanac miozina. Preuzeto i modifikovano iz Schmidt *et al*, 2019.

Poremećaj diferencijacije satelitskih u mišićne ćelije vodi u malignu transformaciju i razvoj rabdomiosarkoma.

1.3. Rabdomiosarkomi

Rabdomiosarkomi (RMS) su najučestaliji maligni tumori mekog tkiva dece i adolescenata. Nastaju usled poremećaja epigenetički regulisanog, hijerarhijski organizovanog procesa diferencijacije satelitskih ćelija u vlakna skeletnih mišića, odgovornog za rast, razvoj i reparaciju mišićnog tkiva (Saab *et al*, 2011). Ovi procesi se u RMS preuređuju i dolazi do prekomerne ekspresije onkogenih proteina odgovornih za razvoj i progresiju bolesti (Pomella *et al*, 2023). MRF proteini, inače zaduženi za usmeravanje progenitorskih ćelija skeletnih mišića tokom embrionalnog razvika i mišićne reparacije, u kombinaciji sa onkogenim aberacijama doprinose nastanku i širenju ćelija RMS, tako što podstiču njihovu proliferaciju, migraciju i abnormalnu diferencijaciju (Gryder *et al*, 2020). Analize na nivou pojedinačnih ćelija otkrivaju podskupove ćelija RMS koje rekapituliraju različite faze miogeneze, ukazujući na blokadu u specifičnim stadijumima diferencijacije (Wei *et al*, 2022).

RMS čine 3% svih malignih tumora kod dece, s incidencom od oko 4,5 slučajeva na milion osoba mlađih od 20 godina, pri čemu je oko polovine pacijenata mlađe od 10 godina. Najčešće se javljaju u predelu glave i vrata (35–40%), genitourinarnom traktu (25%) i na trupu ili ekstremitetima (20%). Među RMS glave i vrata, 75% sa javlja u orbiti oka. S obzirom na retkost bolesti i izuzetnu varijabilnost u lokaciji primarnog tumora i kliničkom ispoljavanju, lečenje RMS predstavlja veliki izazov (Ruiz-Mesa *et al*, 2015; Arnold i Barr 2017; Skapek *et al*, 2019).

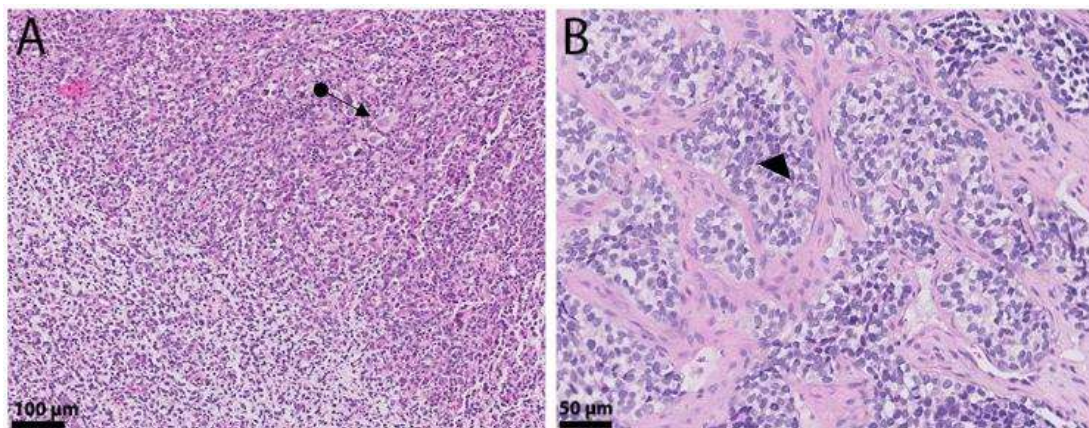
Petogodišnje preživljavanje pedijatrijskih pacijenata sa RMS je prevazišlo 70% (Skapek *et al*, 2019), ali je za one sa visokim rizikom ili recidivom znatno niže (30% i 17%, redom) (Shern *et al*, 2015). Prognostička stratifikacija ima veliki značaj, imajući u vidu da oko 15% dece ima metastaze u trenutku postavljanja dijagnoze (Hawkins *et al*, 2013). Odrasli pacijenti takođe imaju lošu prognozu, sa petogodišnjim preživljavanjem od 26,6% do 61% (Sultan *et al*, 2009; Ferrari *et al*, 2003; Noujaim *et al*, 2015).

Tokom poslednje tri decenije, sproveden je veliki broj kliničkih studija koje su dovele do poboljšanja terapijskih režima, čime je povećan stepen preživljavanja pacijenata (Skapek *et al*, 2019; Hawkins *et al*, 2013). Dodatno, napredak u molekularnoj biologiji i usvajanje tehnologije sekvenciranja nove generacije poboljšali su razumevanje patogeneze RMS (Shern *et al*, 2015; Skapek *et al*, 2019). Međutim, uprkos napretku, petogodišnja stopa preživljavanja je ostala nepromenjena za pacijente sa metastatskom ili rekurentnom bolešću (Zarrabi *et al*, 2023). Takođe, aktuelni režimi hemioterapije i dalje sa sobom nose toksičnost koja dodatno ugrožava život pacijenata (Skapek *et al*, 2019).

Svetska zdravstvena organizacija klasifikuje RMS u tri histološke varijante: alveolarni (ARMS), embrionalni (ERMS) i pleomorfni, pri čemu su ARMS i ERMS najčešći, a 2013. godine podeli je pridodat i vretenasto-ćelijski/sklerozirajući RMS, kao četvrti tip (Doyle 2014; Rudzinski *et al*, 2015). ARMS i ERMS se mogu dalje podeliti na osnovu histoloških i molekularnih karakteristika. Na primer, ARMS se, na osnovu prisustva PAX3–FOXO1 ili PAX7–FOXO1 fuzionog transkripta, deli na RMS pozitivan na fuziju (eng. *fusion positive RMS*, FPRMS) i RMS negativan na fuziju (eng. *fusion negative RMS*, FNRMS) (Williamson *et al*, 2010). ARMS je tipično izgrađen od grupacija gusto zbijenih, sitnih, okruglih ćelija uokvirenih fibrovaskularnim pregradama čime podseća na alveole pluća, dok ERMS čine nezreli rabdmioblasti sa više međućelijskog prostora i bez

alveolarnog izgleda (Slika 3) (Dehner *et al*, 2021). Treba istaći da neki uzorci RMS ispoljavaju intratumorsku heterogenost sa fenotipom koji uključuje osobine i embrionalnog i alveolarnog tipa (Rudzinski *et al*, 2013; Arnold *et al*, 2016).

Od podtipa RMS zavisi preživljavanje pacijenata i vrsta terapije. Stoga je veoma važno izvršiti preciznu i brzu dijagnostiku. Takođe, neophodno je raditi na boljem razumevanju mehanizama nastanka i propagacije rabdomyosarkoma kako bi se identifikovale nove terapijske mete i povećala efikasnost terapije (Arnold i Barr, 2017).



Slika 3. Histologija embrionalnog i alveolarnog RMS. A - Embrionalni RMS je izgrađen od primitivih okruglih i vretenastih ćelija koje liče na skeletne mišićne ćelije (←●). B - Alveolarni RMS čine grupacije okruglih ćelija (◄) oivičene fibrozim septama koje mu daju izgled nalik alveolama pluća. Preuzeto i modifikovano iz Dehner *et al*, 2021.

1.3.1. Dijagnostika rabdomyosarkoma

Dijagnostika RMS predstavlja složen izazov zbog velike morfološke varijabilnosti tumorskog tkiva. Detaljna analiza, koja uključuje biopsiju i histološku, te molekularno-patološku analizu, ključna je za postavljanje precizne dijagnoze (Skapek *et al*, 2019). Kao što je pomenuto, histološke i molekularne karakteristike, uključujući status fuzionog gena PAX3-FOXO1 ili PAX7-FOXO1, igraju ključnu ulogu u razlikovanju podtipova RMS (Williamson *et al*, 2010), što utiče na prognozu i izbor terapije.

Tradicionalna dijagnostika RMS oslanja se na identifikaciju karakteristika tumorskih ćelija sličnih mioblastima skeletnih mišića, što se postiže primenom svetlosne i/ili elektronske mikroskopije, kao i imunohistohemijskom detekcijom proteina specifičnih za mišićne ćelije poput dezmina, mioglobina, miogenina, MYOD1, aktina specifičnog za mišićne ćelije i miozina (Skapek *et al*, 2019). U slučajevima manje diferenciranih tumora, najčešći način za detekciju rabdomyoblastične diferencijacije je na osnovu ekspresije MYOD1 i miogenina. Pozitivno jedarno bojenje oba markera je važan dijagnostički kriterijum za RMS i predstavlja zlatni standard u postavljanju diferencijalne dijagnoze u odnosu na ostale neoplazme. Dalje, MYOD1 i miogenin imaju dodatni praktični značaj u razlikovanju ARMS od ostalih podtipova. Ekspresija miogenina dobijena u više od polovine neoplastičnih ćelija ukazuje na ARMS (Dias *et al*, 2000; Hostein *et al*, 2004). Miogenin i MYOD1 su takođe korisni za razlikovanje ARMS-a i sklerozirajućeg RMS-a (Rudzinski *et al*, 2013). Citoplazmatska ekspresija vimentina i dezmina može biti primetna u slabo diferenciranim ili nediferenciranim ćelijama RMS, dok se ekspresija mišićnog aktina i mioglobina može uočiti u diferenciranim rabdomyoblastima (Dziuba *et al*,

2018). Dodatno, AP2 β (eng. *activating enhancer binding protein 2 beta*) i P-kadherin su se pokazali kao selektivni markeri za ARMS. Sa druge strane, ekspresija EGFR (eng. *epidermal growth factor receptor*) i fibrilina-2 su karakteristične za ERMS (Wachtel *et al*, 2006).

Deo rutinske histo-patološke analize u dijagnostici RMS je detekcija proteinskih markera imunohistohemijskim metodama. Ovaj pristup, međutim, nailazi na poteškoće zbog nedovoljne osetljivosti i specifičnosti korišćenih markera (Dziuba *et al*, 2018), što ističe potrebu za otkrivanjem novih, pouzdanijih dijagnostičkih markera. Važno je napomenuti da se dijagnoza RMS postavlja čak i kada samo manji deo tumorskih ćelija pokazuje detektibilnu ekspresiju ovih proteina. Ova činjenica naglašava složenost dijagnostike RMS, jer isti proteini mogu biti prisutni i u drugim pedijatrijskim tumorima, poput Vilmsovog tumora i malignog Triton tumora, zahtevajući pažljivo razmatranje morfologije i arhitekture ćelija prilikom dijagnostikovanja (Skapek *et al*, 2019).

Primena molekularnih alata, poput fluorescentne *in situ* hibridizacije (eng. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) i kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (eng. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) za detekciju fuzionih transkripata, omogućila je precizniju identifikaciju ARMS-a. Otkriće da oko 20% ARMS ne ispoljava fuzioni transkript ukazalo je na postojanje molekularno i klinički odvojene grupe, tzv. fuziono-negativnog RMS (FNRMS), koji se u pogledu kliničke slike i ishoda tretira ekvivalentno ERMS-u (Missiaglia *et al*, 2012; Skapek *et al*, 2013). Dijagnostika zasnovana na fuzionom statusu razjašnjava i neke probleme koji se odnose na histopatologiju RMS. Na primer, fuzioni transkript može biti detektovan kod mnogih pacijenata sa ARMS tumorima koji imaju čvrstu morfologiju, sa malo alveolarnih prostora, kao i u nekim slučajevima sa "pomešanim" alveolarnim i embrionalnim karakteristikama, čime razjašnjava dijagnozu. Takođe, primećeni su i drugi česti molekularni defekti, kao što su trizomija hromozoma 8 i gubitak heterozigotnosti u regionu 11p15 kod FNRMS-a. Međutim, pošto se ove hromozomske aberacije mogu naći i u drugim pedijatrijskim tumorima, one se ne upotrebljavaju rutinski u dijagnostici (Skapek *et al*, 2019).

Dakle, status fuzionog gena je veoma značajan za dopunjavanje tradicionalnih pristupa u dijagnostici, jer omogućava da se dijagnoza RMS pozitivnog na fuziju (FPRMS) postavi korišćenjem molekularnog testa. Nedavno sprovedena studija procenila je mogućnost razlikovanja FPRMS i FNRMS pomoću panela imunohistohemijskog bojenja, što je pristupačniji pristup u odnosu na FISH. Naime, jako bojenje miogenina, AP2 β i NOS1 (eng. *nitric oxide synthase 1*) može identifikovati FPRMS, dok ekspresija HMGA2 (eng. *high mobility group AT-hook 2*) ukazuje na FNRMS (Rudzinski *et al*, 2014). Trenutna klinička ispitivanja uključuju status fuzionog gena u stratifikaciju rizika za pacijente (Oberoi *et al*, 2023), međutim, dijagnostika samo na osnovu detekcije fuzionog gena još uvek nije postala rutinska praksa, kao ni korišćenje imunohistohemijskog bojenja kao zamene za procenu statusa fuzije.

S obzirom na izazove u dijagnostici RMS-a, jasno se nameće potreba za razvojem novih dijagnostičkih markera i strategija. Identifikacija pouzdanijih biomarkera i unapređenje molekularnih dijagnostičkih alata ključni su za precizniju dijagnostiku i klasifikaciju RMS, što može značajno doprineti poboljšanju prognoze i pristupa u lečenju pacijenata.

1.3.2. Terapija rabdomiosarkoma

Terapija pacijenata sa RMS sprovodi se kombinovanom primenom hirurgije, hemioterapije i zračenja, prilagođavajući se tipu RMS, lokaciji tumora i kliničkoj slici pacijenta. Standardna hemioterapija RMS podrazumeva kombinaciju vinkristina, aktinomicina D i ciklofosfamida/ifosfamida (skraćeno VAC ili IVA), dok se za pacijente sa većim stepenom rizika primenjuje kombinacija vinkristina i irinotekana (skraćeno VI) (Gartrell i Pappo, 2020). Standardizacija režima koji uključuju više hemioterapeutika je značajno poboljšala ishod kod pacijenata sa lokalizovanim RMS, međutim, kod slučajeva sa metastazama značajna poboljšanja nisu zabeležena (Chen *et al*, 2019). Takođe, visoke doze hemioterapije kod pacijenata s metastatskim RMS-om nisu dale bolje rezultate u poređenju sa standardnom terapijom, dok su dovele do povećane učestalosti nuspojava (Carli *et al*, 2004). S obzirom na pedijatrijski uzrast pacijenata koji ograničava primenu radioterapije i agresivnih hemioterapijskih protokola, postoji kontinuirana potraga za novim terapeutima i boljim režimima terapije.

Iako ima široku primenu u terapiji sarkoma mekog tkiva, kliničke studije su pokazale da dodatak doksorubicina standardnom tretmanu nije značajno poboljšao ishode (Bisogno *et al*, 2018). Međutim, nastavak terapije niskim dozama vinoreblina i ciklofosfamida dao je obećavajuće rezultate, poboljšavajući petogodišnju stopu preživljavanja kod pacijenata sa visokorizičnim RMS (Bisogno *et al*, 2019). Pored konvencionalnih tretmana, koji se karakterišu štetnim dejstvom na normalne ćelije pored uništavanja ćelija raka, istražuju se lekovi koji ciljano deluju na specifične molekularne mete povezane s rastom i širenjem tumora, kao što su VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*), ALK (eng. *anaplastic lymphoma kinase*) i mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*). Međutim, nijedan od do sada ispitanih lekova iz ove grupe nije pokazao zadovoljavajuću efikasnost i/ili bezbednost za upotrebu (Miwa *et al*, 2020). Nove strategije uključuju feropotske agense, onkolitičke viruse i ciljanu terapiju bakterijama. Feropotoza, specifična forma programirane smrti ćelija, pokazala se kao obećavajući pristup, s obzirom na osetljivost ćelija RMS na oksidativni stres (Fanzani i Poli, 2017). Pokazano je da erastin, agens koji iscrpljuje glutation, indukuje proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika, lipidnu peroksidaciju i feropotozu ćelija RMS (Dächert *et al*, 2020). Takođe, ksenograft modeli RMS su pokazali osetljivost na nekoliko jedinjenja koja pojačavaju oksidativni stres, kao što su cerivastatin, auranofin i karfilzomib (Fanzani i Poli, 2017). Rekombinantni onkolitički miksoma virus, koji targetuje *RAS* (eng. *rat sarcoma*) gene, je značajno smanjio rast tumora i poboljšao preživljavanje na mišjem modelu ksenografta ERMS (Phelps *et al*, 2018). Osim toga, Igarashi i saradnici su pokazali da je soj *Salmonella typhimurium* A1-R, koji specifično deluje na tumorske ćelije, značajno inhibirao rast tumora u poređenju sa netretiranom kontrolom na mišjem modelu pleomorfnog RMS (Igarashi *et al*, 2020).

1.3.2.1. Agensi prirodnog porekla u terapiji rabdomiosarkoma

Standardni terapeutski režimi, iako efikasni, mogu biti izrazito toksični, što je posebno izazovno kod lečenja pedijatrijskih pacijenata. Dodatno, preživljavanje pacijenata s visokim rizikom nije značajno poboljšano tokom poslednjih decenija, naglašavajući potrebu za novim pristupima u lečenju RMS. U potrazi za manje toksičnim i efikasnijim tretmanima, posebna pažnja se posvećuje agensima prirodnog porekla. Na potencijal prirodnih jedinjenja ukazuje činjenica da se među trenutno korišćenim citostaticima protiv RMS nalaze prirodna jedinjenja kao što su antibiotici aktinomicin D i doksorubicin, kao i vinkristin, alkaloid izolovan iz madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus*) (Almagro *et al*, 2015).

Nedavna istraživanja fokusirana su na ispitivanje novih prirodnih agenasa sa aktivnošću protiv RMS. Neki od njih su garcinol iz biljke *Garcinia indica* i anakardinska kiselina iz indijskog oraha, koji su pokazali inhibitorni efekat na rast RMS *in vitro* (Tomasiak *et al*, 2023). Primena flavonoida je dovela do inhibicije proliferacije i migracije ćelija RMS, kao i do smanjenja ekspresije ključnih onkogenih faktora (Shrestha *et al*, 2021). Pokazano je i da ekstrakt đumbira, a posebno njegova komponenta zerumbon, inhibira proliferaciju i indukuje apoptozu ćelija RMS (Urla *et al*, 2023). Kurkumin, aktivni sastojak kurkume, uspešno je smanjio vijabilnost kultivisanih ćelija RMS na dozno-zavisan način. Osim toga, doveo je do povećanja efekta standardnih hemioterapeutika, smanjujući migraciju i povećavajući apoptozu ćelija RMS (Sorg *et al*, 2021). Ekstrakt ruzmarina je takođe imao citotoksično dejstvo na ćelije RMS (Kakouri *et al*, 2022).

Iako su rezultati navedenih istraživanja obećavajući, većina supstanci je ispitana samo na nivou ćelijskih linija. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdila njihova efikasnost i sigurnost za kliničku primenu. Ipak, ovi nalazi otvaraju put ka razvoju novih, manje toksičnih terapija za RMS, sa potencijalno boljim ishodima za pacijente.

1.4. Protein ANKRD1

U kontekstu potrage za pouzdanijim dijagnostičkim markerima, ova disertacija je obuhvatila karakterizaciju proteina ANKRD1 (eng. *ankyrin repeat domain 1*) za koji je prethodno pokazano da ima potencijal markera za diferencijalnu dijagnostiku RMS (Ishiguro *et al*, 2008).

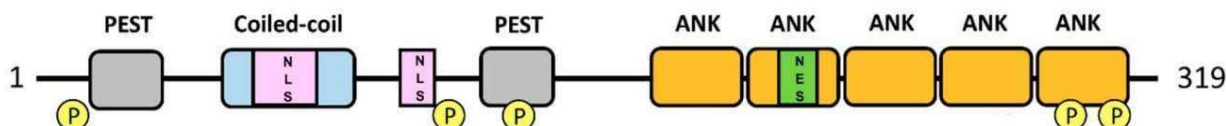
ANKRD1, poznat i kao CARP (eng. *cardiac ankyrin repeat protein/cardiac adriamycin responsive protein*), pripada familiji mišićnih proteina sa ankirinskim ponovcima, MARP (eng. *muscle ankyrin repeat proteins*). Ovi proteini su specifično eksprimirani u ćelijama poprečno-prugastih mišića i deo su mehanosenzornog kompleksa I-trake sarkomere. Ostali članovi ove familije su ANKRD2 (eng. *ankyrin repeat protein 2*) i DARP (eng. *diabetes-related ankyrin repeat protein*). ANKRD1 je dominantno eksprimiran u srcu, ANKRD2 u skeletnim mišićima, a DARP je podjednako prisutan u oba tipa poprečno-prugastih mišića (Kojic *et al*, 2011).

Prvi opisani član familije MARP, ANKRD1, prvobitno je otkriven kao protein čija ekspresija raste pod uticajem citokina u ćelijama endotela (Chu *et al*, 1995). Zatim je zabeleženo nakupljanje njegovih transkripata u primarnim miotubama miša nakon denervacije i tokom morfogeneze mišića (Baumeister *et al*, 1997). Takođe, u neonatalnim kardiomiocitima pacova zabeležena je konstitutivna ekspresija *Ankrd1*, a nivo ekspresije je bio osetljiv na tretman doksorubicinom (Jeyaseelan *et al*, 1997).

Gen *ANKRD1* je lociran na hromozomu 10, sadrži 9 egzona i visoko je evolutivno konzerviran (Moulik *et al*, 2009). Kodira protein od 319 aminokiselina, sa pretpostavljenom molekulskom masom od približno 36 kDa (UniProtKB - Q15327), koji poseduje različite funkcionalne domene i motive (Slika 4):

- Pet tandemskih ankirinskih ponovaka koji omogućavaju interakcije sa proteinima sarkomere i transkripcionim regulatorima (Kojic *et al*, 2011)
- Domen uvijenog uvojka (eng. *coiled-coil*) koji omogućava homodimerizaciju (Witt *et al*, 2005) i heterodimerizaciju u antiparalelnoj orijentaciji (Lun *et al*, 2014)

- Dve PEST sekvence bogate prolinom (P), glutaminskom kiselinom (E), serinom (S) i treoninom (T) koje predstavljaju signale za proteolitičku degradaciju (Rechsteiner i Rogers, 1996)
- Dva signala za lokalizaciju u jedru, koji omogućavaju transport proteina iz citoplazme u jedro
- Jedan potencijalni signal za transport iz jedra.



Slika 4. Šematski prikaz strukture proteina ANKRD1. Prikazani su funkcionalni domeni i motivi: PEST sekvence, uvijeni uvojak (Coiled-coil), signali za lokalizaciju u jedru (NLS), signal za eksport iz jedra (NES), ankirinski ponovci (ANK) i mesta fosforilacije (P). Preuzeto i modifikovano iz Ling *et al*, 2017.

U kardiomiocitima ANKRD1 ima dvostruku ulogu: u citoplazmi učestvuje u održavanju integriteta sarkomere, dok u jedru deluje kao transkripcioni ko-regulator. Strukturna uloga ANKRD1 demonstrirana je u studiji u kojoj je pokazano da narušena interakcija između ANKRD1 i proteina I-trake miopaladina ugrožava strukturu sarkomere (Bang *et al*, 2001). Pod dejstvom mehaničkog stimulusa, ANKRD1 se translocira iz citoplazme u jedro, čime se signali biomehaničkog stresa prenose na regulaciju ekspresije gena, uglavnom u pravcu inhibicije transkripcije (Jeyaseelan *et al*, 1997). ANKRD1 ostvaruje interakcije sa velikim brojem različitih proteina, što ukazuje na njegovu široku umreženost u ćelijskim procesima. Interagujući partneri ANKRD1 su strukturni proteini, kao što su titin, kalsekvestrin-2 i miopaladin, ali i regulatorni proteini, poput YB-1 (eng. *Y-box binding protein 1*) i p53 (Kojic *et al*, 2011).

ANKRD1 je dominantno eksprimiran u srcu, kako tokom razvića tako i u adultnom periodu, ali se u patološkim stanjima (različitim miopatijama i tumorima) i uslovima stresa detektuje i u skeletnim mišićima i drugim nemišićnim tkivima (Kojic *et al*, 2011). Profil ekspresije ANKRD1 tokom razvića ukazuje na njegovu ulogu u procesima miogeneze i kardiogeneze.

1.4.1. Funkcija proteina ANKRD1 u miogenezi

Ekspresija ANKRD1 je najizraženija u ranoj fazi razvića srca, dok je u adultnom srcu smanjena, što ukazuje na njegovu ulogu u kardiogenezi. Osim toga, ekspresija ANKRD1 u fetalnim skeletnim mišićima, koja postaje jedva detektibilna u skeletnim mišićima odraslih, sugerise njegov značaj u razviću skeletnih mišića (Zou *et al*, 1997, Ishiguro *et al*, 2002, Wette *et al*, 2017). ANKRD1 takođe učestvuje u remodelovanju srčanog i skeletnih mišića u odgovoru na različite tipove stresa (Jeyaseelan *et al*, 1997, Ling *et al*, 2017).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je ekspresija ANKRD1 pod kontrolom regulatornih proteina važnih za diferencijaciju mišićnih ćelija. Tokom diferencijacije C2C12 mioblasta miša u miotube, promotor gena *Ankrd1* je meta aktivnosti Mef-2, kao i miogenih regulatornih faktora, miogenina i Myod1 (Blais *et al*, 2005). Pokazano je da signalni put Nkx2-5 (eng. *NK2 homeobox*

5) reguliše ekspresiju *Ankrd1* za vreme razvića srca miša (Zou *et al*, 1997), delujući delimično u sprezi sa Gata-4 (eng. *GATA Binding Protein 4*), koji ima potencijalna mesta vezivanja u promotoru *Ankrd1* (Kuo *et al*, 1999). Dodatno, *Ankrd1* promotor sadrži mesta za vezivanje proteina Sp3 (eng. *trans-acting transcription factor 3*), koji utiče na njegovu ekspresiju tokom razvića srčanih komora (van Loo *et al*, 2007).

Zahvaljujući interakcijama sa različitim proteinima, ANKRD1 ostvaruje ulogu u regulaciji ekspresije gena važnih za diferencijaciju mišićnih ćelija i odgovor na patološke uslove. Tako u kompleksu sa YB-1, ANKRD1 utiče na transkripciju gena esencijalnih za kardiogenezu, kao što je *MLC2v* (eng. *ventricular specific myosin light chain-2*) (Duboscq-Bidot *et al*, 2009, Ling *et al*, 2017), dok interakcija sa NF- κ B moduliše aktivnost ovog transkripcionog regulatora. U miotubama miša *Ankrd1* smanjuje DNK-vezujuću aktivnost p65 subjedinice NF- κ B (Laure *et al*, 2010), a tokom diferencijacije C2C12 mioblasta, vezivanje *Ankrd1* za p50 subjedinicu NF- κ B dovodi do represije njegove transaktivacione aktivnosti u odgovoru na TNF α (eng. *tumor necrosis factor alpha*) (Liu *et al*, 2015).

Ekspresija ANKRD1 je značajno povećana nakon stresa i povrede mišića, što ukazuje na njegovu ulogu u reparaciji tkiva (Shi *et al*, 2005, Samaras *et al*, 2006). Značaj ANKRD1 u procesima reparacije potvrđen je eksperimentima na miševima, gde je odsustvo *Ankrd1* dovelo do kašnjenja u zarastanju rane na koži (Samaras *et al*, 2015). Jedan od mehanizama kojima ANKRD1 doprinosi popravci tkiva je inhibicija transkripcije metaloproteinaze MMP13 (eng. *matrix metalloproteinase 13*) kroz interakciju s nukleolinom (Almodóvar-García *et al*, 2014).

Pomenuti primeri regulacije ekspresije i proteinskih interakcija ANKRD1, kao i njegova dvojna lokalizacija unutar ćelije, ukazuju na ulogu ANKRD1 u signalnim putevima važnim za pravilan razvoj, funkciju i reparaciju mišićnog tkiva.

1.4.2. Protein ANKRD1 u patološkim stanjima i uslovima stresa

Ekspresija *ANKRD1* se brzo menja u odgovoru na stres u mišićnim ćelijama, bilo da je reč o fiziološkoj adaptaciji tkiva ili odgovoru na uslove koji narušavaju funkciju mišića i dovode do patoloških promena (Kojic *et al*, 2011). Stres srčanog mišića dovodi do povećanja ekspresije ANKRD1, posebno u uslovima koji izazivaju hipertrofiju srca (Chen *et al*, 2014; Aihara *et al*, 2000a). Takođe, pokazana je lokalizacija ekspresije ANKRD1 u kardiomiocitima graničnog regiona povrede nakon infarkta miokarda (van Duijvenboden *et al*, 2019). U skeletnim mišićima, ekspresija ANKRD1 raste već nakon tri sata od iscrpljujućih kontrakcija (Koskinen *et al*, 2017).

Kao target Hippo/YAP signalnog puta *ANKRD1* reaguje na oksidativni stres (Jin *et al*, 2022; Imam Aliagan *et al*, 2020). Uključen je u odgovor na hipoksiju (Avivi *et al*, 2006; Han *et al*, 2005), a pod dejstvom oksidativnog stresa indukovano olovom, dolazi do povećanja njegove ekspresije u srcima pacova (Gholami *et al*, 2022). Suprotno tome, ekspresija *Ankrd1* je inhibirana u kardiomiocitima neonatalnih pacova usled oksidativnog stresa izazvanog doksorubicinom, hemioterapeutikom poznatim po kardiotoksičnosti (Aihara *et al*, 2000b).

Poremećaji u obrascu ekspresije *ANKRD1* detektovani su kod pacijenata obolelih od neuromišićnih bolesti, uključujući mišićne distrofije, kongenitalne miopatije i bolesti motornih neurona (spinalna mišićna atrofija i amiotrofična lateralna skleroza) (Kojic *et al*, 2011). Takođe, promene u obrascu i/ili nivou ekspresije ANKRD1 asocirane su sa različitim oboljenjima srca

(Aihara *et al*, 2000a; Zolk *et al*, 2002), a kod pacijenata koji boluju od hipertrofične ili dilatirane kardiomiopatije identifikovano je nekoliko mutacija u genu *ANKRD1* sa različitim funkcionalnim posledicama (Arimura *et al*, 2009; Duboscq-Bidot *et al*, 2009).

Promene u ekspresiji *ANKRD1* u odgovoru na različite forme stresa i njegova asocijacija sa brojnim patološkim stanjima ukazuju na važnu ulogu ovog proteina u adaptaciji i patologiji mišićnog tkiva. Sve veći broj studija takođe ukazuje na njegov značaj u molekularnim mehanizmima nastanka i propagacije različitih tipova tumora, ističući potrebu za dubljim razumevanjem njegovih funkcija.

1.4.2.1. Protein *ANKRD1* u tumorima

Izmenjena ekspresija *ANKRD1* detektovana je u različitim tumorima, uključujući RMS, kompozitni feohromocitom, ganglioneuroblastom i karcinom jajnika (Ishiguro *et al*, 2008; Suenaga *et al*, 2016; Scurr *et al*, 2008; Lei *et al*, 2015). Otkriveno je da je njegova ekspresija pozitivno regulisana onkogenim proteinima YAP (eng. *yes-associated protein 1*) i TAZ (Jiménez *et al*, 2017; Tang *et al*, 2021; Luo *et al*, 2021), ali i tumor-supresornim proteinom p53 (Kojic *et al*, 2010). Takođe, *ANKRD1* interaguje sa p53 i pozitivno reguliše njegove aktivnosti (Kojic *et al*, 2010). Pokazana je i uloga *ANKRD1* u aktivaciji Wnt signalnog puta, čija je narušena regulacija povezana sa različitim tumorima, uključujući RMS (Zhang *et al*, 2023; Adhikari i Davie, 2019). Promene u ekspresiji *ANKRD1* imaju prognostičke implikacije kod tumora jajnika i bubrega (Scurr *et al*, 2008; Huang *et al*, 2022), a povećana ekspresija *ANKRD1* je asocirana sa rezistencijom na hemioterapiju kod karcinoma jajnika i pluća (Scurr *et al*, 2008; Takahashi *et al*, 2018). Osim toga, pokazano je da inhibicija ekspresije *ANKRD1* povećava osetljivost ćelija karcinoma jajnika na apoptozu izazvanu stresom endoplazmatskog retikuluma (Lei *et al*, 2015), a povećanje ekspresije *ANKRD1* stimuliše proliferaciju i invazivnost ćelija osteosarkoma (Yin i Tong, 2022). Sa druge strane, povećanje ekspresije *ANKRD1* dovelo je do inhibicije formiranja kolonija od ćelija hepatocelularnog karcinoma, karcinoma pluća, kolona i prostate *in vitro* (Park *et al*, 2005; Jiménez *et al*, 2017). Otkriveno je i da *ANKRD1* stimuliše migraciju i invazivnost, a inhibira apoptozu ćelija kolorektalnog karcinoma (Xu *et al*, 2024). Osim toga, gen *ANKRD1* je epigenetički inaktiviran u karcinomu pluća i prostate (Jiménez *et al*, 2017).

Nedavno je sprovedena studija koja je uključila podatke dobijene od 10000 pacijenata sa 33 različita tipa tumora u kojoj je, koristeći veliki broj baza podataka, analiziran ekspresioni profil, dijagnostički i prognostički značaj, metilacioni i mutacioni status *ANKRD1*, kao i potencijalne korelacije između nivoa ekspresije *ANKRD1* i stadijuma tumora, imunološkog odgovora i osetljivosti na terapiju. U ovoj studiji pokazan je potencijal *ANKRD1* kao dijagnostičkog i prognostičkog markera velikog broja tumora, naročito kolorektalnog karcinoma, kao i njegova uloga u rezistenciji na terapiju, potencijalno putem signalnih puteva povezanih sa inflamacijom i imunološkim odgovorom, ali i mehanizama asociranih sa miokardijalnom funkcijom (Xu *et al*, 2024). Navedena studija nije uključila analizu RMS, s obzirom da se podaci o ovom tipu tumora ne nalaze u *The Cancer Genome Atlas* bazi podataka na kojoj su se zasnivali rezultati.

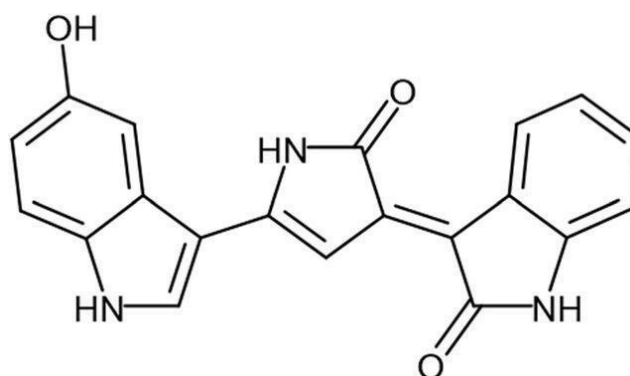
U studiji koja je obuhvatila imunohistohemijsku analizu 159 uzoraka tumora mekih tkiva, uključujući 34 RMS, 85 ne-RMS sarkoma i 40 karcinoma, *ANKRD1* se izdvojio kao potencijalni marker za diferencijalnu dijagnostiku RMS, s obzirom da mu je ekspresija bila značajno viša u RMS u poređenju sa drugim tipovima sarkoma. Intenzivno bojenje na *ANKRD1* je bilo prisutno pre svega u citoplazmi tumorskih ćelija, u 85% slučajeva RMS i samo 4% slučajeva ne-RMS

sarkoma. Iako je poznato da se ANKRD1 takođe može naći u jedru gde učestvuje u regulaciji ekspresije gena, imunoreaktivnost jedara je bila retka i ni u jednom uzorku RMS ANKRD1 nije bio ekspresiran isključivo u jedrima. Specifičnost i senzitivnost ANKRD1 su bile na nivou drugih markera RMS, kao što su MYOD1, miogenin i dezmin, dok je u odnosu na mioglobin pokazao veću osetljivost, a u odnosu na mišićnu formu aktina i veću osetljivost i veću specifičnost (Ishiguro *et al*, 2008). Uprkos ovim rezultatima koji ukazuju na dijagnostičke performanse proteina ANKRD1, uloga i regulacija njegove ekspresije u RMS nisu poznate.

S obzirom na indikovani potencijal proteina ANKRD1 kao dijagnostičkog markera RMS, kao i njegov značaj u diferencijaciji mišićnih ćelija koja je narušena u slučaju RMS, postoji opravdana potreba za karakterizacijom njegove ekspresije i funkcije i u ovom tipu tumora.

1.5. Violacein

Tokom ljudske istorije, priroda je bila i ostala neiscrpan izvor jedinjenja koja se mogu koristiti u prevenciji i lečenju bolesti, a posebno značajno mesto zauzimaju jedinjenja biljnog i bakterijskog porekla (Harvey *et al*, 2015; Newman i Cragg, 2020). Do danas je identifikovan niz bakterijskih metabolita sa izraženom biološkom aktivnošću, a među njima se ističe ljubičasti pigment violacein (Numan *et al*, 2018; Choi *et al*, 2021; Durán *et al*, 2021; Justo i Durán, 2017).



Slika 5. Hemijska struktura violaceina, $C_{20}H_{13}N_3O_3$, koji pripada klasi hidroksi-indola. Preuzeto iz Venegas *et al*, 2019.

Violacein, čija je hemijska struktura prikazana na Slici 5, ima molekulsku masu od 343,3 g/mol, nerastvorljiv je u vodi, ali je rastvorljiv u etanolu, metanolu i dimetil sulfoksidu (DMSO). Pokazuje snažnu apsorpciju u vidljivom delu spektra (Durán *et al*, 2007). Od otkrića violaceina, pre više od 130 godina (Boisbaudran, 1882), identifikovani su brojni mikroorganizmi koji ga proizvode, uključujući vrste rodova *Chromobacterium*, *Alteromonas*, *Janthinobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Duganella* i *Collimonas*, pri čemu je najproučavaniji violacein vrste *Chromobacterium violaceum* (Durán *et al*, 2021). Osim antitumorske, violacein ima i antibakterijsku, antigljivičnu, tripanocidnu, antileišmanijsku, antinematodnu, antiulceroznu, imunomodulatornu i antivirusnu aktivnost (Durán *et al*, 2021). Napredak u razumevanju mehanizama delovanja i stepena toksičnosti violaceina unapredio je njegove biološke i farmakološke funkcionalnosti i doprineo porastu interesovanja za istraživanje violaceina (Choi *et al*, 2021; Kothari *et al*, 2017).

1.5.1. Violacein kao antitumorski agens

Prirodna biološka jedinjenja kao što su paklitaksel, vinkristin i doksorubicin se već koriste u terapiji specifičnih tumora, uključujući i RMS, a jedno od prirodnih jedinjenja koje se danas intenzivno izučava u pogledu svog antitumorskog potencijala je violacein. Citotoksični efekat violaceina pokazan je na velikom broju ćelijskih linija poreklom od različitih tipova tumora (Tabela 1). Takođe, pokazano je da violacein povećava osetljivost ćelijskih linija kolorektalnog karcinoma prema 5-fluorouracilu (Kodach *et al*, 2006), kao i osetljivost ćelija karcinoma mokraćne bešike na cisplatinu, uz istovremeno smanjenje genotoksičnih efekata ovog hemioterapeutika (Alem *et al*, 2022).

Važno je istaći da se citotoksični efekat violaceina ispoljava prema tumorskim ćelijama, za razliku od neizmenjenih ćelija. Konkretno, na netumorskim ćelijama citotoksičnost violaceina se ispoljava pri koncentracijama između 5 i 10 μM , dok su tumorske ćelijske linije pokazale osetljivost pri koncentracijama manjim od 5 μM (Berti *et al*, 2023). Ova selektivna aktivnost violaceina ukazuje na njegov potencijal kao terapijskog agensa, što je dodatno podržano studijom u kojoj je pokazano povećanje preživljavanja miševa sa Erlihovim karcinomom, bez oštećenja vitalnih organa, nakon intraperitonealne primene violaceina (Bromberg *et al*, 2010). Međutim, osim pomenute, do sada je objavljen mali broj studija u kojima su ispitani antitumorski efekti i toksičnost violaceina *in vivo*.

Prvi dokumentovani mehanizam delovanja violaceina na tumorske ćelije je putem indukcije oksidativnog stresa, kroz generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS). U CaCo2 ćelijama violacein je izazvao povećanje produkcije ROS, što je rezultiralo povećanjem nivoa unutarćelijskog kalcijuma, oslobađanjem citohroma c, i konačno apoptozom. Antioksidativni tretman N-acetil-cisteinom sprečio je ove efekte, dodatno potvrđujući ulogu oksidativnog stresa u citotoksičnosti violaceina (de Carvalho *et al*, 2006). Sličan efekat na produkciju ROS zabeležen je i u ćelijama tumora dojke (Alshatwi *et al*, 2016) i u ćelijama Erlihovog karcinoma (Bromberg *et al*, 2010).

Osim indukcije oksidativnog stresa, mehanizmi delovanja violaceina uključuju hiperpolarizaciju mitohondrijalne membrane, blokadu progresije ćelijskog ciklusa i aktivaciju tumor-supresorskih proteina. Efekti violaceina variraju od indukcije apoptoze do inhibicije migracije i invazivnosti tumorskih ćelija, što ukazuje na mogućnost njegove široke primene u inhibiciji metastaze i poboljšanju osetljivosti na terapiju.

U HeLa i MRC-5 ćelijama violacein je izazvao hiperpolarizaciju mitohondrijalne membrane, dovodeći do disfunkcije mitohondrija (Leal *et al*, 2015), dok je u ćelijama kolorektalnog karcinoma HCT116, blokirao progresiju ćelijskog ciklusa i povećao ekspresiju tumor-supresorskih proteina (Kodach *et al*, 2006). U HL60 ćelijama leukemije, violacein je indukovao apoptozu putem TNF signalnog puta, aktivirajući kaspazu 8, NF- κB i MAP (eng. *mitogen activated protein*) kinazu (Ferreira *et al*, 2004). Sa druge strane, violacein je izazvao smrt TF1 ćelija eritroleukemije, uprkos kotretmanu sa inhibitorima pro-apoptotskih kaspaza. Umesto apoptoze, citotoksični efekat je bio ostvaren putem stresa endoplazmatičnog retikuluma i kolapsa Goldžijevog aparata (Queiroz *et al*, 2012). U ćelijama metastatskog melanoma, violacein je uticao na autofagiju putem inhibicije protein kinaza B i AXL (Gonçalves *et al*, 2016). Takođe, pokazano je da pod hipoksičnim uslovima tumorske ćelije imaju veću osetljivost na violacein (Hashimi *et al*, 2015).

Tabela 1. Spisak ćelijskih linija na kojima je ispitan efekat violaceina, sa odgovarajućim koncentracijama potrebnim za ostvarivanje 50% inhibitornog efekta na vijabilnost ćelija (IC₅₀)

Ćelijska linija	Poreklo	IC ₅₀ (µM)	Referenca
253J	karcinom mokraćne bešike	0,49	Alem <i>et al</i> , 2022
A431	tumor kože	0,41	Hashimi <i>et al</i> , 2015
A549	karcinom pluća	0,6	Hashimi <i>et al</i> , 2015
CaCo2	kolorektalni adenokarcinom	2	de Carvalho <i>et al</i> , 2006
DLD1	kolorektalni adenokarcinom	~1	Kodach <i>et al</i> , 2006
EAT	Erlihov tumor miša	5	Bromberg <i>et al</i> , 2010
HCT116	kolorektalni adenokarcinom	1,35	Hashimi <i>et al</i> , 2015
HeLa	karcinom grlića materice	0,74	Hashimi <i>et al</i> , 2015
HL60	promijelocitna leukemija	0,7	Ferreira <i>et al</i> , 2004
HN5	karcinom glave i vrata	1,74	Hashimi <i>et al</i> , 2015
HT29	kolorektalni adenokarcinom	0,57	Hashimi <i>et al</i> , 2015
MCF-7	karcinom dojke	0,42	Hashimi <i>et al</i> , 2015
PC3	karcinom prostate	0,32	Hashimi <i>et al</i> , 2015
SKMEL-103	metastatski melanom	0,5	Gonçalves <i>et al</i> , 2016
T24	karcinom mokraćne bešike	0,52	Alem <i>et al</i> , 2022
TF1	eritroleukemija	~2	Queiroz <i>et al</i> , 2012
U87	glioblastom	~1	Mehta <i>et al</i> , 2015
V79 (netumorska linija)	fibroblasti kineskog hrčka	5	Melo <i>et al</i> , 2000
MRC-5 (netumorska linija)	fibroblasti fetalnih pluća	~6	Leal <i>et al</i> , 2015
CHO-K1 (netumorska linija)	ovarijum kineskog hrčka	>6	Leal <i>et al</i> , 2015

Violacein ne utiče samo na proliferaciju i preživljavanje, već i na migraciju i invazivnost tumorskih ćelija. Na primer, tretman violaceinom je inhibirao invaziju melanomske ćelijske linije SKMEL-103 u 3D modelu ćelijske kulture (Gonçalves *et al*, 2016), kao i migraciju U87 ćelija tumora mozga (Mehta *et al*, 2015), HCT116 i HT29 ćelija kolorektalnog karcinoma (de Souza Oliveira *et al*, 2022). Dodatno, violacein je doveo do smanjenja sekrecije modulatora metastaza CXCL12 (eng. *C-X-C motif chemokine ligand 12*), kao i broja njegovih receptora na ćelijskoj membrani, što ukazuje na potencijalni mehanizam inhibicije migracije i invazivnosti (Platt *et al*, 2014).

Uzimajući u obzir toksičnost postojećih terapija RMS i potrebu za efikasnijim i bezbednijim opcijama, prirodna jedinjenja sa antitumorskim svojstvima su prihvatljiva alternativa. Među njima, violacein se ističe kao potentan antitumorski agens s obzirom na njegovo dokazano anti-migratorno i citotoksično dejstvo na različite tumorske ćelijske linije. Stoga su opravdana naučna istraživanja citotoksičnosti i mehanizma dejstva violaceina na ćelije poreklom od RMS, s obzirom da efekat ovog jedinjenja do sada na njima nije ispitan.

2. CILJEVI RADA

Prvi deo ovog istraživanja odnosi se na ispitivanje potencijalnog dijagnostičkog markera RMS, proteina *ANKRD1*, imajući u vidu rezultate studija koji ukazuju na njegovu ulogu u tumorigenezi i diferencijaciji mišićnih ćelija koja je narušena kod RMS. Stoga je cilj ovog dela disertacije:

1. Karakterizacija gena *ANKRD1* u ćelijskim linijama koje vode poreklo od dva najzastupljenija tipa RMS, kroz ispitivanje njegove endogene ekspresije na nivou RNK i proteina, kao i unutarćelijske lokalizacije.

Drugi deo istraživanja odnosi se na ispitivanje novog potencijalnog terapeutika za RMS, bakterijskog pigmenta violaceina. Oslanjajući se na studije o antitumorskom dejstvu violaceina, cilj disertacije je:

2. Ispitivanje efekta violaceina na ćelije poreklom od RMS, kroz analizu citotoksičnog efekta, uticaja na procese karakteristične za tumorske ćelije i mehanizma delovanja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Ćelijske linije

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su sisarske ćelijske linije gajene u laboratorijskim uslovima čiji je spisak dat u Tabeli 2.

Tabela 2. Spisak korišćenih ćelijskih linija

Naziv	Poreklo	ATCC broj
V79-4	fibroblasti pluća kineskog hrčka	ATCC CCL-93
SJRH30	humani rabdomiosarkom	ATCC CRL-2061
RD		ATCC CCL-136
HS-729		ATCC HTB-153
HeLa	humani karcinom grlića materice	ATCC CCL-2

3.1.2. Laboratorijske životinje

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su zebrice (*Danio rerio*) soja AB. Zebrice su gajene u sistemu sa cirkulišućom vodom temperature 28,5°C, pod svetlosnim režimom od 14 h svetlosti i 10 h mraka. Embrioni su gajeni u E3 medijumu (5 mM NaCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, 0,17 mM KCl).

Uzganjanje zebrića je sprovedeno uz poštovanje institucionalnih i nacionalnih preporuka o etici i dobrobiti životinja, zasnovanim na direktivi Evropske unije 2010/63/EU.

3.1.3. Bakterije

Plazmidni konstrukti i vektori kojima su transfekovane eukariotske ćelije gajene u laboratorijskim uslovima propagirani su u ćelijama *E. coli* soja DH5α, dok su kao izvor violaceina korišćene bakterije vrste *Chromobacterium violaceum* (ATCC 31532). Bakterije su gajene u tečnom LB (*Luria-Bertani*) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca u vodi) sa ampicilinom (finalne koncentracije 100 µg/ml) ili kanamicinom (finalne koncentracije 30 µg/ml), na 37°C pri 180 obrtaja po min (obr/min).

3.1.4. Prajmeri

Za umnožavanje i sekvenciranje otvorenog okvira čitanja (eng. *open reading frame*, ORF) gena *ANKRD1*, kao i za detekciju *ANKRD1* transkripta PCR-om (eng. *polymerase chain reaction*) kome prethodi reverzna transkripcija (eng. *reverse transcription PCR*, RT-PCR) upotrebljeni su prajmeri navedeni u Tabeli 3.

Tabela 3. Spisak korišćenih prajmera

Naziv	Sekvenca (5'-3')	Namena	Mesto vezivanja za ANKRD1 ORF (bp)
GAPDH F	GTGAAGGTCGGAGTCA ACG	RT-PCR	10-28
GAPDH R	TGAGGTCAATGAAGGG GTC	RT-PCR	103-121
ANKRD1 F1	AGTAGAGGAACTGGTC ACTGG	RT-PCR, sekvenciranje	15-35
ANKRD1 R1	TGGGCTAGAAGTGTCT TCAGAT	RT-PCR, sekvenciranje	131-152
ANKRD1 F2	GCTGCAGCGATGATGG TACTGAAAGTA	amplifikacija ORF-a, sekvenciranje	1-18
ANKRD1 R2	TAGGATCCTCAGAATG TAGCTATGCC	amplifikacija ORF-a, sekvenciranje	943-960
ANKRD1 F3	ACGCCAAAGACAGAGA AGGA	sekvenciranje	737-756

bp=bazni par, ORF=otvoreni okvir čitanja, F=uzvodni prajmer, R=nizvodni prajmer, RT-PCR=PCR kome prethodi reverzna transkripcija

3.1.5. Plazmidni konstrukti i vektori

Za ekspresiju rekombinantnih proteina ANKRD1 i ANKRD2, kao i zelenog fluorescentnog proteina GFP (eng. *green fluorescent protein*) u eukariotskim ćelijama, upotrebljeni su plazmidni konstrukti i vektori čije su karakteristike prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Karakteristike korišćenih plazmidnih konstrukata i vektora

Naziv	Insert	Vektor	Antibiotska rezistencija	Referenca/izvor
pCMV-Tag2B-ANKRD1	ORF gena <i>ANKRD1</i>	pCMV-Tag2B (<i>Stratagene, Agilent technologies</i>)	kanamicin	Kojic <i>et al</i> , 2010
pCMV-Tag2B-ANKRD2	ORF gena <i>ANKRD2</i>	pCMV-Tag2B (<i>Stratagene, Agilent technologies</i>)	kanamicin	Jasnic-Savovic <i>et al</i> , 2015
pcDNA3-ANKRD1	ORF gena <i>ANKRD1</i>	pcDNA3 (<i>Invitrogen</i>)	ampicilin	Milosevic <i>et al</i> , 2024
pEGFP-C1	/	pEGFP-C1 (<i>Clontech</i>)	kanamicin	LMB*

*Laboratorija za molekularnu biologiju, IMGGI UB

3.1.6. Antitela

Primarna i sekundarna antitela upotrebljena u ovom radu navedena su u Tabeli 5 i Tabeli 6, redom.

Tabela 5. Karakteristike korišćenih primarnih antitela

Antitelo	Poreklo i tip antitela	Proizvođač
anti-GAPDH	zečje poliklonsko	<i>Beijing Dingguo Biotech Co. Ltd.</i>
anti-ANKRD1 ⁺	mišje poliklonsko	LMB
anti-p21	zečje poliklonsko	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
anti-coilin	zečje monoklonsko	<i>Cell Signaling Technology</i>
anti-PML	kozje poliklonsko	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>

⁺Antitelo na protein ANKRD1 generisano imunizacijom miševa rekombinantnim proteinom ANKRD1

Tabela 6. Karakteristike korišćenih sekundarnih antitela

Antitelo	Poreklo i tip antitela	Proizvođač
HRP* obeleženo antitelo na imunoglobuline zeca	kozje poliklonsko	<i>Sigma-Aldrich</i>
HRP* obeleženo antitelo na imunoglobuline miša	zečje poliklonsko	<i>Sigma-Aldrich</i>
AF488# obeleženo antitelo na imunoglobuline miša	kozje poliklonsko	<i>Invitrogen</i>
AF647# obeleženo antitelo na imunoglobuline koze	magareće poliklonsko	<i>Invitrogen</i>
AF568# obeleženo antitelo na imunoglobuline zeca	magareće poliklonsko	<i>Invitrogen</i>

*Peroksidaza rena (eng. *Horseradish peroxidase*, HRP)

#Fluorofora Alexa Fluor naznačene talasne dužine

3.2. Metode

3.2.1. Čelijska kultura

Ćelije su gajene u prisustvu 5% CO₂ na temperaturi od 37°C u hranljivom medijumu koji sadrži DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) obogaćen L-glutaminom i glukozom koncentracije 4,5 g/l, 10% fetalni goveđi serum (*Thermo Fisher Scientific*) i 1% smešu antibiotika i antimikotika (*Sigma-Aldrich*).

Pasažiranje je vršeno pri konfluentnosti ćelija od 70-80%. Ćelije su pažljivo isprane puferom PBS (eng. *Phosphate-buffered saline*, 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 3,4 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,2) i odlepljene od podloge inkubacijom 2-3 min na 37°C u rastvoru 0,05% tripsina i 0,02% EDTA (etilendiaminotetraacetat) u PBS-u. Aktivnost tripsina je inhibirana dodavanjem kompletnog medijuma. Ćelije su resuspendovane i ponovno zasejavane u odgovarajućem razblaženju.

3.2.2. Tranzijentna transfekcija ćelija u kulturi

Plazmidna DNK, korišćena za transfekciju ćelija u kulturi, izolovana je iz prekončne bakterijske kulture gajene u 10 ml tečnog LB hranljivog medijuma sa odgovarajućim antibiotikom, na 37°C. Za izolaciju je primenjen *GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit* (EURx), prema uputstvu proizvođača. Koncentracija izolovane DNK je merena spektrofotometrijski na uređaju *BioSpec-nano* (Shimadzu).

Po dostizanju konfluentnosti od 70-90%, ćelije su transfekovane primenom reagensa *Lipofectamine® 2000* (*Thermo Fisher Scientific*). Plazmidna DNK i reagens su odvojeno rastvarani u medijumu *Opti-MEM* (*Invitrogen*), a zatim kombinovani i inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi, da bi se formirao kompleks. Odnos reagensa i DNK je iznosio 2:1. Pre dodavanja kompleksa, ćelijama je medijum u kome su gajene zamenjen svežim medijumom istog sastava. Proteinski ekstrakti su pripremani 24 h nakon transfekcije.

Provera transfekcije vršena je vizualizacijom proteina GFP na fluorescentnom mikroskopu *THUNDER Imager Model Organism* (*Leica*), nakon transfekcije konstruktom pEGFP-C1.

3.2.3. Tretman ćelija inhibitorom proteazoma

Za ispitivanje proteazomalne degradacije proteina ANKRD1, ćelije RMS su tretirane inhibitorom proteazoma MG132 (*Merck KGaA*). Po dostizanju 70-80% konfluentnosti, ćelije su tretirane sa 25 µM MG132 ili 0,1% DMSO-om (kontrola). Nakon 4 h i 8 h inkubacije pripremljeni su proteinski ekstrakti.

3.2.4. Analiza ekspresije gena na nivou RNK metodama RT-PCR i qPCR

Prisustvo *ANKRD1* transkripta u uzorcima određivano je PCR-om kome prethodi reverzna transkripcija (RT-PCR), dok je relativni nivo genske ekspresije određen kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu (eng. *quantitative PCR*, qPCR). Nakon izolacije ukupne RNK, sintetisana je komplementarna DNK (eng. *complementary DNA*, cDNK) koja je služila kao matrica u reakcijama RT-PCR-a i qPCR-a.

3.2.4.1. Izolacija molekula RNK

Prilikom pasažiranja, deo ćelija RMS je odvojen u cilju izolacije ukupne RNK. Ćelije su centrifugirane 4 min pri 1400 obr/min i talozi su čuvani na -80°C do trenutka izolacije RNK. RNK je izolovana primenom reagensa *TRIzol* (*Thermo Fisher Scientific*). Ćelijski talozi su resuspendovani u 500 μl reagensa, a homogenizacija je izvršena pomoću šprica i igle promera 21G. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, dodato je 100 μl hloroforma i smeša je promešana pomoću vorteksa. Posle dodatnih 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorak je centrifugiran 15 min pri 13000 obr/min na 4°C . Izdvojena je bistra gornja faza koja sadrži RNK i u nju je dodato 250 μl izopropanola. Rastvor je potom promešan i ostavljen preko noći na -20°C , a narednog dana je centrifugiran 15 min pri 13000 obr/min na 4°C . Talog je ispran sa 1 ml 70% etanola, a potom centrifugiran 5 min pri 7500 obr/min na 4°C . Precipitirana RNK je sušena 5 min na sobnoj temperaturi i rastvorena u 20 μl vode bez ribonukleaza (eng. *nuclease-free water*, *Norgen Biotek*).

Koncentracija i čistoća izolovane RNK su izmerene spektrofotometrijski na uređaju *BioSpec-nano* (*Shimadzu*), nakon čega je RNK čuvana na -80°C .

3.2.4.2. Sinteza molekula cDNK

Za sintezu cDNK korišćeno je 2 μg totalne RNK (matrica) i kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Thermo Fisher Scientific*), prema uputstvu proizvođača. Ovaj kit sadrži M-MuLV reverznu transkriptazu *MultiScribe™* i nasumične heksamerne prajmere dizajnirane tako da omoguće prevođenje iRNK u cDNK. Sintetisana cDNK je čuvana na -20°C .

3.2.4.3. PCR

Korišćenjem sintetisane cDNK kao matrice, amplifikovani su fragmenti koji odgovaraju transkriptima gena *ANKRD1* i *GAPDH* (eng. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Za umnožavanje je korišćena polimeraza *Native taq* (*EURx*) i prajmeri navedeni u Tabeli 3. Količina cDNK u reakciji je bila ekvivalentna 100 ng ukupne RNK, a PCR reakcija se odvijala u aparatu *2720 Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*). Detaljni sastav PCR reakcione smeše i temperaturni profil reakcije prikazani su u Tabelama 7 i 8, redom. Amplifikacija fragmenta *GAPDH* je služila kao kontrola kvaliteta sintetisane cDNK.

Tabela 7. Sastav reakcione smeše za umnožavanje fragmenata koji odgovaraju transkriptima gena *ANKRD1* i *GAPDH*

Komponente	Zapremina (μl)
cDNK	1
10x reakcioni pufer C	1,5
2 mM dNTP-ovi	1,5
10 pmol <i>forward</i> prajmer	0,3
10 pmol <i>reverse</i> prajmer	0,3
<i>Native taq</i> polimeraza	0,25
dH ₂ O	10,15
ukupna zapremina	25

Tabela 8. Temperaturni profil reakcije umnožavanja fragmenata koji odgovaraju transkriptima gena *ANKRD1* i *GAPDH*

Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
95°C	3 min	1
95°C 60°C 72°C	30 s 45 s 30 s	25
72°C	10 min	1

3.2.4.4. Kvantitativni PCR u realnom vremenu

Relativni nivo genske ekspresije je određen metodom qPCR. Reakcija je izvedena pomoću kompleta *TaqMan Gene Expression Assay-a* (*Applied Biosystems*), navedenih u Tabeli 9, na uređaju *7900HT Fast Real-Time System* (*Applied Biosystems*).

U osnovi *Taqman* eseja nalaze se specifične oligonukleotidne probe, obeležene fluorobojama, komplementarne sekvenci koja se amplifikuje. Nakon denaturacije, dolazi do hibridizacije probe sa ciljnom DNK. Kada tokom svoje aktivnosti naiđe na hibridizovanu probu, Taq polimeraza vrši njenu razgradnju, time aktivirajući emisiju fluorescentne svetlosti. Intenzitet emitovane fluorescencije tokom PCR reakcije u realnom vremenu korelira sa količinom ciljne DNK.

Reakcije su sprovedene u tehničkom triplikatu za svaki pojedinačni uzorak iz tri biološka replikata. Kao endogena kontrola za normalizaciju nivoa iRNK između različitih uzoraka služio je transkript gena *GAPDH*. Rezultati su analizirani metodom $2^{-\Delta Ct}$ i predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Tabela 9. Identifikacione oznake korišćenih *Taqman* eseja.

Ciljni transkript	Identifikaciona oznaka
<i>ANKRD1</i>	Hs00923600_m1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1

3.2.5. Sekvenciranje molekula DNK metodom po Sangeru

U ovom radu sekvenciran je ORF gena *ANKRD1* poreklom iz ćelijskih linija RMS. ORF je amplifikovan primenom cDNK kao matrice, *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix-a* (*Thermo Fisher Scientific*) i prajmera navedenih u Tabeli 3. PCR reakcija se odvijala u uređaju *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*), a sastav reakcione smeše i temperaturni profil reakcije su navedeni u Tabelama 10 i 11, redom. Produkti reakcije su prečišćeni kitom *Monarch PCR & DNACleanup Kit* (*New England Biolabs*), prema uputstvu proizvođača, i proveravani elektroforezom u 1% agaroznom gelu.

Tabela 10. Sastav PCR reakcione smeše za umnožavanje ORF-a gena *ANKRD1*

Komponente	Zapremina (µl)
cDNK	2,5
2x <i>Phusion High-Fidelity PCR Master Mix</i>	12,5
10 pmol <i>forward</i> prajmer	1,25
10 pmol <i>reverse</i> prajmer	1,25
dH ₂ O	7,5
ukupna zapremina	25

Tabela 11. Temperaturni profil PCR reakcije umnožavanja ORF-a gena *ANKRD1*

Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
98°C	30 s	1
98°C 62°C 72°C	10 s 30 s 30 s	31
72°C	10 min	1

Prečišćeni produkti PCR reakcije su sekvencirani pomoću prajmera navedenih u Tabeli 3. Za sekvenciranje je korišćen *BigDye™ Terminator Version 3.1 Ready Reaction Kit* (BDT) (*Applied Biosystems*). Sastav reakcione smeše finalne zapremine 8 µl i temperaturni profil reakcije prikazani su u Tabelama 12 i 13, redom.

Tabela 12. Sastav reakcione smeše za sekvenciranje

Komponente	Zapremina
PCR produkt	3 µl (5-20 ng)
3,2 pmol prajmer	1 µl
BDT	2 µl
sterilna dH ₂ O	2 µl

Tabela 13. Temperaturni profil reakcije sekvenciranja

Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
96°C	5 min	1
96°C 50°C 60°C	10 s 5 s 4 min	25
4°C	∞	/

Produkti sekvenciranja su precipitirani dodatkom 40 μ L 0,1 M natrijum-acetata pH 5,2 u etanolu u reakcionu smešu. Smeša je zatim centrifugirana 10 min pri 13000 obr/min i uklonjen je supernatant, a talog opran dva puta sa po 200 μ l hladnog 70% etanola. Nakon svakog ispiranja, smeša je centrifugirana 10 min pri 13000 obr/min. Talog je potom osušen na sobnoj temperaturi, resuspendovan u 20 μ l Hi-Di™ formamida (*Applied Biosystems*) i analiziran kapilarnom elektroforezom na 3130 Genetic Analyzer-u (*Applied Biosystems*).

Digitalni zapisi sekvenci obrađeni su primenom softvera *Sequencing Analysis v5.2.0* (*Applied Biosystems*) i *BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5* (*Informer Technologies*). Sekvence su upoređene sa odgovarajućom referentnom sekvencom (*NCBI Reference Sequence: ANKRD1 NM_014391.3, CCDS: CCDS7412.1*) pomoću programa BLASTN iz porodice programa BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al*, 1990).

3.2.6. Analiza ekspresije na nivou proteina

3.2.6.1. Priprema proteinskih ekstrakata

Za Western blot analizu pripremani su ćelijski proteinski ekstrakti. Ćelije gajene u petri šoljama su dva puta ispirane PBS-om, nakon čega su ćelije odvojene od podloge inkubacijom u rastvoru 0,05% tripsina i 0,02% EDTA u PBS-u, u trajanju od 2-3 min. Ćelije su zatim staložene centrifugiranjem 4 min pri 1400 obr/min, oprane rastvorom PBS-a i ponovo centrifugirane. Talozi su čuvani na -80°C do trenutka izolacije proteina, kada su resuspendovani u puferu za lizu ćelija (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 120 mM NaCl, 0,5% NP40), u koji je neposredno pred korišćenje dodat koktel proteaznih inhibitora *cOmplete™* (*Roche*). Ćelije su lizirane 20 min na ledu, a onda podvrgnute sonikaciji (*Soniprep 150, Sanyo*) sa 2 pulsa amplitude 10 μ m u trajanju od po 10 sekundi. Lizati su potom centrifugirani 10 min pri 13000 obr/min na 4°C. Talozi su odbačeni, a supernatanti, tj. proteinski ekstrakti, čuvani na -80°C do trenutka upotrebe.

3.2.6.2. Merenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Primenjena metoda za merenje koncentracije proteina bazira se na vezivanju boje komasi plavo (eng. *Coommassie Brilliant Blue*) za proteine. Upotrebljen je komercijalni reagens *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (*Bio-Rad*). U 10 μ l uzorka je dodato 200 μ l ovog reagensa, a apsorbancija je očitavana na 595 nm na uređaju *Infinite 200 PRO multiplate reader* (*TECAN*). Na osnovu izmerenih apsorbanci za seriju razblaženja BSA (eng. *bovine serum albumin*), raspona

koncentracija od 0,0625 do 1 mg/ml, konstruisana je standardna kriva i na osnovu nje određena koncentracija proteina u ekstraktima.

3.2.6.3. Imunoprecipitacija

Za obogaćivanje proteina ANKRD1 u uzorku, ekstrakti ćelija RMS koji sadrže 0,5 ili 1 mg ukupnih proteina inkubirani su preko noći na 4°C sa anti-ANKRD1 antitelom, uz lagano okretanje na rotirajućem točku. Narednog dana, antigen-antitelo kompleksi su izdvojeni iz rastvora vezivanjem za Protein A/G imobilisan na matriksu (*Pierce Protein A/G UltraLink Resin, Thermo Fisher Scientific*). Matriks je zatim opran PBS-om, resuspendovan u 30 µl pufera za imunoprecipitaciju (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 100 mM DTT, bromfenol-plavo), inkubiran 5 min na 95°C i centrifugiran 1 min pri 2000 obr/min. Supernatanti su analizirani Western blot metodom.

3.2.6.4. Western blot

Metoda Western blot je korišćena za imunodetekciju proteina ekstraktata ćelija RMS.

Razdvajanje proteina je izvršeno vertikalnom elektroforezom u gelu koga čine dve komponente: gel za koncentrovanje (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% poliakrilamid, 1,4% amonijumpersulfat, 0,1% SDS, i 0,14% TEMED), koji omogućava sinhronizovan početak razdvajanja svih proteina iz uzorka, i gel za razdvajanje (428 mM Tris-HCl pH 8,8, 12% poliakrilamid, 0,7% amonijumpersulfat, 0,1% SDS i 0,04% TEMED), u kome se proteini razdvajaju prema molekularnoj težini. Proteini su pre nanošenja na gel denaturisani kuvanjem 5 min na 95°C u puferu za uzorak (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 0,1% bromfenol plavo, 715 mM β-merkaptotanol). Na gel je nanet i marker molekularskih težina *Page Ruler Plus™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)*. Elektroforeza se odvijala u tris-glicinskom puferu (25 mM Tris-HCl pH 8,8, 250 mM glicin, 0,1% SDS) pri konstantnom naponu od 100 V u gelu za koncentrovanje i 180 V u gelu za razdvajanje.

Proteini su sa gela preneti na membranu od poliviniliden difluorida (*Immobilion-P PVDF, Milipore*), polusuvim transferom pomoću aparata *Fastblot (Biometra)*. Membrana je najpre aktivirana potapanjem u metanol, a zatim isprana destilovanom vodom i inkubirana 2 min u anodnom puferu II (25 mM Tris-HCl pH 10,4, 20% metanol). Anodna ploča je nakvašena anodnim puferom I (300 mM Tris-HCl pH 10,4, 20% metanol), a zatim su na nju redom postavljeni: dva 3MM papira (*Whatman*) nakvašena anodnim puferom I, jedan 3 MM papir nakvašen anodnim puferom II, aktivirana membrana, gel prethodno inkubiran 5 min u katodnom puferu (25 mM Tris-HCl pH 9,4, 20% metanol, 40 mM glicin) i tri 3MM papira nakvašena katodnim puferom. Transfer se odvijao 40 min pri konstantnoj struji od 5 mA/cm² membrane. Uspešnost transfera je proverena bojenjem membrane rastvorom boje Ponso S (eng. *Ponceau S*) (0,1% Ponso S, 1% glacialna sirćetna kiselina), koja se reverzibilno vezuje za proteine na membrani.

Nakon odbojavanja vodom, membrana je inkubirana preko noći na 4°C u 10% rastvoru obranog mleka (*Merck*) u PBST-u (PBS, 0,1% Tween 20), kako bi se blokirala mesta za koja se proteini nisu vezali. Zatim je kratko isprana PBST-om i inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi sa primarnim antitelom razblaženim u 5% rastvoru obranog mleka u PBST-u. Višak antitela je uklonjen ispiranjem membrane tri puta po 10 min u PBST-u. Membrana je potom inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena,

razblaženim u 5% rastvoru obranog mleka u PBST-u. Višak antitela je ponovo uklonjen sa tri pranja od po 10 min u PBST-u. Hemiluminiscentni signal je generisan petominutnom inkubacijom sa supstratom *Immobilon™ Western (Millipore)* ili *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)* i detektovan na uređaju *ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad)*.

Dilucije primarnih i sekundarnih antitela su bile sledeće: anti-GAPDH (1:2000), anti-ANKRD1 (1:750), anti-p21 (1:1000), anti-FLAG (1:1000), HRP obeženo antitelo na imunoglobuline miša (1:80000), HRP obeleženo antitelo na imunoglobuline zeca (1:1000).

3.2.6.5. Imunocitohemija

Nakon zasejavanja na pokrovna stakla i dostizanja 80% konfluentnosti, ćelije su dva puta kratko isprane PBS-om, fiksirane 10 min u 4% paraformaldehidu u PBS-u, a zatim permeabilizovane inkubacijom 10 min u 0,5% TritonX-u u PBS-u. Ćelije su potom inkubirane preko noći na 4°C u rastvoru za blokiranje (3% BSA, PBS).

Sledećeg dana, ćelije su inkubirane 3 h sa primarnim antitelima, razblaženim u 1% BSA u PBS-u. Višak antitela je uklonjen ispiranjem 10 min u PBS-u, a zatim su ćelije inkubirane 1 h sa sekundarnim antitelom, razblaženim u 1% BSA u PBS-u. Jedra su potom 5 min bojena DAPI-jem (4',6-diamidino-2-fenilindol, 100 ng/ml). Nakon kratkog ispiranja ćelija PBS-om, pokrovna stakla su montirana pomoću *Dako fluorescence (Agilent Technologies)* medijuma na predmetna stakla.

Razblaženja primarnih i sekundarnih antitela su bila sledeća: anti-ANKRD1 (1:100), anti-koilin (1:300) i anti-PML (1:100), AF488 obeleženo antitelo na imunoglobuline miša (1:250), AF568 obeleženo antitelo na imunoglobuline zeca (1:250), AF647 obeleženo antitelo na imunoglobuline kože (1:500).

3.2.7. Metode za analizu antitumorskog dejstva violaceina

3.2.7.1. Izolacija i prečišćavanje violaceina

Pigment violacein izolovan je metodom opisanom od strane Konzena i saradnika (Konzen *et al*, 2006). Ukratko, prekonocna kultura *Chromobacterium violaceum* je inokulisana u LB medijum i gajena 48 h na 37°C pri 180 obr/min. Bakterije su staložene centrifugiranjem i resuspendovane u apsolutnom metanolu. Metanolski ekstrakt je prečišćen hromatografijom na koloni od silika gela nakon čega je frakcija koja sadrži violacein sušena na 45°C pomoću rotacionog vakuum uparivača. Osušeni ekstrakt je rastvoren u dimetil-sulfoksidu (DMSO) (*Merck KGaA*) i čuvan na -20°C za dalju primenu. Apsorbanca rastvora violaceina, merena spektrofotometrijski na 576 nm, upotrebljena je za izračunavanje njegove koncentracije prema sledećoj formuli: $c(\mu\text{g/ml}) = (A_{576\text{nm}} \times 100) / \epsilon$, gde ϵ predstavlja molarni ekstinkcioni koeficijent na 585 nm (Pantanella *et al*, 2007).

3.2.7.2. Određivanje vijabilnosti ćelija MTT testom

Vijabilnost ćelija procenjena je MTT testom, zasnovanim na redukciji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromida (MTT, *Merck KGaA*), do ljubičastog formazana (Kumar *et al*, 2018; Bromberg *et al*, 2010). Do reakcije dolazi samo u živim, metabolički aktivnim ćelijama, te je količina generisanog formazana proporcionalna broju vijabilnih ćelija.

Nakon 24 h od zasejavanja 5×10^3 ćelija po bunaru mikrotitarske ploče, ćelije su gajene u prisustvu različitih koncentracija violaceina (0,1-15 μM), doksorubicina (*Adriablastin*, *Phizer*, 0,05-100 $\mu\text{g/ml}$), irinotekana (*Sindan-Pharma*, 25-1500 $\mu\text{g/ml}$) ili vinflunina (*Pierre Fabre*, 0,01-500 $\mu\text{g/ml}$). Posle 24 h, ćelije su oprane PBS-om, inkubirane sa MTT-om (0,5 mg/ml u kompletnom medijumu) 1,5 h na 37°C, a zatim lizirane u DMSO-u, čime su rastvoreni kristali formazana. Absorbance lizata su izmerene na 570 nm (*Infinite 200 PRO multiplate reader*, *TECAN*). Eksperimenti su ponovljeni tri puta u četvorplikatu.

Rezultati MTT testa su izraženi kao procenat vijabilnih ćelija u odnosu na netretiranu kontrolu. Vrednosti koje predstavljaju 50% (IC_{50}) i 25% (IC_{25}) maksimalne inhibitorne koncentracije (eng. *maximal inhibitory concentration*) određene su za svaku ćelijsku liniju koristeći onlajn kalkulator: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> i <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Ecanything1/>.

Koncentracije violaceina, koje odgovaraju izračunatim IC_{50} vrednostima, korišćene su u narednim esejima za analizu njegovog efekta na ćelijske linije RMS, dok su IC_{25} vrednosti primenjene u kombinovanim tretmanima ćelija violaceinom i hemioterapeuticima. Efekat kombinovanih tretmana procenjen je MTT esejem.

MTT esej je takođe korišćen za analizu uticaja antioksidanta NAC (*Sigma-Aldrich*) na smanjenje preživljavanja ćelija indukovano violaceinom. U tu svrhu, ćelije su predtretirane 1 h sa 25 mM NAC-om, a zatim inkubirane sa violaceinom IC_{50} koncentracije tokom 24 h, prema de Carvalho *et al*, 2006.

3.2.7.3. Esej zarastanja rane

Uticaj violaceina na migraciju ćelija RMS analiziran je primenom eseja zarastanja rane (eng. *wound healing assay*), prema protokolu iz Wu *et al*, 2019. Nakon formiranja konfluentnog ćelijskog monosloja, površina petri posude je na tri mesta pravolinijski zagrebana sterilnim nastavkom za pipetman zapremine 200 μl , stvarajući ogrebotine sa pravilnim ivicama. Nakon ispiranja PBS-om, ćelije su tretirane odgovarajućim IC_{50} koncentracijama violaceina ili 0,1% DMSO-om (kontrola), u kompletnom medijumu. Popunjavanje ogrebotina je fotografisano na svetlosnom mikroskopu DM IL LED (*Leica Microsystems*) u trenutku kreiranja ogrebotina, kao i 5 i 10 h kasnije. Površina „rane“ je određivana pomoću softvera *Image-J v1.52a* (Schneider *et al*, 2012), a stepen njenog zatvaranja je izražen kao odnos površine rane posle 5 h i 10 h i površine rane na početku eksperimenta, kako za kontrolne, tako i za ćelije tretirane violaceinom. Za svaku od ćelijskih linija izvršena su po dva nezavisna eksperimenta, a u svakom od njih analizirano je devet fotografija po eksperimentalnoj grupi.

3.2.7.4. Test toksičnosti na embrionima zebrića

Toksičnost violaceina *in vivo* ispitana je FET (eng. *Fish Embryo Acute Toxicity*) testom na embrionima zebrića u nekoliko vremenskih tačaka tokom razvića, i to do 120 sati nakon oplodjenja (eng. *hours post fertilization*, hpf).

Zebriće su stavljane u mrestilice i razdvojene po polovima pregradom. Narednog jutra, po paljenju svetla, pregrada je uklonjena. Nakon polaganja i oplodjenja, jaja su prebačena u ploče od 24 bunara sa standardnim E3 medijumom.

Posle manje od jednog sata od oplodjenja, embrioni su tretirani različitim koncentracijama violaceina (0,1, 0,5, 1, 5, 10 i 50 μM) ili 0,1% DMSO-om u E3 medijumu. Svi tretmani su izvedeni na 60 embriona po eksperimentalnoj grupi. Embrioni su posmatrani na 24, 48, 72, 96 i 120 hpf, pri čemu je proveravano da li su se pravilno razvili (Kimmel *et al*, 1995), a mrtvi embrioni su uklanjani.

3.2.7.5. Određivanje tipa ćelijske smrti metodom protočne citofluorimetrije

Da bi se utvrdio udeo ćelija u apoptozi nakon tretmana violaceinom, ćelije su bojene propidijum jodidom (eng. *propidium iodide*, PI) i Aneksinom V konjugovanim sa fluoroforom AlexaFluor 488 (Aneksin V-AF488)(oba od *Thermo Fisher Scientific*), a zatim analizirane protočnom citofluorimetrijom.

PI je fluorofora koja se koristi za razlikovanje vijabilnih i mrtvih ćelija, budući da ne može proći kroz membranu vijabilnih ćelija, ali može ući u ćelije sa narušenim integritetom membrane. Aneksin V-AF488 se koristi za detekciju apoptoze zbog specifičnog vezivanja za fosfatidil serin, koji se u ranim fazama apoptoze premešta sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane. Ćelije koje se istovremeno boje PI i Aneksinom V, mogu se razvrstati u četiri populacije: žive ćelije (PI-/Aneksin-), ćelije u ranoj apoptozi (PI-/Aneksin+), ćelije u kasnoj apoptozi (PI+/Aneksin+) i mrtve ćelije (PI+/Aneksin-).

Ćelije su zasejane na ploču sa 12 bunara (1×10^5 ćelija po bunaru). Nakon 24 h, tretirane su odgovarajućom IC_{50} koncentracijom violaceina ili 0,1% DMSO-om (kontrola) u trajanju od 24 h. Potom su odlepljene od podloge tripsinom, spojene sa plivajućim ćelijama iz istog uzorka, centrifugirane 3 min na 1600 obr/min, oprane PBS-om i ponovo centrifugirane. Zatim su resuspendovane u 100 μl pufera za vezivanje Aneksina (0,1 M HEPES pH 7,4, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl_2). U ćelijsku suspenziju su dodati Aneksin V-AF488, finalne koncentracije 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, i PI, finalne koncentracije 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Posle 15 min inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi, bojenje je zaustavljeno dodavanjem 900 μl pufera za vezivanje Aneksina (Petrović *et al*, 2021) i ćelije su analizirane protočnom citofluorimetrijom na aparatu *CyFlow space* (*Sysmex Partec*). Analizirano je 10000 događaja po uzorku pomoću softvera *FloMax* (*Sysmex Partec*). Izvedena su tri nezavisna eksperimenta, svaki sa po tri tehnička replikata.

3.2.7.6. Relativna kvantifikacija unutarćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika

Efekat violaceina na generisanje unutarćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika izmeren je fluorometrijski pomoću probe dihlorodihidrofluorescein diacetata (eng. *dichlorodihydrofluorescein diacetate*, DCFH-DA) (de Carvalho *et al*, 2006; Angori *et al*, 2017). Ova tehnika se zasniva na oksidaciji DCFH-DA do fluorescentnog 2',7'-dihlorodihidrofluoresceina od strane reaktivnih vrsta kiseonika, pri čemu je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini reaktivnih vrsta kiseonika u uzorku.

Po $1-2 \times 10^4$ ćelija je zasejano u bunare netransparentne mikrotitarske ploče. Nakon 24 h, ćelije su oprane PBS-om i inkubirane 30 min na 37°C sa DCFH-DA (*Sigma-Aldrich*) finalne koncentracije 15 μM , u kompletnom medijumu. Po uklanjanju DCFH-DA, ćelije su tretirane 2 h različitim koncentracijama violaceina. Netretirane ćelije su služile kao negativna kontrola, a bunari bez ćelija kao blank. Fluorescencija produkata reakcije je izmerena na *Infinite 200 PRO multiplate reader*-u (*TECAN*), pri čemu je ekscitaciona talasna dužina bila 485 nm, a emisiona

530 nm. Rezultati merenja su izraženi relativno u odnosu na kontrolu tretiranu rastvaračem (DMSO).

3.2.7.7. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije

Stepen lipidne peroksidacije je određivan merenjem nivoa malondialdehida (MDA), finalnog produkta lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina usled delovanja slobodnih radikala (Ayala *et al*, 2014). U ovom radu, primenjena je metoda koju su razvili Potter i saradnici, a zasniva se na vezivanju tiobarbituratne kiseline (eng. *thiobarbituric acid*, TBA) za MDA, čime nastaju reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS). Količina formiranih jedinjenja, merena u medijumu u kome su gajene ćelije i u ćelijskim lizatima, direktno je proporcionalna količini MDA (Potter *et al*, 2011).

Ćelije su zasejane u ploče sa 6 bunara ($1,5 \times 10^6$ ćelija po bunaru) i sledećeg dana tretirane violaceinom ili rastvaračem (0,1% DMSO). Posle 24 h tretmana, 500 μ l hranljivog medijuma je prikupljeno i pomešano sa 400 μ l 15% trihlorsirćetne kiseline (*Sigma-Aldrich*) i 800 μ l 0,67% TBA (*Sigma-Aldrich*) sa 0,01% butilovanog hidrositoluena (*Sigma-Aldrich*). Smeša je zagrevana 20 min na 95°C, a potom ohlađena na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja po 3 ml butanola i blagog mešanja, uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi do momenta odvajanja faza. Po 200 μ l gornje faze svakog od uzoraka je prebačeno u bunar mikrotitarske ploče za merenje fluorescencije produkata reakcije.

Za analizu sadržaja MDA u ćelijskim lizatima, ćelije su oprane PBS-om i lizirane u 1 ml 2,5% trihlorsirćetne kiseline. Nakon centrifugiranja 5 min pri 13000 obr/min, supernatanti su upotrebljeni za merenje produkata MDA-TBA reakcije, dok su talozi iskorišćeni za merenje koncentracije proteina prethodno opisanom metodom po Bradfordu. Ćelijski lizati su pripremljeni za MDA-TBA reakciju, na isti način kao što je opisano za medijum u kome su gajene ćelije.

Fluorescencija produkata MDA-TBA reakcije je merena na *Infinite 200 PRO multiplate reader-u* (TECAN), pri ekscitacionoj talasnoj dužini od 530 nm i emisioj od 550 nm. Standardna kriva, konstruisana na osnovu izmerenih apsorbanaci za seriju razblaženja MDA poznate koncentracije, primenjena je za izračunavanje koncentracije MDA u uzorcima. Rezultati su normirani u odnosu na sadržaj ukupnih proteina u uzorku i izraženi u ekvivalentima MDA po mg proteina.

3.2.8. Konfokalna i DIC mikroskopija

Za vizualizaciju violaceina i analizu preparata sa fluorescentno obeleženim proteinima primenjena je konfokalna mikroskopija na sistemu TCS SP8 (*Leica*), a slike su zabeležene i obrađene pomoću programa LAS AF (*Leica*, softver instaliran uz mikroskop) i LAS X (*Leica*, slobodno dostupan softver).

U cilju vizualizacije violaceina tokom tretmana, ćelije su zasejane na petri šolje sa staklenim dnom i tretirane odgovarajućom IC₅₀ koncentracijom. U toku naredna 24 h, praćeno je da li dolazi do prodiranja violaceina u unutrašnjost ćelija. Fluorescencija violaceina pobuđena je laserskom svetlošću talasne dužine 575 nm, a maksimum emisije je detektovan na 675 nm. Vizualizacija ćelija tretiranih violaceinom izvedena je putem fazno-kontrastne mikroskopije (eng. *Differential interference contrast*, DIC). Ova metoda naglašava kontrast u transparentnim

uzorcima, čime se postiže reljefnost slike. Sistem za ovu mikroskopiju je integralni deo TCS SP8 sistema.

3.2.9. Statistička analiza

Statistička analiza je sprovedena korišćenjem programskog paketa *SPSS v21.0 (IBM)*. Normalna distribucija podataka je potvrđena Šapiro-Vilkovim testom, a homogenost varijanse Levenovim testom. Pojedinačna poređenja eksperimentalnih grupa sa kontrolnom grupom izvedena su putem Studentovog t-testa. Jednofaktorskom analizom varijansi (eng. *One-way analysis of variance, ANOVA*) međusobno je poređeno više grupa, pri čemu je za simultano poređenje nekoliko grupa sa kontrolnom korišćen Danetov *post hoc* test. Dvofaktorskom analizom varijanse određivana je statistička značajnost efekta interakcije različitih faktora. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, a p vrednost $\leq 0,05$ je smatrana značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija ekspresije gena *ANKRD1* u ćelijskim linijama RMS

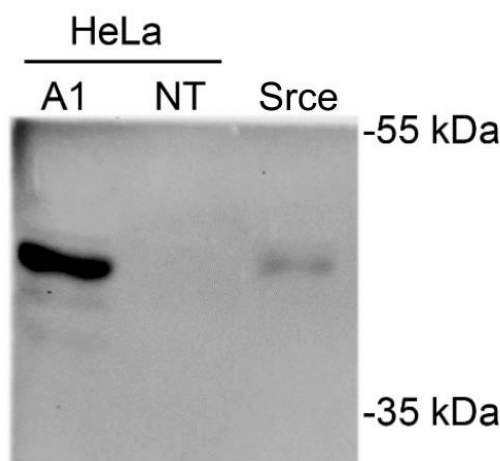
Prvi deo ove doktorske disertacije posvećen je karakterizaciji ekspresije i unutarćelijske lokalizacije proteina ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS (SJRH30, RD i HS-729).

4.1.1. Potvrda specifičnosti antitela na humani protein ANKRD1

U ovom radu korišćeno je anti-ANKRD1 antitelo, proizvedeno u saradnji između LMB i Vojnomedicinske akademije, prema proceduri opisanoj u radu Kojić *et al*, 2009. Za imunizaciju miševa je pritom korišćen rekombinantni protein ANKRD1 fuzionisan sa histidinskim tagom.

Da bismo potvrdili specifičnost anti-ANKRD1 antitela, eksprimirali smo ANKRD1 u HeLa ćelijama transfekcijom ekspresionim vektorom pcDNA3 u koji je ukloniran ORF gena *ANKRD1*. Nakon 24 h, pripremljeni su proteinski ekstrakti koji su potom analizirani metodom Western blot. Za imunodetekciju je korišćeno anti-ANKRD1 antitelo, a ekstrakt netransfekovanih HeLa ćelija i ekstrakt humanog srca su poslužili kao negativna i pozitivna kontrola, redom (Slika 6).

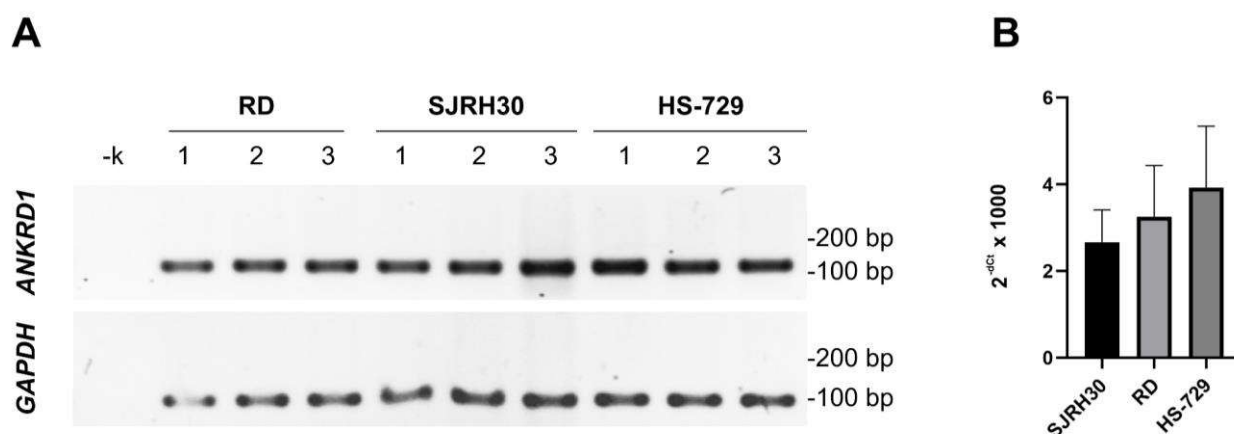
Rezultati prikazani na Slici 6 pokazuju da je testirano antitelo specifično prepoznalo odgovarajući antigen. Signal, koji odgovara molekularnoj težini proteina ANKRD1 od približno 38 kDa, bio je prisutan u pozitivnoj kontroli i u transfekovanim ćelijama, ali ne i u negativnoj kontroli. Ovi nalazi podržavaju validnost i specifičnost anti-ANKRD1 antitela za prepoznavanje ciljnog proteina.



Slika 6. Validacija anti-ANKRD1 antitela. HeLa ćelije su transfekovane ekspresionim vektorom pcDNA3 koji sadrži ORF gena *ANKRD1* (A1). Ekstrakt netransfekovanih HeLa ćelija (NT) je korišćen kao negativna kontrola, a ekstrakt humanog srca kao pozitivna kontrola. Na gel je naneto po 20 µg ekstrakata HeLa ćelija i 10 µg proteina srca. Imunodetekcija je izvršena pomoću anti-ANKRD1 antitela.

4.1.2. Ekspresija *ANKRD1* u ćelijskim linijama RMS

S obzirom da je u bazi *The Human Protein Atlas* registrovana ekspresija *ANKRD1* iRNK u ćelijskim linijama RD i SJRH30, ispitali smo eventualne razlike u nivou ekspresije i primarnoj strukturi *ANKRD1* transkripta među njima. Analizu smo proširili na još jednu ćelijsku liniju RMS, HS-729. Metodom RT-PCR detektovali smo transkript *ANKRD1* u ćelijama svih ispitivanih linija (Slika 7A), a qPCR metodom smo utvrdili da ne postoji značajna razlika u nivou ekspresije ovog transkripta među njima (Slika 7B). Prosečne Ct vrednosti \pm standardne devijacije su prikazane u Tabeli 14. Sekvenciranje ORF-a gena *ANKRD1* je pokazalo da sve analizirane ćelijske linije eksprimiraju neizmenjeni, *wild-type ANKRD1*.

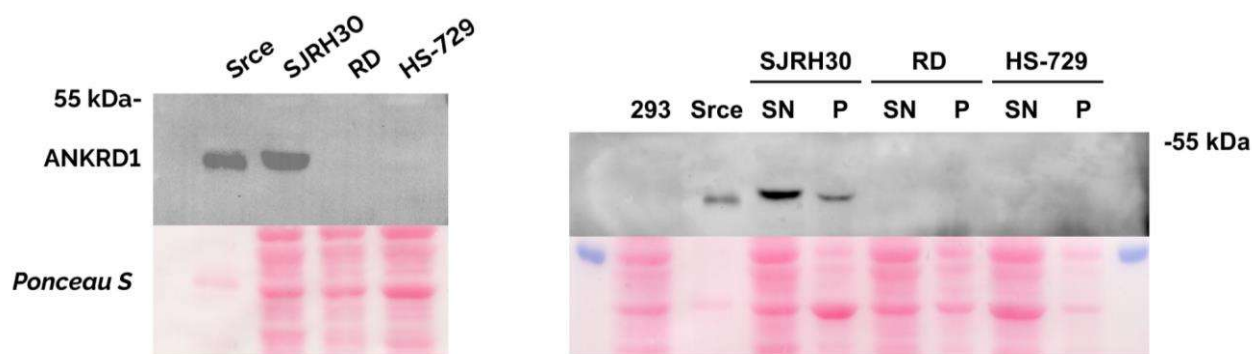


Slika 7. Ekspresija transkripta *ANKRD1* u ćelijskim linijama RMS. A - Fragmenti transkripta *ANKRD1* poreklom iz tri ćelijske linije RMS amplifikovani RT-PCR metodom. *GAPDH* transkript je služio kao referentni, a reakcija bez cDNK kao negativna kontrola (-k). Analizirana su tri biološka replikata (1-3) po ćelijskoj liniji. B - Relativna kvantifikacija *ANKRD1* iRNK u ćelijskim linijama RMS metodom qPCR. Nivo ekspresije je izračunat metodom $2^{-\Delta Ct}$, pri čemu je kao referentni korišćen transkript *GAPDH*. Vrednosti su pomnožene sa 1000 radi lakšeg poređenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija iz tri biološka replikata.

Tabela 14. Vrednosti Ct \pm standardna devijacija dobijene analizom rezultata qPCR-a za transkripte gena *ANKRD1* i *GAPDH* u testiranim ćelijskim linijama

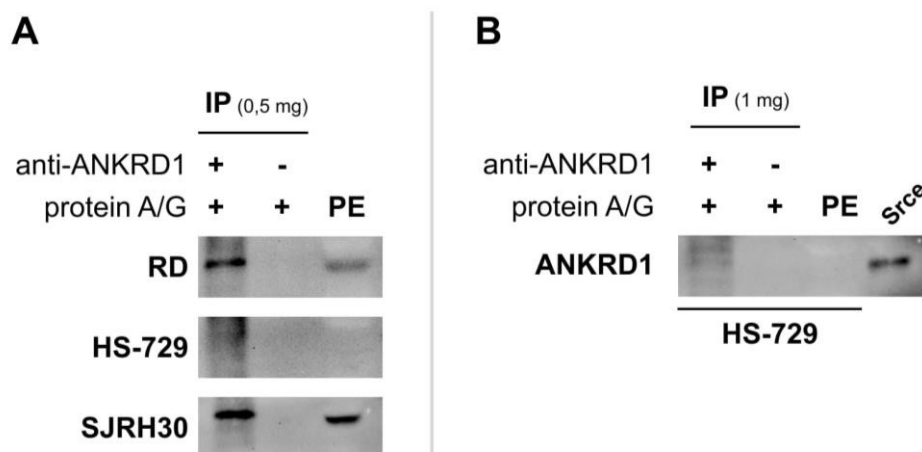
	<i>ANKRD1</i>	<i>GAPDH</i>
SJRH30	24.59 \pm 0.97	16.01 \pm 1.32
RD	24.47 \pm 0.39	16.17 \pm 0.77
HS-729	23.39 \pm 0.36	15.34 \pm 0.61

Nasuprot rezultatima dobijenim na nivou iRNK, Western blot analizom smo detektovali različite nivoe ekspresije proteina ANKRD1 među ćelijskim linijama RMS. Nakon analize 50 μ g ukupnih proteina po ćelijskoj liniji, ANKRD1 je detektovan samo u SJRH30 (Slika 8, levo). Odsustvo signala u RD i HS-729 ćelijama nije bilo izazvano taloženjem proteina ANKRD1 tokom pripreme proteinskih ekstrakata (Slika 8, desno).



Slika 8. Ekspresija proteina ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS. Levi panel - Detekcija ANKRD1 u 50 μ g ukupnih proteina izolovanih iz ćelija RMS. Pozitivan signal, koji odgovara traci očekivane molekulske mase od približno 38 kDa, uočen je u ekstraktu ćelija SJRH30. Proteinski ekstrakt srca služio je kao pozitivna kontrola. Prikazan je reprezentativni od tri nezavisna eksperimenta. Desni panel - Detekcija proteina ANKRD1 u supernatantu (SN) i peletu (P) dobijenim u toku izolacije ukupnih proteina iz ćelija. Proteinski ekstrakti humanog srca i 293 ćelija su korišćeni kao pozitivna i negativna kontrola, redom.

U cilju povećanja praga detektabilnosti proteina ANKRD1 u uzorcima, sproveli smo njegovu imunoprecipitaciju koristeći anti-ANKRD1 antitelo, nakon čega je u uzorku poreklom od RD ćelija detektovana traka koja odgovara molekularnoj masi proteina ANKRD1 (Slika 9A). Međutim, imunoprecipitacija nije rezultirala detekcijom ANKRD1 u uzorku ćelijske linije HS-729, čak ni nakon imunoprecipitacije ANKRD1 iz 1 mg ukupnih proteina (Slika 9B).



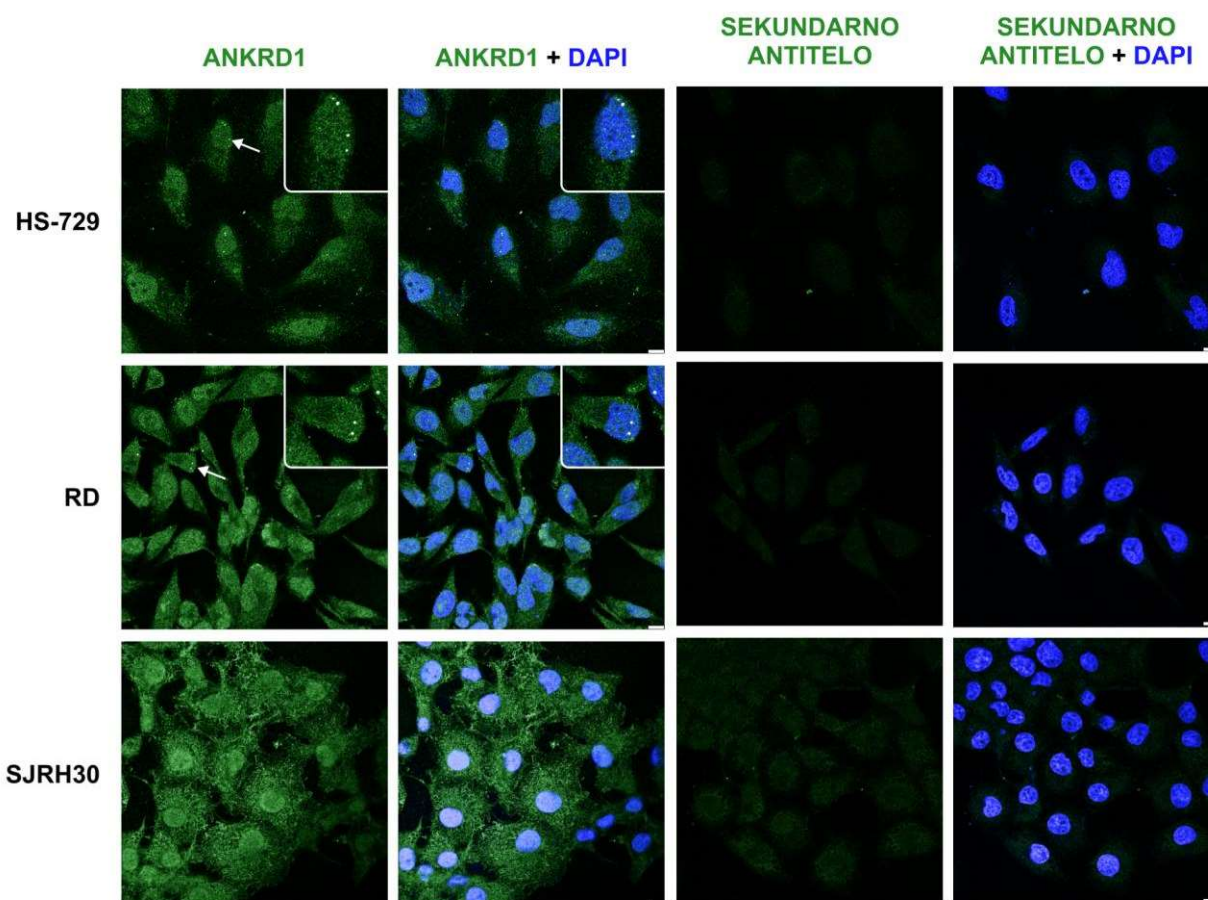
Slika 9. Detekcija proteina ANKRD1 nakon selektivnog obogaćivanja. A - Protein ANKRD1 je imunoprecipitiran (IP) anti-ANKRD1 antitelom iz 0,5 mg ukupnih proteina izolovanih iz ćelija RMS. Prikazan je jedan od dva nezavisna eksperimenta. PE: 15% količine ukupnih proteina za RD i SJRH30 i 10% količine ukupnih proteina za HS-729. B - Detekcija ANKRD1 proteina nakon imunoprecipitacije (IP) sa anti-ANKRD1 antitelom i 1 mg ukupnih proteina izolovanih iz HS-729 ćelija. PE: 5% količine ukupnih proteina. Proteinski ekstrakt srca je korišćen kao pozitivna kontrola.

Predstavljeni rezultati ukazuju na heterogenost ekspresije ANKRD1 proteina u ćelijskim linijama RMS, za razliku od transkripta koji je imao sličan nivo ekspresije u analiziranim ćelijama.

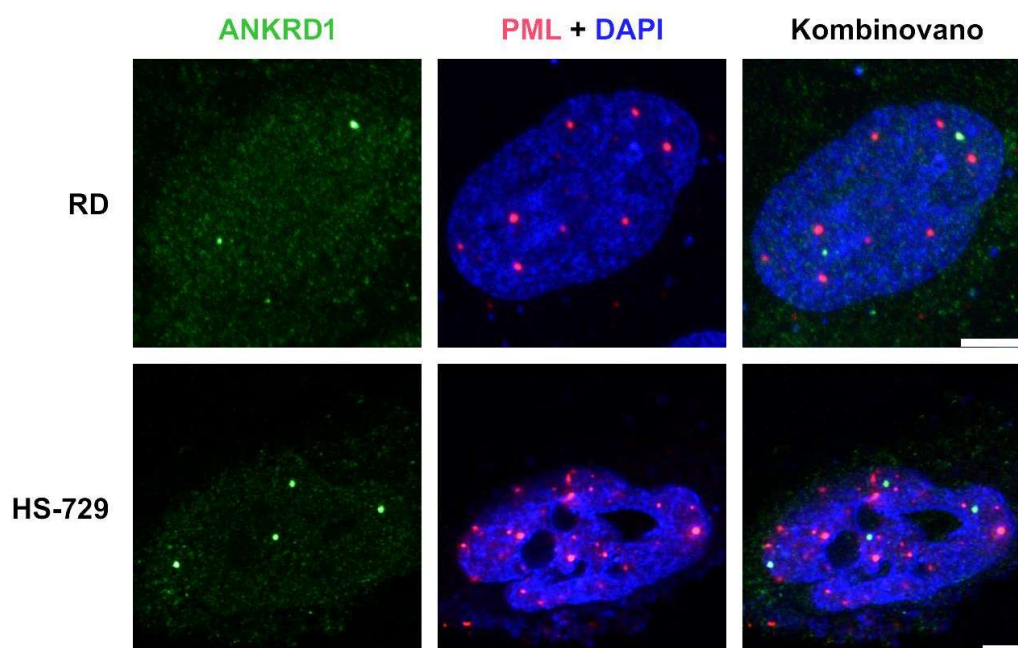
4.1.3. Unutarćelijska lokalizacija ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS

Imunocitohemijskom analizom, protein ANKRD1 smo detektovali u citoplazmi i jedrima ćelija RMS, sa naglašenim jedarnim signalom (Slika 10). Odsustvo signala u kontrolnom uzorku (bez primarnog antitela), potvrdilo je specifičnost imunobojenja na ANKRD1.

U jedrima RD i HS-729 ćelija primećen je tačkasti signal, koji ukazuje na prisustvo ANKRD1 u specifičnim jedarnim strukturama (Slika 10, strelice). U pokušaju da identifikujemo ove strukture, istovremeno smo inkubirali ćelije sa antitelima na ANKRD1 i protein promijelocitne leukemije, marker PML tela. Odsustvo ko-lokalizacije (Slika 11) ukazuje da ANKRD1 nije prisutan u PML telima ćelija RMS.

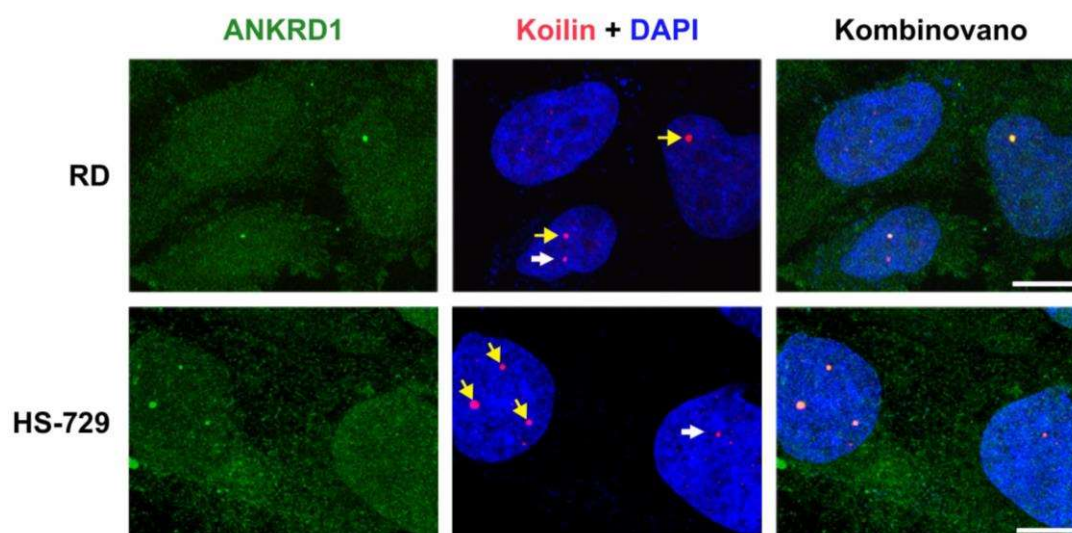


Slika 10. Lokalizacija proteina ANKRD1 u ćelijama RMS. Imunofluorescentnim bojenjem i konfokalnom mikroskopijom identifikovana je citoplazmatična i jedarna lokalizacija ANKRD1 (zeleni signal) u ćelijama RMS. Jedra su obeležena bojom DAPI (plavi signal). Bele strelice pokazuju na jedarne strukture sa visokim sadržajem ANKRD1 (uvećane u umecima). Intenzitet signala nije uporediv između slika. Fluorescentni signal nije registrovan kada je primarno antitelo izostavljeno. Linija razmere odgovara dužini od 10 μm .



Slika 11. ANKRD1 nije lokalizovan u PML telima ćelija RMS. Ćelije su simultano obojene anti-ANKRD1 antitelom (zeleni signal) i anti-PML antitelom (crveni signal). Jedra su bojena DAPI-jem (plavi signal). Linija razmere odgovara dužini od 5 μm .

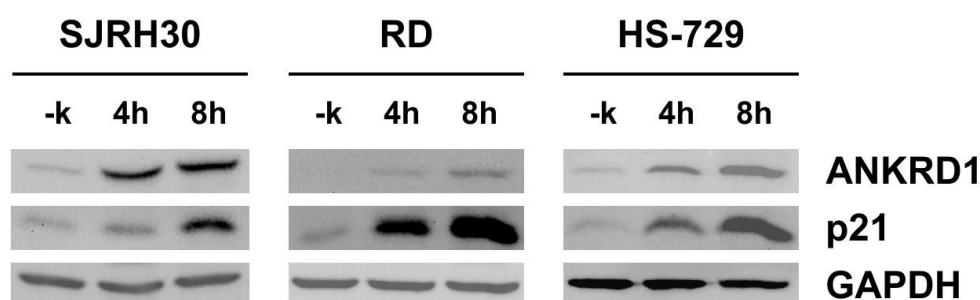
Sledeći korak je bio da testiramo da li su strukture u kojima je detektovan ANKRD1 Kahalova tela. Imunofluorescentnim bojenjem ćelija anti-ANKRD1 antitelom i antitelom na marker Kahalovih tela, koilin, dobijeni su preklapajući signali (Slika 12), čime je potvrđeno prisustvo ANKRD1 u Kahalovim telima ovih ćelija. Međutim, nisu sva Kahalova tela bila pozitivna na ANKRD1.



Slika 12. Lokalizacija ANKRD1 u Kahalovim telima RD i HS-729 ćelija. Imunocitohemijska detekcija ANKRD1 (zeleni signal) i markera Kahalovih tela, koilina (crveni signal). Jedra su obojena bojom DAPI (plavi signal). Žute strelice pokazuju na Kahalova tela pozitivna na ANKRD1, a bele na negativna. Linija razmere odgovara dužini od 10 μm .

4.1.4. Proteazomalna degradacija ANKRD1 u ćelijama RMS

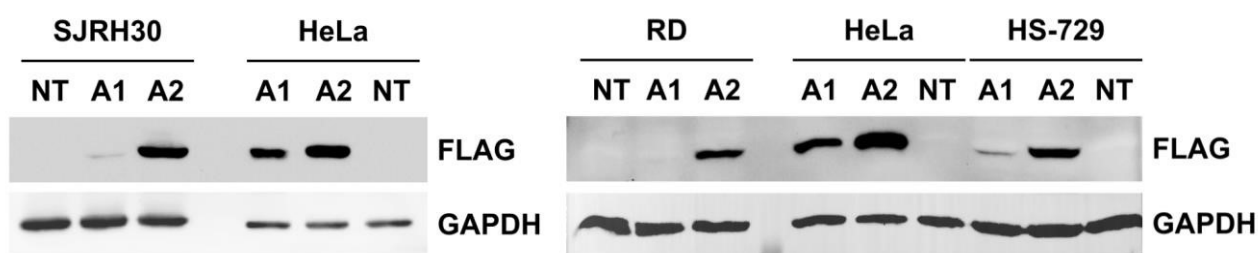
Hipotezu da do disproporcije između nivoa ANKRD1 iRNK i proteina u ćelijama RMS dolazi usled degradacije ANKRD1 u proteazomima testirali smo inhibicijom proteazomalne aktivnosti primenom MG132, inhibitora proteazoma. Efikasnost inhibicije proteazomske aktivnosti potvrđena je povećanjem nivoa proteina p21, poznatog supstrata proteazomalne degradacije u ćelijama RMS (Phillips *et al*, 2007). Nakon 4 i 8 h tretmana, došlo je do povećanja nivoa ANKRD1 u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu rastvaračem (DMSO) (Slika 13), ukazujući da je ANKRD1 podložan proteazomalnoj degradaciji u ćelijskim linijama RMS.



Slika 13. ANKRD1 se degraduje u proteazomima ćelija poreklom od RMS. Tretman ćelija RMS 25 μ M inhibitorom proteazoma MG132 tokom 4 i 8 h rezultovao je povećanjem nivoa ANKRD1 u poređenju sa kontrolnim ćelijama tretiranim rastvaračem (-k). Efikasnost tretmana potvrđena je na osnovu očekivanog povećanja nivoa proteina p21. Na gel je naneto po 60 μ g proteinskih ekstrakata, a GAPDH je detektovan kao kontrola da su na gel nanete jednake količine proteina. Prikazan je reprezentativni od tri nezavisna eksperimenta.

4.1.5. Egzogen ekspresija ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS

U cilju proučavanja funkcije ANKRD1 u ćelijama RMS, želeli smo da ispitamo efekat njegove povećane ekspresije na karakteristike tumorskih ćelija RMS. U tu svrhu, ćelije RMS smo transfekovali ekspresionim vektorom u koji je ukloniran ORF gena *ANKRD1*. Međutim, nakon nekoliko pokušaja, nismo detektovali povećanje ekspresije proteina ANKRD1. Postavili smo hipotezu da ćelije RMS ne tolerišu povećanu ekspresiju ANKRD1. Hipotezu smo dokazali eksperimentom u kome smo ANKRD1 uspešno povećano eksprimirali u drugom tipu tumorskih ćelija (HeLa), dok smo u ćelijama RMS povećano eksprimirali ANKRD2 koji je evolutivno blizak proteinu ANKRD1, pripada istoj familiji proteina i sa njim deli iste strukturne motive, uključujući PEST sekvence neophodne za proteazomalnu degradaciju. Ćelije smo transfekovali konstruktima pCMV-Tag2B-ANKRD1 i pCMV-Tag2B-ANKRD2, koji omogućavaju ekspresiju rekombinantnih proteina ANKRD1 i ANKRD2 konjugovanih sa FLAG peptidom. Iako je povećanje ekspresije ANKRD2 bilo postignuto u svim ćelijskim linijama, ekspresija ANKRD1 je ostala niska (u SJRH30 i HS-729 ćelijama) ili nedetektabilna (u RD ćelijama) (Slika 14). Suprotno tome, povećana ekspresija ANKRD1 je postignuta u HeLa ćelijama, ukazujući na specifično svojstvo ćelija RMS da ne tolerišu egzogen ekspresiju ANKRD1.



Slika 14. Neuspešnost povećanja ekspresije proteina ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS. RMS i HeLa ćelije su transfekovane vektorom pCMV-Tag2B u koji je ukloniran ORF gena *ANKRD1* (A1) ili *ANKRD2* (A2). ANKRD1 i ANKRD2 su detektovani antitelom na FLAG peptid sa kojim su fuzionisani. Netransfekovane ćelije (NT) su korišćene kao negativna kontrola. Nivo proteina je praćen Western blot metodom, koristeći GAPDH kao kontrolu nanošenja jednake količine proteina. Na gel je naneto po 50 μg ukupnih proteina ćelija RMS i po 10 μg ukupnih proteina HeLa ćelija.

4.2. Procena antitumorskog efekta violaceina na ćelije poreklom od RMS

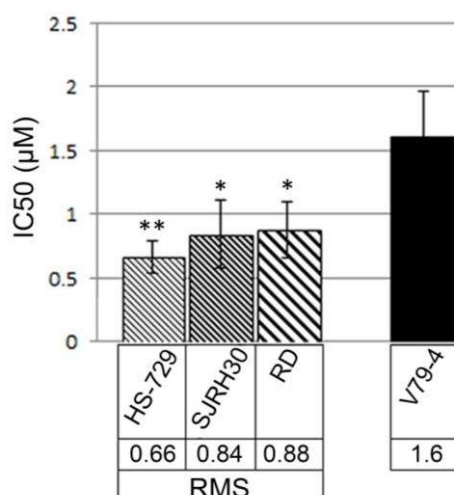
U drugom segmentu istraživanja, ispitali smo antitumorski potencijal violaceina na ćelijskim linijama RMS koristeći niz eksperimentalnih pristupa:

- Analiza citotoksičnosti *in vitro* i toksičnosti *in vivo*
- Određivanje tipa ćelijske smrti
- Praćenje interakcije sa ćelijama
- Praćenje efekta na migraciju ćelija
- Analiza parametara oksidativnog stresa
- Ispitivanje citotoksičnog efekta u kombinaciji sa hemioterapeuticima.

4.2.1. Citotoksični efekat violaceina na ćelije poreklom od RMS

Efekat violaceina na preživljavanje ćelijskih linija RMS (SJRH30, RD i HS-729), ispitali smo primenom MTT eseja. Ćelije su tretirane 24 h rastućim koncentracijama violaceina i na osnovu procenata preživelih ćelija za svaku od koncentracija, određene su IC_{50} vrednosti, potrebne za smanjenje vijabilnosti za 50% (Slika 15). Na osnovu IC_{50} vrednosti, najosetljivija na dejstvo violaceina bila je ćelijska linija HS-729 ($IC_{50} = 0,66 \mu\text{M}$), dok su RD ćelije bile najrezistentnije ($IC_{50} = 0,88 \mu\text{M}$). IC_{50} vrednost za SJRH30 ćelijsku liniju iznosila je $0,84 \mu\text{M}$. IC_{50} vrednost dobijena za V79-4 ćelije ($1,6 \mu\text{M}$) bila je statistički značajno viša u odnosu na IC_{50} vrednosti ćelija RMS, ukazujući na selektivnost citotoksičnog dejstva violaceina prema tumorskim ćelijama.

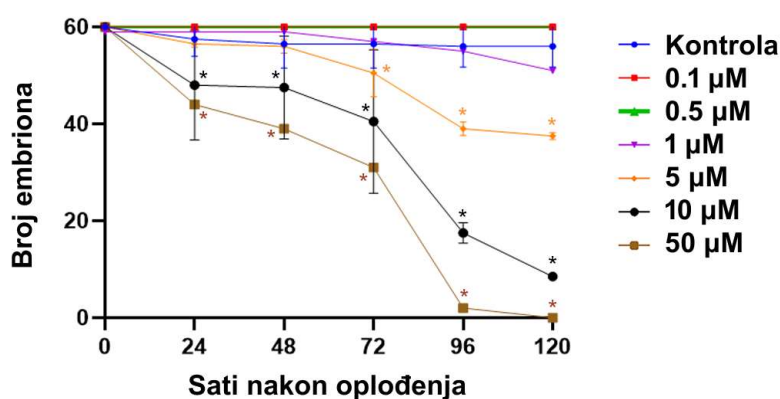
U narednim esejima primenjene su koncentracije koje odgovaraju dobijenim IC_{50} vrednostima, a kao reprezent je odabrana ćelijska linija RD koja vodi poreklo od najčešćeg, embrionalnog tipa RMS.



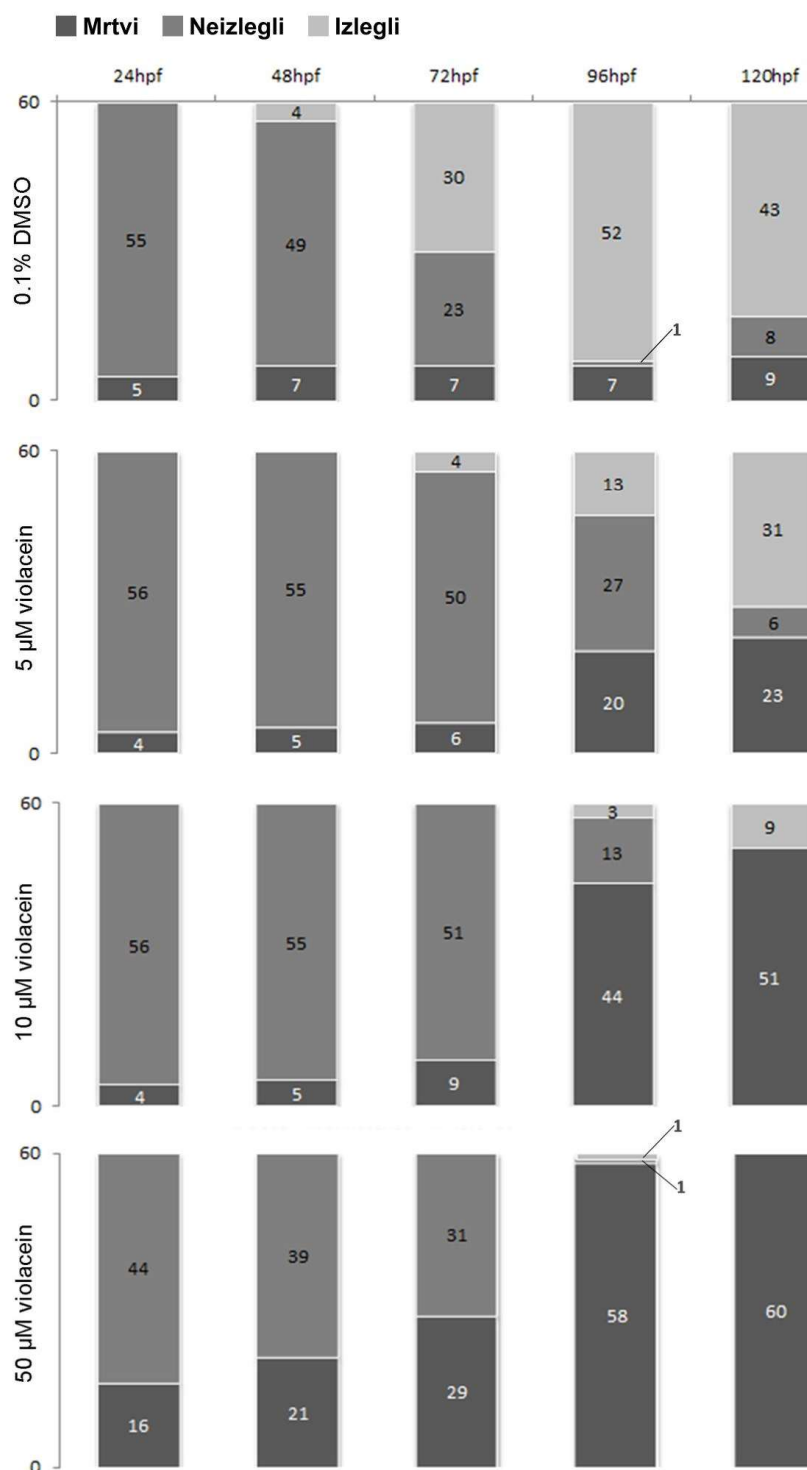
Slika 15. IC₅₀ vrednosti violaceina za ćelijske linije RMS i V79-4. IC₅₀ vrednosti, izražene u µM, izračunate su na osnovu rezultata MTT eseja. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. IC₅₀ vrednost svake od ćelijskih linija RMS je upoređena sa IC₅₀ vrednošću V79-4 ćelijske linije, koristeći Danetov test, **p ≤ 0,01, *p ≤ 0,05.

4.2.2. Uticaj violaceina na preživljavanje embriona zebrica

Primenom FET testa ispitali smo *in vivo* toksičnost violaceina na embrionima zebrica. Embrioni su inkubirani u prisustvu rastućih koncentracija violaceina (od 0,1 do 50 µM) do 120 hpf. Toksičnost je procenjena na osnovu procenta mrtvih, izleglih i neizleglih embriona u pet različitih vremenskih tačaka (24, 48, 72, 96 i 120 hpf) u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracije violaceina od 0,1, 0,5 i 1 µM nisu pokazale toksičnost (Slika 16). Nasuprot tome, tretmani sa 10 i 50 µM violaceinom su značajno smanjili preživljavanje embriona u svim vremenskim tačkama, dok je 5 µM violacein izazvao značajno smanjenje preživljavanja počevši od 72 hpf (p ≤ 0,001). Jače doze violaceina (5, 10 i 50 µM) prouzrokovale su odlaganje izleganja embriona (Slika 17), koje se očekuje na 72 hpf.



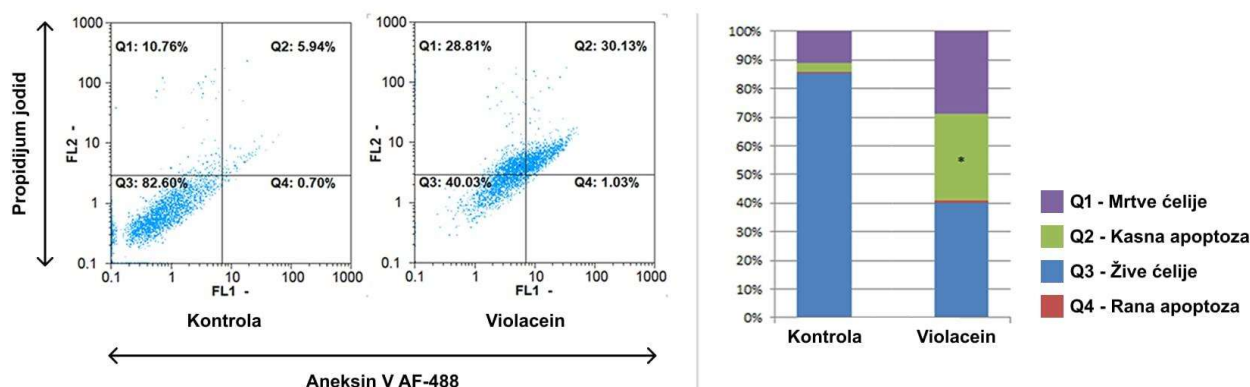
Slika 16. Preživljavanje embriona zebrica izloženih violaceinu. Embrioni su tretirani rastućim koncentracijama violaceina (od 0,1 do 50 µM), a preživljavanje je praćeno od 24 do 120 sati nakon oplodjenja. Kao negativna kontrola korišćen je tretman 0,1% DMSO-om. Efekat različitih koncentracija violaceina analiziran je Danetovim testom, pri čemu je negativna kontrola služila kao kontrolna grupa, *p ≤ 0,001.



Slika 17. Preživljavanje i izleganje embriona zebrića pod dejstvom violaceina koncentracije $\geq 5 \mu\text{M}$. Embrioni su tretirani violaceinom u koncentracijama od 5, 10 i 50 μM i praćeni na 24, 48, 72, 96 i 120 hpf. U negativnoj kontroli korišćen je 0,1% DMSO (rastvarač). Početni broj embriona u svakoj eksperimentalnoj grupi je bio 60. Brojevi mrtvih, izleglih i neizleglih embriona su prikazani unutar stubaca. Stubac koji se odnosi na 120 hpf prikazuje rezultat zasebnog eksperimenta.

4.2.3. Tip ćelijske smrti ćelija RD tretiranih violaceinom

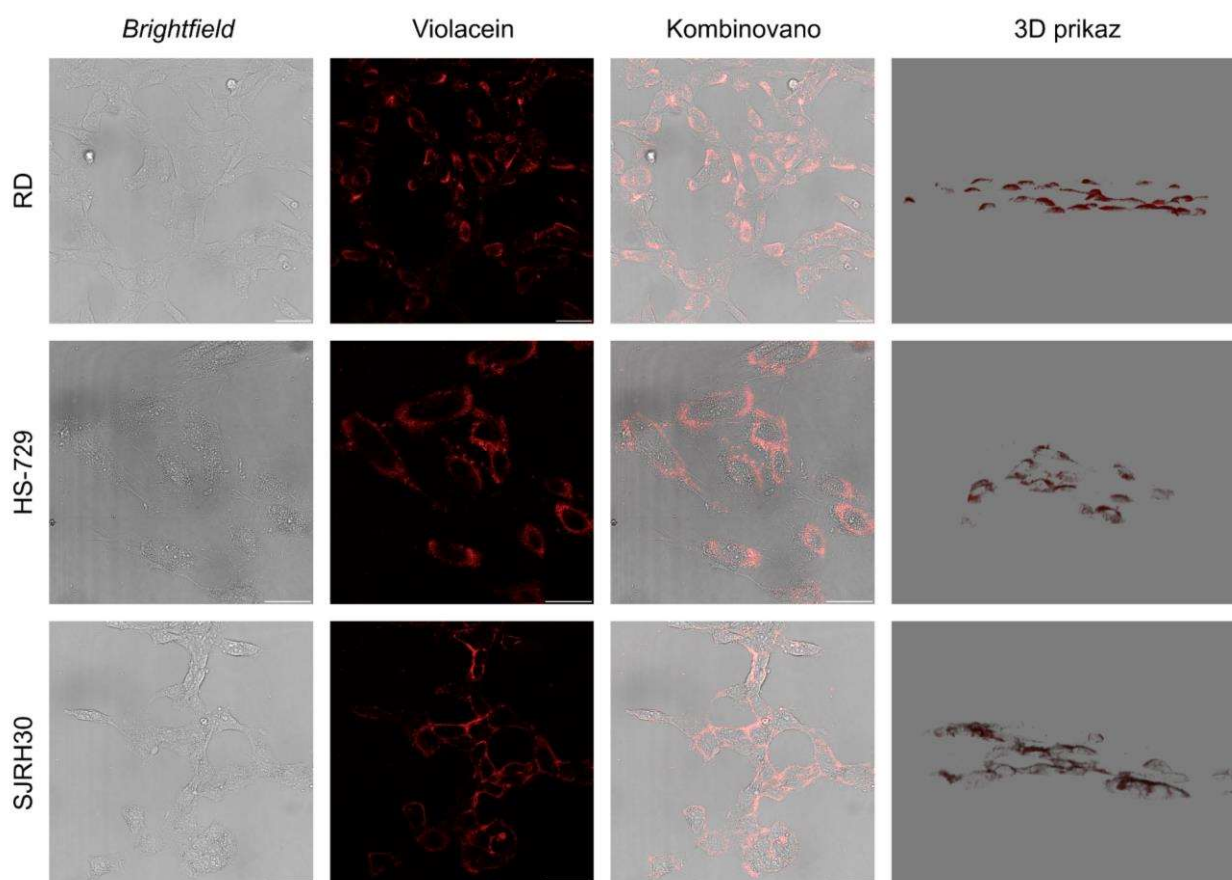
U cilju određivanja tipa ćelijske smrti izazvane violaceinom, RD ćelije su tretirane 24 h odgovarajućom IC_{50} koncentracijom ($0,88 \mu\text{M}$) ovog jedinjenja. Kontrolne ćelije su tretirane 0,1% DMSO-om. Na osnovu analize protočnom citofluorimetrijom nakon obeležavanja ćelija PI i AneksinomV-AF488, procenat vijabilnih (fluorescentno-neobebeženih) ćelija je iznosio 40%, dok je 1% bilo u ranoj apoptozi i 30% u kasnoj apoptozi (Slika 18). Tretman je doveo do statistički značajnog povećanja procenta dvostruko pozitivnih ćelija (obebeženih i PI i AneksinomV-AF488) u odnosu na kontrolu.



Slika 18. Analiza tipa ćelijske smrti nakon tretmana RD ćelija violaceinom. Prikazani su rezultati protočne citofluorimetrije nakon 24 h tretmana violaceinom koncentracije $0,88 \mu\text{M}$. Kvadranti na levom panelu su definisani kao: Q1 – PI⁺/Aneksin V⁻ (mrtve ćelije); Q2 – PI⁺/Aneksin V⁺ (ćelije u kasnoj apoptozi); Q3 – PI⁻/Aneksin V⁻ (žive ćelije); Q4 – PI⁻/AneksinV⁺ (ćelije u ranoj apoptozi). Prikazan je jedan od tri nezavisna eksperimenta. Kontrolne ćelije su tretirane 0,1% DMSO-om. Desni panel prikazuje procenat ćelija u svakom od kvadranta (Q1-Q4) iz tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom, * $p \leq 0,05$.

4.2.4. Interakcija violaceina sa ćelijama RMS

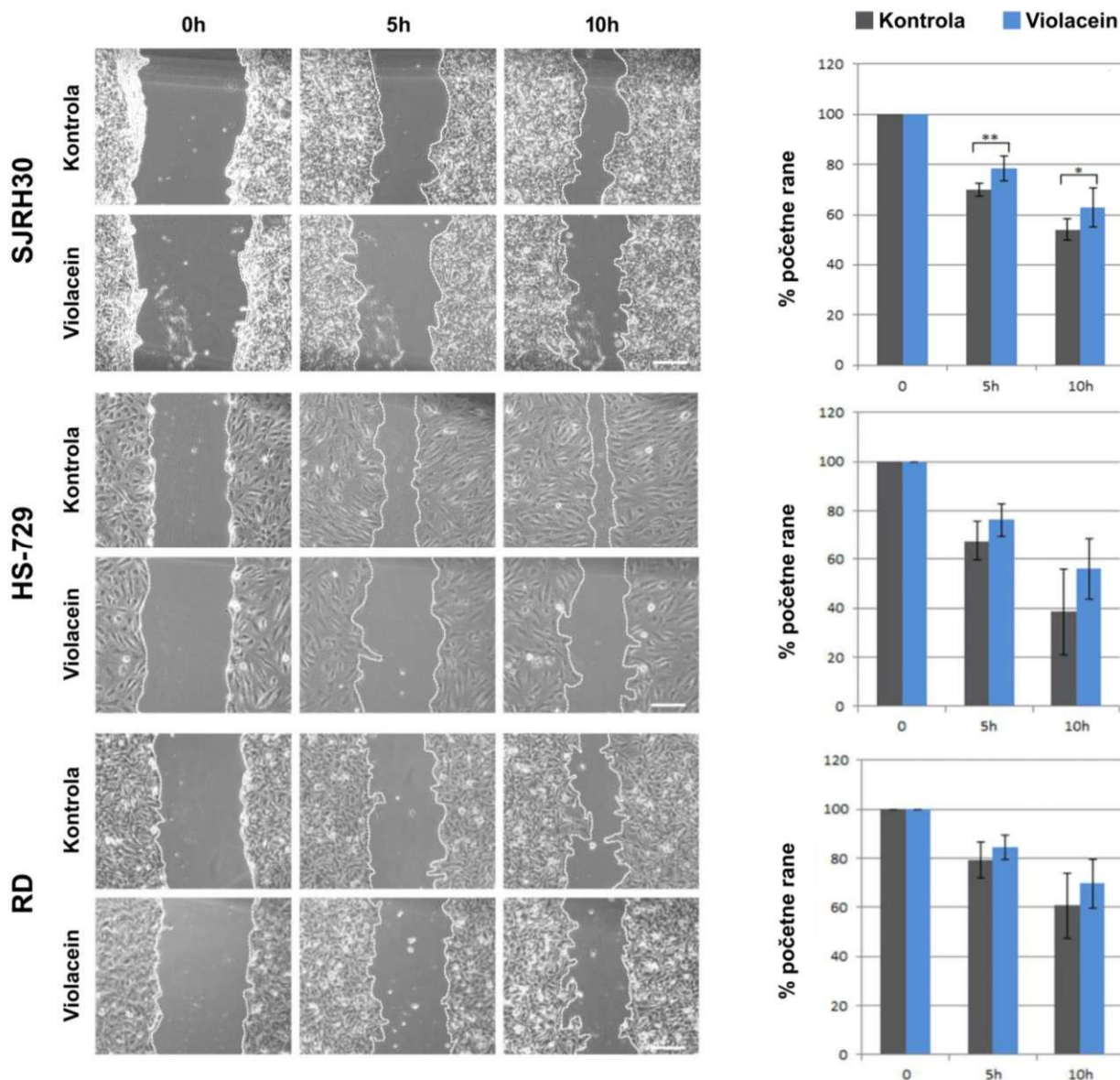
Interakcija violaceina sa ćelijama RMS praćena je u realnom vremenu zahvaljujući njegovoj autofluorescenciji. Ćelije su analizirane na konfokalnom mikroskopu tokom 24 h tretmana violaceinom u odgovarajućoj IC_{50} koncentraciji. Samo 15 minuta nakon dodavanja violaceina, zabeležena je njegova precipitacija na površini ćelija, što se može jasno videti sa 3D prikaza dobijenog rekonstrukcijom serije optičkih preseka (Slika 19). Ovaj fenomen se zadržao do kraja tretmana. Tokom ispitivanog vremenskog perioda, unutarćelijska lokalizacija violaceina nije primećena.



Slika 19. Vizualizacija violaceina na površini ćelija RMS nakon 15 min tretmana. Sleva nadesno: Morfologija tretiranih ćelija praćena DIC mikroskopijom (*Brightfield*); Autofluorescencija violaceina zabeleţena na 675 nm (crveni signal); Preklopljena slika; 3D prikaz. Linija razmere odgovara duţini od 50 μm .

4.2.5. Uticaj violaceina na migraciju ćelija RMS

Efekat violaceina na migraciju ćelija RMS ispitan je putem eseja zarastanja rane (eng. *wound healing assay*). Zatvaranje „rane” je praćeno u dve vremenske taćke: 5 h i 10 h nakon njenog kreiranja. Kao Ńto se moţe videti na Slici 20, kod ćelija tretiranih violaceinom procenat površine nepokrivene ćelijama je bio veći u poređenju sa ćelijama tretiranim 0,1% DMSO-om (kontrola) u obe vremenske taćke. U slućaju ćelijske linije SJRH30, rezultat je bio statistićki znaćajan ($p \leq 0,05$) u obe vremenske taćke, dok je u ćelijskim linijama HS-729 i RD usporavanje migracije bilo primetno, ali ne i statistićki znaćajno.

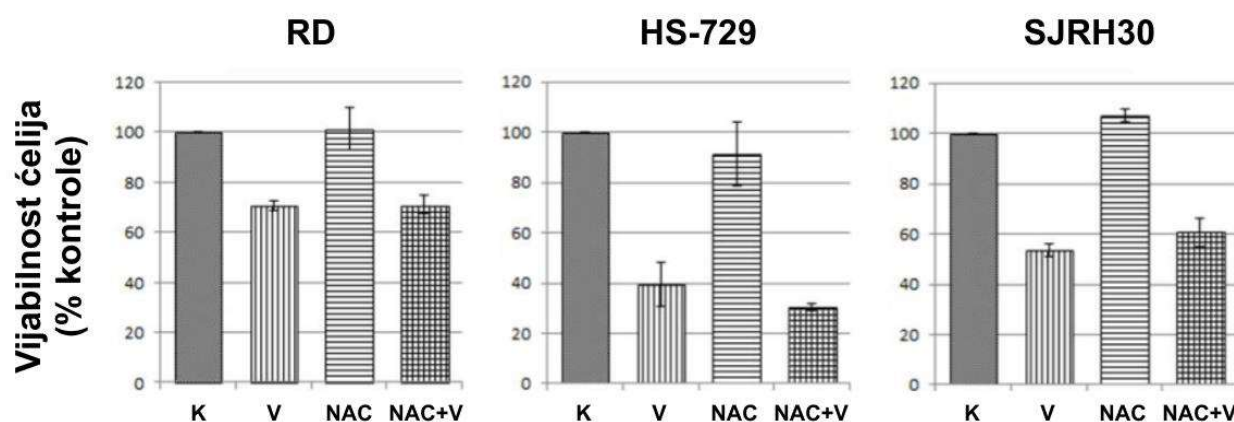


Slika 20. Efekat violaceina na migraciju ćelija RMS. Ćelije su tretirane odgovarajućim IC_{50} koncentracijama violaceina, dok su ćelije u kontroli izložene 0,1% DMSO-u kao rastvaraču. Prikazane su reprezentativne fotografije „rane” u momentu kad je napravljena (0 h), i 5 h i 10 h nakon njenog formiranja. Linija razmere odgovara 100 μ m. Histogrami ilustruju procenat površine nepokrivene ćelijama u odnosu na početnu površinu rane iz tri nezavisna eksperimenta. ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

4.2.6. Dejstvo violaceina na parametre oksidativnog stresa u ćelijama poreklom od RMS

Da bismo utvrdili da li violacein izaziva oksidativni stres u ćelijama RMS, ispitali smo citotoksičnost violaceina nakon tretmana ćelija antioksidantom i izmerili uticaj violaceina na nivoe reaktivnih vrsta kiseonika i lipidne peroksidacije.

U slučaju da violacein izaziva ćelijsku smrt preko oksidativnog stresa, tretman ćelija antioksidantom bi trebalo da dovede do povećanja broja preživelih ćelija nakon tretmana violaceinom. Ćelije su predtretirane antioksidantom N-acetil-cisteinom (NAC) u trajanju od 1 h, nakon čega su gajene u prisustvu violaceina naredna 24 h. Ovaj kombinovani režim nije doveo do promene u preživljavanju ćelija u poređenju sa kontrolnim ćelijama tretiranim violaceinom, koji je očekivano izazvao smanjeno preživljavanje u svim ćelijskim linijama (Slika 21).

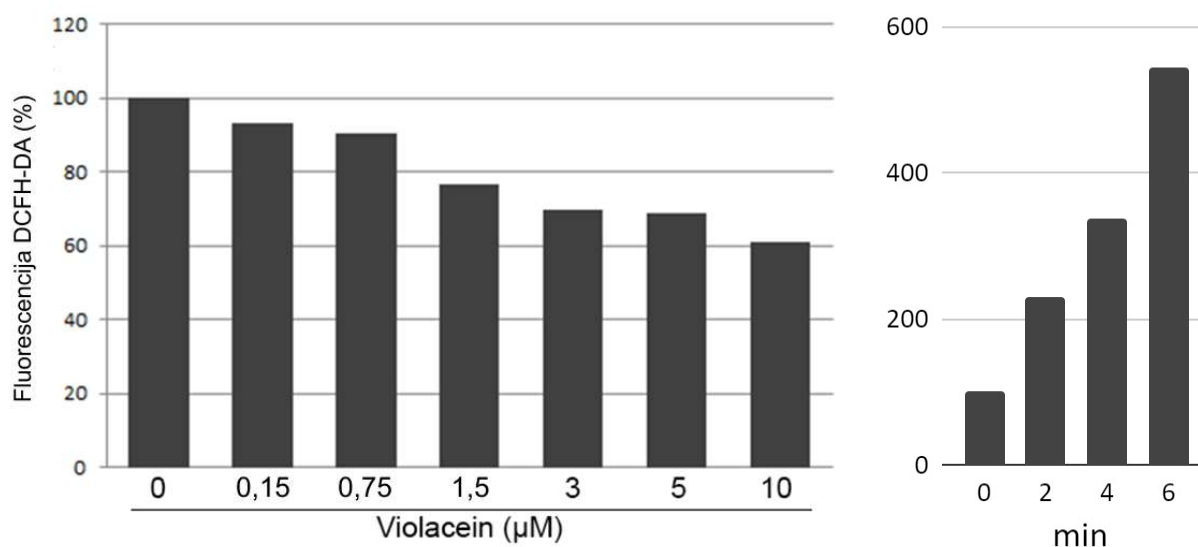


Slika 21. N-acetil-cistein nije uticao na smanjenje vijabilnosti ćelija indukovano violaceinom. Ćelije su preinkubirane sa 25 mM NAC-om u trajanju od 1 h, a potom su 24 h tretirane odgovarajućom IC_{50} koncentracijom violaceina (NAC+V). Kontrolne grupe su bile netretirane ćelije (K) i ćelije tretirane samo N-acetil-cisteinom (NAC) ili samo violaceinom (V). Rezultati su normalizovani u odnosu na vrednosti dobijene za netretirane ćelije (K).

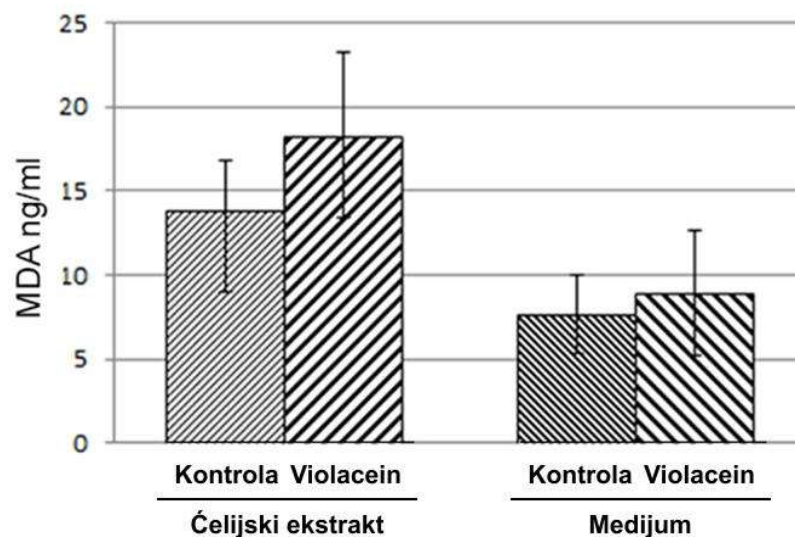
Da bismo utvrdili da li tretman violaceinom dovodi do povećanja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika, primenili smo DCFH esej. Produkcija ROS je kvantifikovana u RD ćelijama tretiranim rastućim koncentracijama violaceina, većim i manjim od IC_{50} (0,15, 0,75, 1,5, 3, 5 i 10 μ M). Stepenn fluorescencije DCFH-DA, koji odražava nivo produkcije ROS, nije pokazao razlike između kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih koncentracijama manjim od IC_{50} (Slika 22, levo), dok je tretman 1,5 μ M i većim koncentracijama redukovao stepenn fluorescencije DCFH-DA za 25 i više procenata. Kontrolni tretman 800 μ M vodonik-peroksidom je doveo do očekivanog povećanja produkcije ROS (Slika 22, desno).

Još jedan indikator oksidativnog stresa, lipidna peroksidacija, analiziran je određivanjem reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline. RD ćelije su prvo tretirane odgovarajućom IC_{50} koncentracijom violaceina tokom 24 h. U medijumu u kome su gajene ćelije i ćelijskim ekstraktima je, potom, izmeren nivo lipidne peroksidacije, izražen u ekvivalentima MDA. Sadržaj MDA između kontrolnih i tretiranih ćelija nije bio statistički značajno različit (Slika 23).

Dobijeni rezultati ukazuju da dejstvo violaceina na ćelije RMS nije povezano sa oksidativnim stresom.



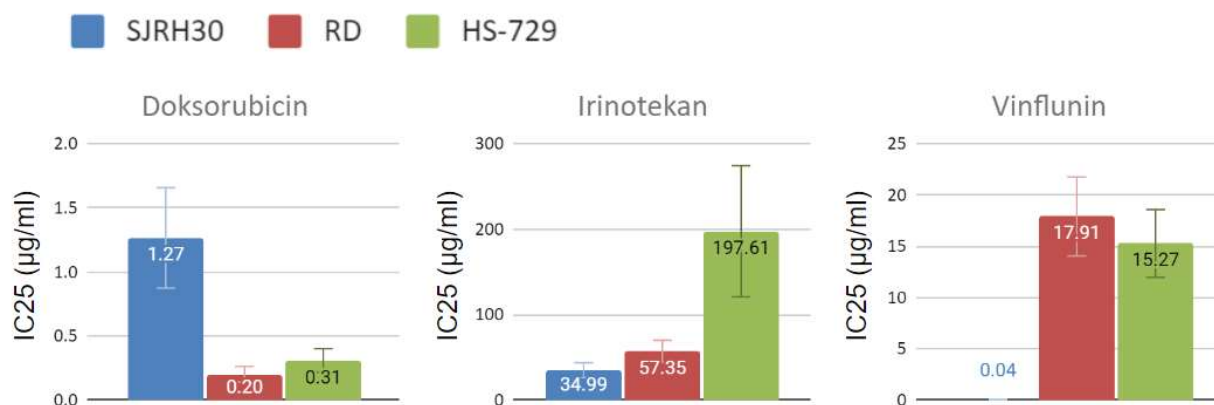
Slika 22. Tretman violaceinom nije indukovao produkciju reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijama RMS. Levo - Nivo reaktivnih vrsta kiseonika izmeren primenom DCFH-DA eseja u RD ćelijama izloženim naznačenim koncentracijama violaceina u toku 2 h. Fluorescencija DCFH-DA u ćelijama tretiranim violaceinom je normalizovana u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije. Desno - Produkcija ROS u RD ćelijama nakon tretmana 800 µM vodonik-peroksidom u trajanju od 6 minuta. Rezultat je izražen relativno u odnosu na trenutak pre dodavanja vodonik-peroksida.



Slika 23. Tretman violaceinom nije indukovao lipidnu peroksidaciju u ćelijama RMS. Lipidna peroksidacija je analizirana merenjem koncentracije MDA u ćelijskim ekstraktima i medijumu u kome su gajene ćelije. RD ćelije su tretirane IC₅₀ koncentracijom violaceina (0,88 µM) u trajanju od 24 h. Netretirane ćelije su služile kao kontrola. Koncentracija MDA je izražena u ng/mg ukupnih proteina u uzorku.

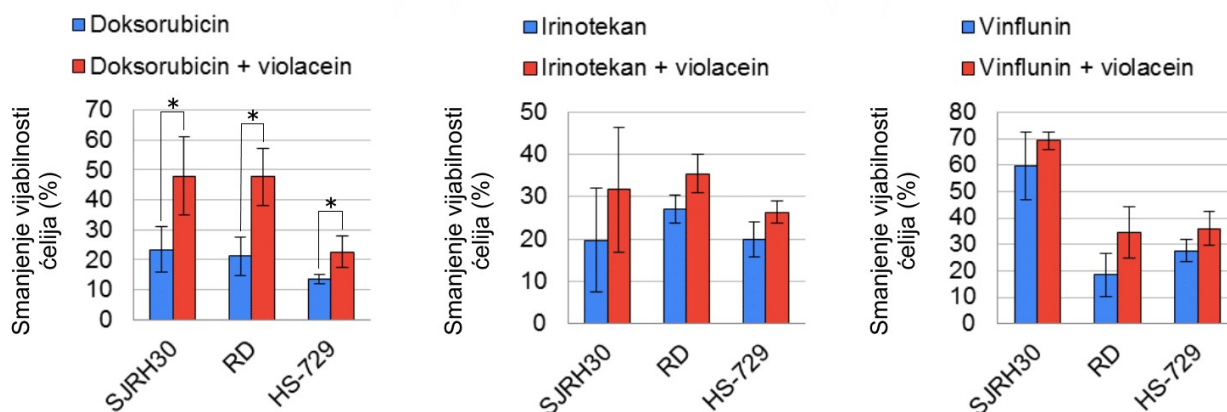
4.2.7. Sadejstvo violaceina sa konvencionalnim hemioterapeuticima

Jedan od najčešće primenjivanih režima u lečenju RMS predstavlja kombinovani tretman irinotekanom i vinkristinom. Takođe, česta je primena doksorubicina, međutim, s obzirom na izražen kardiotoksični efekat, izbegava se kod pedijatrijskih pacijenata. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitano je sadejstvo violaceina sa doksorubicinom, irinotekanom i analogom vinkristina, vinfluninom. Najpre smo, na osnovu rezultata MTT testa, odredili IC₂₅ koncentracije ova tri hemioterapeutika za RMS ćelije (Slika 24).



Slika 24. IC₂₅ vrednosti doksorubicina, irinotekana i vinflunina za ćelijske linije RMS. Vrednosti su izražene u µg/ml. Prikazane su srednje vrednosti ± standardne devijacije koje predstavljaju rezultate tri nezavisna eksperimenta.

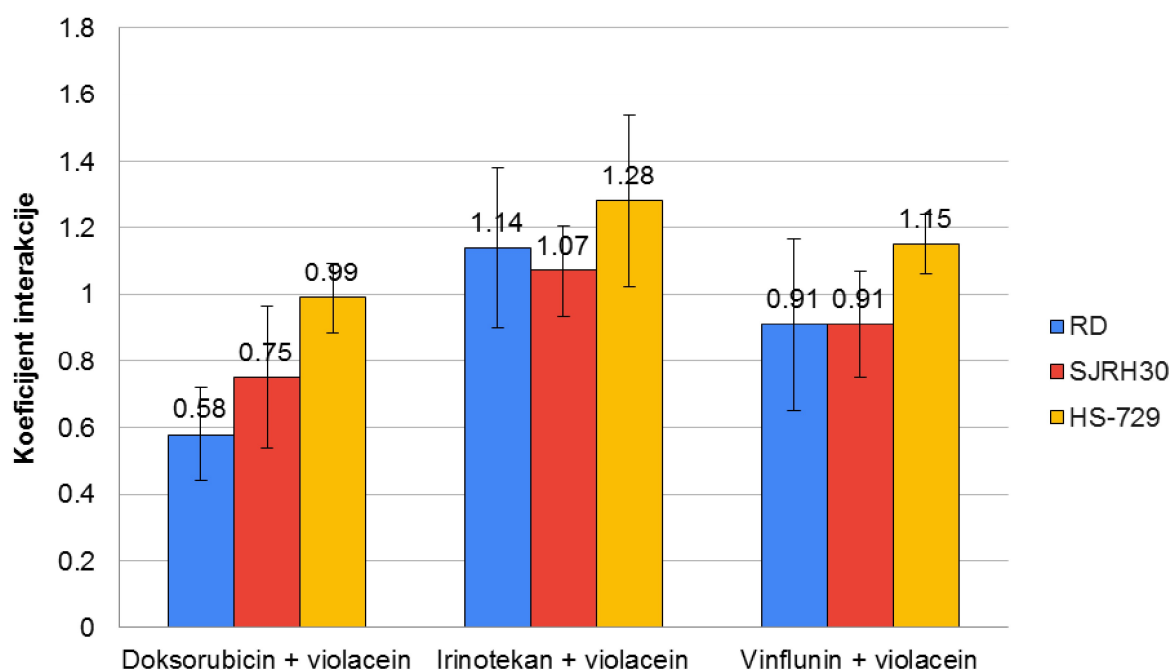
Potom su hemioterapeutici u koncentraciji IC₂₅ primenjeni samostalno i u kombinaciji sa violaceinom koncentracije IC₂₅. Svi eksperimenti su urađeni u tri replikata za svaku od ćelijskih linija i za svaki od ispitivanih hemioterapeutika, u tehničkim četvoroplikatima. Rezultati su predstavljeni kao procentualno smanjenje broja vijabilnih ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom. Kombinovani tretman je doveo do povećanja broja umrlih ćelija (Slika 25), u odnosu na ćelije koje su bile tretirane samo jednim hemioterapeutikom odgovarajuće IC₂₅ koncentracije. Rezultat je bio statistički značajan ($p \leq 0,05$) za sve ćelijske linije tretirane kombinacijom violaceina i doksorubicina, dok violacein nije imao statistički značajan uticaj na efekat irinotekana i vinflunina.



Slika 25. Violacein pojačava citotoksični efekat hemioterapeutika. Rezultati su predstavljeni kao procentualno smanjenje broja vijabilnih ćelija u odnosu na broj ćelija u kontroli. Prikazane su srednje vrednosti \pm standardne devijacije dobijene na osnovu rezultata tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti su upoređene Studentovim t-testom, * $p \leq 0,05$.

Da bismo odredili da li se radi o sinergističkom, aditivnom ili antagonističkom dejstvu ispitivanih agenasa, izračunali smo koeficijent interakcije (eng. *coefficient of drug interaction*, CDI). U računicu su ušle tri eksperimentalne grupe: ćelije tretirane violaceinom, ćelije tretirane hemioterapeutikom i ćelije izložene kombinovanom tretmanu violaceinom i hemioterapeutikom. Efekat je izražen relativno u odnosu na kontrolne netretirane ćelije. Primijenjena je formula $CDI = (E_A + E_B) / E_{AB}$, gde E_A i E_B predstavljaju efekte pojedinačnih agenasa, a E_{AB} efekat njihove kombinacije (Foucquier i Guedj, 2015). Odgovarajuće p vrednosti su izražene na osnovu značajnosti interakcije dobijene faktorijalnom analizom varijanse efekata individualnih i kombinovanih tretmana (Slinker, 1998).

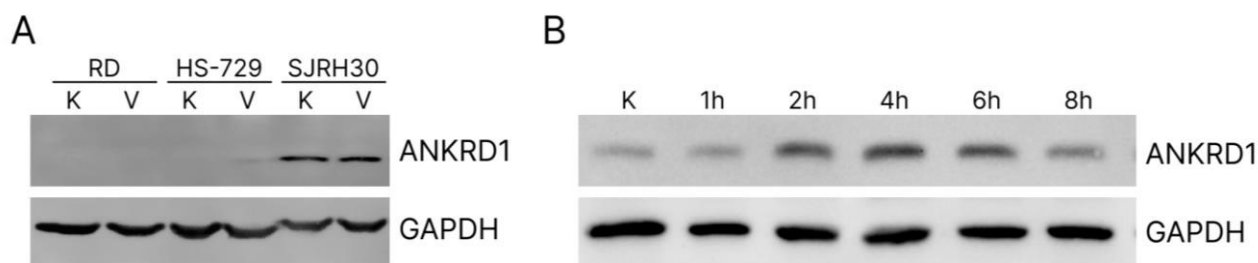
Izračunavanjem CDI koeficijenta utvrdili smo da je kombinovani tretman violaceina i ispitivanih hemioterapeutika imao aditivni efekat ($CDI \sim 1$) u svim ćelijskim linijama RMS, osim kombinovanog tretmana violaceinom i doksorubicinom koji je pokazao sinergistički efekat u pogledu smanjenog preživljavanja RD ćelija ($CDI = 0,58$) (Slika 26). Međutim, faktorijalnom analizom varijanse nije dobijena statistička značajnost interakcije doksorubicina i violaceina ($p = 0,11$).



Slika 26. Koeficijent interakcije (CDI) violaceina sa hemioterapeuticima dokсорubicinom, irinotekanom i vinfluninom. Na osnovu efekata pojedinačnih i kombinovanih tretmana violaceinom i jednim od ispitivanih hemioterapeutika izračunate su CDI vrednosti prema metodi opisanoj u Fouquier i Guedj, 2015. Vrednosti CDI veće, manje ili jednake jedinici ukazuju na antagonistički, sinergistički i aditivni efekat, redom.

4.2.8. Uticaj violaceina na ekspresiju proteina ANKRD1

S obzirom da hemioterapeutici, kao što su dokсорubicin i cisplatina, utiču na nivo ekspresije ANKRD1 (Aihara *et al*, 2000b; Scurr *et al*, 2008), ispitali smo da li violacein menja njegovu ekspresiju u ćelijskim linijama RMS. Tretman violaceinom u trajanju od 24 h nije doveo do promene u ekspresiji ANKRD1 (Slika 27, A). Međutim, tokom prvih 4 h u ćelijskoj liniji SJRH30 došlo je do prolaznog porasta ekspresije ANKRD1, koja se do osmog sata vratila na bazalni nivo (Slika 27, B). U preliminarnim eksperimentima na RD i HS-729 ćelijama violacein nije doveo do promene u ekspresiji ANKRD1 u prvih 8 h tretmana.



Slika 27. Violacein nema uticaja na ekspresiju ANKRD1 u ćelijama RMS. A - Ekspresija ANKRD1 u ćelijama tretiranim IC₅₀ koncentracijom violaceina (V) u trajanju od 24 h. Prikazan je jedan od dva nezavisna eksperimenta. B - Ekspresija ANKRD1 u SJRH30 ćelijama tokom 8 h tretmana IC₅₀ koncentracijom violaceina. Tretman 0,1% DMSO-om je služio kao negativna kontrola (K). Prikazan je reprezentativni od tri nezavisna eksperimenta.

5. DISKUSIJA

U ovoj disertaciji razmatrana su dva izazova vezana za RMS. Jedan se odnosi na proučavanje proteina ANKRD1, novog potencijalnog targeta za koji je pokazano da može da ima klinički značaj. ANKRD1 je detaljno proučavan u mišićnim ćelijama, u kojima ima ulogu u diferencijaciji i mehanosignalizaciji, kako u fiziološkim uslovima, tako i u uslovima stresa (Jeyaseelan *et al*, 1997; Kuo *et al*, 1999; Miller *et al*, 2003). Paralelna istraživanja su pokazala povećanu ekspresiju ANKRD1 u ćelijama različitih primarnih tumora, uključujući RMS i karcinom jajnika (Ishiguro *et al*, 2002; Scurr *et al*, 2008). Osim toga, podaci iz baze *The Human Protein Atlas* ukazuju na povećan nivo ANKRD1 transkripta u ćelijskim linijama poreklom iz nekoliko vrsta tumora, kao što su RMS i karcinomi testisa, jetre, jajnika i pankreasa. Dodatno, pokazano je da ANKRD1 učestvuje u progresiji tumora jajnika, dojke i pankreasa (Lei *et al*, 2015; Kikuchi *et al*, 2016; Hui *et al*, 2019), kao i u hemorezistenciji tumora jajnika i pluća (Scurr *et al*, 2008; Takahashi *et al*, 2018). U RMS, ANKRD1 je prethodno istraživan kao potencijalni dijagnostički marker. Ishiguro i saradnici su izvestili da je nivo ANKRD1 u RMS veći nego u drugim tipovima sarkoma, ukazujući na njegov potencijal kao markera za diferencijalnu dijagnostiku (Ishiguro *et al*, 2008).

Podstaknuti nalazima o ulozi ANKRD1 u tumorigenezi i njegovom potencijalu za primenu kao dijagnostičkog markera, sprovedi smo studiju u kojoj smo ispitali profil i regulaciju njegove ekspresije u komercijalnim ćelijskim linijama izvedenim iz embrionalnog (RD i HS-729) i alveolarnog (SJRH30) RMS. Ova dva tipa RMS se razlikuju po morfološkim i molekularno-genetičkim karakteristikama. RD linija potiče od biopsijskog uzorka embrionalnog RMS sedmogodišnje devojčice i karakteriše je amplifikacija *MYC* onkogene, mutacija *NRAS*-a i homozigotna mutacija u DNK vezujućem domenu p53 (Missiaglia *et al*, 2009; Schaaf *et al*, 2010; Miyachi *et al*, 2009). HS-729 je ćelijska linija primarnog embrionalnog RMS izolovana iz mišića 74-godišnjeg muškarca. S obzirom da je pojava ovog tipa RMS jako retka kod starije populacije, negde je označena i kao linija pleomorfog RMS (Missiaglia *et al*, 2009). Ima homozigotnu mutaciju koja dovodi do aminokiselinske zamene H179R u p53. Mutirani p53 ne može da indukuje ekspresiju ciljnih gena uključenih u apoptozu i zaustavljanje ćelijskog ciklusa (Ashur-Fabian *et al*, 2007). Linija SJRH30, izvedena iz metastaze alveolarnog RMS 16-godišnjeg pacijenta muškog pola, ima translokaciju t(2;13) i skoro triploidni broj hromozoma (Douglass *et al*, 1987; Barr *et al*, 1998). U genomu ćelija ove linije amplifikovan je region koji obuhvata gen za ciklin-zavisnu kinazu 4 odgovornu za progresiju kroz G1 fazu ćelijskog ciklusa (Khatib *et al*, 1993; Weber-Hall *et al*, 1996; Berner *et al*, 1996). Osim toga, detektovana je i heterozigotna mutacija koja rezultuje smanjenjem DNK vezujuće aktivnosti p53 (Miyachi *et al*, 2009). Ova ćelijska linija se, zajedno sa RD, veoma često koristi u istraživanju RMS.

U ćelijskim linijama RD i SJRH30 potvrdili smo ekspresiju transkripta ANKRD1, što je u saglasnosti sa podacima navedenim u bazi *The Human Protein Atlas*. Rezultati naših eksperimenata pokazuju sličan nivo ANKRD1 iRNK u ove dve ćelijske linije i HS-729 ćelijama, i neizmenjenu primarnu strukturu ORF-a u ovim ćelijama, koja odgovara *wild-type* sekvenci. Suprotno od sličnih nivoa iRNK, protein ANKRD1 je pokazao razlike u ekspresiji među testiranim ćelijskim linijama, što ukazuje na različite regulatorne mehanizme koji kontrolišu nivo ovog proteina u ćelijama RMS. Western blot analizom detektovali smo ANKRD1 u ćelijama SJRH30 i RD, sa izraženijom ekspresijom u SJRH30, dok u HS-729 ćelijama odgovarajući signal nije uočen, čak ni nakon imunoprecipitacije. Ipak, ANKRD1 je detektovan u HS-729 ćelijama metodom imunocitohemije, što može biti pripisano razlikama u osetljivosti metoda ili

afinitetima antitela u različitim metodama (Burry, 2011). Proteazomalna degradacija može objasniti razlike između nivoa ANKRD1 iRNK i proteina, kao i razlike u količinama endogenog ANKRD1 u proteinskim ekstraktima dobijenim iz različitih pasaža, budući da je inhibicija proteazoma dovela do povećanja nivoa proteina ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS. Slično drugim proteinima sa PEST sekvencama koje služe kao proteolitički signali, ANKRD1 se odlikuje kratkim unutarćelijskim poluživotom zbog brze degradacije u 26S proteazomima (Badi *et al*, 2009; Samaras *et al*, 2012). Ovaj mehanizam bi takođe mogao doprineti izostanku povećane ekspresije ANKRD1 u ćelijama RMS. Međutim, u skladu sa prethodnim studijama (Piazzi *et al*, 2021), postignuto je povećanje ekspresije ANKRD2, srodnog proteina koji deli strukturne motive sa ANKRD1, uključujući PEST sekvence. Dodatno, postignuto je povećanje ekspresije ANKRD1 u HeLa ćelijama, uprkos njegovom kratkom poluživotu usled proteazomalne degradacije u ovoj ćelijskoj liniji (Badi *et al*, 2009). Ovi rezultati ukazuju da ćelije RMS ne poseduju mehanizme koji mogu da zaštite ANKRD1 od proteazomalne degradacije i da je osetljivost na povećan nivo ANKRD1 specifična osobina ćelija RMS. Shodno tome, mehanizmi regulacije nivoa ANKRD1 u ovim tumorskim ćelijama zaslužuju detaljnija istraživanja. Vredelo bi ispitati i da li je ANKRD1 uključen u inhibiciju rasta ćelija RMS usled gubitka proteazomalne aktivnosti indukovane tretmanom bortezomibom (Bersani *et al*, 2008; Péron *et al*, 2012). Treba imati u vidu i da proteazomalna degradacija ANKRD1 u ćelijama RMS dovodi u pitanje prikladnost ovog proteina kao potencijalnog markera RMS koju su predložili Ishiguro i saradnici (Ishiguro *et al*, 2008).

U literaturi su poznati slični slučajevi da ćelije pokazuju intoleranciju na povećanje ekspresije određenih gena. Lee i saradnici su pokazali da mišje embrionalne ćelije ne tolerišu povećanu ekspresiju SUMO1 (eng. *small ubiquitin like modifier 1*), prilagođavajući se smanjenjem njegovog nivoa (Lee *et al*, 2019). Analogna zapažanja se odnose na ekspresiju glukokortikoidnog receptora u ćelijskim linijama sitno-ćelijskog karcinoma pluća (Sommer *et al*, 2007) i povećanu ekspresiju sirtuina 6 u tumorskim ćelijskim linijama (Van Meter *et al*, 2011). Lista se nastavlja, uključujući mnoge pro-apoptotske proteine i tumor supresore, kao što su BAX, kaspaza-9, beclin-1 i p21 (Pastorino *et al*, 1998; Druskovic *et al*, 2006; Zhu *et al*, 2018; Mansour *et al*, 2023).

U prethodnim istraživanjima, ANKRD1 je okarakterisan kao pro-apoptotski ili anti-apoptotski protein, u zavisnosti od patološkog konteksta. Egzogeno ekspresija Ankrd1 smanjila je apoptozu kardiomiocita miša izazvanu hipoksijom, kroz stimulaciju ekspresije gena *Bcl-2* (eng. *B-cell lymphoma 2*), kako *in vitro* tako i *in vivo* (Zhang *et al*, 2016). Suprotno, Shen i saradnici su pokazali da je povećana ekspresija Ankrd1 stimulisala apoptozu kardiomiocita kada su srca bila stimulisana angiotenzinom II ili izložena pritisku (Shen *et al*, 2015). Na vezu između ANKRD1 i apoptoze dodatno ukazuje prisustvo više predviđenih mesta za sečenje kaspazama (Ling *et al*, 2017). Nadalje, ANKRD1 je povezan sa povećanjem apoptotske smrti u humanim ćelijskim linijama poreklom od tumora jetre, pluća, kolona, prostate i pankreasa (Park *et al*, 2005; Jimenez *et al*, 2017; Hui *et al*, 2019). Suprotno tome, povećana ekspresija ANKRD1 je promovisala proliferaciju i invaziju ćelija osteosarkoma (Yin i Tong, 2022), a inhibicija ANKRD1 je povećala osetljivost ćelija karcinoma jajnika na apoptozu izazvanu stresom endoplazmatičnog retikuluma (Lei *et al*, 2015). Uloga ANKRD1 u modulaciji apoptoze u različitim tipovima tumora, sa njegovim diferencijalnim pro- i anti-apoptotskim efektima, dodatno komplikuje razumevanje njegove funkcije u ćelijama RMS.

Funkcija ANKRD1 u tumorskim ćelijama, posebno u apoptozi, trebalo bi da se razmatra u odnosu na p53. Pored njihove interakcije na nivou proteina, prethodno je pokazano da ANKRD1 povećava aktivnost p53 (Kojic *et al*, 2010). Osim toga, povećana ekspresija ANKRD1 stimuliše transkripciju *TP53*, indukujući apoptozu kardiomiocita (Shen *et al*, 2015). Spekulacija da bi povećana ekspresija ANKRD1 mogla biti uključena u indukciju apoptotske smrti ćelija RMS putem aktivacije p53 ostaje neispitana, pri čemu se mora voditi računa o mutacionom statusu gena *TP53*. Takođe, bilo bi značajno ispitati interakciju ANKRD1 sa NF- κ B, s obzirom na sposobnost ANKRD1 da inhibira aktivnost ovog transkripcionog regulatora (Laure *et al*, 2010; Liu *et al*, 2015), koji promoviše maligni fenotip ćelija RMS i predstavlja metu agenasa usmerenih protiv ovog tipa tumora (Cleary *et al*, 2017; Berger *et al*, 2012; Keller i Guttridge, 2013).

U mišićnim ćelijama, ANKRD1 ima dvostruku, citoplazmatsku i jedarnu lokalizaciju. Komponenta je mehanosenzornog kompleksa sarkomere i pod uticajem mehaničkih stimulusa premešta se u jedro gde učestvuje u regulaciji ekspresije gena uključenih u odgovor na stres (Bang *et al*, 2001; Miller *et al*, 2003). U ćelijama RMS takođe smo detektovali i citoplazmatsku i jedarnu lokalizaciju ANKRD1, u skladu sa nalazima Ishiguro i saradnika (Ishiguro *et al*, 2002). Međutim, u suprotnosti sa njihovim rezultatima, otkrili smo veću zastupljenost ANKRD1 u jedru u poređenju sa citoplazmom. To bi moglo proizaći iz razlika u tipovima uzoraka (preseci tkiva naspram ćelijskih linija) ili upotrebi antitela sa različitom osetljivošću i epitopima. Jedarna lokalizacija ANKRD1 ukazuje na njegovu regulatornu ulogu i u ćelijama RMS. Stoga bi sledeći korak bila identifikacija gena u čijoj regulaciji ekspresije učestvuje. S druge strane, utišavanjem *ANKRD1* u ćelijskim linijama koje eksprimiraju detektabilne količine ANKRD1 bi se mogli otkriti nizvodni targeti ANKRD1 specifični za RMS.

U jedrima ćelija RD i HS-729, detektovali smo ANKRD1 u strukturama nalik na jedarna tela. Prva pretpostavka je bila da su to PML jedarna tela jer je poznato da drugi član MARP porodice, ANKRD2, ko-lokalizuje sa proteinom PML u PML telima humanih mioblasta (Kojic *et al*, 2004). Međutim, ko-lokalizacija ANKRD1 sa markerom PML tela nije detektovana. Nakon toga, testirali smo da li je ANKRD1 lokalizovan u Kahalovim telima, nemembranskim organelama važnim za funkcionisanje visoko metabolički aktivnih ćelija, uključujući tumorske. Konfokalnom mikroskopijom smo detektovali da ANKRD1 i koilin, rezidentni protein Kahalovih tela ko-lokalizuju u jedrima RMS ćelija.

Kahalova tela su ključna za sazrevanje malih jedarnih ribonukleoproteina neophodnih za procesovanje pre-iRNK i modifikaciju ribozomalne RNK (Staněk, 2017). Promene u obradi RNK mogu doprineti tumorigenezi utičući na ekspresiju gena i funkcionalnost proteina uključenih u rast, apoptozu i metastazu. Osim toga, Kahalova tela učestvuju u formiranju i sazrevanju telomeraze. U većini tumorskih ćelija, telomeraza je prekomerno aktivirana, što omogućava neograničenu proliferaciju i produžava život ćelija održavanjem dužine telomera (Zhu *et al*, 2004; Machyna *et al*, 2013). Kahalova tela imaju ulogu i u odgovoru na stres i održavanju integriteta genoma (Henriksson i Farnebo, 2015; Bergstrand *et al*, 2019). Pored toga, usko su povezana sa jedarcetom, a dinamika njihove interakcije može biti izmenjena stresom jedarceta (Boulon *et al*, 2010), stanjem izazvanim primenom različitih hemioterapeutika. Ovaj stres utiče na biogenezu ribozoma i ćelijski metabolizam na načine koji smanjuju preživljavanje i proliferaciju malignih ćelija (Ishihara *et al*, 2022; Potapova *et al*, 2023).

Naše istraživanje prvi put dokumentuje prisustvo ANKRD1 u Kahalovim telima. Iako ima mnogo poznatih proteinskih partnera, interakcije ANKRD1 sa rezidentnim proteinima Kahalovih tela kao što su fibrilarin, SMN (eng. *survival motor neuron*) i koilin nisu zabeležene. Takođe, nema dokaza da ANKRD1 može vezati molekule RNK. Međutim, prijavljena je interakcija ANKRD1 sa YB-1 (Zou *et al*, 1997), RNK-vezujućim proteinom koji se razmatra kao terapijski target u RMS (Oda *et al*, 2008). Iako retko, prisustvo YB-1 u Kahalovim telima (Bogolyubova *et al*, 2014) i njegova uloga kao komponente splajsozoma (Chansky *et al*, 2001; Rapp *et al*, 2002) usmeravaju dalja istraživanja na interakciju ANKRD1 sa YB-1 i srodnim proteinima u Kahalovim telima. Drugi mogući pravac bi bilo istraživanje da li ANKRD1, kao nizvodni target signalnog puta Hippo u odgovoru na oksidativni stres (Jiménez *et al*, 2017; Jin *et al*, 2022), učestvuje u održavanju redoks homeostaze kojom Kahalova tela upravljaju u tumorskim ćelijama (Beneventi *et al*, 2021). Jedan od ključnih proteina koji učestvuju u odgovoru na različite tipove stresa je upravo marker Kahalovih tela, koilin (Boulon *et al*, 2010), te bi bilo značajno ispitati da li pored ko-lokalizacije, ANKRD1 i koilin interaguju.

Iako je prisustvo ANKRD1 unutar fibrilarnog centra jedarceta dokumentovano u različitim ćelijskim linijama (protein-atlas.org), u ovoj disertaciji nije detektovan u drugim jedarnim strukturama osim Kahalovih tela. S obzirom na dinamički odnos i razmenu proteina i molekula RNK između Kahalovih tela i jedarceta u biogenezi ribozoma, lokalizaciji telomeraze, RNK interferenciji i odgovoru na stres (Trinkle-Mulcahy i Sleeman 2017), translokacija ANKRD1 između Kahalovih tela i jedarceta može predstavljati temu za dalje istraživanje. Na mogućnost njegove translokacije između Kahalovih tela i drugih ćelijskih i/ili jedarnih odeljaka, ukazuje i to da nisu sva Kahalova tela bila pozitivna na ANKRD1. Takođe, činjenica da je ANKRD1 detektovan u Kahalovim telima RD i HS-729, ali ne i u Kahalovim telima SJRH30 linije, sugeriše mogućnost da je njegova lokalizacija u ovim jedarnim telima specifična za ERMS.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pružaju nove uvide u ekspresiju i regulaciju ANKRD1 u ćelijama RMS. Razlika između nivoa ANKRD1 proteina i iRNK, intolerancija ćelija RMS na povećanu ekspresiju ANKRD1 i njegova lokalizacija u Kahalovim telima ukazuju na jedinstven status ovog proteina u ćelijama RMS. Karakterizacija endogene ekspresije ANKRD1 u ćelijama RMS predstavlja osnovu za buduća istraživanja njegove uloge u patogenezi RMS, koja mogu doprineti identifikaciji novih terapijskih targeta.

Drugi izazov kojim se bavi ova disertacija je poboljšanje terapijskih opcija uvođenjem violaceina, jedinjenja prirodnog porekla sa dokumentovanim antitumorskim dejstvom, koje nije testirano na RMS, kroz analizu njegovog antitumorskog dejstva na ćelijama porekom od embrionalnog i alveolarnog RMS.

Embrionalni RMS se najčešće javlja kod dece mlađe od 10 godina i ima petogodišnju stopu preživljavanja blizu 75%. Kod alveolarnog RMS, koji se sa sličnom učestalošću javlja kod dece i adolescenata, petogodišnja stopa preživljavanja je manja od 50% (Ognjanovic *et al*, 2009). Najlošiju prognozu imaju pacijenti sa refraktornom bolešću ili recidivom, gde preživljavanje iznosi od 10 do 30% (Shern *et al*, 2015). Odrasli sa RMS imaju preživljavanje od 26,6% do 61% (Sultan *et al*, 2009; Ferrari *et al*, 2003; Noujaim *et al*, 2015).

Lečenje podrazumeva mesece intenzivnih terapija koje mogu dovesti do ozbiljnih komplikacija koje ugrožavaju život pacijenata, poput infekcija, oštećenja organa i teške neutropenije (Gupta *et al*, 2017). Zbog visokih doza hemioterapije i zračenja, neki pacijenti mogu doživeti trajne

posledice, koje uključuju pojavu sekundarnih maligniteta, kardiovaskularnih problema, problema sa fertilitetom i negativnih uticaja na rast i razvoj (Punyko *et al*, 2005; Diller *et al*, 2009). S obzirom na to, fokus je na razvoju novih, ciljanih terapija koje bi smanjile štetne efekte i poboljšale prognozu, posebno kod pacijenata s metastatskom bolešću ili recidivom (Skapek *et al*, 2019).

S obzirom na relativno malu populaciju obolelih na godišnjem nivou, kao i trajanje kliničkih ispitivanja, testiranje novih potencijalnih agenasa za lečenje je ograničeno. Istraživanja na ćelijskim linijama i *in vivo* modeli ksenografta doprinose naporima da se što efikasnije identifikuju novi potencijalni tretmani u prekliničkoj fazi razvoja novih lekova. Ako se pokažu obećavajućim, ispitivani agensi mogu zatim biti testirani na ljudima i upoređeni sa standardnim agensima za terapiju. U cilju da doprinesemo poboljšanju terapije RMS, ispitali smo bakterijski pigment violacein, kao novi potencijalni terapeutski agens, koristeći ćelijske linije RMS.

Violacein, ljubičasti derivat indola, ispoljava širok spektar bioloških aktivnosti sa kliničkim značajem (Durán *et al*, 2016; Park *et al*, 2021). Zajedno sa drugim prirodnim produktima, istražuje se kao potencijalni antitumorski terapeutik sa ciljem razvoja bezbednijih (i pristupačnijih) režima hemioterapije. Nekoliko studija pokazalo je da violacein nadjačava neke od ključnih karakteristika malignih ćelija kao što su izbegavanje apoptoze i sposobnost metastaze i invazije tkiva (Durán *et al*, 2021). Pokazano je da izaziva smrt ćelija i inhibiciju proliferacije i migracije ćelijskih linija poreklom od različitih tipova tumora, uključujući leukemiju, tumore kolona, pluća, kože, glave i vrata, mozga i dojke (Park *et al*, 2021). Prema našem saznanju, efekat violaceina na ćelijske linije izvedene od pedijatrijskih sarkoma do sada nije istraživan. Samo su Hassani i saradnici istraživali jednu vrstu bakterijskog pigmenta kao potencijalnog antitumorskog agensa za RMS. Njihova studija je pokazala da plavi bakterijski pigment piocijanin inhibira rast i izaziva apoptozu RD ćelija (Hassani *et al*, 2012). U ovoj disertaciji ispitan je efekat violaceina na ćelijskim linijama RD i HS-729, poreklom od najčešćeg embrionalnog podtipa, i na liniji SJRH30, poreklom od agresivnijeg alveolarnog podtipa RMS.

Za svaku od ispitivanih linija odredili smo IC_{50} vrednosti violaceina. Vrednosti su se kretale od 0,66 μM (za HS-729) do 0,88 μM (za RD ćelije), što je nešto niže u poređenju sa literaturnim podacima za druge tumorske ćelijske linije, gde IC_{50} obično varira od 1 do 5 μM (Saraiva *et al*, 2004; de Carvalho *et al*, 2006; Bromberg *et al*, 2010). Najosjetljivije na violacein su ćelijske linije MOLT-4 (leukemija), NCI-H460 (karcinom pluća) i KM12 (karcinom debelog creva) sa IC_{50} vrednostima od 0,03 do 0,06 μM (Melo *et al*, 2000; Durán *et al*, 2007). IC_{50} za ćelijske linije RMS razlikovale su se u rasponu manjem od 0,3 μM (0,66–0,88 μM). U poređenju sa ovim manjim razlikama, IC_{50} vrednosti za ćelijske linije karcinoma debelog creva su znatno različite, 2 μM za CaCo2 i iznad 10 μM za HT29. To je pripisano različitim molekularnim mehanizmima koji dovode do apoptotske smrti ćelija izazvane violaceinom. Za razliku od CaCo2, u HT29 ćelijama otpornijim na violacein nije došlo do povećanja proizvodnje ROS (de Carvalho *et al*, 2006). Shodno tome, IC_{50} vrednosti mogu poslužiti kao vodič za dizajniranje eksperimentalnih strategija usmerenih na odgonetanje molekularnih mehanizama citotoksičnosti izazvane violaceinom.

Na ćelijskim linijama RD i SJRH30 do sada je ispitan citotoksični efekat velikog broja supstanci, među kojima je značajan broj jedinjenja poreklom iz prirode. Prema pregledu literature iz publikacije Mesas i saradnika, do sada su objavljena 84 originalna naučna članka u kojim je ispitan efekat biljnih ekstrakata ili njihovih izolovanih komponenti na ćelijskim linijama RMS.

Sudeći prema IC₅₀ vrednostima, violacein je pokazao veću efikasnost u odnosu na druge supstance (Mesas *et al*, 2023). Samo su jedinjenja poreklom iz biljaka *Choerospondias axillaris*, *Anacolosa clarkii* i *Macaranga barteri* imala IC₅₀ vrednosti u rangu ili niže od IC₅₀ vrednosti violaceina (Kil *et al*, 2020; Cai *et al*, 2019; Ogbole *et al*, 2017). Citotoksični efekat violaceina na RD ćelije bio je u nivou vrednosti prethodno dobijene za vinkristin (IC₅₀ = 0,77 μM) (Adekunle *et al*, 2022), najčešće korišćeni agens u terapiji RMS, a u odnosu na ciklofosamid (Abu *et al*, 2023), violacein je imao četiri puta nižu IC₅₀ vrednost. Međutim, treba imati u vidu da je u ovoj disertaciji IC₅₀ vrednost procenjena na osnovu tretmana u trajanju od 24 h, dok su u navedenim studijama IC₅₀ vinkristina, ciklofosamida i drugih supstanci određivane nakon 48 ili 72 h tretmana (Kil *et al*, 2020; Cai *et al*, 2019; Adekunle *et al*, 2022; Abu *et al*, 2023; Ogbole *et al*, 2017), što potencijalno ukazuje da je u odnosu na njih violacein još potentniji, ali bi to trebalo dodatno ispitati.

Na potencijal violaceina kao efikasnog agensa protiv RMS ukazuje i to da su njegove IC₅₀ vrednosti bile niže u odnosu na vrednosti koje su u ovoj disertaciji dobijene za konvencionalno korišćene hemioterapeutike, doksorubicin, irinotekan i vinflunin. Samo je efekat vinflunina na ćelijsku liniju SJRH30 bio izraženiji (IC₅₀ = 0,12 μM). Takođe, ispitivane ćelijske linije su se u velikoj meri međusobno razlikovale u pogledu osetljivosti na standardne hemioterapeutike (od 3,7 puta za irinotekan do čak 540 puta za vinflunin), dok to sa violaceinom nije bio slučaj.

Važno svojstvo antitumorskih terapeutika je selektivnost prema tumorskim ćelijama bez štetnog uticaja na neizmenjene ćelije. Prethodne studije su pokazale da su koncentracije violaceina toksične za neizmenjene ćelije od 5 do 10 μM (Melo *et al*, 2000; Bromberg *et al*, 2005). U ovoj disertaciji, koristili smo V79-4 fibroblaste pluća kineskog hrčka, često korišćene u studijama mutagenosti i toksičnosti (Chaung *et al*, 1997), da bismo procenili selektivnost violaceina. IC₅₀ vrednost za V79-4 ćelije je iznosila 1,6 μM, što je dva do četiri puta više od IC₅₀ vrednosti za RMS ćelije. Ovaj rezultat potvrđuje prethodne podatke o većoj toksičnosti violaceina za tumorske ćelije u odnosu na V79-4 fibroblaste, čija je IC₅₀ vrednost bila od 1,7 do 4,1 μM (Haun *et al*, 1992; Durán *et al*, 2007). Međutim, u radu Melo i saradnika IC₅₀ za V79-4 bila je u rasponu od 5 do 12 μM (Melo *et al*, 2003). Varijacije se mogu objasniti korišćenjem violaceina izolovanog iz različitih bakterijskih sojeva u različitim studijama i/ili različitim sastavima izolovanih pigmenata. Naime, *Chromobacterium violaceum* proizvodi dva ljubičasta pigmenta: violacein i sporedni proizvod deoksiviolacein. Kada se koncentracija meri metodom zasnovanom na spektrofotometriji, dobijena vrednost je u stvari zbir koncentracija violaceina i neaktivnog deoksiviolaceina (Rodrigues *et al*, 2013; Choi *et al*, 2015).

Selektivnost violaceina smo dodatno potvrdili testiranjem njegove toksičnosti *in vivo*, na embrionima zebrića, pri čemu smo utvrdili da IC₅₀ koncentracije dobijene za RMS ćelije nisu bile toksične za embrione zebrića do 120 hpf. Ovi rezultati su podržani prethodnim nalazima da violacein, primenjen intraperitonealno ili intratumorski, ne izaziva patološke promene ni znake toksičnosti kod zdravih i miševa sa tumorima, dok smanjuje volumen tumora kod potonjih (Bromberg *et al*, 2010; Masuelli *et al*, 2016). Takođe, pokazano je da oralna primena violaceina kod miševa u dozama do 10 mg/kg nema toksični efekat (Durán *et al*, 2003).

Zebrića su široko prihvaćen model organizam za istraživanje mehanizama različitih bolesti, uključujući i maligne. Modeli RMS na zebrićama, koji nastaju primenom transgeneze i/ili ksenotransplantacije, omogućavaju razumevanje genetičkih promena koje doprinose razvoju RMS i testiranje novih terapeutika na humanim tumorskim ćelijama u *in vivo* uslovima (Chen i

Langenau, 2011; Zarrabi *et al*, 2023; Siebert *et al*, 2023). Imaju brojne prednosti u odnosu na sisarske modele, kao što je lako praćenje razvoja i napredovanja tumora usled transparentnosti embriona. Osim toga, embrioni nemaju potpuno razvijen imunski sistem, što smanjuje mogućnost odbacivanja ksenografta. Značajna je i činjenica da zebrice daju veliki broj potomaka, čime se podiže efikasnost genetičkih istraživanja i testiranja lekova. Koriste se za testiranje biblioteka hemijskih jedinjenja pre prelaska na skuplje testove na sisarima. Dodatno, modeli ksenografta na zebricama otvaraju put ka personalizovanoj medicini, omogućavajući brzo testiranje tretmana na tumorskim ćelijama pacijenta (Zarrabi *et al*, 2023; Siebert *et al*, 2023). Otkriće da koncentracije toksične za ćelije RMS nisu negativno uticale na preživljavanje embriona zebrica, otvara mogućnost daljeg korišćenja ovog model organizma u ispitivanju efekata violaceina na razvoj i progresiju RMS, primarno kroz ksenotransplantaciju testiranih ćelijskih linija.

Pošto smo pokazali citotoksičnost i selektivnost violaceina prema tumorskim ćelijama, pristupili smo ispitivanju mehanizma njegovog dejstva na ćelije RMS.

Violacein indukuje apoptozu tumorskih ćelija kroz različite molekularne puteve. Kodach i saradnici su zabeležili povećanje nivoa p53 u ćelijama karcinoma debelog creva izloženim violaceinu. U istoj studiji pokazano je da violacein inhibira fosforilaciju protein kinaze B sa posledičnom aktivacijom apoptoze i represijom signalnog puta NF- κ B (Kodach *et al*, 2006). Zatim, violacein podstiče apoptozu ćelija melanoma inhibicijom autofagije (Gonçalves *et al*, 2016), koja ovim ćelijama omogućava preživljavanje nepovoljnih uslova, kao što su nedostatak hranljivih materija i prisustvo citotoksičnih agenasa (Corazzari *et al*, 2013). U ćelijama glioblastoma, violacein indukuje apoptozu posredstvom p44/42 MAP kinaze (Mehta *et al*, 2015), dok u ćelijama karcinoma glave i vrata aktivira TNFR1 i inaktivira prokaspazu-9 (Masuelli *et al*, 2016). U ćelijama tumora debelog creva CaCo2, violacein izaziva apoptozu stvaranjem ROS, što dovodi do povećanja unutarćelijskog kalcijuma i oslobađanja citohroma c (de Carvalho *et al*, 2006). Violaceinom indukovana apoptoza ćelija leukemije HL60 rezultat je aktivacije signalne kaskade TNF (Melo *et al*, 2003; Ferreira *et al*, 2004), dok je hiperpolarizacija membrane predložena za glavni uzrok smrti HeLa ćelija pod uticajem violaceina (Leal *et al*, 2015).

Naši rezultati pokazuju da je tip ćelijske smrti izazvane violaceinom u RD ćelijama takođe apoptoza. Manji procenat ćelija u ranoj fazi u odnosu na kasnu fazu ukazuje da je potrebno dodatno istražiti vremensko-zavisni efekat violaceina kako bi se procenila dinamika progresije apoptoze. Identifikacija molekula uključenih u apoptozu indukovanu violaceinom, kao što su kaspaze, citohrom c i tumor supresor p53, ključna je za određivanje molekularnih meta antitumorskog delovanja violaceina. Naši preliminarni rezultati (nisu prikazani u ovoj disertaciji) pokazuju da tretman violaceinom ne menja nivo proteina p53 u ćelijama RMS nakon 24 h, iako se u prva 4 h uočava smanjenje njegove ekspresije u ćelijskoj liniji SJRH30. Ispitali smo i uticaj violaceina na ekspresiju proteina ANKRD1, koji je predmet prvog dela ove disertacije, s obzirom da različiti hemioterapeutici indukuju promenu njegove ekspresije (Aihara *et al*, 2000b; Scurr *et al*, 2008). Takođe, poznato je da ANKRD1 ima ulogu u inhibiciji NF- κ B (Laure *et al*, 2010; Liu *et al*, 2015), što je jedan od mehanizama delovanja violaceina (Kodach *et al*, 2006). Međutim, 24-časovni tretman nije doveo do promene u ekspresiji ANKRD1. U SJRH30 ćelijama je tokom prva 4 h došlo do povećanja njegove ekspresije, koja se zatim vratila na bazalni nivo. Ostaje da se ispita da li su ove promene u ekspresiji ANKRD1 i p53 u toku prva 4 h tretmana međusobno zavisne i značajne.

Neizmenjene ćelije strogo kontrolišu sintezu i sekreciju faktora rasta, čime osiguravaju homeostazu, dok ćelije tumora stiču sposobnost kontinuirane proliferacije usled mutacija i prekomerne aktivacije proteina koji promovišu progresiju ćelijskog ciklusa, kao što su receptori sa aktivnošću tirozin kinaza, učesnici MAP kinaznog signalnog puta i protein kinaza B, ključni učesnik signalnog puta PI3K (eng. *phosphoinositide 3-kinase*)(Durán *et al*, 2021). Zanimljivo je da je protein kinaza B inhibirana violaceinom u ćelijama melanoma i karcinoma debelog creva (Gonçalves *et al*, 2016; Kodach *et al*, 2006). Takođe, pokazano je da tretman violaceinom dovodi do smanjenja aktivnosti AXL kinaze u TF1 progenitorskim ćelijama leukemije (Queiroz *et al*, 2012). Ova kinaza je identifikovana kao povećano eksprimirana u nekoliko različitih tumora, stimulišući signalne puteve PI3K, MAP kinazni i FAK (eng. *focal adhesion kinase*) (Linger *et al*, 2013; Verma *et al*, 2011). Prema Mojib i saradnicima, ćelije mišjeg fibrosarkoma 2237 tretirane violaceinom pokazale su niže nivoe ciklin-zavisnih kinaza (Cdk2, Cdk4 i Cdk6), ključnih za napredovanje ćelijskog ciklusa, kao i više nivoe proteina p53 i p21, blokatora ćelijskog ciklusa (Mojib *et al*, 2011). Dodatno, ćelijska linija melanoma (SKMEL-103) tretirana violaceinom pokazala je sniženu ekspresiju histon deacetilaze-6, koja deluje kao aktivator proliferacije u ovim ćelijama (Gonçalves *et al*, 2016). Dakle, osim što dovodi do smrti tumorskih ćelija, pokazano je da violacein može smanjiti njihovu proliferaciju. Ostaje da se razjasni da li smanjenju broja ćelija RMS nakon tretmana violaceinom, osim ćelijske smrti, doprinosi i inhibicija proliferacije.

U saglasnosti sa zapažanjem Durán i saradnika, talog ćelija tretiranih violaceinom je bio ljubičaste boje, što ukazuje na njegovu interakciju sa ćelijskom membranom (Durán *et al*, 2021). Dodatno, autofluorescencija violaceina i 3D slike dobijene rekonstrukcijom serije optičkih preseka omogućile su nam da detektujemo violacein na površini ćelije. Izostanak fluorescentnog signala unutar ćelija sugeriše da violacein ne narušava integritet membrane ćelija RMS i da najverovatnije ne postoji mehanizam aktivnog transporta violaceina u ćeliju. Nasuprot ćelijama RMS, violacein može da permeabilizuje bakterijske ćelije soja *Staphylococcus aureus*, uz pojavu vidljivih diskontinuiteta u membrani (Cauz *et al*, 2019). U skorašnjim studijama je zabeleženo da interakcija violaceina sa ćelijskim membranama dovodi do strukturne reorganizacije lipida, čime se otvaraju istraživanja usmerena na dostavu hidrofobnih antitumorskih molekula poput violaceina (Berti *et al*, 2020). Violacein je interagovao sa modelima ćelijskih membrana, utičući na viskoznost, elastičnost i strukturne karakteristike, ali ne i na permeabilnost (de Souza *et al*, 2017). Dalja istraživanja su pokazala da interakcija violaceina sa lipidnim monoslojem dovodi do promene u uglovima nagiba i unutrašnjem rasporedu lipida, u zavisnosti od njihove elektrostatičke prirode (Gupta *et al*, 2021). Široka sposobnost violaceina da indukuje modulaciju različitih signalnih puteva može se, bar delimično, povezati s njegovim interakcijama sa lipidnim površinama.

Citotoksični agensi često izazivaju oksidativni stres, definisan kao disbalans između antioksidativne odbrane i akumulacije ROS, kao što su superoksidni anjoni, vodonik-peroksid i hidroksilni radikali. Unutarćelijska produkcija ROS pokreće apoptotsku kaskadu i dovodi do prekomerne oksidacije lipida, DNK i proteina (Bertin i Averbeck, 2006). Iako violacein ima antioksidativna svojstva u bakterijama (Konzen *et al*, 2006; Vishnu i Palaniswamy, 2018), u nekim tumorskim ćelijskim linijama indukuje značajno povećanje produkcije ROS, dovodeći do ćelijske smrti (Masuelli *et al*, 2016; Kim *et al*, 2021). Rezultati ove disertacije pokazuju da smrt ćelija RMS izazvana violaceinom nije povezana sa povećanim oksidativnim stresom, s obzirom da antioksidans NAC nije ublažio citotoksični efekat violaceina. Takođe, nakon tretmana

violaceinom nije bilo povećanja produkcije ROS i stepena lipidne peroksidacije. Isto je zapaženo i u ćelijskoj liniji kolorektalnog karcinoma HT29 u kojoj se redoks status nije promenio nakon tretmana, uprkos indukovanoj apoptozi (de Carvalho *et al*, 2006). U eksperimentu prikazanom u ovoj disertaciji nakon tretmana violaceinom produkcija ROS je bila delimično smanjena u RD ćelijama, međutim ovo je potrebno potvrditi dodatnim eksperimentima, s obzirom da je urađeno samo jednom. U daljim studijama se treba fokusirati na istraživanje mehanizama ćelijske smrti indukovane violaceinom nezavisnih od oksidativnog stresa. Budući da violacein precipitira na površini ćelija, postavlja se pitanje da li violacein može aktivirati apoptozu dejstvom preko ćelijske membrane, kroz interakciju sa receptorima smrti (Ashkenazi, 2015). Takođe, moguće je da violacein interaguje sa EGFR i inhibira aktivnost ovog ključnog faktora u kontroli nastanka i progresije malignih bolesti (Bhat i Prasad, 2022).

Razvoj novih terapeutika koji mogu da spreče metastaze zahteva da kandidat ima anti-migratorni efekat na tumorske ćelije. Inhibicija migracije tumorskih ćelija povezana sa violaceinom prethodno je zabeležena u ćelijskim linijama glioblastoma, karcinoma pluća, dojke i debelog creva (Platt *et al*, 2014; Mehta *et al*, 2015; de Souza Oliveira *et al*, 2022). Violacein je inhibirao migraciju ćelija glioblastoma, narušavanjem mreže aktinskih filamenata (Mehta *et al*, 2015), i ćelija karcinoma dojke, smanjivanjem sekrecije proinflamatornog hemokina CXCL12 (Platt *et al*, 2014). U ovoj disertaciji, tretirane ćelije RMS su takođe pokazale smanjenu migraciju, ali je dinamika zatvaranja rane bila zavisna od ćelijske linije. Dok su pod dejstvom violaceina ćelije SJRH30 pokazale značajno usporavanje, pokretljivost ćelija HS-729 i RD je bila suptilno smanjena. Iako je uobičajeno da inhibitorni efekat nekog agensa zavisi od korišćenih ćelijskih linija (Kauanova *et al*, 2021), ove razlike zahtevaju dodatno objašnjenje. Sledeći korak bilo bi testiranje hipoteze da mehanizmi inhibicije migracije ćelija RMS izazvane violaceinom uključuju poremećaj aktinske mreže citoskeleta ili inhibiciju sekrecije hemokina CXCL12. Takođe, korisno je ispitati efekat različitih koncentracija violaceina na migraciju ćelija RMS, s obzirom na to da neki antitumorski lekovi mogu umanjiti ili povećati pokretljivost tumorskih ćelija u zavisnosti od doze (Ganguly *et al*, 2012).

Specifični molekularni mehanizam delovanja violaceina na ćelije RMS ostaje da se razjasni, uzimajući u obzir naše nalaze: interakciju sa ćelijskom membranom i ćelijsku smrt nezavisnu od oksidativnog stresa. Naš sledeći korak u istraživanju biće ispitivanje uticaja violaceina na transkriptom ćelija RMS, kako bi se identifikovali signalni putevi odgovorni za ostvarivanje njegovog citotoksičnog i anti-migratornog dejstva.

Sinergistički efekat violaceina u kombinaciji sa hemioterapeuticima, 5-fluouracilom i cisplatinom, pokazan je na ćelijskim linijama karcinoma debelog creva i mokraćne bešike, redom (Kodach *et al*, 2006; Alem *et al*, 2022). Tretman violaceinom je takođe izazvao smrt ćelija karcinoma jetre rezistentnih na doksorubicin (Dahlem *et al*, 2022).

U cilju ispitivanja sadejstva violaceina sa konvencionalnim hemioterapeuticima na ćelijama RMS, odredili smo IC₂₅ vrednosti za doksorubicin, irinotekan i vinflunin. Irinotekan je izabran jer je deo standardnih režima terapije RMS, doksorubicin kao deo režima za pacijente sa agresivnijom formom RMS, a vinflunin kao analog vinkristina, najčešće korišćenog terapeutika RMS. Vinflunin nije prethodno ispitan na ćelijama RMS, iako u poređenju sa vinkristinom pokazuje veću efikasnost i bezbednost u tretmanu drugih tipova tumora (Schutz *et al*, 2011). Efikasnost doksorubicina bila je u skladu sa literaturnim podacima (Herrmann *et al*, 2012; Satheesha *et al*, 2016), dok su koncentracije irinotekana koje su dovele do smrti ćelija bile 1000

puta veće od prethodno objavljenih (Satheesha *et al*, 2016), što dovodi u pitanje validnost rezultata dobijenih primenom ovog jedinjenja. U poređenju sa vrednostima dobijenim na drugim ćelijskim linijama (Aparicio *et al*, 2014), efikasnost vinflunina je odgovarajuća samo za ćelijsku liniju SJRH30, dok su druge dve linije pokazale znatno slabiju osetljivost.

Ćelije su potom tretirane kombinacijom violaceina sa svakim od hemioterapeutika pojedinačno. Korišćena je kombinacija IC₂₅ koncentracija koja bi, ako je efekat aditivan, trebalo da dovede do smanjenja vijabilnosti ćelija za oko 50%. Tretman ćelija kombinacijom violaceina i doksorubicina je rezultirao statistički značajnim povećanjem citotoksičnosti, dok je za ostale kombinacije statistički značajan efekat izostao. Koeficijent interakcije CDI od 0,58 ukazuje na sinergiju između violaceina i doksorubicina, ali dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala statističku značajnost. Međutim, da bi se u potpunosti ispitalo postojanje sinergističkog efekta, potrebno je obuhvatiti širi raspon koncentracija. Stoga, rezultati prikazani u ovoj disertaciji predstavljaju samo preliminarne nalaze koji će usmeriti dalja istraživanja kombinovanog efekta violaceina i doksorubicina na ćelije RMS. Uzimajući u obzir izražene kardiotoksične efekte doksorubicina (Linders *et al*, 2024), ključno je utvrditi da li violacein pojačava citotoksični efekat ovog hemioterapeutika i na ćelije srca.

Da bi violacein kao prirodna supstanca postao kandidat za terapiju tumora, mora ispuniti nekoliko ključnih zahteva:

- **Efikasnost:** Supstanca mora pokazati sposobnost da onemogući, uspori ili preokrene rast tumorskih ćelija *in vitro* i *in vivo*, pre ulaska u klinička ispitivanja. U ovoj disertaciji pokazali smo efikasnost violaceina *in vitro*, u pogledu smanjenja vijabilnosti, indukcije apoptoze i usporavanja migracije ćelija RMS. Sledeći korak podrazumevao bi ispitivanje njegovog efekta na *in vivo* modelima.
- **Selektivnost:** Supstanca treba da deluje specifično na tumorske ćelije sa minimalnim efektom na neizmenjene ćelije, čime se smanjuje verovatnoća ispoljavanja neželjenih efekata. U ovoj disertaciji pokazano je da su IC₅₀ vrednosti violaceina bile značajno niže za ćelijske linije RMS u poređenju sa neizmenjenom ćelijskom linijom V79-4, što pokazuje da su ćelije RMS osetljivije na tretman violaceinom.
- **Bezbednost i niska toksičnost:** Pre bilo kakve kliničke primene, supstanca mora proći rigorozno testiranje kako bi se procenila bezbednost upotrebe i umanjili štetni efekti (Tran *et al*, 2017). Prethodne studije su pokazale da violacein ne izaziva patološke promene i znake toksičnosti kod zdravih miševa i miševa sa tumorima (Bromberg *et al*, 2010; Masuelli *et al*, 2016). U ovoj studiji smo pokazali da IC₅₀ koncentracije violaceina, toksične za ćelije RMS, nisu imale negativan uticaj na preživljavanje embriona zebrića, što omogućava dalja ispitivanja na ovom model organizmu.
- **Rasvetljen mehanizam delovanja:** Potrebno je identifikovati molekulske targete, uticaj na signalne puteve i otkriti da li jedinjenje može premostiti mehanizme rezistencije tumorskih ćelija. U ovoj disertaciji smo pokazali da se violacein zadržava na membrani i izaziva apoptozu ćelija RMS putem mehanizma nezavisnog od oksidativnog stresa. Međutim, tačan mehanizam delovanja ostaje da se razjasni.
- **Adekvatna farmakokinetika:** Osobine terapijske supstance kao što su apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija utiču na doziranje, frekvenciju i metodu aplikacije kako bi se postigao optimalan nivo terapeutika u organizmu (FDA, 2022). Jedan od ograničavajućih faktora violaceina je njegova nerastvorljivost u vodi. Međutim, razvijen

je niz lipidnih nosača koji olakšavaju njegovu primenu i omogućavaju ciljano dejstvo na tumorske ćelije, smanjujući toksičan efekat na zdravo tkivo (Berti *et al*, 2019; Berti *et al*, 2020). Takođe, Bhat i Prasad su *in silico* analizom pokazali da se oralnom primenom postiže visoka biološka raspoloživost violaceina (Bhat i Prasad, 2022).

- Dostupnost: Supstanca mora biti dostupna u momentu kada je treba primeniti. Za violacein ovo nije limitirajući faktor s obzirom na veliki broj široko zastupljenih bakterijskih vrsta koje ga produkuju i koje su deo laboratorijskih kolekcija.
- Stabilnost: Hemijska i fizička stabilnost tokom vremena obezbeđuju da supstanca ostane delotvorna u periodu od proizvodnje do primene. Violacein je stabilan čak i nakon izlaganja svetlosti i temperaturama do 100°C u trajanju od mesec dana (Nathan *et al*, 2019).
- Mogućnost produkcije na velikoj skali: Procesi proizvodnje moraju biti efikasni i ekonomični. U poslednjih nekoliko godina razvijeni su sistemi za veću produkciju violaceina koristeći mikroorganizme koji ga endogeno sintetišu, kao i genetički izmenjene vrste za heterolognu ekspresiju uključujući *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae* (Durán *et al*, 2021).
- Usaglašenost sa pravnom regulativom i standardima: U cilju dobijanja odobrenja za kliničku upotrebu od strane FDA (eng. *U.S. Food and Drug Administration*) i EMA (eng. *European Medicines Agency*) potrebno je ispoštovati njihove zahteve. Potrebno je još istraživanja kako bi se violacein razmatrao u ovom smislu.

Ispunjenje navedenih zahteva osigurava da je supstanca predložena kao antitumorski terapeutik ne samo bezbedna i efikasna, već i praktična za kliničku upotrebu. Iako je violacein pokazao obećavajuće rezultate, da bi se uvrstio na listu kandidata za terapeutike RMS, potrebna su dodatna istraživanja, pre svega usmerena na rasvetljavanje mehanizama njegovog dejstva i testiranje efikasnosti *in vivo*.

6. ZAKLJUČCI

U ovoj disertaciji je određen profil ekspresije ANKRD1 u ćelijama poreklom od RMS (SJRH30, RD i HS-729) kao i uticaj violaceina na ove ćelije. Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Utvrđena je razlika u nivou *ANKRD1* transkripta i proteina u ćelijskim linijama RMS.
- Ispitivane ćelijske linije RMS eksprimiraju *wild-type ANKRD1*.
- Protein ANKRD1 lokalizovan je u citoplazmi i jedrima ćelija RMS, prisutan je i u Kahalovim telima RD i HS-729 ćelija.
- Protein ANKRD1 podložan je proteazomalnoj degradaciji u ćelijama RMS.
- Violacein ima citotoksično dejstvo na ćelije poreklom od RMS.
- Koncentracije violaceina toksične za ćelije RMS ne utiču na preživljavanje embriona zebrića.
- Violacein indukuje apoptozu RD ćelija.
- Violacein precipitira na površini ćelija RMS i ne ulazi u ćelije tokom 24 h tretmana.
- Violacein statistički značajno usporava migraciju SJRH30 ćelija, dok je usporavanje migracije RD i HS-729 ćelija primetno, ali ne i statistički značajno.
- Dejstvo violaceina na ćelije RMS je nezavisno od oksidativnog stresa jer:
 - predtretman antioksidantom (NAC) ne smanjuje osetljivost ćelija RMS na violacein.
 - nema indukcije lipidne peroksidacije i povećane produkcije ROS u ćelijama RMS.
- Violacein povećava osetljivost ćelija RMS na doksorubicin. Isti trend prisutan je i u kombinovanim tretmanima sa irinotekanom i vinfluninom, ali bez statističke značajnosti.
- Tretman violaceinom u trajanju od 24 h ne utiče na ekspresiju proteina ANKRD1 u ćelijskim linijama RMS.

7. LITERATURA

- Abu, T., Ogbale, O., Ajaiyeoba, E. O., Akinleye, T. E., Sanusi, A. J., & Adeniji, J. (2023). Cytotoxic effects of Nigerian ethnomedicinal plant extracts on three cancer cell lines and their antioxidant properties. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 135-146.
- Adekunle, Y., Samuel, B., Emmanuel, T., Adeniji, J., & Ogbale, O. (2022). Cytotoxicity analysis of nineteen medicinal plants extracts on breast adenocarcinoma (MCF-7) and rhabdomyosarcoma (RD) cancer cell lines. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 57-64.
- Adhikari, A., & Davie, J. (2019). Wnt deregulation in rhabdomyosarcoma. *Stem Cell Investig*, 6, 13.
- Aihara, Y., Kurabayashi, M., Saito, Y., Ohyama, Y., Tanaka, T., Takeda, S., et al. (2000). Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: Role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension*, 36(1), 48-53.
- Aihara, Y., Kurabayashi, M., Tanaka, T., Takeda, S. I., Tomaru, K., Sekiguchi, K. I., et al. (2000). Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: Possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 32(8), 1401-1414.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., & Roberts, K. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.).
- Alem, D., Canclini, L., & Castro-Sowinski, S. (2022). Chemosensitizer effect of violacein on cisplatin-treated bladder cancer cells. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, 2(2), 100036.
- Almagro, L., Fernández-Pérez, F., & Pedreño, M. A. (2015). Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and their effect on human health. *Molecules*, 20(2), 2973-3000.
- Almodóvar-García, K., Kwon, M., Samaras, S. E., & Davidson, J. M. (2014). ANKRD1 acts as a transcriptional repressor of MMP13 via the AP-1 site. *Mol Cell Biol*, 34(8), 1500-1511.
- Alshatwi, A. A., Subash-Babu, P., & Antonisamy, P. (2016). Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2. *Exp Toxicol Pathol*, 68(1), 89-97.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410.
- Angori, S., Capanni, C., Faulkner, G., Bean, C., Boriani, G., & Lattanzi, G. (2017). Emery-Dreifuss muscular dystrophy-associated mutant forms of lamin A recruit the stress responsive protein Ankr2 into the nucleus, affecting the cellular response to oxidative stress. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(1), 169-184.
- Aparicio, L. A., Castosa, R., Haz-Conde, M., Rodríguez, M., Blanco, M., & Valladares, M. (2014). Role of the microtubule-targeting drug vinflunine on cell-cell adhesions in bladder epithelial tumour cells. *BMC Cancer*, 14, 507.

- Arimura, T., Bos, J. M., Sato, A., Kubo, T., Okamoto, H., Nishi, H., et al. (2009). Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 54(4), 334-342.
- Arnold, M. A., Anderson, J. R., Gastier-Foster, J. M., Barr, F. G., Skapek, S. X., Hawkins, D. S., et al. (2016). Histology, fusion status, and outcome in alveolar rhabdomyosarcoma with low-risk clinical features: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 63(4), 634-639.
- Arnold, M. A., & Barr, F. G. (2017). Molecular diagnostics in the management of rhabdomyosarcoma. *Expert Rev Mol Diagn*, 17(2), 189-194.
- Ashkenazi, A. (2015). Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: Lessons learned and future directions. *J Clin Invest*, 125(2), 487-489.
- Ashur-Fabian, O., Adamsky, K., Trakhtenbrot, L., Cohen, Y., Raanani, P., & Hardan, I. (2007). Apaf1 in chronic myelogenous leukemia (CML) progression: Reduced Apaf1 expression is correlated with a H179R p53 mutation during clinical blast crisis. *Cell Cycle*, 6(5), 589-594.
- Avivi, A., Brodsky, L., Nevo, E., & Band, M. R. (2006). Differential expression profiling of the blind subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi* superspecies: Bioprospecting for hypoxia tolerance. *Physiol Genomics*, 27(1), 54-64.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438.
- Badi, I., Cinquetti, R., Frascoli, M., Parolini, C., Chiesa, G., & Taramelli, R. (2009). Intracellular ANKRD1 protein levels are regulated by 26S proteasome-mediated degradation. *FEBS Lett*, 583(15), 2486-2492.
- Bang, M. L., Mudry, R. E., McElhinny, A. S., Trombitás, K., Geach, A. J., & Yamasaki, R. (2001). Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol*, 153(2), 413-427.
- Barr, F. G., Nauta, L. E., & Hollows, J. C. (1998). Structural analysis of PAX3 genomic rearrangements in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 102(1), 32-39.
- Baumeister, A., Arber, S., & Caroni, P. (1997). Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis. *J Cell Biol*, 139(5), 1231-1242.
- Beneventi, G., Munita, R., Cao Thi Ngoc, P., Madej, M., Cieśła, M., & Muthukumar, S. (2021). The small Cajal body-specific RNA 15 (SCARNA15) directs p53 and redox homeostasis via selective splicing in cancer cells. *NAR Cancer*, 3(3), zcab026.
- Berger, F., Büchsler, I., & Munz, B. (2012). The effect of the NF-kappa B inhibitors curcumin and lactacystin on myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *Differentiation*, 83(5), 271-281.

- Bergstrand, S., O'Brien, E. M., & Farnebo, M. (2019). The Cajal body protein WRAP53 β prepares the scene for repair of DNA double-strand breaks by regulating local ubiquitination. *Front Mol Biosci*, 6, 51.
- Berner, J. M., Forus, A., Elkahloun, A., Meltzer, P. S., Fodstad, O., & Myklebost, O. (1996). Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 17(4), 254-259.
- Bersani, F., Taulli, R., Accornero, P., Morotti, A., Miretti, S., & Crepaldi, T. (2008). Bortezomib-mediated proteasome inhibition as a potential strategy for the treatment of rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*, 44(6), 876-884.
- Berti, I. R., Rodenak-Kladniew, B., Perez, A. A., Santiago, L., Duran, N., & Castro, G. R. (2020). Development of biocarrier for violacein controlled release in the treatment of cancer. *Reactive and Functional Polymers*, 136, 122-130.
- Berti, I. R., Rodenak-Kladniew, B., Onaindia, C., Adam, C. G., Islan, G. A., & Durán, N. (2019). Assessment of in vitro cytotoxicity of imidazole ionic liquids and inclusion in targeted drug carriers containing violacein. *RSC Advances*, 10(49), 29336-29346.
- Berti, I. R., Gantner, M. E., Rodriguez, S., Islan, G. A., Fávoro, W. J., & Talevi, A. (2023). Potential biocide roles of violacein. *Frontiers in Nanotechnology*, 5, 1186386.
- Bertin, G., & Averbeck, D. (2006). Cadmium: Cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11), 1549-1559.
- Bhat, S. S., & Prasad, S. K. (2022). In silico screening of violacein as an epidermal growth factor receptor inhibitor. *International Journal of Health and Allied Sciences*, 11(1), 6.
- Bisogno, G., De Salvo, G. L., Bergeron, C., Gallego Melcón, S., Merks, J. H., Kelsey, A., et al. (2019). Vinorelbine and continuous low-dose cyclophosphamide as maintenance chemotherapy in patients with high-risk rhabdomyosarcoma (RMS 2005): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 20(11), 1566-1575.
- Bisogno, G., Jenney, M., Bergeron, C., Gallego Melcón, S., Ferrari, A., Oberlin, O., et al. (2018). Addition of dose-intensified doxorubicin to standard chemotherapy for rhabdomyosarcoma (EpSSG RMS 2005): A multicentre, open-label, randomised controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 19(8), 1061-1071.
- Blais, A., Tsikitis, M., Acosta-Alvear, D., Sharan, R., Kluger, Y., & Dynlacht, B. D. (2005). An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes Dev*, 19(5), 553-569.
- Bogolyubova, I. O., Lyabin, D. N., Bogolyubov, D. S., & Ovchinnikov, L. P. (2014). Immunocytochemical study of YB-1 nuclear distribution in different cell types. *Tissue Cell*, 46(6), 457-461.
- Boisbaudran, L. (1882). Matière colorante se formant dans la colle de farine. *Comp Rend Acad Sci*, 94, 562-563.

- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., & Lamond, A. I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell*, *40*(2), 216-227.
- Bromberg, N., Dreyfuss, J. L., Regatieri, C. V., Palladino, M. V., Durán, N., Nader, H. B., et al. (2010). Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chem Biol Interact*, *186*(1), 43-52.
- Bromberg, N., Justo, G. Z., Haun, M., Durán, N., & Ferreira, C. V. (2005). Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect on phosphatases. *J Enzyme Inhib Med Chem*, *20*(5), 449-454.
- Burry, R. W. (2011). Controls for immunocytochemistry: An update. *J Histochem Cytochem*, *59*(1), 6-12.
- Cai, S., Risinger, A. L., Petersen, C. L., Grkovic, T., O'Keefe, B. R., & Mooberry, S. L. (2019). Anacolosins A-F and Corymbulosins X and Y, clerodane diterpenes from *Anacolosa clarkii* exhibiting cytotoxicity toward pediatric cancer cell lines. *J Nat Prod*, *82*(4), 928-936.
- Carli, M., Colombatti, R., Oberlin, O., Bisogno, G., Treuner, J., & Koscielniak, E. (2004). European intergroup studies (MMT4-89 and MMT4-91) on childhood metastatic rhabdomyosarcoma: Final results and analysis of prognostic factors. *J Clin Oncol*, *22*(23), 4787-4794.
- Cauz, A. C. G., Carretero, G. P. B., Saraiva, G. K. V., Park, P., Mortara, L., Cuccovia, I. M., et al. (2019). Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. *ACS Infect Dis*, *5*(4), 539-549.
- Chansky, H. A., Hu, M., Hickstein, D. D., & Yang, L. (2001). Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res*, *61*(9), 3586-3590.
- Chang, W., Mi, L. J., & Boorstein, R. J. (1997). The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. *Nucleic Acids Res*, *25*(5), 992-994.
- Chen, C., Dorado Garcia, H., Scheer, M., & Henssen, A. G. (2019). Current and future treatment strategies for rhabdomyosarcoma. *Front Oncol*, *9*, 1458.
- Chen, C., Shen, L., Cao, S., Li, X., Xuan, W., Zhang, J., et al. (2014). Cytosolic CARP promotes angiotensin II- or pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy through calcineurin accumulation. *PLoS One*, *9*(8), e104040.
- Chen, E. Y., & Langenau, D. M. (2011). Zebrafish models of rhabdomyosarcoma. *Methods Cell Biol*, *105*, 383-402.
- Choi, S. Y., Lim, S., Yoon, K. H., Lee, J. I., & Mitchell, R. J. (2021). Biotechnological activities and applications of bacterial pigments violacein and prodigiosin. *J Biol Eng*, *15*(1), 10.
- Choi, S. Y., Yoon, K. H., Lee, J. I., & Mitchell, R. J. (2015). Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment. *Biomed Res Int*, *2015*, 465056.
- Chu, W., Burns, D. K., & Swerlick, R. A. (1995). Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J Biol Chem*, *270*(17), 10236-10245.

- Cleary, M. M., Mansoor, A., Settlemeyer, T., Ijiri, Y., Ladner, K. J., Svalina, M. N., et al. (2017). NF κ B signaling in alveolar rhabdomyosarcoma. *Disease Models & Mechanisms*, *10*(9), 1109-1115.
- Corazzari, M., Fimia, G. M., Lovat, P., & Piacentini, M. (2013). Why is autophagy important for melanoma? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin Cancer Biol*, *23*(5), 337-343.
- Dächert, J., Ehrenfeld, V., Habermann, K., Dolgikh, N., & Fulda, S. (2020). Targeting ferroptosis in rhabdomyosarcoma cells. *Int J Cancer*, *146*(2), 510-520.
- Dahlem, C., Chanda, S., Hemmer, J., Schymik, H. S., Kohlstedt, M., Wittmann, C., & Kiemer, A. K. (2022). Characterization of Anti-Cancer Activities of Violacein: Actions on Tumor Cells and the Tumor Microenvironment. *Frontiers in oncology*, *12*, 872223.
- de Carvalho, D. D., Costa, F. T., Duran, N., & Haun, M. (2006). Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol In Vitro*, *20*(8), 1514-1521.
- de Souza Oliveira, P. F., Faria, A. V. S., Clerici, S. P., Akagi, E. M., Carvalho, H. F., Justo, G. Z., et al. (2022). Violacein negatively modulates the colorectal cancer survival and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biochem*, *123*(7), 1247-1258.
- de Souza, K. D., Perez, K. R., Durán, N., Justo, G. Z., & Caseli, L. (2017). Interaction of violacein in models for cellular membranes: Regulation of the interaction by the lipid composition at the air-water interface. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *160*, 247-253.
- Dehner, C. A., Armstrong, A. E., Yohe, M., & Shern, J. F. (2021). Genetic characterization, current model systems and prognostic stratification in PAX fusion-negative vs. PAX fusion-positive rhabdomyosarcoma. *Genes*, *12*(10).
- Dias, P., Chen, B., Dilday, B., Palmer, H., Hosoi, H., Singh, S., et al. (2000). Strong immunostaining for myogenin in rhabdomyosarcoma is significantly associated with tumors of the alveolar subclass. *Am J Pathol*, *156*(2), 399-408.
- Diller, L., Chow, E. J., Gurney, J. G., Hudson, M. M., Kadin-Lottick, N. S., Kawashima, T. I., et al. (2009). Chronic disease in the childhood cancer survivor study cohort: A review of published findings. *J Clin Oncol*, *27*(14), 2339-2355.
- Douglass, E. C., Valentine, M., Etcubanas, E., Parham, D., Webber, B. L., & Houghton, P. J. (1987). A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet Cell Genet*, *45*(3-4), 148-155.
- Doyle, L. A. (2014). Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization classification of tumors of soft tissue and bone. *Cancer*, *120*(12), 1763-1774.
- Druskovic, M., Suput, D., & Milisav, I. (2006). Overexpression of caspase-9 triggers its activation and apoptosis in vitro. *Croat Med J*, *47*(6), 832-840.
- Duboscq-Bidot, L., Charron, P., Ruppert, V., Fauchier, L., Richter, A., Tavazzi, L., et al. (2009). Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, *30*(17), 2128-2136.

- Durán, N., Justo, G. Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., et al. (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-its main secondary metabolite: A review. *Biotechnol Adv*, *34*(5), 1030-1045.
- Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., & Martins, D. (2007). Violacein: Properties and biological activities. *Biotechnol Appl Biochem*, *48*(Pt 3), 127-133.
- Durán, N., Justo, G. Z., Melo, P. S., De Azevedo, M. B., Brito, A. R., & Almeida, A. B. (2003). Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Can J Physiol Pharmacol*, *81*(4), 387-396.
- Durán, N., Nakazato, G., Durán, M., Berti, I. R., Castro, G. R., & Stanisic, D. (2021). Multi-target drug with potential applications: Violacein in the spotlight. *World J Microbiol Biotechnol*, *37*(9), 151.
- Dziuba, I., Kurzawa, P., Dopierała, M., Larque, A. B., & Januszkiewicz-Lewandowska, D. (2018). Rhabdomyosarcoma in children - Current pathologic and molecular classification. *Pol J Pathol*, *69*(1), 20-32.
- Estrella, N. L., Desjardins, C. A., Nocco, S. E., Clark, A. L., Maksimenko, Y., & Naya, F. J. (2015). MEF2 transcription factors regulate distinct gene programs in mammalian skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*, *290*(2), 1256-1268.
- Fanzani, A., & Poli, M. (2017). Iron, oxidative damage and ferroptosis in rhabdomyosarcoma. *Int J Mol Sci*, *18*(8).
- FDA. (2022). Pharmacokinetic-based criteria for supporting alternative dosing regimens of programmed cell death receptor-1 (PD-1) or programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) blocking antibodies for treatment of patients with cancer guidance for industry (draft guidance).
- Ferrari, A., Dileo, P., Casanova, M., Bertulli, R., Meazza, C., & Gandola, L. (2003). Rhabdomyosarcoma in adults. A retrospective analysis of 171 patients treated at a single institution. *Cancer*, *98*(3), 571-580.
- Ferraro, E., Giammarioli, A. M., Chiandotto, S., Spoletini, I., & Rosano, G. (2014). Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: Redox signaling and role of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, *21*(1), 154-176.
- Ferreira, C. V., Bos, C. L., Versteeg, H. H., Justo, G. Z., Durán, N., & Peppelenbosch, M. P. (2004). Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*, *104*(5), 1459-1464.
- Franchi, M. V., Reeves, N. D., & Narici, M. V. (2017). Skeletal muscle remodeling in response to eccentric vs. concentric loading: Morphological, molecular, and metabolic adaptations. *Front Physiol*, *8*, 447.
- Ganguly, A., Yang, H., Sharma, R., Patel, K. D., & Cabral, F. (2012). The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(52), 43359-43369.
- Gartrell, J., & Pappo, A. (2020). Recent advances in understanding and managing pediatric rhabdomyosarcoma. *F1000Res*, *9*.

- Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Flamant, P., Gomès, D., Zammit, P. S., & Tajbakhsh, S. (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol*, 312(1), 13-28.
- Gholami, M., Ghahremani, P., Mohsenifar, Z., Jaafarzadeh, M. M., Momeni, A., & Parvizi, M. R. (2022). Ameliorative effects of N-acetylcysteine on the expression of oxidative stress-related genes and inflammatory biomarkers in the cardiac tissues of rats exposed to lead. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 24(1).
- Gonçalves, P. R., Rocha-Brito, K. J., Fernandes, M. R., Abrantes, J. L., Durán, N., & Ferreira-Halder, C. V. (2016). Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process. *Tumour Biol*, 37(10), 14049-14058.
- Gryder, B. E., Wachtel, M., Chang, K., El Demerdash, O., Aboredden, N. G., Mohammed, W., et al. (2020). Miswired enhancer logic drives a cancer of the muscle lineage. *iScience*, 23(5), 101103.
- Gupta, A. A., Chi, Y. Y., Anderson, J. R., Lyden, E., Weigel, B., Arndt, C., et al. (2017). Patterns of chemotherapy-induced toxicities and outcome in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 64(9).
- Gupta, R., Mitra, S., Chowdhury, S., Das, G., Priyadarshini, R., Mukhopadhyay, M. K., et al. (2021). Discerning perturbed assembly of lipids in a model membrane in presence of violacein. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1863(9), 183647.
- Han, X. J., Chae, J. K., Lee, M. J., You, K. R., Lee, B. H., & Kim, D. G. (2005). Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cells. *J Biol Chem*, 280(24), 23122-23129.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*, 14(2), 111-129.
- Hashimi, S. M., Xu, T., & Wei, M. Q. (2015). Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. *Oncol Rep*, 33(4), 1731-1736.
- Hassani, H. H., Hasan, H. M., al-Saadi, A., & Ali, A. M. (2012). A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Experimental Biology*, 2.
- Haun, M., Pereira, M. F., Hoffmann, M. E., Joyas, A., Campos, V., & Filardi, L. D. (1992). Bacterial chemistry. VI. Biological activities and cytotoxicity of 1, 3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. *Biol Res*, 25, 21-25.
- Hawkins, D. S., Spunt, S. L., & Skapek, S. X. (2013). Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Soft tissue sarcomas. *Pediatr Blood Cancer*, 60(6), 1001-1008.
- Henriksson, S., & Farnebo, M. (2015). On the road with WRAP53β: Guardian of Cajal bodies and genome integrity. *Front Genet*, 6, 91.
- Herrmann, D., Seitz, G., Fuchs, J., & Armeanu-Ebinger, S. (2012). Susceptibility of rhabdomyosarcoma cells to macrophage-mediated cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 1(3), 279-286.

- Hostein, I., Andraud-Fregeville, M., Guillou, L., Terrier-Lacombe, M. J., Deminière, C., Ranchère, D., et al. (2004). Rhabdomyosarcoma: Value of myogenin expression analysis and molecular testing in diagnosing the alveolar subtype: An analysis of 109 paraffin-embedded specimens. *Cancer*, *101*(12), 2817-2824.
- Huang, Y., Wang, Q., Tang, Y., Liu, Z., Sun, G., & Lu, Z. (2022). Identification and validation of a cigarette smoke-related five-gene signature as a prognostic biomarker in kidney renal clear cell carcinoma. *Sci Rep*, *12*(1), 2189.
- Hui, B., Ji, H., Xu, Y., Wang, J., Ma, Z., & Zhang, C. (2019). RREB1-induced upregulation of the lncRNA AGAP2-AS1 regulates the proliferation and migration of pancreatic cancer partly through suppressing ANKRD1 and ANGPTL4. *Cell Death Dis*, *10*(3), 207.
- Igarashi, K., Kawaguchi, K., Zhao, M., Kiyuna, T., Miyake, K., & Miyake, M. (2020). Exquisite tumor targeting by Salmonella A1-R in combination with caffeine and valproic acid regresses an adult pleomorphic rhabdomyosarcoma patient-derived orthotopic xenograft mouse model. *Transl Oncol*, *13*(2), 393-400.
- Imam Aliagan, A., Madungwe, N. B., Tombo, N., Feng, Y., & Bopassa, J. C. (2020). Chronic GPER1 activation protects against oxidative stress-induced cardiomyoblast death via preservation of mitochondrial integrity and deactivation of mammalian sterile-20-like kinase/Yes-associated protein pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *11*, 579161.
- Ishiguro, N., Baba, T., Ishida, T., Takeuchi, K., Osaki, M., & Araki, N. (2002). Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol*, *160*(5), 1767-1778.
- Ishiguro, N., Motoi, T., Araki, N., Ito, H., Moriyama, M., & Yoshida, H. (2008). Expression of cardiac ankyrin repeat protein, CARP, in malignant tumors: Diagnostic use of CARP protein immunostaining in rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol*, *39*(11), 1673-1679.
- Ishihara, Y., Nakamura, K., Nakagawa, S., Okamoto, Y., Yamamoto, M., & Furukawa, T. (2022). Nucleolar stress response via ribosomal protein L11 regulates topoisomerase inhibitor sensitivity of P53-intact cancers. *Int J Mol Sci*, *23*(24).
- Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M., & Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol (1985)*, *89*(1), 81-88.
- Jasnić, J. (2016). Određivanje profila ekspresije i unutarćelijske lokalizacije proteina ANKRD2 u srcu i skeletnim mišićima čoveka. *Univerzitet u Beogradu*.
- Jasnic-Savovic, J., Nestorovic, A., Savic, S., Karasek, S., Vitulo, N., Valle, G., et al. (2015). Profiling of skeletal muscle Ankrd2 protein in human cardiac tissue and neonatal rat cardiomyocytes. *Histochem Cell Biol*, *143*(6), 583-597.
- Jeyaseelan, R., Poizat, C., Baker, R. K., Abdishoo, S., Isterabadi, L. B., Lyons, G. E., et al. (1997). A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*, *272*(36), 22800-22808.

- Jiménez, A. P., Traum, A., Boettger, T., Hackstein, H., Richter, A. M., & Dammann, R. H. (2017). The tumor suppressor RASSF1A induces the YAP1 target gene. *Oncotarget*, *8*(51), 88437-88452.
- Jin, J., Zhang, L., Li, X., Xu, W., Yang, S., Song, J., et al. (2022). Oxidative stress-CBP axis modulates MOB1 acetylation and activates the Hippo signaling pathway. *Nucleic Acids Res*, *50*(7), 3817-3834.
- Justo, G. Z., & Durán, N. (2017). Action and function of *Chromobacterium violaceum* in health and disease: Violacein as a promising metabolite to counteract gastroenterological diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *31*(6), 649-656.
- Kakouri, E., Nikola, O., Kanakis, C., Hatzigiapiou, K., Lambrou, G. I., & Trigas, P. (2022). Cytotoxic effect of *Rosmarinus officinalis* extract on glioblastoma and rhabdomyosarcoma cell lines. *Molecules*, *27*(19).
- Kaspar, P., Ilencikova, K., Zikova, M., Horvath, O., Cermak, V., & Bartunek, P. (2013). c-Myb inhibits myoblast fusion. *PLoS One*, *8*(10), e76742.
- Kauanova, S., Urazbayev, A., & Vorobjev, I. (2021). The frequent sampling of wound scratch assay reveals the “opportunity” window for quantitative evaluation of cell motility-impeding drugs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 640972.
- Keller, C., & Guttridge, D. C. (2013). Mechanisms of impaired differentiation in rhabdomyosarcoma. *FEBS J*, *280*(17), 4323-4334.
- Khatib, Z. A., Matsushime, H., Valentine, M., Shapiro, D. N., Sherr, C. J., & Look, A. T. (1993). Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res*, *53*(22), 5535-5541.
- Kikuchi, M., Yamashita, K., Waraya, M., Minatani, N., Ushiku, H., Kojo, K., et al. (2016). Epigenetic regulation of ZEB1-RAB25/ESRP1 axis plays a critical role in phenylbutyrate treatment-resistant breast cancer. *Oncotarget*, *7*(2), 1741-1753.
- Kil, Y. S., Risinger, A. L., Petersen, C. L., Liang, H., Grkovic, T., & O'Keefe, B. R. (2020). Using the cancer dependency map to identify the mechanism of action of a cytotoxic alkenyl derivative from the fruit of. *J Nat Prod*, *83*(3), 584-592.
- Kim, Y. J., Yuk, N., Shin, H. J., & Jung, H. J. (2021). The natural pigment violacein potentially suppresses the proliferation and stemness of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Int J Mol Sci*, *22*(19).
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, *203*(3), 253-310.
- Kodach, L. L., Bos, C. L., Durán, N., Peppelenbosch, M. P., Ferreira, C. V., & Hardwick, J. C. (2006). Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, *27*(3), 508-516.

- Kodippili, K., & Rudnicki, M. A. (2023). Satellite cell contribution to disease pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Front Physiol*, *14*, 1180980.
- Kojić, S. (2016). Struktura i dinamika sarkomere. 1. izd. Beograd: Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.
- Kojic, S., Medeot, E., Guccione, E., Krmac, H., Zara, I., & Martinelli, V. (2004). The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol*, *339*(2), 313-325.
- Kojic, S., Nestorovic, A., Rakicevic, L., Belgrano, A., Stankovic, M., Divac, A., et al. (2010). A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Arch Biochem Biophys*, *502*(1), 60-67.
- Kojic, S., Radojkovic, D., & Faulkner, G. (2011). Muscle ankyrin repeat proteins: Their role in striated muscle function in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*, *48*(5-6), 269-294.
- Kojić, S., Medeot, E., & Faulkner, G. (2009). Characterization of antibodies directed against the ankrd2 human muscle protein. *Archives of Biological Sciences*, *61*(4), 683-691.
- Konzen, M., De Marco, D., Cordova, C. A., Vieira, T. O., Antônio, R. V., & Creczynski-Pasa, T. B. (2006). Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. *Bioorg Med Chem*, *14*(24), 8307-8313.
- Koskinen, S. O. A., Kyröläinen, H., Flink, R., Selänne, H. P., Gagnon, S. S., Ahtiainen, J. P., et al. (2017). Human skeletal muscle type 1 fibre distribution and response of stress-sensing proteins along the titin molecule after submaximal exhaustive exercise. *Histochem Cell Biol*, *148*(5), 545-555.
- Kothari, V., Sharma, S., & Padia, D. (2017). Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pac J Trop Med*, *10*(8), 744-752.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), pdb.prot095505.
- Kuo, H., Chen, J., Ruiz-Lozano, P., Zou, Y., Nemer, M., & Chien, K. R. (1999). Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development*, *126*(19), 4223-4234.
- Laure, L., Danièle, N., Suel, L., Marchand, S., Aubert, S., & Bourg, N. (2010). A new pathway encompassing calpain 3 and its newly identified substrate cardiac ankyrin repeat protein is involved in the regulation of the nuclear factor- κ B pathway in skeletal muscle. *FEBS J*, *277*(20), 4322-4373.
- Leal, A. M., de Queiroz, J. D., de Medeiros, S. R., & Lima, T. K. (2015). Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro. *BMC Microbiol*, *15*, 115.
- Lee, A., Zhu, Y., Sabo, Y., & Goff, S. P. (2019). Embryonic cells redistribute SUMO1 upon forced SUMO1 overexpression. *mBio*, *10*(6).

- Lei, Y., Henderson, B. R., Emmanuel, C., Harnett, P. R., & deFazio, A. (2015). Inhibition of ANKRD1 sensitizes human ovarian cancer cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Oncogene*, *34*(4), 485-495.
- Linders, A. N., Dias, I. B., López Fernández, T., Tocchetti, C. G., Bommer, N., & Van der Meer, P. (2024). A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *NPJ Aging*, *10*(1), 9.
- Ling, S. S. M., Chen, Y. T., Wang, J., Richards, A. M., & Liew, O. W. (2017). Ankyrin repeat domain 1 protein: A functionally pleiotropic protein with cardiac biomarker potential. *Int J Mol Sci*, *18*(7).
- Linger, R. M., Cohen, R. A., Cummings, C. T., Sather, S., Migdall-Wilson, J., Middleton, D. H., et al. (2013). Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene*, *32*(29), 3420-3431.
- Liu, X. H., Bauman, W. A., & Cardozo, C. (2015). ANKRD1 modulates inflammatory responses in C2C12 myoblasts through feedback inhibition of NF- κ B signaling activity. *Biochem Biophys Res Commun*, *464*(1), 208-213.
- Lun, A. S., Chen, J., & Lange, S. (2014). Probing muscle ankyrin-repeat protein (MARPs) structure and function. *Anat Rec (Hoboken)*, *297*(9), 1615-1629.
- Luo, Y., Zhou, J., Tang, J., Zhou, F., He, Z., & Liu, T. (2021). MINDY1 promotes bladder cancer progression by stabilizing YAP. *Cancer Cell Int*, *21*(1), 395.
- Machyna, M., Heyn, P., & Neugebauer, K. M. (2013). Cajal bodies: Where form meets function. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *4*(1), 17-34.
- Mansour, M. A., Rahman, M., Ayad, A. A., Warrington, A. E., & Burns, T. C. (2023). P21 overexpression promotes cell death and induces senescence in human glioblastoma. *Cancers*, *15*(4).
- Masuelli, L., Pantanella, F., La Regina, G., Benvenuto, M., Fantini, M., & Mattera, R. (2016). Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. *Tumour Biol*, *37*(3), 3705-3717.
- Mehta, T., Vercruyse, K., Johnson, T., Ejiofor, A. O., Myles, E., & Quick, Q. A. (2015). Violacein induces p44/42 mitogen-activated protein kinase-mediated solid tumor cell death and inhibits tumor cell migration. *Mol Med Rep*, *12*(1), 1443-1448.
- Melo, P. S., Justo, G. Z., de Azevedo, M. B., Durán, N., & Haun, M. (2003). Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology*, *186*(3), 217-225.
- Melo, P. S., Maria, S. S., Vidal, B. C., Haun, M., & Durán, N. (2000). Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *36*(8), 539-543.

- Mesas, C., Segura, B., Perazzoli, G., Chico, M. A., Moreno, J., & Doello, K. (2023). Plant-derived bioactive compounds for rhabdomyosarcoma therapy in vitro: A systematic review. *Applied Sciences*, *13*(23), 12964.
- Miller, M. K., Bang, M. L., Witt, C. C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., et al. (2003). The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol*, *333*(5), 951-964.
- Milosevic, E., Novkovic, M., Cenni, V., Bavelloni, A., Kojic, S., & Jasnic, J. (2024). Molecular characterization of ANKRD1 in rhabdomyosarcoma cell lines: Expression, localization, and proteasomal degradation. *Histochem Cell Biol*, *161*(5), 435-444.
- Missiaglia, E., Selfe, J., Hamdi, M., Williamson, D., Schaaf, G., & Fang, C. (2009). Genomic imbalances in rhabdomyosarcoma cell lines affect expression of genes frequently altered in primary tumors: An approach to identify candidate genes involved in tumor development. *Genes Chromosomes Cancer*, *48*(6), 455-467.
- Missiaglia, E., Williamson, D., Chisholm, J., Wirapati, P., Pierron, G., Petel, F., et al. (2012). PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification. *J Clin Oncol*, *30*(14), 1670-1677.
- Miwa, S., Yamamoto, N., Hayashi, K., Takeuchi, A., Igarashi, K., & Tsuchiya, H. (2020). Recent advances and challenges in the treatment of rhabdomyosarcoma. *Cancers*, *12*(7).
- Miyachi, M., Kakazu, N., Yagyū, S., Katsumi, Y., Tsubai-Shimizu, S., Kikuchi, K., et al. (2009). Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clin Cancer Res*, *15*(12), 4077-4084.
- Mojib, N., Nasti, T. H., Andersen, D. T., Attigada, V. R., Hoover, R. B., Yusuf, N., et al. (2011). The antiproliferative function of violacein-like purple violet pigment (PVP) from an Antarctic Janthinobacterium sp. Ant5-2 in UV-induced 2237 fibrosarcoma. *Int J Dermatol*, *50*(10), 1223-1233.
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., & Olson, E. N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*, *83*(7), 1125-1136.
- Moulik, M., Vatta, M., Witt, S. H., Arola, A. M., Murphy, R. T., McKenna, W. J., et al. (2009). ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol*, *54*(4), 325-333.
- Nathan, V., Subha Rajam, K., Rani, M., Rathinasamy, G., & Kannan, N. (2019). Surface culturing of Chromobacterium violaceum MTCC 2656 for violacein production and prospecting its bio-activities, chapter 3. *Current Research in Micro*.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, *83*(3), 770-803.
- Noujaim, J., Thway, K., Jones, R. L., Miah, A., Khabra, K., & Langer, R. (2015). Adult pleomorphic rhabdomyosarcoma: A multicentre retrospective study. *Anticancer Res*, *35*(11), 6213-6217.

- Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Rehman, N. U., Khan, A. L., et al. (2018). Therapeutic applications of bacterial pigments: A review of current status and future opportunities. *3 Biotech*, *8*(4), 207.
- Oberoi, S., Qumseya, A., Xue, W., Harrison, D. J., Rudzinski, E. R., & Wolden, S. L. (2023). Feasibility of combining temsirolimus to vincristine, dactinomycin, cyclophosphamide, and vincristine and irinotecan chemotherapy for children with intermediate-risk rhabdomyosarcoma: A report from Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, e30436.
- Oda, Y., Kohashi, K., Yamamoto, H., Tamiya, S., Kohno, K., Kuwano, M., et al. (2008). Different expression profiles of Y-box-binding protein-1 and multidrug resistance-associated proteins between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Sci*, *99*(4), 726-732.
- Ogbole, O. O., Segun, P. A., & Adeniji, A. J. (2017). In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complement Altern Med*, *17*(1), 494.
- Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B., & Ross, J. A. (2009). Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, *115*(18), 4218-4226.
- Pantanella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C., & Schippa, S. (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J Appl Microbiol*, *102*(4), 992-999.
- Park, H., Park, S., Yang, Y. H., & Choi, K. Y. (2021). Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. *Crit Rev Biotechnol*, *41*(6), 879-901.
- Park, J. H., Liu, L., Kim, I. H., Kim, J. H., You, K. R., & Kim, D. G. (2005). Identification of the genes involved in enhanced fenretinide-induced apoptosis by parthenolide in human hepatoma cells. *Cancer Res*, *65*(7), 2804-2814.
- Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W., & Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, *273*(13), 7770-7775.
- Peron, M., Bonvini, P., & Rosolen, A. (2012). Effect of inhibition of the ubiquitin-proteasome system and Hsp90 on growth and survival of rhabdomyosarcoma cells in vitro. *BMC Cancer*, *12*, 233.
- Peterson, J. M., Bakkar, N., & Guttridge, D. C. (2011). NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease. *Curr Top Dev Biol*, *96*, 85-119.
- Petrović, I., Milivojević, M., Arsenijević, A., Lazić, A., Kovačević Grujičić, N., Schwirtlich, M., et al. (2021). Retinoic acid affects basic cellular processes and SOX2 and SOX18 expression in breast carcinoma cells. *Biocell*, *45*(5), 1355-1370.
- Phelps, M. P., Yang, H., Patel, S., Rahman, M. M., McFadden, G., & Chen, E. (2018). Oncolytic virus-mediated RAS targeting in rhabdomyosarcoma. *Mol Ther Oncolytics*, *11*, 52-61.
- Phillips, D. C., Hunt, J. T., Moneypenny, C. G., Maclean, K. H., McKenzie, P. P., Harris, L. C., & Houghton, J. A. (2007). Ceramide-induced G2 arrest in rhabdomyosarcoma (RMS) cells requires

- p21Cip1/Waf1 induction and is prevented by MDM2 overexpression. Cell death and differentiation, 14(10), 1780–1791.
- Piazzzi, M., Kojic, S., Capanni, C., Stamenkovic, N., Bavelloni, A., & Marin, O. (2021). Ectopic expression of Ankrd2 affects proliferation, motility and clonogenic potential of human osteosarcoma cells. *Cancers*, 13(2).
- Platt, D., Amara, S., Mehta, T., Vercuyssee, K., Myles, E. L., & Johnson, T. (2014). Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: Potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 455(1-2), 107-112.
- Pomella, S., Danielli, S. G., Alaggio, R., Breunis, W. B., Hamed, E., & Selfe, J. (2023). Genomic and epigenetic changes drive aberrant skeletal muscle differentiation in rhabdomyosarcoma. *Cancers*, 15(10).
- Potapova, T. A., Unruh, J. R., Conkright-Fincham, J., Banks, C. A. S., Florens, L., Schneider, D. A., et al. (2023). Distinct states of nucleolar stress induced by anticancer drugs. *Elife*, 12.
- Potter, T. M., Neun, B. W., & Stern, S. T. (2011). Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles. *Methods Mol Biol*, 697, 181-189.
- Punyko, J. A., Mertens, A. C., Gurney, J. G., Yasui, Y., Donaldson, S. S., Rodeberg, D. A., et al. (2005). Long-term medical effects of childhood and adolescent rhabdomyosarcoma: A report from the childhood cancer survivor study. *Pediatr Blood Cancer*, 44(7), 643-653.
- Queiroz, K. C., Milani, R., Ruela-de-Sousa, R. R., Fuhler, G. M., Justo, G. Z., Zambuzzi, W. F., et al. (2012). Violacein induces death of resistant leukaemia cells via kinome reprogramming, endoplasmic reticulum stress and Golgi apparatus collapse. *PLoS One*, 7(10), e45362.
- Rapp, T. B., Yang, L., Conrad, E. U., Mandahl, N., & Chansky, H. A. (2002). RNA splicing mediated by YB-1 is inhibited by TLS/CHOP in human myxoid liposarcoma cells. *J Orthop Res*, 20(4), 723-729.
- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21(7), 267-271.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., & Tajbakhsh, S. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*, 172(1), 91-102.
- Rodrigues, A. L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A. F., Blotenberg, J., & Bolten, C. J. (2013). Systems metabolic engineering of Escherichia coli for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metab Eng*, 20, 29-41.
- Rudzinski, E. R., Anderson, J. R., Hawkins, D. S., Skapek, S. X., Parham, D. M., & Teot, L. A. (2015). The World Health Organization classification of skeletal muscle tumors in pediatric rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med*, 139(10), 1281-1287.
- Rudzinski, E. R., Anderson, J. R., Lyden, E. R., Bridge, J. A., Barr, F. G., & Gastier-Foster, J. M. (2014). Myogenin, AP2 β , NOS-1, and HMGA2 are surrogate markers of fusion status in

- rhabdomyosarcoma: A report from the soft tissue sarcoma committee of the children's oncology group. *Am J Surg Pathol*, 38(5), 654-659.
- Rudzinski, E. R., Teot, L. A., Anderson, J. R., Moore, J., Bridge, J. A., & Barr, F. G. (2013). Dense pattern of embryonal rhabdomyosarcoma, a lesion easily confused with alveolar rhabdomyosarcoma: A report from the soft tissue sarcoma committee of the Children's Oncology Group. *Am J Clin Pathol*, 140(1), 82-90.
- Ruiz-Mesa, C., Goldberg, J. M., Coronado Munoz, A. J., Dumont, S. N., & Trent, J. C. (2015). Rhabdomyosarcoma in adults: New perspectives on therapy. *Curr Treat Options Oncol*, 16(6), 27.
- Saab, R., Spunt, S. L., & Skapek, S. X. (2011). Myogenesis and rhabdomyosarcoma the Jekyll and Hyde of skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol*, 94, 197-234.
- Samaras, S. E., Almodóvar-García, K., Wu, N., Yu, F., & Davidson, J. M. (2015). Global deletion of Ankrd1 results in a wound-healing phenotype associated with dermal fibroblast dysfunction. *Am J Pathol*, 185(1), 96-109.
- Samaras, S. E., Chen, B., Koch, S. R., Sawyer, D. B., Lim, C. C., & Davidson, J. M. (2012). 26S proteasome regulation of Ankrd1/CARP in adult rat ventricular myocytes and human microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(4), 830-835.
- Samaras, S. E., Shi, Y., & Davidson, J. M. (2006). CARP: Fishing for novel mechanisms of neovascularization. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 11(1), 124-131.
- Saraiva, V. S., Marshall, J. C., Cools-Lartigue, J., & Burnier, M. N. (2004). Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 14(5), 421-424.
- Satheesha, S., Manzella, G., Bovay, A., Casanova, E. A., Bode, P. K., & Belle, R. (2016). Targeting hedgehog signaling reduces self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 35(16), 2020-2030.
- Schaaf, G., Hamdi, M., Zwijnenburg, D., Lakeman, A., Geerts, D., Versteeg, R., et al. (2010). Silencing of SPRY1 triggers complete regression of rhabdomyosarcoma tumors carrying a mutated RAS gene. *Cancer Res*, 70(2), 762-771.
- Schmidt, M., Schüler, S. C., Hüttner, S. S., von Eyss, B., & von Maltzahn, J. (2019). Adult stem cells at work: Regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci*, 76(13), 2559-2570.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675.
- Schutz, F. A., Bellmunt, J., Rosenberg, J. E., & Choueiri, T. K. (2011). Vinflunine: Drug safety evaluation of this novel synthetic vinca alkaloid. *Expert Opin Drug Saf*, 10(4), 645-653.
- Scurr, L. L., Guminski, A. D., Chiew, Y. E., Balleine, R. L., Sharma, R., Lei, Y., et al. (2008). Ankyrin repeat domain 1, ANKRD1, a novel determinant of cisplatin sensitivity expressed in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 14(21), 6924-6932.

- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, *102*(6), 777-786.
- Shen, L., Chen, C., Wei, X., Li, X., Luo, G., & Zhang, J. (2015). Overexpression of ankyrin repeat domain 1 enhances cardiomyocyte apoptosis by promoting p53 activation and mitochondrial dysfunction in rodents. *Clin Sci (Lond)*, *128*(10), 665-678.
- Shern, J. F., Yohe, M. E., & Khan, J. (2015). Pediatric rhabdomyosarcoma. *Crit Rev Oncog*, *20*(3-4), 227-243.
- Shi, Y., Reitmaier, B., Regenbogen, J., Slowey, R. M., Opalenik, S. R., & Wolf, E. (2005). CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is up-regulated during wound healing and induces angiogenesis in experimental granulation tissue. *Am J Pathol*, *166*(1), 303-312.
- Shrestha, R., Mohankumar, K., Martin, G., Hailemariam, A., Lee, S. O., & Jin, U. H. (2021). Flavonoids kaempferol and quercetin are nuclear receptor 4A1 (NR4A1, Nur77) ligands and inhibit rhabdomyosarcoma cell and tumor growth. *J Exp Clin Cancer Res*, *40*(1), 392.
- Siebert, J., Schneider, M., Reuter-Schmitt, D., Würtemberger, J., Neubüser, A., & Driever, W. (2023). Rhabdomyosarcoma xenotransplants in zebrafish embryos. *Pediatr Blood Cancer*, *70*(1), e30053.
- Singh, K., & Dilworth, F. J. (2013). Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS J*, *280*(17), 3991-4003.
- Skapek, S. X., Anderson, J., Barr, F. G., Bridge, J. A., Gastier-Foster, J. M., & Parham, D. M. (2013). PAX-FOXO1 fusion status drives unfavorable outcome for children with rhabdomyosarcoma: A children's oncology group report. *Pediatr Blood Cancer*, *60*(9), 1411-1417.
- Skapek, S. X., Ferrari, A., Gupta, A. A., Lupo, P. J., Butler, E., & Shipley, J. (2019). Rhabdomyosarcoma. *Nat Rev Dis Primers*, *5*(1), 1.
- Slinker, B. K. (1998). The statistics of synergism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *30*(4), 723-731.
- Sommer, P., Le Rouzic, P., Gillingham, H., Berry, A., Kayahara, M., & Huynh, T. (2007). Glucocorticoid receptor overexpression exerts an antisurvival effect on human small cell lung cancer cells. *Oncogene*, *26*(50), 7111-7121.
- Sorg, C., Schmid, E., Bortel, N., Fuchs, J., & Ellerkamp, V. (2021). Antitumor effects of curcumin in pediatric rhabdomyosarcoma in combination with chemotherapy and phototherapy in vitro. *Int J Oncol*, *58*(2), 266-274.
- Staněk, D. (2017). Cajal bodies and snRNPs - Friends with benefits. *RNA Biol*, *14*(6), 671-679.
- Suenaga, S., Ichiyanagi, O., Ito, H., Naito, S., Kato, T., & Nagaoka, A. (2016). Expression of extracellular signal-regulated kinase 5 and ankyrin repeat domain 1 in composite pheochromocytoma and ganglioneuroblastoma detected incidentally in the adult adrenal gland. *Intern Med*, *55*(24), 3611-3621.

- Sultan, I., Qaddoumi, I., Yaser, S., Rodriguez-Galindo, C., & Ferrari, A. (2009). Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: An analysis of 2,600 patients. *J Clin Oncol*, *27*(20), 3391-3397.
- Takahashi, A., Seike, M., Chiba, M., Takahashi, S., Nakamichi, S., Matsumoto, M., et al. (2018). Ankyrin repeat domain 1 overexpression is associated with common resistance to afatinib and osimertinib in EGFR-mutant lung cancer. *Sci Rep*, *8*(1), 14896.
- Tang, J., Tian, Z., Liao, X., & Wu, G. (2021). SOX13/TRIM11/YAP axis promotes the proliferation, migration and chemoresistance of anaplastic thyroid cancer. *Int J Biol Sci*, *17*(2), 417-429.
- Tomasiak, P., Janisiak, J., Rogińska, D., Perużyńska, M., Machaliński, B., & Tarnowski, M. (2023). Garcinol and anacardic acid, natural inhibitors of histone acetyltransferases, inhibit rhabdomyosarcoma growth and proliferation. *Molecules*, *28*(14).
- Tran, S., DeGiovanni, P. J., Piel, B., & Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine: A review of recent success in drug delivery. *Clin Transl Med*, *6*(1), 44.
- Trinkle-Mulcahy, L., & Sleeman, J. E. (2017). The Cajal body and the nucleolus: "In a relationship" or "It's complicated"? *RNA Biol*, *14*(6), 739-751.
- Urla, C., Stagno, M. J., Fuchs, J., Warmann, S. W., & Schmid, E. (2023). Anticancer bioactivity of zerumbone on pediatric rhabdomyosarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, *149*(7), 3313-3323.
- van Duijvenboden, K., de Bakker, D. E. M., Man, J. C. K., Janssen, R., Günthel, M., & Hill, M. C. (2019). Conserved NPPB+ border zone switches from MEF2- to AP-1-driven gene program. *Circulation*, *140*(10), 864-879.
- van Loo, P. F., Mahtab, E. A., Wisse, L. J., Hou, J., Grosveld, F., & Suske, G. (2007). Transcription factor Sp3 knockout mice display serious cardiac malformations. *Mol Cell Biol*, *27*(24), 8571-8582.
- Van Meter, M., Mao, Z., Gorbunova, V., & Seluanov, A. (2011). SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle*, *10*(18), 3153-3158.
- Venegas, F. A., Köllisch, G., Mark, K., Diederich, W. E., Kaufmann, A., Bauer, S., et al. (2019). The bacterial product violacein exerts an immunostimulatory effect via TLR8. *Sci Rep*, *9*(1), 13661.
- Verma, A., Warner, S. L., Vankayalapati, H., Bearss, D. J., & Sharma, S. (2011). Targeting Axl and Mer kinases in cancer. *Mol Cancer Ther*, *10*(10), 1763-1773.
- Vishnu, T., & Palaniswamy, M. (2018). Systematic approach on evaluating the in vitro antioxidant activity of violacein; novel isolate Chromobacterium Vaccinii CV5. *Biomedical and Pharmacology Journal*, *11*(2), 703-709.
- Wachtel, M., Runge, T., Leuschner, I., Stegmaier, S., Koscielniak, E., & Treuner, J. (2006). Subtype and prognostic classification of rhabdomyosarcoma by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, *24*(5), 816-822.

- Weber-Hall, S., Anderson, J., McManus, A., Abe, S., Nojima, T., Pinkerton, R., et al. (1996). Gains, losses, and amplification of genomic material in rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 56(14), 3220-3224.
- Wei, Y., Qin, Q., Yan, C., Hayes, M. N., Garcia, S. P., Xi, H., et al. (2022). Single-cell analysis and functional characterization uncover the stem cell hierarchies and developmental origins of rhabdomyosarcoma. *Nat Cancer*, 3(8), 961-975.
- Wette, S. G., Smith, H. K., Lamb, G. D., & Murphy, R. M. (2017). Characterization of muscle ankyrin repeat proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 313(3), C327-C339.
- Williamson, D., Missiaglia, E., de Reyniès, A., Pierron, G., Thuille, B., Palenzuela, G., et al. (2010). Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 28(13), 2151-2158.
- Witt, S. H., Labeit, D., Granzier, H., Labeit, S., & Witt, C. C. (2005). Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: Implications for MARP titin-based signaling. *J Muscle Res Cell Motil*, 26(6-8), 401-408.
- Wu, D., Wang, Z., Lin, M., Shang, Y., Wang, F., Zhou, J., Wang, F., Zhang, X., Luo, X., & Huang, W. (2019). In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Cucurbitacin C, a Novel Natural Product From Cucumber. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1287.
- Xu, X., Zhong, D., Wang, X., Luo, F., Zheng, X., & Feng, T. (2024). Pan-cancer integrated analysis of ANKRD1 expression, prognostic value, and potential implications in cancer. *Sci Rep*, 14(1), 5268.
- Yin, P., & Tong, C. (2022). LncRNA RGMB-AS1 up-regulates ANKRD1 through competitively sponging miR-3614-5p to promote OSA cell proliferation and invasion. *Arch Med Res*, 53(2), 131-137.
- Zammit, P. S. (2017). Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 72, 19-32.
- Zarrabi, A., Perrin, D., Kavooosi, M., Sommer, M., Sezen, S., Mehrbod, P., et al. (2023). Rhabdomyosarcoma: Current therapy, challenges, and future approaches to treatment strategies. *Cancers*, 15(21).
- Zhang, N., Ye, F., Zhu, W., Hu, D., Xiao, C., & Nan, J. (2016). Cardiac ankyrin repeat protein attenuates cardiomyocyte apoptosis by upregulation of Bcl-2 expression. *Biochim Biophys Acta*, 1863(12), 3040-3049.
- Zhang, Y., Zhou, L., Fu, Q., & Liu, Z. (2023). ANKRD1 activates the Wnt signaling pathway by modulating CAV3 expression and thus promotes BMSC osteogenic differentiation and bone formation in ovariectomized mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1869(5), 166693.
- Zhu, J., Cai, Y., Xu, K., Ren, X., Sun, J., & Lu, S. (2018). Beclin1 overexpression suppresses tumor cell proliferation and survival via an autophagy-dependent pathway in human synovial sarcoma cells. *Oncol Rep*, 40(4), 1927-1936.

Zhu, Y., Tomlinson, R. L., Lukowiak, A. A., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol Biol Cell*, 15(1), 81-90.

Zolk, O., Frohme, M., Maurer, A., Kluxen, F. W., Hentsch, B., Zubakov, D., et al. (2002). Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(5), 1377-1382.

Zou, Y., Evans, S., Chen, J., Kuo, H. C., Harvey, R. P., & Chien, K. R. (1997). CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development*, 124(4), 793-804.

BIOGRAFIJA AUTORA

Emilija Milošević je rođena u Užicu 15. novembra 1994. godine. Na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (UB), diplomirala je 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,03. Iste godine upisala je master akademske studije na Biološkom fakultetu, UB. Master studije završila je 2018. godine sa prosečnom ocenom 10,0. Od 2019. godine zaposlena je na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI) na nacionalnom projektu „Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa – strukturna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera“ (evidencioni broj 173008), a trenutno je angažovana na projektima „Program rada IMGGI za 2024. godinu“ (evidencioni broj 451-03-47/2023-01/200042) i „ZEBARR – ankrd1a zebrice u regeneraciji srca i reparaciji skeletnih mišića – nova perspektiva za otključavanje endogenog regenerativnog potencijala srca čoveka“. Eksperimentalni deo svoje doktorske disertacije uradila je u Laboratoriji za molekularnu biologiju, IMGGI, u Grupi za ćelijsku i molekularnu biologiju mišića, pod mentorstvom dr Jovane Jasnić. Do danas, Emilija Milošević je objavila tri naučna rada u međunarodnim časopisima i autor je devet saopštenja na međunarodnim kongresima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Емилија Милошевић

број индекса М3003/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација гена *ANKRD1* и утицаја виолацеина на ћелије рабдомиосаркома *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 15.7.2024.

Емилија Милошевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Емилија Милошевић

Број индекса M3003/2018

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Карактеризација гена ANKRD1 и утицаја виолацеина на ћелије
рабдомиосаркома *in vitro*

Ментори др Јована Јаснић, научни сарадник (Институт за молекуларну генетику и
генетичко инжењерство, Универзитет у Београду); др Милош Бркушанин, доцент
(Биолошки факултет, Универзитет у Београду)

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији
коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума
Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања
доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у
електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 15.7.2024.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација гена ANKRD1 и утицаја виолацеина на ћелије рабдомиосаркома *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15.7.2024.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.