

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u
Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne
bioznanosti

Ana Dekanić

**Utjecaj utišavanja integrinskih podjedinica α u
stanicama melanoma čovjeka na osjetljivost na
protutumorske lijekove i pokretljivost**

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska Disertacija

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ UTIŠAVANJA INTEGRINSKIH PODJEDINICA α U STANICAMA MELANOMA ČOVJEKA NA OSJETLJIVOST NA PROTUTUMORSKE LIJEKOVE I POKRETLJIVOST

Ana Dekanić

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Terapija protutumorskim lijekovima nije metoda odabira za metastatski melanom, ali se koristi u liječenju melanoma koji ne odgovaraju na ciljanu terapiju. Ovaj rad istražuje na modelu četiri stanične linije melanoma čovjeka utjecaj utišavanja integrinskih podjedinica α (α_3 , α_4 ili α_v) na osjetljivost na protutumorske lijekove (cisplatinu, paklitaksel ili vinkristin) i pokretljivost. U staničnoj liniji melanoma RPMI-7951, u kojoj utišavanje integrinske podjedinice α_v povećava osjetljivost na cisplatinu, paklitaksel ili vinkristin, i smanjuje pokretljivost, istražen je sastav kompleksa adhezije, tj. adhesoma integrina α_v . Rezultati ovog rada doprinose razumijevanju signalnih puteva integrina u melanomu, kao i razvoju kombiniranih terapija.

Broj stranica: 195

Broj slika: 24

Broj tablica: 30

Broj literaturnih navoda: 203

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: melanom, integrinske podjedinice α_3 , α_4 , α_v , integrini $\alpha\beta_3$, $\alpha\beta_5$, integrinsko preslagivanje, otpornost na protutumorske lijekove posredovana integrinima, cisplatinu, paklitaksel, vinkristin, migracija, fokalne adhezije, kompleks adhezije integrina, adhesom

Datum obrane: 14. veljače 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Doc. dr. sc. Neda Slade, znanstvena savjetnica, predsjednica povjerenstva
2. Prof. dr. sc. Igor Weber, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju
3. Prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica u trajnom zvanju
4. Doc. dr. sc. Maja Herak Bosnar, znanstvena savjetnica, zamjena

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

University of Dubrovnik

Ruđer Bošković Institute

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Biological Sciences

Scientific Field: Biology

THE EFFECT OF SILENCING OF INTEGRIN SUBUNITS α IN HUMAN MELANOMA CELLS ON SENSITIVITY TO ANTITUMOUR DRUGS AND MOTILITY

Ana Dekanić

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

Supervisor: Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Scientist, Associate professor

Short abstract:

Chemotherapy is not a preferred treatment option for metastatic melanoma, but is used in the treatment of melanoma which do not respond to targeted therapy. This dissertation studies, in a panel of four human melanoma cell lines, the effect of integrin subunits α ($\alpha 3$, $\alpha 4$ or αv) knockdown on the modulation of sensitivity to chemotherapy drugs (cisplatin, paclitaxel or vincristine) and motility. In melanoma cell line RPMI-7951, in which integrin αv knockdown increases sensitivity to cisplatin, paclitaxel or vincristine, the composition of integrin αv adhesion complexes (IAC), i.e. adhesome, was analysed. Results of this work contribute to the understanding of integrin signaling pathways in melanoma and to the development of the combinational therapy for melanoma.

Number of pages: 195

Number of figures: 24

Number of tables: 30

Number of references: 203

Original in: Croatian

Key words: melanoma, integrin $\alpha 3$, $\alpha 4$, αv , $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, integrin switching, integrin mediated drug resistance, cisplatin, paclitaxel, vincristine, migration, focal adhesions, integrin adhesion complexes, adhesome

Date of the thesis defense: 14th February 2019

Reviewers:

1. Neda Slade, PhD, Senior Scientist, Assistant professor, Ruđer Bošković Institute, president of commission
2. Igor Weber, PhD, Senior Scientist, Full professor, Ruđer Bošković Institute
3. Vera Cesar, PhD, Full professor tenure, J.J. Strossmayer University of Osijek
4. Maja Herak Bosnar, PhD, Senior Scientist, Assistant professor, Ruđer Bošković Institute, substitute member

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

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-11-2013-2465 (2014-2018) „Molekularni mehanizmi povećanja osjetljivosti na protutumorske lijekove stanica karcinoma dojke i melanoma čovjeka utišavanjem integrina“.

Kako riječima opisati duboku Zahvalnost i Zadovoljstvo nakon završetka jednog divnog Životnog poglavlja? Puno je ljudi koji su mi uljepšali Život i pomogli mi da shvatim da je sve moguće i potakli me da slijedim svoje Snove i kreiram svoju Budućnost. Na listi je moja divna mentorica, moji kolege, moji roditelji, sestra, obitelj, prijatelji i Luka.

Prvo želim reći hvala svojoj mentorici. Andreja, hvala ti na mentorstvu i stručnom vodstvu. Hvala što sa zadovoljstvom živiš Znanost. Ti si mi uzor i da su me pitali da izmislim idealnog mentora prije nego sam krenula u ovu Avanturu, ne bi ti bio ni do koljena! Hvala ti na svom znanju koje si prenijela na mene, na potpori, povjerenju, motivaciji i optimizmu i na kišne dane, i na svim savjetima, kako o Znanosti tako i o Životu. Hvala ti pogotovo što si svojim trudom i znanjem pokrenula istraživački projekt koji ti je omogućio zapošljavanje i istraživački rad jednog doktoranda. Hvala što si me izabrala.

Nina, hvala na svemu što si me naučila, na svim trikovima za bolje eksperimente, na kritičkim osurtima svega što sam pisala i radila, na ohrabrivanju i na uljepšavanju svakodnevne Znanosti.

Dragomira, hvala na prijateljstvu, savjetima i zagrljajima, maminim kolačima i jabukama koje su održavale energiju kada je bila kriza. Hvala ti posebno za pokuse imunofluorescencije.

Hvala, Mladen, na kritičkim raspravama, savjetima i na tome što si me naučio metodu izdvajanja i analize sastava kompleksa adhezije integrina. Hvala također prof. dr. sc. M. J. Humphriesu i dr. sc. J. D. Humphriesu što su ovu metodu podijelili s nama i analizirali naše uzorke na masenom spektrometru.

Davore, hvala na snimanju divnih fotografija konfokalnim mikroskopom, na prijateljstvu, na slušanju i raspravama.

Hvala, Ivana, na ispravicima, prijedlozima i gramatičkim lekcijama pri pisanju ovog doktorata. ☺

Hvala svim članovima LSBPS-a. Hvala, dr. Osmak, Anamaria, Sanjica, Tihana, Juran, Margareta, Alen, Ana T. i Marina, na divnoj energiji kojom zračite, na žustrim diskusijama o Znanosti i veselim ručkovima. Divni ste!

Hvala Christine i Kristini, našim diplomanticama s kojima sam učila kako biti mentor.

Hvala svim Ruđerovcima s kojima mi se isprepleo put, Marku, Tamari i Mateji, a pogotovo ekipi iz busa 201, jer su mi uljepšali svakodnevni put do Laboratorija gdje se događa Čarolija.

Mama, hvala što si uvijek tu, što me podupireš, potičeš i pratiš u kojem god smjeru da nam Život ide. Hvala ti što uvijek imaš riječi Utjehe i što s tobom mogu pronaći Mir koji se zna izgubiti svakodnevnim brigama.

Hvala, tata, što si mi usadio sliku Znanosti i objasnio što je to pH kada nisam znala niti što je kemija. Hvala ti što si uvijek nasmijan, spreman za slušanje i što me uvijek savjetuješ da „udrim brigu na veselje“. To mi je bila važna lekcija.

Hvala, Jelena, što si najbolja sestra koju sam mogla zamisliti. Imati sestru je neprocjenjivo, a pogotovo tebe u toj ulozi. Hvala ti na potpori i savjetima, što misliš kada ja to ne znam i što skupa živimo ovu avanturu Života. Hvala mom šogiju što uvijek sa zanimanjem razgovara sa mnom o Znanosti i dijeli moju Sreću oko doktorata.

Hvala mojoj baki Franjki, što mi je uljepšala Život i pokazala kako Skromnost donosi Sreću i Mir. Hvala svim Demeterkama i njihovim obiteljima, Dekanićima, kao i Tadijanima koji su me primili u svoju obitelj. Hvala što me podupirete i pratite na mom putu i što zajedno činimo Obitelj.

Hvala, Marina i Martina, na prijateljstvu i kavama. Hvala na slušanju i na svim riječima potpore i savjeta, što ste uvijek uz mene i što skupa napredujemo i hodamo kroz Život. Bolje prijateljice ne bih mogla izmisliti!

Hvala svim prijateljima. Hvala, Džeja i Nina, jer ste mi uljepšale Život kada je znao biti siv. Hvala, Ana L., Ivana M. i Zorana, jer, iako smo udaljene, skupa rastemo i

razvijamo se. Hvala, Verane i Tea, Vedrane i Julija, Nikola i Martina, što ste uvijek s ponosom svima pričali kako će Ana biti doktorica :)

Hvala, Luka, što si uz mene, što si uvijek slušao o mojim uspjesima, brigama i propalim pokusima, što me podržavaš na mom znanstvenom putu i što me nasmijavaš. Hvala ti na svim avanturama koje smo skupa proživjeli.

Hvala Stručnom povjerenstvu ovog doktorskog rada na ispravcima i prijedlozima.

Hvala svim učiteljima, nastavnicima i profesorima kojima sam prošla kroz prste i pogotovo Poslijediplomskom studiju Molekularnih bioznanosti, koji me srdačno primio u svoju zajednicu.

Hvala na kraju Hrvatskoj zakladi za znanost koja je financirala moj rad i projekt u sklopu kojeg sam izradila ovu doktorsku disertaciju. Bez Vas bi ovaj rad ostao samo na idejama.

„Someone told me recently I was delusional.

I almost fell of my unicorn.“

Unknown

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Melanom - zloćudni tumor kože	1
1.1.1. Liječenje melanoma.....	5
1.2. Integrini	8
1. Uloga integrina u osjetljivosti stanica tumora na protutumorske lijekove	10
1.3. Ekspresija integrina u melanomu: integrinske podjedinice α_3 , α_4 i α_V	12
1.4. Modulacija osjetljivosti melanoma na protutumorske lijekove djelovanjem na integrine	14
1.5. Adhezija stanica	16
1.5.1. Izvanstanični matriks.....	17
1.5.2. Adhezija posredovana integrinima.....	17
1.6. Adhesom integrina	19
1.6.1. Istraživanje adhesoma integrina.....	22
1.7. Sažetak i ciljevi rada.....	28
2. MATERIJALI I METODE.....	30
2.1. MATERIJALI	30
2.1.1. Stanice melanoma čovjeka.....	30
2.1.2. Osnovne kemikalije	30
2.1.3. Otopine i njihova priprema	32
2.1.4. Male interferirajuće RNA korištene u pokusima prolazne transfekcije	34
2.1.5. Plazmid SUPER.puro. α_V za izdvajanje stabilnih transfektanata	35
2.1.6. Protutumorski lijekovi i inhibitori	35
2.1.7. Kompleti kemikalija i standardi	36

2.1.8. Protutijela i spojevi korišteni u metodama protočne citometrije, western blota i fluorescencijske mikroskopije.....	36
2.1.9. Uređaji	38
2.1.10. Laboratorijski pribor	39
2.1.11. Računalni programi.....	40
2.2. METODE	41
2.2.1. Kultura stanica.....	41
2.2.2. Određivanje ekspresije površinskih integrina metodom protočne citometrije	42
2.2.3. Utišavanje gena za integrinske podjedinice transfekcijom specifičnih malih interferirajućih RNA	43
2.2.4. Izdvajanje stabilno transficiranih klonova stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrina αv	44
2.2.5. Određivanje preživljenja stanica testom MTT.....	46
2.2.6. Tumačenje utjecaja utišavanja integrinskih podjedinica ili PF-228 na djelovanja cisplatine, paklitaksela i vinkristina pomoću dvostruke ANOVA-e ...	47
2.2.7. Utvrđivanje apoptoze protočnom citometrijom nakon istovremenog bojenja aneksin V fluoresceinom i propidij jodidom	47
2.2.8. Mjerenje migracije i invazije stanica pomoću komorica za migraciju i invaziju	48
2.2.9. Analiza ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot	50
2.2.10. Analiza fokalnih adhezija imunofluorescencijskom mikroskopijom i mikroskopijom refleksijskog interferencijskog kontrasta.....	53
2.2.11. Analiza sastava kompleksa adhezije integrina (adhesoma) masenom spektrometrijom.....	54
2.2.12. Statistička obrada podataka	56
3. REZULTATI	57

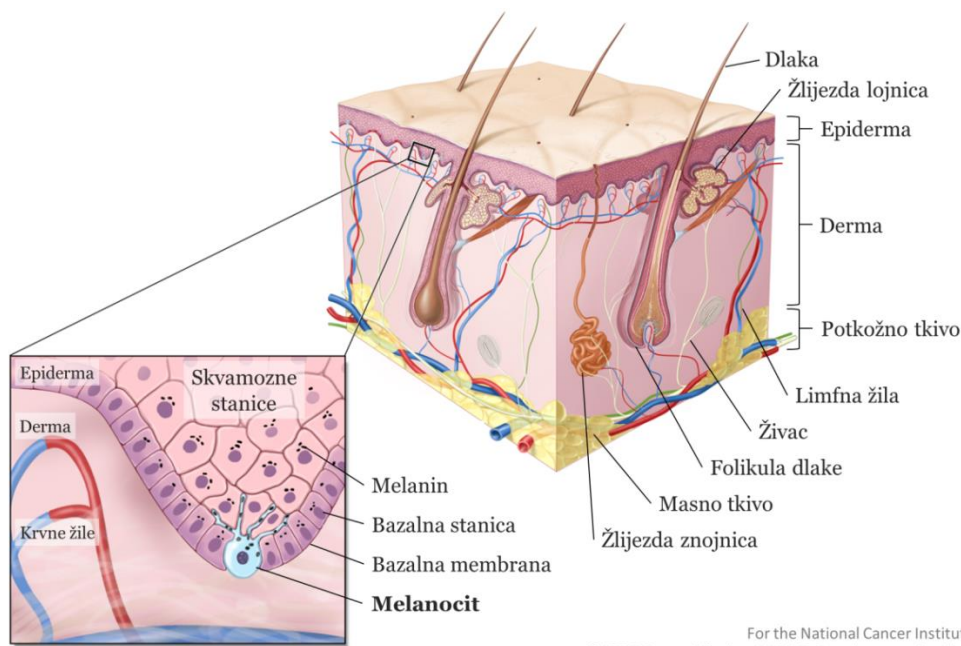
3.1. Ekspresija integrina u stanicama melanoma čovjeka	57
3.2. Povoljan učinak utišavanja gena za integrinske podjedinice α_4 , α_v ili β_5 na odgovor stanica na paklitaksel i vinkristin u stanicama MDA-MB-435S	59
3.3. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_3 povećava <i>in vitro</i> migraciju, a utišavanje α_v smanjuje <i>in vitro</i> invaziju stanica MDA-MB-435S.....	61
3.4. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_v ima različit učinak na osjetljivost stanica melanoma RPMI-7951, A375 i MeWo na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin	63
3.5. Uključenost integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u odgovor stanica RPMI-7951 i MeWo na protutumorske lijekove	66
3.5.1. Utišavanje integrinske podjedinice β_3 ili β_5 u stanicama RPMI-7951 povećava osjetljivost stanica na paklitaksel i vinkristin	66
3.5.2. Utišavanje integrinskih podjedinica β_3 ili β_5 u stanicama MeWo smanjuje osjetljivost stanica na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin.....	69
3.6. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_v u stanicama melanoma MDA-MB-435S i RPMI-7951 povećava paklitakselom izazvanu apoptozu	72
3.7. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_v u stanicama RPMI-7951 smanjuje pokretljivost: ključna uloga integrina $\alpha_v\beta_5$	74
3.8. Inhibicija pFAK-a (Y397) smanjuje osjetljivost tri od četiri stanične linije melanoma na paklitaksel	77
3.9. Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice α_v u stanicama RPMI-7951 na lokalizaciju pPax-a (Y113), tubulina i aktinskog citoskeleta.....	81
3.10. Stabilno transficirani klonovi stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrina α_v su smanjeno osjetljivi na paklitaksel i vinkristin i nisu sposobni dugotrajno rasti u kulturi.....	85
3.10.1. Optimizacija transfekcije i određivanje količine puromicina za odabir stabilno transficiranih klonova	85

3.10.2. Stabilno transficirani klonovi stanica RPMI-7951 pokazuju smanjenu ekspresiju integrina αv , smanjenu osjetljivost na paklitaksel i vinkristin i nisu sposobni dugotrajno rasti u kulturi	87
3.11. Promjena adhesoma nakon utišavanja integrinske podjedinice αv u stanicama RPMI-7951.....	91
3.11.1. Utvrđivanje optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om za izdvajanje proteina IAC-a	91
3.11.2. Promjena sastava adhesoma stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice αv	93
4. RASPRAVA	109
5. ZAKLJUČCI	128
6. LITERATURA.....	130
7. SAŽETAK	153
8. SUMMARY	155
9. PRILOZI.....	157
9.1. Metoda: spektrometrija masa	157
9.2. Adhesom stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom siRNA ili integrin αv -specifičnom podjedinicom siRNA.....	158
9.3. Značenje kratica imena proteina IAC-a povezanih s FA-om i ECM-om prikazanih String pogromom	181
9.4. Popis značajno promijenjenih proteina IAC-a stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice αv	186
10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA.....	193

1. UVOD

1.1. Melanom - zloćudni tumor kože

Tumori kože mogu se podijeliti na nemelanomske tumore i melanom. Melanom je najsmrtonosniji tumor kože koji nastaje nekontroliranim rastom melanocita, stanica kože porijeklom iz neuralnog grebena, koje proizvode pigment, a nalaze se u donjem dijelu epiderme (Slika 1); dok nemelanomske tumore kože čine karcinom bazalnih stanica (engl. *basal cell carcinoma*, BCC) i karcinom skvamoznih stanica (engl. *squamous cell carcinoma*, SCC). BCC i SCC su najčešći oblici tumora kože, a melanom, iako predstavlja manje od 5% zloćudnih oboljenja kože, odgovoran je za većinu smrti u toj skupini. U zadnjih 50 godina učestalost pojave melanoma je u porastu u odnosu na ostale tipove tumora (Matthews i ostali, 2017.; PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2018.).



Slika 1. Shematski prikaz građe kože i smještaja melanocita, stanica čijim nekontroliranim dijeljenjem nastaje melanom. Melanocit je smješten na bazalnoj membrani u donjem dijelu epiderme, gornjeg sloja kože. Preuzeto iz PDQ Adult Treatment Editorial Board (2018.) i prilagođeno.

Melanom je heterogena bolest sa složenim mehanizmima patogeneze, a nastaje kao posljedica specifičnih genskih promjena unutar nekoliko funkcionalno povezanih molekulskih puteva (Slika 2) (Palmieri i ostali, 2015.). Na uzorcima melanoma pacijenata je pokazano da je signalni put mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) pretjerano aktivan u oko 50% melanoma, uglavnom zbog specifične mutacije u genu za kinazu BRAF (engl. *isoform B of RAF kinase*; RAF, *rapidly accelerated fibrosarcoma*) koja ju čini konstitutivno aktivnom. Najčešća mutacija je V600E koja se pojavljuje u 73% slučajeva, dok se u 19% slučajeva pojavljuje mutacija V600K (Luke i ostali, 2017.; Menzies i ostali, 2012.). Zanimljivo je da se BRAF-mutacija V600E nalazi i u 82% madeža, što upućuje na zaključak da, iako aktivacija puta MAPK mutacijom u madežu predstavlja kritičan korak za razvoj melanoma, to nije dostatno za tumorigenezu. Istom studijom zabilježeno je da 64% metastaza i 14% madeža nosi mutaciju u genu za protein NRAS (engl. *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*) koji se nalazi uzvodno od kinaza RAF u MAPK putu (Pollock i ostali, 2003.). Hodis i ostali (2012.) su sekvenciranjem cijelog genoma identificirali funkcionalne mutacije u proteinu NRAS u 26% istraživanih uzoraka melanoma.

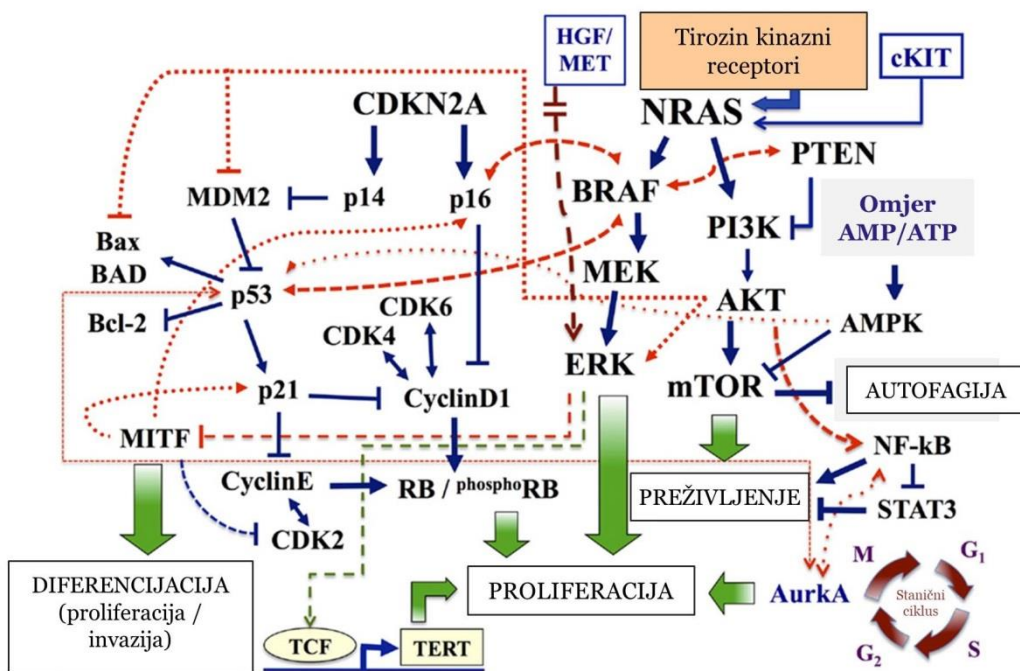
Drugi signalni put važan u melanomu je put ovisan o ciklin-ovisnom kinaznom inhibitoru 2A (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, CDKN2A) (Palmieri i ostali, 2015.). Gen *CDKN2A* kodira za tumor supresorske proteine p14^{ARF}, koji inhibicijom MDM2 (engl. *murine double minute 2*) sprječava degradaciju proteina p53 i osigurava kontrolu staničnog ciklusa; i p16, koji je glavni negativni regulator kompleksa ciklin ovisne kinaze 4 (engl. *cyclin-dependent kinase 4*, CDK4) - ciklin D1 (CCND1) koji služi kao kontrolna točka za prelazak iz G1 u S fazu staničnog ciklusa (Serra i Chetty, 2018.). Studija konzorcija GenoMEL za istraživanje nasljednog melanoma je na 466 obitelji i 2137 pacijenata pokazala da su promjene u genu *CDKN2A* prisutne u čak 40% istraživanih obitelji (Goldstein i ostali, 2006.). Drugom studijom, također sekvenciranjem genoma melanoma pacijenata, pronađene su delecije gena *CDKN2A* u 38% uzoraka, dok je funkcionalna mutacija u *p14* pronađena u 12% te u *p16* u 19% melanoma (Hodis i ostali, 2012.). Njihovu važnu ulogu u razvoju melanoma dodatno potvrđuje činjenica da miševi *knockout* za p16, a

heterozigoti za p14, razvijaju široki spektar tumora, uključujući melanom (Krimpenfort i ostali, 2001.).

Signalni put fosfoinozid 3 kinaze (PI3K) koji uključuje homolog fosfataze i tensina (engl. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN), PI3K i Akt (ili PKB, proteinska kinaza B), također sudjeluje u kontroli nastanka, rasta, preživljenja i stanične smrti u melanomu. Kao i MAPK put, može ovisiti o uzvodnim signalnim putevima proteina RAS (Davies, 2012.). U uzorcima melanoma pacijenata, kao i staničnim linijama melanoma, somatske mutacije u genima koji kodiraju za PI3K i Akt, kao i amplifikacije gena *Akt* su rijetke (Curtin i ostali, 2006.; Davies i ostali, 2008.), dok su delecije gena *PTEN*, negativnog regulatora puta PI3K, zabilježene u 25%, a funkcionalne mutacije u 12% ispitivanih uzoraka (Hodis i ostali, 2012.). Osim promjena u nukleotidnom slijedu DNA, bitnu ulogu u nastanku melanoma imaju i epigenetičke promjene, pa je tako na uzorcima melanoma pacijenata pokazano da je u 62% slučajeva gen *PTEN* smanjeno aktivan zbog povećane metilacije promotora (Mirmohammadsadegh i ostali, 2006.).

P53 je tumor-supresorski protein koji je mutiran u većini tumora. Iako se podatci iz literature o udjelu melanoma s mutacijom u genu za p53 razlikuju, udio melanoma koji imaju mutiran p53 nije velik (Hocker i Tsao, 2007.; Hodis i ostali, 2012.). Zanimljiva je činjenica da je u 60% staničnih linija melanoma protein p53, iako divljeg tipa, neaktivan (Houben i ostali, 2011.).

Uloga transkripcijskog faktora vezanog uz mikroftalamiju (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*, *MITF*) se također pokazala vrlo važna u patogenezi melanoma. On naime sudjeluje u kontroli proliferacije i diferencijacije melanocita, a njegova povišena ekspresija je pronađena u metastatskom melanomu i povezana je sa smanjenim preživljenjem pacijenta (Garraway i ostali, 2005.).



Slika 2. Glavni putevi prijenosa signala proliferacije, preživljavanja i diferencijacije stanica koji su uključeni u patogenezu melanoma. Strelice, aktivirajući signali; isprekidane linije, inhibirajući signali. AMPK, AMP-aktivirana protein-kinaza; Aurk, Aurora kinaza; BAD, BCL-2 antagonist stanične smrti; CDK4, kinaza 4-ovisna o ciklinu; CDKN2A, ciklin-ovisni inhibitor kinaze 2A; ERK, kinaza regulirana izvanstaničnim signalima; HGF, faktor rasta hepatocita; MITF, faktor transkripcije povezan s mikroftalamijom; MEK, kinaza mitogen aktivirane protein kinaze; PI3K, fosfatidilinozitol 3-kinaza; PTEN, homolog fosfataze i tenzina; RB, protein retinoblastoma; TERT, reverzna transkriptaza telomeraze. Preuzeto iz Palmieri i ostali (2015.) i prilagođeno.

1.1.1. Liječenje melanoma

Melanom se liječi ovisno o stadiju bolesti i prisutnosti specifičnih mutacija za koje postoji ciljana terapija (Tablica 1). Za melanom *in situ* je dovoljno kirurško odstranjivanje. Ukoliko se radi o manjem (stadij I) ili većem (stadij II) melanomu s ili bez ulceracija, melanom se izrezuje, a po potrebi se odstranjuju limfni čvorovi. Stadij III podrazumijeva melanoma koji je metastazirao u limfne žile ili limfne čvorove i liječi se izrezivanjem primarnog tumora, po potrebi limfnih čvorova, a može se primijeniti i adjuvantna terapija kako bi se smanjio rizik ponovne pojave tumora. Melanom III. stadija koji se ne može izrezati, uznapredovali stadij IV, kao i melanom koji se ponovo pojavio, mogu se liječiti na više različitih načina.

Tablica 1. Sažeti prikaz načina liječenja melanoma ovisno o stadiju bolesti. Preuzeto i pojednostavljeno iz PDQ Adult Treatment Editorial Board (2018.).

Stadij	TNM-kriteriji stadija*	Opcije terapije
0	Melanom <i>in situ</i>	Izrezivanje
I	Manji tumor	Izrezivanje +/- odstranjivanje limfnih čvorova
II	Veći tumor	Izrezivanje +/- odstranjivanje limfnih čvorova
III	Metastaze na limfni čvor i / ili limfne žile	Izrezivanje +/- odstranjivanje limfnih čvorova
		Adjuvantna terapija
III, koji se ne može izrezati; IV; Ponovljeni melanom	Prisutnost udaljenih metastaza	Intralezionalna terapija
		Imunoterapija
		Inhibitori signalnih puteva
		Terapija klasičnim protutumorskim lijekovima / kemoterapija
		Palijativno odstranjivanje metastaza

*TNM klasifikacija zloćudnih tumora, prema T=primarni tumor (debljina / ulceracije); N = prisutnost regionalnih metastaza u limfnom čvoru ili limfnim žilama; M = prisutnost udaljenih metastaza

Ukoliko melanom sadrži mutaciju V600E/K u kinazi BRAF, mogu se primijeniti specifični BRAF-inhibitori kao što su vemurafenib (Kim i Cohen, 2016.) ili dabrafenib

(Ballantyne i Garnock-Jones, 2013.). Zbog relativno brze pojave otpornosti na terapiju, preživljenje s danas dostupnim monoterapijama BRAF-inhibitorima je oko godine dana (Chapman i ostali, 2011.; Hauschild i ostali, 2012.). Kako bi se spriječila pojava otpornosti i produžilo preživljenje, razvijeni su inhibitori MEK-a koji je nizvodno od BRAF u signalnom putu: trametinib i kobimetinib, te su odobrene kombinacijske terapije s BRAF-inhibitorima, koje su značajno produžile ukupno preživljenje pacijenata s metastatskim melanomom na oko 2 godine (Luke i ostali, 2017.).

Za terapiju metastatskog melanoma koristi se i ciljana imunoterapija inhibitorima kontrolnih točaka, kao što su protutijela na protein programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed cell-death protein 1*, PD-1) pembrolizumab ili nivolumab te protutijelo na citotoksični antigen 4 povezan s T-limfocitima (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*, CTLA-4) ipilimumab. Također se primjenjuju i kombinacije ciljane imunoterapije čije je djelovanje usporedivo kombinaciji inhibitora BRAF i MEK.

U klinici još nisu objavljeni rezultati kombinacijske terapije kinaznih inhibitora i imunoterapije za melanom (Luke i ostali, 2017.).

Jedan od novijih načina liječenja metastatskog melanoma koji se ne može izrezati je intralezionalna terapija onkolitičkim, genski modificiranim herpes simpleks virusom tipa 1 (engl. *Herpes simplex virus type 1*, HSV1) *Talimogene laherparepvec* (T-VEC). T-VEC se primjenjuje lokalno i isključivo umnaža unutar stanica tumora i razara ih, a uz to eksprimira i granulocitno makrofagni faktor za stimuliranje kolonija (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) kako bi se poboljšala imunosna reakcija na tumor. Preživljenje pacijenata s ovom vrstom terapije je oko 2 godine (Andtbacka i ostali, 2015.).

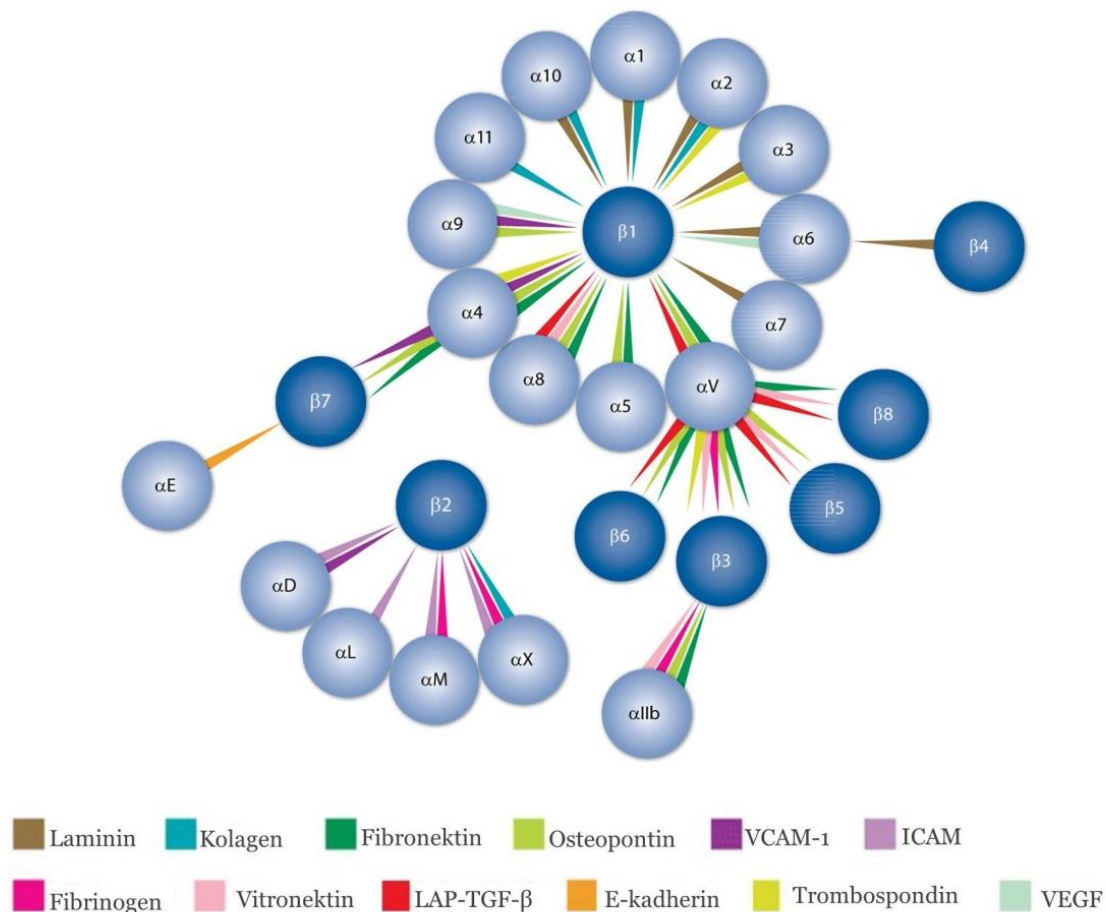
Protutumorski lijekovi (kemoterapija) se koriste uglavnom za palijativnu terapiju melanoma, i to alkilirajući agensi dakarbazin (Al-Badr i Alodhaib, 2016.) i temozolomid (Li i ostali, 2015.). Međutim, oba lijeka slabo djeluju na ukupno preživljenje pacijenata (oko 7 mjeseci) (Bhatia i ostali, 2009.; Middleton i ostali,

2000.; PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2018.). Terapija protutumorskim lijekovima kao što su: vinka alkaloid vinkristin, koji djeluje kao inhibitor polimerizacije diobenog vretena; taksan paklitaksel, koji inhibira rastavljanje diobenog vretena; te analozi platine, kao što je cisplatina, također imaju skromnu aktivnost kod bolesnika s metastatskim melanomom (Bhatia i ostali, 2009.). Klinički pokusi s paklitakselom ili cisplatinom na pacijentima s melanomom su pokazali slabo djelovanje usporedivo dakarbazinu (Einzig i ostali, 1991.; Glover i ostali, 2003.; Walker i ostali, 2005.).

Usprkos napretku u terapiji metastatskog melanoma, naročito postojanju ciljanih terapija za melanome s konstitutivno aktivnom kinazom BRAF i imunoterapije, do povratka bolesti u prosjeku prođe oko godine dana, a ukupno preživljenje pacijenata u pravilu nije više od dvije godine. Terapija metastatskog melanoma koji ne odgovara na ciljanu terapiju i terapiju onkolitičkim virusom T-VEC i dalje je moguća jedino klasičnim protutumorskim lijekovima za koje je pokazan vrlo slab utjecaj na ukupno preživljenje (Mackiewicz i Mackiewicz, 2018.). Sve navedeno upućuje na važnost pronalaska novih meta za terapiju ili poboljšanja odgovora metastatskog melanoma na postojeću terapiju.

1.2. Integrini

Integrini su heterodimerni transmembranski proteini sastavljeni od α i β podjedinice, a do sada je pronađeno 8 različitih α - i 18 β -podjedinica koje se kombiniraju u 24 različita $\alpha\beta$ -heterodimera (Hynes i Naba, 2012.) (Slika 3).



Slika 3. Shema kombiniranja integrinskih podjedinica u heterodimere i njihovih preferencijalnih liganada u izvanstaničnom matriksu. Svaki krug predstavlja jednu integrinsku podjedinicu. Moguće vezivanje podjedinica u heterodimere je naznačeno poveznicom, a boja poveznice upućuje na mogući ligand integrinskog heterodimera, značenje boja je navedeno na donjem dijelu slike. VCAM-1, vaskularni adhezijski protein 1 (engl. *vascular cell adhesion protein 1*); ICAM-1, unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*); LAP-TGF- β , peptid povezan s latencijom transformirajućeg faktora rasta β (engl. *latency associated peptide of transforming growth factor β*). Preuzeto i doručeno iz R&D Systems (bez datuma).

Integrini se ovisno o preferenciji vezanja prema sastavnicama izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) mogu podijeliti na: receptore laminina ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ i $\alpha 6\beta 4$), receptore specifične za leukocite (integrini $\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ i

$\alpha E\beta 7$), receptore kolagena ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$) i RGD-receptore ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ i $\alpha IIb\beta 3$) koji prepoznaju slijed arginin-glicin-aspartat (RGD), motiv pronađen u mnogim proteinima ECM-a kao što su fibronektin, kolagen, vitronektin, osteopontin i trombospondin (Ahmedah i ostali, 2017.). Integrinima se stanica mehanički pričvršćuje za ECM i ujedno povezuje ECM s citoskeletom: mikrotubulima (Myers i ostali, 2011.), aktinom (Oakes i ostali, 2012.) i intermedijarnim filamentima (Johnson i ostali, 2007.). Osim same uloge sidrenja stanice, integrini provode signale proliferacije, migracije, diferencijacije i preživljenja u oba smjera (Danen, 2013.) kao što je niže pojašnjeno.

Integrini sudjeluju u tzv. *inside out* i *outside in* prijenosu signala, čiji mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni. S jedne strane, vezivanje liganda, koji je izvan stanice, aktivira integrine koji zatim prenose informacije iz izvanstaničnog okruženja u stanicu (engl. *outside in signalling*) čime se modulira ponašanje stanice, uključujući adheziju, širenje (engl. *spreading*), migraciju, proliferaciju, preživljenje, lučenje proteaza i invaziju; a s druge strane, sama aktivnost i sposobnost adhezije integrinske molekule je modulirana unutarstaničnim signalima, točnije, vezivanjem unutarstaničnih proteina za citoplazmatske repove integrina (engl. *inside out signalling*) (Danen, 2013.; C. Kim i ostali, 2011.; Raab-Westphal i ostali, 2017.).

Ekspresija integrina je specifična za vrstu stanice. Stanice tumora mijenjaju ekspresiju integrina tako da obično gube integrine koji osiguravaju njihovo vezanje na bazalnu membranu i pomažu im da ostanu u mirujućem, diferenciranom stanju (Guo i Giancotti, 2004.). Tako se repertoar i razina ekspresije integrina razlikuje između normalnih i tumorskih stanica, što ih čini potencijalnim metama za protutumorske lijekove (Desgrosellier i Cheresh, 2010.; Huang i Rofstad, 2018.; Pickup i ostali, 2014.).

1.Uloga integrina u osjetljivosti stanica tumora na protutumorske lijekove

Prije gotovo 30 godina je postalo jasno da je adhezija tumorskih stanica na ECM važan modulator osjetljivosti tumora na terapiju. Od tada je objavljeno mnogo radova kako bi se objasnili temeljni mehanizmi ovog fenomena i izvedene su dvije paradigme: otpornost tumora na radioterapiju posredovana staničnom adhezijom (engl. *cell adhesion-mediated radioresistance*, CAM-RR) i otpornost na kemoterapiju posredovana staničnom adhezijom (engl. *cell adhesion-mediated chemoresistance*, CAM-DR) (Dickreuter i Cordes, 2017.).

Pokazano je da je CAM-DR općeniti fenomen kod više tipova čvrstih tumora, uključujući tumore dojke, pluća, prostate, jajnika, gušterače i debelog crijeva, kao i hematoloških zloćudnih bolesti (Aoudjit i Vuori, 2012.).

Uključenost $\beta 1$ integrina u CAM-DR je pokazana u stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231, kao i u stanicama melanoma MDA-MB-435 gdje vezivanje pomoću $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$ inhibira apoptozu induciranu paklitakselom i vinkristinom putem aktivacije signalnog puta PI3K i Akt i inhibicije oslobađanja citokroma c (Aoudjit i Vuori, 2001.).

Također je istražena i uloga αv integrina u odgovoru tumora na terapiju. Tako je pokazano da aktivacija integrina $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ vezanjem stanica glioblastoma za vitronektin štiti od djelovanja topotekana povećanjem ekspresije dva antiapoptotska proteina, Bcl-2 i Bcl-XL (engl. *B-cell lymphoma-extra large*) (Uhm i ostali, 1999.). Utišavanjem pak integrina $\alpha v\beta 3$ u stanicama glioma povećava se osjetljivost na temozolomid signalnim putem koji u konačnici inhibira ekspresiju Rad51, što onemogućuje popravak DNA mehanizmom homologne rekombinacije (Christmann i ostali, 2016.). U stanicama tumora dojke MCF-7 pokazano je da povećana ekspresija $\alpha v\beta 3$ smanjuje osjetljivost stanica na apoptozu induciranu paklitakselom zbog aktivacije puta ERK 1/2 MAPK (Menendez i ostali, 2005.). Istraživačka grupa u kojoj je izrađen ovaj doktorski rad pokazala je *de novo* ekspresiju integrina $\alpha v\beta 3$ u stanicama karcinoma grkljana čovjeka otpornim na cisplatinu u usporedbi s

roditeljskim stanicama HEp2 (Ambriović-Ristov i ostali, 2004.). Potencijal ove *de novo* ekspresije integrina $\alpha\beta_3$ da stanicama osigura otpornost na cisplatinu, ali istovremeno i na mitomicin C i doksorubicin, je potvrđen da se odvija mehanizmom povećane količine ukupnog glutationa, koji uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta induciranih lijekovima osigurava otpornost (Brozović i ostali, 2008.). Čini se da je mehanizam otpornosti na protutumorske lijekove posredovan integrinima specifičan za tumorsku stanicu jer je *de novo* ekspresija integrina $\alpha\beta_3$ u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka Cal27, koje pripadaju tumorima glave i vrata, osigurala otpornost na cisplatinu, mitomicin C, doksorubicin i 5-fluorouracil putem gubitka pSrc (Y418). Ovaj mehanizam bi ipak mogao biti učestaliji u tumorima glave i vrata jer je inhibicija pSrc (Y418) imala isti učinak na osjetljivost na protutumorske lijekove u dodatne dvije, od analizirane tri, stanične linije tumora ove skupine (Stojanović i ostali, 2016.).

Također i integrini α_3 sudjeluju u modulaciji osjetljivosti tumora na terapiju. Tako je na stanicama tumora dojke čovjeka pokazano da adhezija na laminin 5 putem integrina $\alpha_3\beta_1$ i $\alpha_6\beta_4$ i tetraspanina CD151 putem nizvodne signalizacije kroz Akt, ERK 1/2 i kinazu fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) uzrokuje otpornost na trastuzumab i lapatinib (Yang i ostali, 2010.). Uključenost integrina α_4 u odgovor tumora na terapiju je pokazana na stanicama kronične limfocitne leukemije B-stanica, gdje je aktivacija $\alpha_4\beta_1$ pridonijela otpornosti na fludarabin preko Bcl-XL (Fuente i ostali, 2002.).

S otkrićem RNA interferencije (RNAi), ali i pojavom specifičnih inhibitora koji koče okidanje signala integrina, npr. cilengitida koji sprječava prijenos signala integrina $\alpha\beta_3$ i $\alpha\beta_5$ (Fire i ostali, 1998.), počela se istraživati mogućnost da se utišavanjem gena za integrinske podjedinice ili inhibicijom signala preko integrina poveća osjetljivost stanica tumora na protutumorske lijekove (Eke i Cordes, 2015.). Također, kako integrini sudjeluju u procesima migracije i invazije moglo bi se istovremeno smanjiti i metastaziranje (Ganguly i ostali, 2013.).

1.3. Ekspresija integrina u melanomu: integrinske podjedinice $\alpha 3$, $\alpha 4$ i αv

Repertoar eksprimiranih integrina se razlikuje između melanocita i primarnog melanoma, kao i između primarnog i metastatskog melanoma (Huang i Rofstad, 2018.; Kuphal i ostali, 2005.). Melanociti eksprimiraju $\beta 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ ($\alpha 6\beta 1$ integrinom se drže za bazalnu laminu) i αv -integrinske podjedinice, kao i heterodimer $\alpha v\beta 3$ (Zambruno i ostali, 1993.).

Integrini $\beta 1$, koji čine najveću skupinu integrina, jer mogu tvoriti heterodimere s 12 različitim α -podjedinica (Hynes, 2002.), povećano su eksprimirani u vertikalnoj fazi rasta melanoma i njihova ekspresija je povezana s razvojem metastaza i slabijim preživljenjem pacijenata (Nikkola i ostali, 2004.). Istraživanje uzoraka melanoma pacijenata povežalo je ekspresiju integrina $\beta 1$ u primarnom melanomu s metastaziranjem u limfne čvorove (Hieken i ostali, 1995.). Integrin $\beta 1$ pomaže ekstravazaciji stanica melanoma miša B16F10 i metastaziranju u jetru (Kato i ostali, 2012.) i pluća (Liu i ostali, 2017.). Aktivacija integrina $\beta 1$ je potaknula imunosti odgovor miša na stanice melanoma čovjeka A375 i potakla zaštitu od melanoma preko aktivacije TGF- β (Ritsma i ostali, 2017.). Također je u pokusima ciljanja integrina $\beta 1$ otkriven fenomen preslagivanja integrina (engl. *switching effect*), tj. pojava da se utjecajem na ekspresiju ili aktivnost jednog integrina može utjecati na ekspresiju ili aktivnost drugih integrina, što u nekim slučajevima dovodi do neželjenih učinaka. Naime, inaktivacija integrina $\beta 1$ je uzrokovala povećani rast organoida stanica karcinoma dojke čovjeka MDA-MB-231, kao i povećala tumorigenost i sposobnost metastaziranja stanica dojke miša 4T1 *in vivo*, putem kompenzatornog povećanja ekspresije integrina $\beta 3$ (Parvani i ostali, 2013.).

Podjedinica integrina $\alpha 3$ tvori heterodimer samo s podjedinicom $\beta 1$ (Hynes i Naba, 2012.). Stanice primarnog melanoma eksprimiraju niske količine integrina $\alpha 3\beta 1$, za razliku od stanica metastatskog melanoma koje visoko eksprimiraju ovaj integrin. Stanice melanoma čovjeka Me665/2 s povišenom ekspresijom $\alpha 3\beta 1$ pokazuju veću

migracijsku i invazijsku sposobnost *in vitro*, koja se može inhibirati blokirajućim protutijelima usmjerenim protiv integrina $\alpha 3\beta 1$ (Melchiori i ostali, 1995.).

Podjedinica integrina $\alpha 4$ tvori heterodimer s podjedinicama $\beta 1$ i $\beta 7$ s tim da je integrin $\alpha 4\beta 7$ eksprimiran uglavnom na stanicama imunskog sustava. Melanociti ne eksprimiraju $\alpha 4$ integrin (Kramer i ostali, 1991.; Pinon i Wehrle-Haller, 2011.). Njegova ekspresija također nije zabilježena u madežima, radijalnoj kao ni u vertikalnoj fazi razvoja melanoma, međutim, zabilježena je njegova ekspresija u uzorcima metastaza u limfnim čvorovima pacijenata kao i u staničnim linijama melanoma (Kramer i ostali, 1991.; Marshall i ostali, 1998.). Povišena ekspresija integrina $\alpha 4$, kao i $\alpha 3$ i αv je također zabilježena u stanicama melanoma čovjeka A375SM, u odnosu na manje metastatsku i manje invazivnu roditeljsku staničnu liniju A375 (Gehlsen i ostali, 1992.). Integrin $\alpha 4\beta 1$ igra važnu ulogu u metastaziranju stanica melanoma miša B16-F1 na limfne čvorove i kosti preko interakcije s VCAM-1 *in vivo* na modelu miša (Rebhun i ostali, 2010.).

Podjedinica integrina αv može tvoriti heterodimere s podjedinicama $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ i $\beta 8$ (Raab-Westphal i ostali, 2017.). Integrini $\alpha v\beta 6$ i $\alpha v\beta 8$ su nisko eksprimirani u staničnim linijama melanoma (Marshall i ostali, 1998.; Marshall i Hart, 1996.). Imunohistokemijske analize su pokazale da je integrin $\alpha v\beta 8$ često eksprimiran u primarnom melanomu i metastazama mozga, međutim bez razlika u ekspresiji. Na istim uzorcima nije pronađeno bojenje na $\alpha v\beta 6$ (Vogetseder i ostali, 2013.). Ekspresija ukupnih integrina αv značajno je povišena u metastazama melanoma u mozgu u odnosu na primarni melanom što upućuje na ulogu integrina αv u probijanju krvno moždane barijere, a povećanje ekspresije αv također povećava i migraciju stanica melanoma A375 *in vitro* (Vogetseder i ostali, 2013.; Wu i ostali, 2017.). Integrin $\alpha v\beta 3$, koji je nisko eksprimiran u epitelnim stanicama, pokazuje visoku ekspresiju u stanicama melanoma u vertikalnoj fazi rasta i metastatskog melanoma (Van Belle i ostali, 1999.) te ima važnu ulogu u poticanju vertikalne faze i u migraciji stanica kroz endotel, a njegova ekspresija je povezana s razvojem metastaza (Bakewell i ostali, 2003.; Küsters i ostali, 2001.; Pickarski i ostali, 2015.). Integrin $\alpha v\beta 5$ sudjeluje u razvoju visoko agresivnog fenotipa stanica melanoma koje

ekspimiraju transmembranski glikoprotein neuropilin 1 (NRP-1) (Ruffini i ostali, 2013.) i povećano je ekspimiran u metastazama u mozgu (Vogetseder i ostali, 2013.).

1.4. Modulacija osjetljivosti melanoma na protutumorske lijekove djelovanjem na integrine

Činjenica da su integrini uključeni u modulaciju odgovora stanica tumora na protutumorske lijekove pruža mogućnost da se ciljanjem integrina tumor učini osjetljivijim na liječenje (Dickreuter i Cordes, 2017.). Do sada je objavljeno samo nekoliko radova koji su istražili potencijal djelovanja modulacije osjetljivosti melanoma na protutumorske lijekove djelovanjem na integrine (Tablica 2).

Pokazano je da se aktiviranjem integrina αv i $\alpha 5\beta 1$ križnim vezanjem uz multivalentni otrov zmije disintegrin kontortrostatin, kao i aktiviranjem integrinske podjedinice $\beta 1$ monoklonskim protutijelom TS2/16, može povećati osjetljivost stanica melanoma čovjeka M21 na citozin arabinozid (araC) *in vivo* (Schwartz i ostali, 2008.). Ista grupa znanstvenika je pentavalentnim fibronektinom (FN-COMP) koji veže i aktivira $\alpha v\beta 3$ i $\alpha 5\beta 1$ povećala osjetljivost stanica melanoma M21 i VMM18 na cisplatinu *in vivo* (Andarawewa i ostali, 2015.). Također, vinkulin-aktivirajući peptid (engl. *vinculin activating peptide*) je aktiviranjem integrina unutar stanice povećao osjetljivost stanica melanoma čovjeka M21 *in vivo* na araC (Nelson i ostali, 2012.).

Obrnuto, aktivacija integrina manganom ili vezanjem na kolagen uzrokuje smanjenu osjetljivost stanica melanoma čovjeka MV3 na cisplatinu kroz aktivaciju puta WNT (Piva i ostali, 2017.). Također je u stanicama melanoma čovjeka MDA-MB-435 pokazano da vezanje integrina $\beta 1$ za laminin 1 inhibira apoptozu induciranu paklitakselom i vinkristinom putem aktivacije puta PI3-kinaza/Akt (Aoudjit, Vuori 2001).

Inhibicijom pak prijenosa signala preko integrina pomoću cilengitida, specifičnog inhibitora integrina $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$, povećana je osjetljivost stanica melanoma miša B16 na temozolomid *in vivo* (Tentori i ostali 2008). Slično tome, smanjenjem aktivacije i ekspresije integrina $\alpha v\beta 3$ uz makrovipectin, lektin-nalik protein tipa C (engl. *C-type*

lectin-like proteins, snaclecs), izoliran iz otrova zmije, povećala se osjetljivost stanica melanoma čovjeka SK-MEL-28 na cisplatinu aktivacijom apoptotskih signalnih puteva povećanjem ekspresije faktora induciranog apoptozom (engl. *apoptosis inducing factor*, AIF) i aktivacijom ERK 1/2, p38, Akt i NF- κ B (Hammouda i ostali 2018).

Tablica 2. Shematski prikaz rezultata istraživanja modulacije osjetljivosti melanoma na protutumorske lijekove djelovanjem na integrine. AraC, citozin arabinozid; FN-COMP, pentavalentni fibronektin.

Smjer modulacije integrina	Ciljani integrini	Djelatna tvar	Stanice melanoma čovjeka	Posljedica na osjetljivost	Referenca
Aktivacija	α_v , $\alpha_5\beta_1$ i β_1	Kontortrostatin i TS2/16	M21	Povećanje osjetljivosti na araC <i>in vivo</i>	(Schwartz i ostali, 2008.)
	$\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$	FN-COMP	M21 i VMM18	Povećanje osjetljivosti na cisplatinu <i>in vivo</i>	(Andarawewa i ostali, 2015.)
	β_1	Vinkulin aktivirajući peptid	M21	Povećanje osjetljivosti na araC	(Nelson i ostali, 2012.)
	svi integrini i kolagen-vezujući integrini	Mangan ili kolagen	MV3	Smanjenje osjetljivosti na cisplatinu	(Piva i ostali, 2017.)
	$\alpha_6\beta_1$	Laminin 1	MDA-MB-435S	Smanjenje osjetljivosti na paklitaksel	(Aoudjit i Vuori, 2001.)
Inhibicija	α_v	Cilengitid	B16 (mišje)	Povećanje osjetljivosti na temozolomid	(Tentori i ostali, 2008.)
	$\alpha_v\beta_3$	Makroviceptin	SK-MEL-28	Povećanje osjetljivosti na cisplatinu <i>in vivo</i>	(Hammouda i ostali, 2018.)

Integrini istovremeno moduliraju veliki broj signalnih puteva, pa tako sudjeluju i u modulaciji osjetljivosti melanoma na ciljanu terapiju inhibitorima BRAF-kinaze. Tako su Fedorenko i ostali (2015.) objasnili mehanizam otpornosti PTEN-null BRAF V600E stanica melanoma na vemurafenib. Naime, pokazano je da otporne stanice povišeno eksprimiraju fibronektin, za kojeg se zatim same stanice vežu integrinom $\alpha 5\beta 1$, čime se aktivira signalni put putem kinaze Akt koji potiče ekspresiju antiapoptotske molekule Mcl-1 (engl. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*). Uloga integrina u osjetljivosti melanoma na inhibitor BRAF-a pokazana je i u radu Hirata i ostali (2015.) gdje fibroblasti povezani s melanomom na poticaj inhibitora BRAF-a PLX4720 remodeliraju ECM *in vivo* kako bi u stanicama melanoma aktivirali signalni put integrin $\beta 1$ -FAK-*Src* i osigurali reaktivaciju ERK. Inhibitorom fosforilacije FAK PF562271 se uspjelo povećati djelovanje PLX4720 na ksenograftima melanoma porijeklom iz pacijenata. Proteomska analiza stanica melanoma čovjeka VM-1 i A375 te od njih dobivenih stanica otpornih na vemurafenib, dobivenih kontinuiranim izlaganjem vemurafenibu, pokazala je povećanje ekspresije mnogih proteina u otpornim stanicama, posebno onih uključenih u adheziju i migraciju, kao što su integrin αv i vimentin (Paulitschke i ostali, 2015.).

1.5. Adhezija stanica

Stanice ostvaruju adheziju s ECM-om putem više različitih receptora među kojima su proteoglikani, kao CD44 koji može vezati kolagene, hijaluronsku kiselinu i osteopontin (Senbanjo i Chellaiah, 2017.); i sindekani (Afratis i ostali, 2017.). U adheziji stanica također mogu sudjelovati i glikoproteini, kao što su CD36 koji se veže za kolagen i trombospondin-2 (Enciu i ostali, 2018.); te obitelj kinaznih receptora s domenom diskoidin (engl. *discoidin domain receptors*) koji se vežu za kolagen (Fu i ostali, 2013.). Međutim, dominantna klasa receptora za ECM su 24 integrina, koji imaju glavnu ulogu u adheziji stanica za ECM (van Dijk i ostali, 2013.).

1.5.1. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks (ECM) je kompleksna mreža makromolekula sastavljenih od različitih domena, koja je specifično organizirana ovisno o stanicama i tkivu u kojem se nalazi. Komponente ECM-a su međusobno povezane stvarajući tako mehaničku potporu tkivu. ECM je također izvor faktora rasta i bioaktivnih molekula. To je vrlo dinamična struktura koja regulira proliferaciju, adheziju, pokretljivost, polarnost, diferencijaciju i apoptozu. Glavne komponente ECM-a su kolageni, proteoglikani, laminini, elastin, fibronektin i drugi glikoproteini (Yue, 2014.).

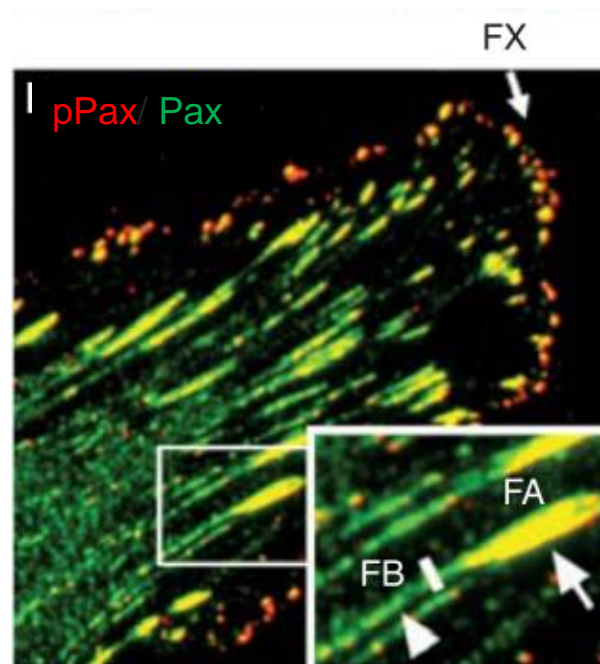
1.5.2. Adhezija posredovana integrinima

Adhezija posredovana integrinima ima važnu ulogu u pokretljivosti, proliferaciji i preživljenju normalnih stanica. Ima također važnu ulogu u bolestima, posebice u tumorima (van Dijk i ostali, 2013.).

Svaka stanica za adheziju na raspolaganju, u pravilu, ima više heterodimera integrina, koji se vežu za različite, ali i preklapajuće ligande (Slika 3) što omogućava aktivaciju različitih puteva prijenosa signala. Upravo to stanici omogućuje brzi odgovor na promjenu uvjeta u okolišu. Čak i unutar jedne te iste stanice integrini su sposobni formirati morfološki, molekulski i dinamički različite adhezijske strukture (Geiger i Yamada, 2011; Hynes, 2002).

Razlikujemo nekoliko vrsta adhezijskih struktura. Klasična FA je veličine nekoliko kvadratnih mikrometara, smještena je na krajevima aktinskih vlakana i stimulirana aktivnošću RhoA. Nascentne adhezije i fokalni kompleksi su točkaste, kratkoživuće strukture koje se nalaze uglavnom na vodećem dijelu (engl. *leading edge*) stanice u lamelipodijima, sadrže fosforilirani oblik paksilina i mogu se pretvoriti u FA. Nascentne adhezije rastom se pretvaraju u nešto veće fokalne komplekse čiji je nastanak induciran aktivnošću Rac 1. Treća adhezijska struktura su izdužene fibrilarne adhezije koje se nalaze u središnjim područjima stanica i ne sadrže fosforilirani paksilin (Slika 4). Podosomi i invadopodiji, karakteristični samo za neke tipove stanica, su prstenaste adhezije stvorene oko aktinske niti ili tanki membranski

izdanci povezani sa središnjim kompleksom aktin-kortaktin. Obje strukture sudjeluju u degradaciji proteina ECM-a (Geiger i Yamada, 2011.). Nedavno su otkrivene retikularne adhezije koje imaju ulogu u diobi stanice, a ne sadrže talin niti aktin (Lock i ostali, 2018.).



Slika 4. Vrste adhezija u stanicama. Klasične fokalne adhezije (FA), fibrilarne adhezije (FB) i fokalni kompleksi (FX) u fibroblastima prepucija čovjeka (engl. *human foreskin fibroblasts*, HFF). FX se nalaze na vodećem kraju i sadrže fosforilirani paksilin (pPax); FB se nastavljaju na FA koje su, za razliku od FB, pozitivne na pPax. Preuzeto i uređeno iz Geiger i Yamada (2011.).

Fokalne adhezije (FA) su specijalizirane višemolekularne proteinske strukture u stanici koje se stvaraju oko citoplazmatskog repa integrina nakon vezivanja integrina za ECM. FA su dinamičke prirode i sastoje se od velikog broja različitih proteina. One omogućuju vezanje stanice za ECM, ali u isto vrijeme prenose kemijske, ali i mehaničke signale u oba smjera (Burrige, 2017.; Zaidel-Bar i ostali, 2007.). Prvi put se u literaturi spominju u radu Abercrombie i ostali (1971.) u kojem su u stanicama fibroblasta srca pilića elektronskom mikroskopijom zabilježene strukture nazvane plakovi koje sadrže uzdužne filamente. Pretpostavljeno je da ove strukture stvaraju adhezije, danas poznate kao FA, a uzdužni filamenti su danas dobro poznati kao aktinska vlakna. Hotchin i Hall su 1995. godine, istražujući u fibroblastima čovjeka

proteine odgovorne za prijenos integrinskih signala, koristili drugi naziv za FA - kompleks adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complex*, IAC). Budući da su integrini glavni proteini kojima stanica stvara FA, taj se naziv danas sve više koristi u literaturi umjesto FA (Geiger i Yamada, 2011.).

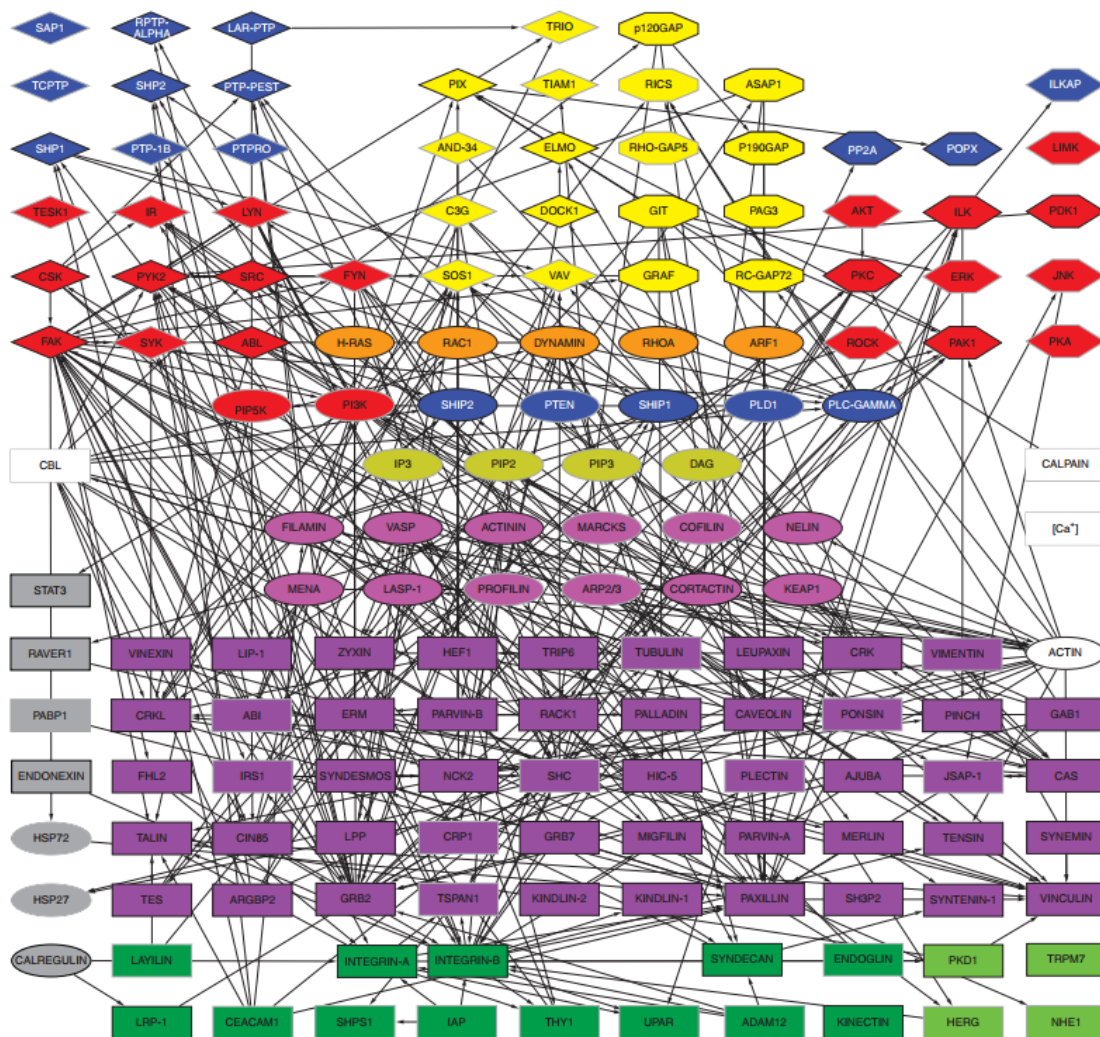
Paksilin je protein koji se koristi kao marker FA. To je skeletni protein u FA oko kojeg se, nakon fosforilacije na specifičnim tirozinima i serinima, nakupljaju strukturni i signalni proteini uključeni u različite procese u stanici. Nakon vezanja integrina na proteine ECM-a, paksilin se fosforilira na Y31, Y118, S188 i S190, aktivirajući tako različite signalne puteve preko proteina: homologa proteina 42 koji kontrolira staničnu diobu (engl. *cell division control protein 42 homolog*, Cdc42), Ras-povezanog C3 supstrata 1 botulina (engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, Rac1) i GTPaze člana A obitelji RAS homologa (engl. *RAS homolog gene family member A*, RhoA GTPaze), dovodeći faktore izmjene nukleotida gvanina (engl. *guanine nucleotide exchange factors*, GEF), proteine koji aktiviraju GTP-aze (engl. *GTPase-activating protein*, GAPs) i proteine koji su u interakciji s receptorima spregnutim s G-proteinima (engl. *G-protein-coupled receptor (GPCR)- kinase-interacting proteins 1*, GIT) u FA (López-Colomé i ostali, 2017.).

1.6. Adhesom integrina

S istraživanjem sastava IAC-a uveden je i pojam adhesom koji je naziv za ukupne proteine koji čine IAC. Iako su integrini glavni proteini uključeni u adheziju, ipak nisu jedini te se to naglašava korištenjem naziva adhesom integrina (Manninen i Varjosalo, 2017.). Naziv adhesom je prvi put zabilježen u literaturi 2006. godine kada su Whittaker i ostali (2006.) opisali ukupni zbroj gena i proteina uključenih u adheziju morskog ježinca. Proteini adhesoma, uključujući integrine, se tijekom dinamičnog procesa adhezije sastavljaju i rastavljaju u različite tipove adhezijskih struktura koje se razlikuju u sastavu (Rossier i ostali, 2012.). Vrste integrina u adhezijama mogu se mijenjati kako adhezije postaju zrele, što je povezano, ali nedovoljno objašnjeno, s različitim funkcijama različitih vrsta adhezija. Tako je na modelu fibroblasta prepucija čovjeka (engl. *human foreskin fibroblast*, HFF)

pokazano da integrin $\alpha v\beta 3$ ostaje cijelo vrijeme adhezije unutar FA i održavanjem sile regrutira tipične proteine FA, kao što su paksilin i vinkulin. Istovremeno integrin $\alpha 5\beta 1$ nakon početnog kontakta s ECM-om regrutira tenzin i izlazi iz FA putem aktinskih vlakana (Pankov i ostali, 2000.; Zamir i ostali, 2000.).

Osim integrina, u IAC-u se nalaze skeletni i signalni proteini (Slika 5). Skeletni proteini u staničnim adhezijama pripadaju dvjema obiteljima citoplazmatskih proteina: proteinima koji vežu aktin i adaptornim proteinima. Proteini koji vežu aktin reguliraju njegovu organizaciju, a samo neki od njih su direktno povezani s integrinima kao što su tenzin, filamin, talin, plektin i α -aktinin. Adaptorni proteini se vežu s proteinima koji vežu aktin, integrinima kao i međusobno te tako stvaraju kompleksnu mrežu proteina (Geiger i Yamada, 2011.). Signalni proteini u adhesomu uključuju tirozin i serin/treonin protein-kinaze i fosfataze, Rho GTPaze i njihove regulatore (GAP i GEF).



Slika 5. Interakcije unutar kompleksa adhezije integrina (IAC). Proteini unutar IAC-a se mogu podijeliti po funkcijama na: membranske receptore (tamno zeleni pravokutnici), adaptorske proteine (ljubičasti pravokutnici), proteine koji se vežu na aktin (ljubičasti krugovi), tirozin kinaze (crveni romb) i fosfataze (plavi dijamanti), serin/treonin kinaze (crveni izduženi šesterokuti) i fosfataze (plavi izduženi šesterokuti), G-proteine (narančasti krug), GEF (žuti romb) i GAP (žuti izduženi osmerokuti). Preuzeto i doradeno iz Geiger i Yamada (2011.)

1.6.1. Istraživanje adhesoma integrina

Sastav adhesoma se pokušao sustavno definirati na temelju objavljenih rezultata dobivenih mikroskopijom, analizom proteinskih interakcija i funkcionalnom genomikom (Winograd-Katz i ostali, 2014.; Zaidel-Bar i ostali, 2007.; Zaidel-Bar i Geiger, 2010.). Na temelju tih radova, opisan je sastav adhesoma od 232 proteina i njihova povezanost s bolestima. Proteine adhesoma podijeljeni su na strukturne proteine uključene u funkciju skela (engl. *scaffold*), koji fizički povezuju integrine s aktinskim citoskeletom (proteini koji vežu aktin i adapterski proteini), i proteine za prijenos signala posredovanih adhezijom (kinaze, fosfataze i regulatori G proteina) (Winograd-Katz i ostali, 2014.).

Detaljna sustavna analiza sastava adhesoma integrina masenom spektrometrijom je dugo bila nemoguća prvenstveno zbog problema neučinkovitog izdvajanja ovako dinamičnog, nestabilnog kompleksa koji, za razliku od organela, nema jasne granice. Korištene su različite metode, kao što su izdvajanje IAC-a iz stanica u suspenziji nakon inkubacije s kuglicama koje sadrže ligand za integrine; izdvajanje iz adherentnih stanica uzgajanih na fibronektinu; ili na neobloženim podlogama, s ili bez umreživača proteina kao što je pojašnjeno u nastavku i prikazano u Tablici 3 (Horton, Humphries, Stutchbury, i ostali, 2016.; Huang i ostali, 2014.; Humphries i ostali, 2009.; Kuo i ostali, 2011.; Lock i ostali, 2018.; Ng i ostali, 2014.; Robertson i ostali, 2015.; Schiller i ostali, 2011., 2013.; Yue i ostali, 2014.)

Humphries i ostali (2009.) su objavili prvi rad koji je analizirao sastav IAC-a metodom masene spektrometrije. Stanice eritroleukemije K562 u suspenziji su inkubirane s paramagnetnim kuglicama na koje su prethodno vezani ligandi VCAM-1 ili FN kako bi se stanice vezale na kuglice isključivo stvaranjem IAC-a putem integrina $\alpha4\beta1$ ili $\alpha5\beta1$. Nakon kritičnog koraka umreživanja proteina umreživačem DTBP-om (dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat), kako bi se stabilizirao IAC, stanice su razorene neionskim deterdžentima i sonikacijom, a analizom IAC-a je identificirano 620 proteina (Byron i ostali, 2011.).

Kuo i ostali (2011.) su koristili metodu bez umreživača i izolirali IAC iz stanica prepucija čovjeka HFF koje su uzgajane u fibronektinom obloženim Petrijevim zdjelicama. Stanice su lizirali hipotoničnim šokom, ostatke stanice isprali mlazom vode te nakon uklanjanja fibronektina i aktina pomoću specifičnih protutijela, u tako izoliranom IAC masenom spektrometrijom identificirali 905 proteina. Istim protokolom Huang i ostali (2014.) su analizirali sastav IAC-a mezenhimskih matičnih stanica čovjeka MSC-3A6 i identificirali 335 proteina.

Dodatan napredak izdvajanja IAC-a je postignut u radu Schiller i ostali (2011.), gdje je korištena modificirana metoda izdvajanja IAC-a pomoću kuglica iz rada Humphries i ostali (2009.), na način da su IAC-i izolirani iz adherentnih stanica mišjih fibroblasta nasadenih na Petrijeve zdjelice za uzgoj stanica obložene fibronektinom, nakon umrežavanja proteina pomoću DSP-a (ditiobis (sukcinimidil propionat) i DPDPB-a (1,4-Bis [3-(2-piridilditio) propionamido] butan). Na taj način identificirano je oko 2000 proteina. Ista grupa je ovom metodom analizirala IAC stanica fibroblasta bubrega miša koji eksprimiraju isključivo $\alpha 5\beta 1$; $\alpha \nu\beta 3$ i $\alpha \nu\beta 5$; ili $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ i $\alpha \nu\beta 5$ kako bi istražili razlike u vezanju različitih integrina za fibronektin (Schiller i ostali, 2013.). Ng i ostali (2014.) su istražili utjecaj nokodazola, koji depolimerizira mikrotubule, na sastav IAC-a gdje su pronašli 850–1000 proteina po uzorku. IAC su izolirali iz stanica prepucija čovjeka HFF u zdjelicama obloženim fibronektinom nakon umrežavanja drugim umreživačem, DTBP-om. Istom metodom, objavljenom zasebno 2015. godine (Jones i ostali 2015.), Robertson i ostali (2015.) su analizirali adhesom, kao i fosfoadhesom stanica melanoma čovjeka A375, a Horton i ostali (2015.) adhesom stanica embrija miša MEF. Zanimljivo je da se sastav IAC-a stanica HFF nakon farmakološke inhibicije inhibitorom FAK-a AZ13256675 nije promijenio (Horton, Humphries, Stutchbury, i ostali, 2016.).

Prema našem saznanju, postoje samo dva objavljena rada koja su istražila adhesom stanica uzgajanih na neobloženim Petrijevim zdjelicama. I to, adhesom stanica kože čovjeka HaCaT u kojem je identificirano samo 48 proteina. Tako mali broj proteina je dobiven vjerojatno zbog toga što u pokusima nisu korišteni umreživači proteina (Yue i ostali, 2014.). Drugi takav „prirodni“ adhesom je objavljen nedavno na stanicama

osteosarkoma čovjeka U2OS gdje je identificirano 214 proteina (Lock i ostali, 2018.). Svi spomenuti radovi koji su istraživali adhesom sažeto su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Pregled istraživanja sastava IAC-a (adhesoma) masenim spektrometrom.

Stanice	Vrsta stanica	Pristup izdvajaju	Umreživač	Ligand	Uvjeti	Kontrola	Broj proteina	Referenca
K562	Eritroleukemija čovjeka	Kuglice	DTBP	FN	-	Bez liganda	620	(Humphries i ostali, 2009.)
				VCAM-1			418	
MEF	Fibroblasti embrija miša	2D	DTBP	FN	-	Transferin	1,461	(Horton i ostali, 2015.)
A375	Melanom čovjeka	2D	DTBP	FN	-	Transferin	1,174	(Robertson i ostali, 2015.)
HFF	Fibroblasti prepucija čovjeka	2D	DTBP	FN	Nokodazol	Poli-D-lizin; DMSO	850 - 1000	(Ng i ostali, 2014.)
MKF1	Fibroblasti bubrega miša	2D	DSP, DPDPB	FN	Blebistatin	Poli-L-lizin I bez blebistatina	2118	(Schiller i ostali, 2011.)
MKF2	Fibroblasti bubrega miša	2D	DSP, DPDPB	FN	-	Poli-L-lizin	3180	(Schiller i ostali, 2013.)
HFF	Fibroblasti prepucija čovjeka	2D	-	FN	Blebistatin	Bez blebistatina	905	(Kuo i ostali, 2011.)
MSC-3A6	Mezenhimske matične stanice čovjeka	2D	-	FN	Si (GEF-H1)	Bez si	335	(Huang i ostali, 2014.)
HaCaT	Keratinociti čovjeka	2 D	-	-	Nokodazol	Bez nokodazola	48	(Yue i ostali, 2014.)
HFF	Fibroblasti čovjeka	2D	DTBP	FN	AZ13256675	Transferin; DMSO	898	(Horton, Humphries, Stutchbury, i ostali, 2016.)
U2OS	Osteosarkom čovjeka	2D	DTBP	-	Citohalazin	DMSO	214	(Lock i ostali, 2018.)

Ovisno o vrsti stanica, ponuđenom ligandu za stvaranje IAC-a i integrinima na površini stanice, kao i uvjetima izdvajanja IAC-a, vidljive su velike razlike u broju proteina i sastavu objavljenih adhesoma analiziranih masenom spektrometrijom. Kako bi se znanje iz ovih ogromnih i potencijalno korisnih skupova podataka moglo bolje iskoristiti, Humphries i ostali su 2015. sustavno analizirali odabrane objavljene adhesome iz 7 različitih radova na 5 različitih vrsta stanica (A375, HFF, K562, fibroblasti bubrega miša MKF, i MEF) nasadenih na fibronektin i bioinformatičkom obradom definirali *meta* i konsenzusni adhesom (Byron i ostali, 2011.; Horton i ostali, 2015.; Ng i ostali, 2014.; Robertson i ostali, 2015.; Schiller i ostali, 2011., 2013.). U *meta* adhesom su uključeni svi proteini pronađeni u barem jednom setu podataka, s uvjetom da je bio barem dva puta obogaćen na fibronektinu u odnosu na kontrolu i na taj način je odabrano 2412 proteina. Primijećeno je da je skoro polovica proteina *meta* adhesoma identificirana u samo jednom setu, a samo 10 proteina je obogaćeno u svih sedam setova. Ove velike razlike vjerojatno ovise o razini ekspresije proteina u stanicama, vrsti stanice, izvedbi pokusa ili nedostatku u metodi masene spektrometrije. Ipak, konsenzusni adhesom je definiran i sastoji se od 60 proteina koji se pojavljuju u barem 5 setova podataka (isključene su sastavnice ECM-a) i predstavlja srž adhezijske mašinerije. Ovi su proteini organizirani oko 4 osi: ILK–PINCH–kindlin, FAK–paksilin, talin–vinkulin i α -aktinin–ziksini–VASP (fosfoprotein stimuliran vazodilatatorom, engl. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) te uključuju neke do sada nezabilježene komponente kao što su Rsu-1 i kaldezmom. Važno je naglasti da su čak 32 proteina konsenzus-adhesoma povezana s razvojem tumora (Horton i ostali, 2015.; Horton, Humphries, James, i ostali, 2016.).

Ukratko će biti opisani proteini konsensus-adhesoma koji tvore četiri osi: ILK–PINCH–kindlin, FAK–paksilin, talin–vinkulin i α -aktinin–ziksini–VASP, identificiranih prema Horton i ostali (2015., 2016.) s kratkim osvrtom na njihovu ulogu u tumorima.

Kompleks kinaze povezan s integrinima (ILK)-PINCH-parvin (IPP kompleks) je dio FA i pokazano je da se direktno veže s citoplazmatskim repom β integrina i povezuje integrine s aktinskim citoskeletom. Osim toga, ILK djeluje kao serin / treonin kinaza i

izravno aktivira nekoliko signalnih puteva nizvodno od integrina (Ghatak i ostali, 2013.; Wickström i ostali, 2010.). PINCH je adaptorni protein FA, povećano eksprimiran u više tipova tumora kao što su tumori pluća, kolona, dojke i prostate; koji se veže za katalitičku podjedinicu fosfataze 1 (engl. *protein phosphatase 1 catalytic subunit α* , PP1 α) i inhibira njenu aktivnost, što dovodi do povećane fosforilacije Akt 1 i povećane otpornosti stanica MEF na zračenje (Eke i ostali, 2010.). PINCH također štiti stanice fibrosarkoma od apoptoze preko proteina ERK inhibirajući transkripciju Bim i povećavajući njegovu degradaciju (Chen i ostali, 2008.). Kindlini su proteini FA koji se direktno vežu za citoplazmatski rep β -integrinske podjedinice i sudjeluju u aktivaciji integrina (Rognoni i ostali, 2016.). Ektopična ekspresija kindlina-3 u stanicama melanoma miša B16-F10 i melanoma čovjeka M10 koji ne eksprimiraju kindlin-3 uzrokuje smanjenje migracije zbog povećane ekspresije Rac 1 i RhoA i smanjenje metastaziranja *in vivo* (Feng i ostali, 2017.).

FAK je citoplazmatska nerekceptorska tirozin kinaza koja omogućuje aktivaciju receptora faktora rasta ili integrina u različitim tipovima tumora čovjeka (Tai i ostali, 2015.). Mikroskopijom živih, obilježenih stanica pokazano je da se FAK nalazi u nascentnim FA, dok se paksilin pojavljuje kasnije (Hu i ostali, 2015.). Fosforilacija je osnovni način aktivacije FAK-a, s tim da je glavno autofosforilacijsko mjesto tirozin 397 (Y397) (Grigera et al., 2005). Fosforilacija na ovom mjestu omogućuje vezanje proteina koji sadrže domenu SH2, uključujući kinazu Src (Schaller, 2001). Aktivacija FAK-a nakon vezanja integrina β 1 za ECM osigurava preživljenje melanoma nakon izlaganja inhibitoru BRAF-a *in vivo* (Frame i Serrels, 2015.; Hirata i ostali, 2015.). Uz funkciju kinaze, postoje istraživanja koja su zabilježila i njegovu nekinaznu funkciju u invazivnosti i aktivnosti matičnih stanica tumora dojke (Tai i ostali, 2015.). Paksilin je sidrište u FA za kinaze, citoskeletne proteine, GAP i druge adaptorne proteine (Schaller, 2001.). Paksilin i FAK imaju ključnu ulogu u malignom fenotipu povećane proliferacije i invazije stanica SK-MEL-28-N koje eksprimiraju gangliozid GD3 (Hamamura i ostali, 2008.). Smanjena ekspresija paksilina nakon izlaganja stanica

melanoma miša B16-F10 4-hidroksikumarinu zaslužna je za protumetastatski utjecaj *in vivo* (Velasco-Velázquez i ostali, 2008.).

Talin je još jedna komponenta FA, veliki adaptorni protein koji se veže direktno za citoplazmatski rep integrina. Metodom magnetne pincete, ukupne refleksijske fluorescencije i mikroskopije atomskih sila pokazano je da mehaničko rastezanje talina može aktivirati vinkulin, odnosno prevesti mehanički u kemijski signal (del Rio i ostali, 2009.). Njegova uloga je pokazana u poticanju invazije i metastaziranja preko proteina Src i Akt u stanicama tumora prostate čovjeka (Sakamoto i ostali, 2010.). Budući da vinkulin prenosi silu od talina do aktinskog citoskeleta (Bays i DeMali, 2017.), njegova smanjena ekspresija je povezana s metastatskim potencijalom stanica melanoma miša B16 i stanica fibroblasta embrija štakora 3Y1 (Sadano i ostali, 1992.).

α -aktinini su citoskeletni proteini, a α -aktinin 4 (ACTN4), osim strukturne uloge, također prenosi signale (Hsu i Kao, 2013.). Pokazano je da je α -aktinin-4 povećano eksprimiran u melanomu (Hood i ostali, 2010.) i da je potreban za ameboidno invazivno kretanje stanica melanoma WM1158 (Shao i ostali, 2014.). Ziksin je fosfoprotein uključen u organizaciju citoskeleta (Han i ostali, 2009.). Utišavanje proteina Wilmsovog tumora (WT1) je smanjilo ekspresiju ziksina i posljedično proliferaciju stanica melanoma (Wagner i ostali, 2008.). Protein VASP sudjeluje u organizaciji aktinskog citoskeleta direktno se vežući s aktinom (Hood i ostali, 2010.). Pokazano je da je rast melanoma *in vivo* u VASP-*knockout* mišu smanjen, a melanomi imaju manje stanice i manje su prokrvljeni (Y. M. Kim i ostali, 2011.).

1.7. Sažetak i ciljevi rada

Melanom, najopasniji oblik tumora kože, jedan je od glavnih problema javnog zdravstva (Mayer i ostali, 2014.). Usprkos napretku u terapiji metastatskog melanoma i postojanju ciljanih terapija kao što su inhibitori BRAF-a i MEK-a, imunoterapija i postojećih kombinacijskih terapija te relativno dobrom odgovoru pacijenata na terapiju, do povratka bolesti u prosjeku prođe oko godine dana, a ukupno preživljenje pacijenata nije više od dvije godine. S pojavom novih terapijskih mogućnosti, terapija klasičnim protutumorskim lijekovima više nije metoda odabira za liječenje metastatskog melanoma, ali i dalje ima ulogu u liječenju bolesnika koji ne odgovaraju na ciljanu terapiju (Mackiewicz i Mackiewicz, 2018.). Stoga postoji hitna potreba za identifikacijom novih ciljnih molekula i kombiniranih pristupa.

Integrini su adhezivni transmembranski proteini preko kojih se aktivno prenose signali preživljenja, proliferacije, diferencijacije i migracije. Stanice tumora mijenjaju ekspresiju integrina tako da obično gube integrine koji osiguravaju njihovo vezanje na bazalnu membranu i pomažu im da ostanu u mirujućem, diferenciranom stanju (Guo i Giancotti, 2004.). S druge strane, održavaju ili prekomjerno ekspimiraju integrine koji potiču njihovo preživljenje, migraciju i proliferaciju tijekom invazije i metastaziranja (Desgrosellier i Cheresch, 2010.). Integrini, nakon vezanja na proteine izvanstaničnog matriksa, okidaju signale stvaranjem višemolekulskog kompleksa proteina s unutrašnje strane stanične membrane, koji se naziva fokalna adhezija ili kompleks adhezije integrina, koja ima važnu ulogu u osjetljivosti stanica na protutumorske lijekove, migraciji i invaziji stanica tumora (Dickreuter i Cordes, 2017.).

Cilj je ovog rada utvrditi može li se utišavanjem ekspresije jedne od podjedinica integrina α (α_3 , α_4 ili α_v) stanice melanoma čovjeka učiniti osjetljivijima na jedan od tri protutumorska lijeka (cisplatinu, paklitaksel ili vinkristin) i istovremeno smanjiti pokretljivost, tj. migracijsku i invazivnu sposobnost stanica. Osim toga, cilj nam je istražiti sastav kompleksa adhezije (adhesom) odabranog integrina koji povećava osjetljivost stanica melanoma čovjeka na protutumorske lijekove i ujedno smanjuje

pokretljivost. Rezultati ovog rada trebali bi doprinijeti razumijevanju signalnih puteva integrina u melanomu kao i razvoju kombiniranih terapija za njegovo liječenje.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Stanice melanoma čovjeka

U radu su korištene komercijalno dostupne stanične linije melanoma čovjeka kupljene od tvrtke ATCC (American Type Culture Collection, SAD) koje rastu pričvršćene za podlogu: MDA-MB-435S (ATCC HTB-129D), RPMI-7951 (ATCC HTB-66), MeWo (ATCC HTB-65) i stanična linija A375 (ATCC CRL-1619) dobivena ljubaznošću dr. sc. Maje T. Tomičić (Department of Toxicology, University Medical Center Mainz, Mainz, Njemačka).

2.1.2. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u Tablici 4.

Tablica 4. Osnovne kemikalije korištene u radu.

Kemikalija	Kataloški broj	Proizvođač
aceton	650501	Sigma-Aldrich, SAD
akrilamid	A8887	Sigma-Aldrich, SAD
Amido-crnilo (engl. <i>amido black</i>)		Kemika, Hrvatska
APS (amonijev persulfat)	13375	Serva, Njemačka
beta-merkaptioetanol	63690	Fluka, Njemačka
bisakrilamid	M7279	Serva, Njemačka
bromfenolno plavilo (engl. <i>bromophenol blue</i>)	15375	Serva, Njemačka
BSA (albumin seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumine</i>))	80762	Carl Roth, Njemačka
DMEM (Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>))	D5796	Sigma-Aldrich, SAD
DMSO (dimetilsulfoksid) za otapanje inhibitora	D2650	Sigma-Aldrich, SAD
DMSO (dimetilsulfoksid) za smrzavanje stanica	D8418	Sigma-Aldrich, SAD
DMSO (dimetilsulfoksid) za otapanje kristala formazana u testu MTT	P120601	GramMol, Hrvatska
DTBP (dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat)	20665	Thermo Fisher Scientific, SAD
DTT (ditiotreitol)	D0632	Sigma-Aldrich, SAD
EDTA (disodium etilendiamin tetraoctena kiselina, kompleksal III)	1136808	GramMol, Hrvatska
etanol	P112001	GramMol, Hrvatska

FACSFlow™	342003	BD Biosciences, SAD
fiksir	5285937	Kodak, SAD
glicerol	0711901	Kemika, Hrvatska
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich, SAD
IsoFlow Sheat Fluid	8546859	Beckman Coulter, SAD
kemiluminiscentni reagens za western blot (Western lightning plus-ECL)	NEL104001EA	Perkin Elmer, SAD
kristal ljubičasto (engl. <i>crystal violet</i>)		
Lipofectamine® Reagent	18324-012	Invitrogen, SAD
medij za uklapanje stakalaca (Dako fluorescent mounting medium) za filtere iz pokusa migracije i invazije	S3023	Dako, SAD
medij za uklapanje stakalaca Fluoromount-G™ za pokuse imunofluorescencije	00-4959-52	Thermo Fischer Scientific, SAD
metanol	P140501	GramMol, Hrvatska
mlijeko u prahu, nemasno	F145.1	Carl Roth, Njemačka
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)	M2128	Sigma-Aldrich, SAD
NaCl	P148590	GramMol, Hrvatska
natrijev deokiskolat (engl. <i>sodium deoxycholate</i>)	D6750	Sigma-Aldrich, SAD
Opti-MEM (engl. <i>minimum essential media</i>)	11058-021	Gibco, SAD
penicilin 10 000 u/mL /streptomycin 10 000 µg/mL	15140-122	Gibco, SAD
PI (propidij jodid)	P4170	Sigma-Aldrich, SAD
pufer RIPA (engl. radioimmunoprecipitation assay buffer)	89901	Thermo Fisher Scientific, SAD
puomicin	P7255	Sigma-Aldrich, SAD
razvijlač	G138i	AGFA, Belgija
RNA iMAX Lipofectamine®	13778	Invitrogen, SAD
SDS (natrij-dodecil sulfat)	L5750	Sigma-Aldrich, SAD
serum fetusa goveda (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS)	F7524	Sigma-Aldrich, SAD
TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilendiamin)	T22500	Sigma-Aldrich, SAD
tripsin-EDTA	T4049	Sigma-Aldrich, SAD
tris baza	T1503	Sigma-Aldrich, SAD
tris HCl, tris-klorovodična kiselina	1.08219	Merck Millipore, Njemačka
triton X-100	X100	Sigma-Aldrich, SAD
tween-20	P139	Sigma-Aldrich, SAD

2.1.3. Otopine i njihova priprema

Osnovne otopine, načini njihove pripreme i temperatura čuvanja navedeni su u Tablici 5.

Tablica 5. Otopine, njihova priprema i temperatura čuvanja*

Ime otopine	Priprema	Čuvanje
5%-tno mlijeko u TBST	5% mlijeko u 1× TBS s 0,1% Tween, priprema se netom prije korištenja	-
akrilamid/bisakrilamid 30%	29,2 g akrilamida i 0,8 g bisakrilamida otapa se u 100 mL diH ₂ O	4°C
ABB, annexin-vezujući pufer (engl. <i>annexin binding buffer</i>) 10×	100 mM HEPES, pH 7,4, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl ₂ ;	4°C
ARS (engl. <i>adhesion recovery solution</i>)	125 mM TrisHCl, pH 6,8, 1% SDS (w/V) 150 mM DTT, otopina se priprema netom prije pokusa	-
BSA 3%, 5%	1%, 3% ili 5%-tni BSA u PBS	-20°C
CaCl ₂ otopina	25 mM	4°C
DMEM-FCS (engl. <i>fetal calf serum</i>)	DMEM s 10%-tnim serumom fetusa goveda s 50 u/mL penicilina i 50 µg/mL streptomicina	4°C
DMEM-BSA	1%-tni BSA u DMEM	
DMEM-HEPES	25 mM	4°C
DTBP otopina	6 mM u 25 mM DMEM-HEPES, otopljen netom prije pokusa	-
EDTA otopina	0,5 M, pH 8	4°C
HEPES	1 M, pH 7,4	4°C
hranjiva podloga za zamrzavanje stanica	950 µL DMEM-FCS + 50 µL DMSO, priprema se netom prije korištenja	-
NaCl	4 M	4°C
otopina APS	10%, 500 mg APS otapa se u 5 mL diH ₂ O	-20°C
otopina boje amido crno	0,1% amidoblack, 10% octene kiseline, 7,5% MetOH	sobna temperatura
MTT otopina (12,1 mM, 10×	5 mg MTT-a se otapa u 1 mL fosfatnog pufera (PBS), filtrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci	4°C
otopina za odbojavanje	40% MetOH, 7% octene kiseline	sobna

boje amido crno		temperatura
paraformaldehid (2 ili 4%), PFA	20g ili 40 g paraformaldehida i 100 μ L NaOH otapa se u 1000 mL PBS-a	-20°C
PBS, fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i>) pH7,1-7,2	Otopina I: 27 mM KCl, 1,4 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 . Otopina II: Smiješati 3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Autoklavirati zasebno. Pomiješati 80 mL Otopine I i 100 mL otopine II. pH 7.2.	4°C
PBS Δ , fosfatni pufer bez Ca^{2+} i Mg^{2+}	2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4	4°C
PI, propidij jodid	Matična otopina koncentracije 1 mg/mL	4°C
PBS-PI	PI 1 μ g/mL u PBS, priprema se netom prije korištenja	-
pufer za gel za razdvajanje 4 \times	1,88 M Tris baza, pH 8,8	4°C
pufer za elektroforezu	24 g Tris baza, 114 g glicina, 10 g SDS, pH 8,3	4°C
pufer za gel za sabijanje 4x	1,25 M Tris baza, pH 6,8	4°C
pufer za nanošenje uzoraka za SDS-PAGE, 5 \times	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25% (w/v) glicerol, 10% (w/v) SDS, 0.01% (w/v) bromofenolno plavilo, 20% (v/v) 2-merkaptotanol	-20°C
pufer za uklanjanje vezanih protutijela za membranu (engl. <i>stripping pufer</i>)	100 mM otopina glicina pH 2,8	4°C
pufer za prijenos proteina	50 mL SDS Tris-HCl pH 8,3, 350 mL diH_2O i 100 mL MetOH za 500 mL	4°C
pufer za pripremu lizata stanica	RIPA (89901, Thermo Fischer Scientific, SAD) s dodatkom 1 \times inhibitora fosfataza i proteaza iz Halt Protease Inhibitor Cocktail Kita i 50 μ M EDTA, priprema se netom prije korištenja	-
puromicin dihidroklorid matična otopina	10 mg/mL u diH_2O	-20°C

modificirana RIPA, 5×	250 mM Tris-HCl (pH7.6), 750 mM NaCl, 25 mM dinatrij EDTA (pH8), 12,5% (w/v) SDS, 5% Triton X-100, 5% natrij deoksikolat	4°C
TBS 10×	250 mL 1 M TrisHCl (pH 7,5), 150 mL 5 M NaCl, diH ₂ O do 500 mL	4°C
TBST	1× TBS, 0,1% Tween	4°C
Tris-HCl pH7.6	1 M, pH 7,6	4°C
Tris-HCl, pH6,8	125 mM, pH 6,8	4°C
Tris-HCl, pH8	1 M, pH 8	4°C
Triton X-100	0,1%	Sobna temperatura

*otopine spremljene u diH₂O (deionizirana H₂O), osim ako nije drugačije navedeno

2.1.4. Male interferirajuće RNA korištene u pokusima prolazne transfekcije

Popis malih interferirajućih siRNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) korišten u radu naveden je u Tablici 6. SiRNA u liofiliziranom obliku proizvođača Ambion su otopljene u diH₂O do koncentracije matične otopine od 100 μM. Daljnjim razrjeđivanjem u diH₂O pripravljene su radne otopine od 10 μM. Matične i radne otopine čuvane su pri -20°C.

Tablica 6. Korištene siRNA molekule.

Specifičnost	Kataloški broj	Identifikacijska oznaka
Nespecifična	4390844	Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA
α3	4390821	S7543
αv	4390826	S7568
β3	4390818	S7580
β5	4392422	S7591

2.1.5. Plazmid SUPER.puro. α V za izdvajanje stabilnih transfektanata

Za izdvajanje stabilno transficiranih klonova stanica s konstitutivno smanjenom ekspresijom integrina α v korišten je plazmid SUPER.puro. α V dobiven ugradnjom shRNA (engl. *short hairpin RNA*), koja je specifična za α v-integrinsku podjedinicu (slijed 5' GAAUAUCGGUUGGAUUAUATT 3'), u pSUPER.puro VEC-PBS-0007/0008 (Addgene, SAD) koji sadrži gen za otpornost na puromicin. Slijed za shRNA izveden je iz slijeda siRNA specifične za integrin α V koja je korištena u pokusima prolazne transfekcije.

2.1.6. Protutumorski lijekovi i inhibitori

Protutumorski lijekovi, inhibitori korišteni u ovom radu su navedeni u Tablici 7.

Tablica 7. Protutumorski lijekovi i inhibitori korišteni u radu.

	Ime	Proizvođač	Kataloški broj	Koncentracija matične otopine*
Protutumorski lijek	Cisplatina	Sigma-Aldrich, SAD	P4394	0,5 mg/mL, u vodi
	Paklitaksel	Sigma-Aldrich, SAD	T7191	6 mg/mL
	Vinkristin	Sigma-Aldrich, SAD	V8879	0,1 mg/mL
Inhibitor	PF-573228 (PF-228)	Sigma-Aldrich, SAD	PZ0117	100 mM

*matična otopina pripremljena u DMSO, osim ako nije drugačije navedeno

2.1.7. Kompleti kemikalija i standardi

U Tablici 8 i Tablici 9 popisani su kompleti kemikalija i standardi za određivanje duljine odsječaka DNA i veličine proteina.

Tablica 8. Kompleti kemikalija korištenih u radu.

Primjena	Naziv	Sastojci	Proizvođač	Kataloški broj
Za mjerenje koncentracije proteina: BCA test	BCA Protein Assay Kit	<ul style="list-style-type: none"> •BCA reagens A •BCA reagens B •albuminski standard, 2 mg/mL 	Thermo Fischer Scientific, SAD	23227
Za pripremu lizata stanica	Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit	<ul style="list-style-type: none"> •inhibitori proteaza (100×) •otopina EDTA, 0,5 M 	Thermo Fischer Scientific, SAD	78430

Tablica 9. Standardi za elektroforezu proteina korišteni u radu.

Upotreba	Standard	Proizvođač
Za SDS-PAGE proteina	Standard za određivanje molekularne mase proteina <i>Pageruler Prestained Protein Ladder</i> , 26616.	Thermo Fisher Scientific, SAD

2.1.8. Protutijela i spojevi korišteni u metodama protočne citometrije, western blota i fluorescencijske mikroskopije

Za određivanje ekspresije proteina metodom protočne citometrije ili metodom western blot ili za vizualizaciju proteina metodom fluorescencijske mikroskopije korištena su protutijela navedena u Tablici 10.

Tablica 10. Protutijela i spojevi korišteni u metodama protočne citometrije, western blot i fluorescencijske mikroskopije.

Metoda	Specifičnost	Proizvedeno u	Kataloški broj	Proizvođač	Razrjeđenje
Protočna citometrija *	integrin $\alpha\beta3$	miš	CBL544	Merck Millipore, Njemačka	1:100
	integrin $\alpha\beta5$	miš	MAB1961	Abcam, UK	1:100
	podjedinica integrina $\alpha\gamma$	miš	407286	Merck Millipore, SAD	1:100
	integrin $\alpha3\beta1$	miš	Mab1992	Chemicon, USA	1:1

	podjedinica integrina $\alpha 4$	miš	MAB16983	Merck Millipore, Njemačka	1:100
	podjedinica integrina $\beta 1$	miš	AB1965	Abcam, UK	1:100
	nema: izotipska kontrola IgG ₁	mišji Fc fragmenti IgG ₁	M5284	Sigma-Aldrich, SAD	1:50
	mišji imunoglobulini, obilježen FITC-om	zec	554001	BD Biosciences, SAD	1:50
	fosfatidil serin: aneksin obilježen FITC-om	-	556420	BD Biosciences, SAD	50× u ABB
	stanice s narušenim integritetom membrane: propidij jodid (PI)	-	P4170	Sigma-Aldrich, SAD	50µg/m L u ABB
Western blot **	Bcl-XI	zec	ab2568	Abcam, UK	1:500
	Antigen ranog endosoma (engl. <i>Early Endosome Antigen 1</i> , EEA1)	zec	2411	Cell Signalling, SAD	1:1000
	Kinaza fokalne adhezije (engl. <i>focal adhesion kinase</i> , FAK)	zec	ab40794	Abcam, UK	1:1000
	pFAK (Y397)	zec	ab81298	Abcam, UK	1:1000
	Laktat dehidrogenaza (LDH)	zec	sc33781	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:400
	Liprin $\beta 1$	miš	sc-514575	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500
	mišji imunoglobulini, obilježen peroksidazom iz hrena	ovca	NA931	GE Healthcare, SAD	1:5000
	zečji imunoglobulini, obilježen peroksidazom iz hrena	koza	31466	Thermo Fischer Scientific, SAD	1:10.000
Fluorescentna mikroskopija ***	pPAX (Y113)	zec	ab32084	Abcam, UK	1:100
	α -tubulin	miš	CB06	Merck Millipore, SAD	1:500
	zečji imunoglobulini, obilježen Alexa-Fluor 488	magarac	A-21206	Thermo Fisher Scientific, SAD	1:1000
	aktin: faloidin obilježen FITC-om	-	P5282	Sigma-Aldrich, SAD	1:200

*Razrjeđenja pripravljena u PBSΔ; **Razrjeđenja pripravljena u 5%-tnom mlijeku u TBST-u;

***Razrjeđenja pripravljena u BSA 5%

2.1.9. Uređaji

Uređaji korišteni u radu navedeni su u Tablici 11.

Tablica 11. Uređaji korišteni u radu.

Uređaj	Proizvođač
analitička vaga AB54-S	Mettler Toledo Classic
brojač stanica Coulter Counter	Beckman Coulter, SAD
centrifuga za mikroprevute (do 14000 × g)	Eppendorf, Njemačka
centrifuga za stanice (do 12568 × g) Labofuge 400	Heraeus, Njemačka
fluorescentni mikroskop Olympus BX51TF	Olympus, Japan
frižider -80°C	Skadi MORIS Technology, Latvija
frižider -20°C	Bosch, Njemačka
frižideri 4°C	Gorenje, Slovenija
inkubator za uzgoj stanica HeraCell 150	Heraeus, Njemačka
izvor napajanja za elektroforezu proteina i transfer PowerPac Basic	BioRad, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
kadica za elektroforezu i transfer proteina	BioRad, SAD
konfokalni mikroskop LeicaTSC SP2	Lasertechnik GmbH, Njemačka
kupelj JB Nova	Grant Instruments, UK
magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija
maseni spektrometar Orbitrap Elite	Thermo Fischer Scientific, SAD
PCR uređaj LKB-GPS 200/400	Pharmacia Biotech, Švedska
pH metar PH3 Sension+	Hach, SAD
protočni citometar FACSCalibur	BD Biosciences, SAD
skener ScanMaker 5900	Microtek, Kina
spektrofotometar BioSpec-nano UV-VIS	Shimadzu, Japan
spektrofotometar StatFax 2100	Awareness Technology INC, SAD
spremnik za tekući dušik 35VHC	Taylor-Wharton, SAD
svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
tresilica za pločice Vibromix 301EVT	Tehnica, Slovenija
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom Ultrasonic Processor	ColeParmer, SAD
uređaj za ultračistu milliQ vodu Direct-Q	Merck Millipore, Njemačka
uređaj za vizualizaciju gelova s DNA Transiluminator TCX20M	Vilber, Njemačka
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala Ibright CL1000	IBright, SAD
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala Uvitec	Cambridge, UK

vaga	Tehtnica, Slovenija
vakuumska pumpa	-
vorteks EV 102	Tehtnica, Slovenija
zibalica Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija

2.1.10. Laboratorijski pribor

Laboratorijski pribor korišten u radu naveden je u Tablici 12.

Tablica 12. Popis laboratorijskog pribora korištenog u radu.

Laboratorijski pribor	Proizvođač
ampule za smrzavanje stanica	Nunc
aparatura za izlivanje gela i za vertikalnu elektroforezu proteina Mini-PROTEAN® <i>Tetra Cell Systems</i>	BioRad, SAD
automatska pipeta	Integra Biosciences, SAD
bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75	Falcon, SAD
čaše, staklene različitih zapremnina	Kimble, SAD
epruvete, plastične 15 mL	Falcon, SAD
Erlenmeyer staklene tikvice različitih zapremnina	VWR, SAD
filmovi za razvijanje kemiluminiscentnog signala za WB Amersham Hyperfilm	GE Healthcare, SAD
filtrar papir za prijenos proteina u western blot	BioRad, SAD
gradijentni poliakrilamidni gel za SDS-PAGE 4-15%, 456-1084	BioRad, SAD
komorice za invaziju BioCoat Growth Factor Reduced Matrigel® Invasion Chamber	Falcon, SAD
komorice za migraciju Permeable Support for 24 Well Plate with 8.0 µm Transparent PET Membrane	Falcon, SAD Falcon, SAD, SAD
membrana za prijenos proteina, nitrocelulozna, Amersham Protran 0,2 µm	GE Healthcare, USAcare
mikroepuvete, plastične za PCR	
mikroepuvete, plastične od 1,5 ili 2 mL	Falcon, SAD
mikroepuvete, plastične od 1,3 mL za protočnu citometriju 102201	Greiner, Austrija
mikropipete	Eppendorf, Njemačka
nastavci za mikropipete, razne zapremnine	Brand, Njemačka
nastavci za mikropipete s filtrom, razne zapremnine	Thermo Fischer Scientific, SAD
Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm	Falcon, SAD
pingvini za led	-
pipete, plastične različitih zapremnina: 1, 2, 5, 10 i 25 mL	Sarstedt, Njemačka i Sigma-Aldrich, SAD
pipete, staklene, različitih zapremnina: 1, 2, 5, 10 i 25 mL	Bellco, SAD i Hirschmann, Njemačka
pločice za uzgoj kulture stanica s 96/24/6 bunarića	Falcon, SAD Falcon, SAD, SAD, SAD

pokrovno staklo 0115020	Marienfeld GmbH, Njemačka
predmetno staklo Super Frost Plus	Menzel-Gläser, Njemačka
skalpel u obliku zareza	Swann-Morton, UK
strugač za stanice	TPP Techno Plastic Products AG, Švicarska

2.1.11. Računalni programi

Računalni programi korišteni u radu navedeni su u Tablici 13.

Tablica 13. Računalni programi.

Svrha	Ime računalnog programa	Inačica	Izdavač
analiza fotografija snimljenih konfokalnim mikroskopom	LasX	3.4.2.18368	Leica Microsystems, Njemačka
analiza podataka dobivenih masenom spektrometrijom	Scaffold	4	Proteome Software, SAD
	Gene Functional Classification Tool DAVID Bioinformatics Resources, NIAID/NIH	6.8	Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics, Leidos Biomedical Research, SAD (Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics, 2018.)
	STRING	10.5	STRING Consortium 2018, EU (STRING Consortium 2018, 2017.)
	Spec/QProt	1.2.2	(Choi i ostali, 2015.)
mjerenje migracije i invazije stanica, western blot	ImageJ	1.45S	National Institutes of Health, SAD
svi pokusi	Microsoft Office Excel Professional Plus 2010	14.0.07214.5000	Microsoft Office, SAD
protočna citometrija	FCS Express Flow Cytometry Data Analysis	3	Denovosoftware, SAD
statistička analiza	GraphPad Prism	5	GraphPad Software, SAD

2.2. METODE

Većina metoda molekularne i stanične biologije koje su korištene u ovom doktorskom radu su detaljno opisane u priručniku Metode u molekularnoj biologiji (Ambriović Ristov i ostali, 2007.).

2.2.1. Kultura stanica

Stanice su uzgajane prema preporukama ATCC (*American Type Culture Collection*) u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM-FCS u bočicama ili Petrijevim zdjelicama za uzgoj stanica, u inkubatoru pri 37°C s 5% CO₂. Stanice su presađivane dva puta tjedno, odvajanjem od površine pomoću tripsina zagrijanog na 37°C, prije nego što bi u potpunosti popunile površine posude na kojoj rastu. Na taj način stanice su održavane u eksponencijalnoj fazi rasta. Odvajanje stanica od površine je praćeno svjetlosnim mikroskopom. Nakon par minuta inkubacije u tripsinu pri 37°C, odvajanje od površine je zaustavljeno dodatkom četiri puta većeg volumena DMEM-FCS. Dio stanične suspenzije (od 1/6 do 1/12, ovisno o staničnoj liniji) je vraćen u posudu za održavanje stanične kulture, dok je ostatak korišten za pokuse.

Kako bi se održala zaliha stanica ranih pasaža, dio stanica je prema potrebi zamrzavan u tekući dušik (-196°C). Stanice su za zamrzavanje skupljene centrifugiranjem tijekom 5 minuta pri 1100 × g, resuspendirane u 950 µL DMEM-FCS i prebačene u ampule za smrzavanje. Nakon pola sata inkubacije na ledu, u suspenziju stanica je dodano 50 µL DMSO (zaštita od stvaranja kristala vode tijekom zamrzavanja) i stanice su zatim prebačene na stalak spremnika za tekući dušik u pare tekućeg dušika (temperature oko -80°C) kako bi im se osiguralo polagano zamrzavanje. Ampule sa stanicama su sutradan prebačene u spremnik u tekući dušik pri -196°C gdje su čuvane do idućeg odmrzavanja.

Stanice su odmrzavane naglim uranjanjem ampule u vodenu kupelj ugrišanu na 37°C, nakon čega su prebačene u 7 ili 10 mL DMEM-FCS u bočice T-25 ili Petrijeve zdjelice (promjer 10 cm) za uzgoj stanica. Sutradan je stanicama zamijenjena hranjiva podloga kako bi se u potpunosti otklonio DMSO.

2.2.2. Određivanje ekspresije površinskih integrina metodom protočne citometrije

Stanicama u Petrijevim zdjelicama ili bočicama za uzgoj stanica je uklonjena stara hranjiva podloga, isprane su jedanput s PBS Δ i zatim odvojene od površine pomoću 0,5 mM EDTA. Postupak odvajanja je zaustavljen dodatkom DMEM-FCS, a dobivenoj suspenziji stanica je određena koncentracija pomoću brojača stanica Coulter Counter. Kod određivanja ekspresije integrina metodom protočne citometrije je bitno u svakom uzorku imati isti odabrani broj stanica ($3-5 \times 10^5$). Odabran broj stanica je odvojen u epruvete od 15 mL i centrifugiran 5 minuta pri $1100 \times g$, a talog je zatim resuspendiran u 1 mL PBS Δ , prebačen u mikroeprevete za protočnu citometriju i zatim ponovno centrifugiran 5 minuta pri $1100 \times g$ kako bi se uklonili ostaci hranjive podloge i EDTA. Vakuum sisaljkom je sa stanica izvučen supernatant tako da nad stanicama ostane približno 50 μ L PBS Δ , na što je dodano protutijelo u razrjeđenju prema preporuci proizvođača ili iskustvu. Stanice su u primarnom protutijelu inkubirane jedan sat na ledu, nakon čega su stanice isprane tako da su resuspendirane u 1 mL PBS Δ , centrifugirane 5 minuta pri $1100 \times g$, a supernatant je ponovno izvučen vakuum sisaljkom, tako da su stanice ostavljene u oko 50 μ L PBS Δ . Postupak ispiranja ponovljen je dva puta te je zatim dodano sekundarno protutijelo obilježeno fluorescentnom bojom i inkubirano na ledu, u mraku tijekom 30 minuta. Stanice su zatim isprane dva puta s 1 mL PBS Δ , kako je prethodno opisano i nakon toga resuspendirane u 250 μ L PBS-PI. U ovom se puferu nalazi propidij jodid kako bi se u analizi mogle odvojiti mrtve stanice. Analiza ovako pripremljenih stanica vršena je na protočnom citometru FACSCalibur, a rezultati obrađeni pomoću FCS Express Flow Cytometry Data Analysis programa. Probrane su stanice za analizu koje su PI negativne i prema veličini i granuliranosti (prema presjeku kanala FSC (engl. *forward scatter*) i SSC (engl. *side scatter*)). Rezultati se prikazuju kao histogrami raspodjele intenziteta fluorescencije (FL-1) u populaciji stanica (broj).

2.2.3. Utišavanje gena za integrinske podjedinice transfekcijom specifičnih malih interferirajućih RNA

Kako bi se utišala ekspresija gena za integrinske podjedinice, stanice su transficirane predizajniranim (Ambion, SAD) specifičnim malim interferirajućim RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) uz pomoć komercijalno dostupnog reagensa Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific, SAD). Stanice (3×10^5) su nasađene u pločice za uzgoj stanica sa 6 bunarića u 1.5 mL DMEM-FCS bez antibiotika kako bi sutradan pri transfekciji popunjenost površine bila 60-80%. Na stanice je dodano 500 μ L transfekcijske smjese (otopina A + otopina B) pripremljene prema uputama proizvođača i opisane u Tablici 14. Konačne koncentracije siRNA su bile 50 nM. Stanice su dan nakon transfekcije rasađene za daljnje pokuse, a dva dana nakon transfekcije provjeravala se uspješnost utišavanja mjerenjem površinske ekspresije integrina metodom protočne citometrije, stanice su izlagane djelovanju protutumorskih lijekova, skupljeni proteini kompleksa adhezije integrina za analizu masenom spektrometrijom ili je uklanjan serum iz hranjive podloge kao prvi korak u mjerenju sposobnosti stanica da migriraju ili invadiraju.

Tablica 14. Sastav transfekcijske smjese za utišavanje gena za integrinske podjedinice transfekcijom specifičnih siRNA.

Konačna koncentracija siRNA	50 nM
Otopina	
A	10 μ L siRNA 240 μ L Opti-MEM
B	3 μ L Lipofectamine RNAiMax 247 μ L Opti-MEM

2.2.4. Izdvajanje stabilno transficiranih klonova stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrina αv

Klonovi stanica s konstitutivno smanjenom ekspresijom integrina αv dobiveni su transfekcijom plazmida pSUPER.puro. αv koji sadrži gen za otpornost na puromicin (za odabir uspješno transficiranih stanica tumora) i u kojeg je ugrađena shRNA (engl. *short hairpin RNA*) specifična za podjedinicu integrina αv .

Utvrđivanje koncentracije puromicina za odabir transficiranih stanica

Prije transfekcije, bilo je potrebno utvrditi optimalnu koncentraciju puromicina za odabir transficiranih stanica. To je učinjeno određivanjem citotoksičnosti serije dvostrukih razrjeđenja puromicina tijekom pet dana pomoću testa MTT. Odabrana je najmanja koncentracija puromicina koja ima potpuni citotoksični učinak na stanice.

Transfekcija pSUPER.puro. αv s ugrađenom shRNA specifičnom za integrin αv

Za pokus transfekcije nasadeno je $1,2 \times 10^6$ stanica u Petrijevu zdjelicu za uzgoj stanica promjera 10 cm u 10 mL DMEM-FCS bez antibiotika kako bi sutradan popunjenost površine bila oko 80%. Pripremljena je transfekcijska smjesa (otopina A + otopina B) prema Tablici 15. Na stanicama je ostavljeno 2 mL hranjive podloge, dodana je transfekcijska smjesa, ostavljena u kontaktu sa stanicama tijekom 3 sata i 30 minuta nakon čega je hranjiva podloga zamijenjena s DMEM-FCS bez antibiotika. Zbog toksičnog djelovanja transfekcijske smjese na stanice trajanje transfekcije je prethodno određeno pokusima.

Tablica 15. Sastav transfekcijske smjese za stabilnu transfekciju s pSUPER.puro. αv .

Otopina	Sastav
A	12,5 μ g pSUPER.puro. αv Opti-MEM do 600 μ L
B	25 μ L Lipofectamine Reagent 575 μ L Opti-MEM

Utvrđivanje optimalne koncentracije Lipofectamine Reagent za stabilnu transfekciju

Kako bi se utvrdila optimalna koncentracija Lipofectamine Reagent za transfekciju pSUPER.puro.αv s ugrađenom shRNA specifičnom za integrin αv, stanice su transficirane na isti način plazmidom pEGFPN1 (Clontech, SAD) s tri različite koncentracije Lipofectamine Reagenta, a učinkovitost transfekcije je analizirana protočnom citometrijom. $4,5 \times 10^4$ stanica je nasađeno u pločicu s 24 bunarića u 1600 μL DMEM-FCS bez antibiotika. Sutradan su pripremljene transfekcijske smjese (otopina A + otopina B) prema Tablici 16. Na stanicama je ostavljeno 350 μL hranjive podloge, dodana je transfekcijska smjesa i ostavljena u kontaktu sa stanicama tijekom 5 sati nakon čega je hranjiva podloga zamijenjena s DMEM-FCS bez antibiotika.

Tablica 16. Sastav transfekcijskih smjesa za utvrđivanje optimalne koncentracije Lipofectamine Reagent za stabilnu transfekciju.

Otopina	Sastav		
	Transfekcija 1	Transfekcija 2	Transfekcija 3
A	500 ng pEGFP Opti-MEM do 25 μL	500 ng pEGFP Opti-MEM do 25 μL	500 ng pEGFP Opti-MEM do 25 μL
B	1 μL Lipofectamine Reagent 25 μL Opti-MEM	2 μL Lipofectamine Reagent 25 μL Opti-MEM	3 μL Lipofectamine Reagent 25 μL Opti-MEM

Odabir stabilno transficiranih klonova

Stanice su dan nakon transfekcije pSUPER.puro.αv rasađene na deset puta veću površinu u Petrijeve zdjelice za uzgoj stanica u DMEM-FCS s 0,2 μg/mL puromicina. Svaki tjedan stanicama je mijenjana hranjiva podloga svježom DMEM-FCS s 0,2 μg/mL puromicina. Nakon dva tjedna rasta u Petrijevim zdjelicama, vidljive kolonije stanica su obilježene flomasterom i prenesene pomoću nastavka za mikropipete od 200 μL u pločicu za uzgoj stanica s 96 bunarića ispunjenih sa 150 μL DMEM-FCS sa 0,2 μg/mL puromicina. Uspješnost prenošenja stanica je provjerena svjetlosnim mikroskopom. Klonovi su, nakon što su popunili bunarić pločice za uzgoj stanica s 96 bunarića, prebačeni u pločicu za uzgoj stanica sa 24 i, konačno, 6 bunarića. Klonovima koji su prekrili površinu bunarića u pločici sa 6 bunarića je provjerena

uspješnost utišavanja određivanjem površinske ekspresije integrina αv metodom protočne citometrije s protutijelom specifičnim za integrinsku podjedinicu αv . Uspješno transficirani klonovi sa smanjenom ekspresijom integrina αv su nakon prvog presađivanja u bočici za uzgoj stanica smrznuti kako bi se osigurala zaliha stanica za daljnje pokuse. Dalje su uzgajani u DMEM-FCS bez puromicina.

2.2.5. Određivanje preživljenja stanica testom MTT

Preživljenje stanica je mjereno kolorimetrijskom metodom MTT. Stanice nasade u pločice s 96 bunarića u 180 μL u broju od $1-1,2 \times 10^4$, ovisno o staničnoj liniji, su dan nakon nasadivanja izlagane djelovanju protutumorskog lijeka ili inhibitora. Protutumorski lijekovi i/ili inhibitori dodavani su u volumenu 20 ili 10 μL (20 μL za ispitivanje jednog agensa, 10 μL za kombinaciju) u koncentracijama 20 ili 10 puta većima od konačne željene koncentracije. Nakon 96 sati iz bunarića je uklonjena hranjiva podloga naglim okretanjem pločice naopako i laganim udaranjem po staničevini kako bi se u potpunosti odstranila tekućina. U svaki bunarić sa stanicama i u jedan bunarić bez nasadenih stanica (slijepa proba) je dodano po 40 μL 1 x MTT otopine nakon čega je slijedila inkubacija pri 37°C tijekom tri sata u inkubatoru za uzgoj stanica. Tijekom inkubacije, žive, metabolički aktivne stanice pomoću mitohondrijskih reduktaza reduciraju žuti 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT) u ljubičaste kristale formazana koji su zatim otapani dodatkom 170 μL dimetilsulfoksida (DMSO) tijekom 30 minuta na tresilici za pločice EC-102. Nakon što je pregledom pločice pod svjetlosnim mikroskopom provjereno da su kristali potpuno otopljeni, intenzitet obojenja (apsorbancija) je mjeran spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra StatFax 2100 pri valnoj duljini 600 nm. Vijabilnost stanica je proporcionalna apsorbciji i izračunata je pomoću formule:

$$\text{preživljenje}(\%) = \frac{\text{apsorbancija stanica izloženih djelovanju citostatika} - \text{apsorbancija negativne kontrole}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica} - \text{apsorbancija negativne kontrole}}$$

2.2.6. Tumačenje utjecaja utišavanja integrinskih podjedinica ili PF-228 na djelovanja cisplatine, paklitaksela i vinkristina pomoću dvostruke ANOVA-e

Značaj kombiniranog učinka utišavanja integrinske podjedinice ili PF-228 i cisplatine, paklitaksela ili vinkristina na preživljenje stanica određen je statističkim testom dvostruke ANOVA-e s Bonferroni post-testom uz program GraphPad Prism. Korištene su vrijednosti apsorbancije očitane pomoću spektrofotometra umanjene za vrijednost slijepe probe. P-vrijednost manja od 0,05 (S ili R u tablicama rezultata) je upućivala na međudjelovanje dvaju tretmana, dok je vrijednost iznad 0,05 upućivala na nedostatak međudjelovanja među tretmanima (NI u tablicama rezultata). Bonferroni post-testom je određen smjer zabilježenog međudjelovanja: 1. smanjenje osjetljivosti na lijek (u tablicama označeno kao R; ukoliko se statistički značajna razlika u preživljenju između stanica transficiranih nespecifičnom siRNA i integrin-specifičnom siRNA (ili negativne kontrole i stanica izloženih PF-228), smanjila s dozom lijeka); 2. povećanje osjetljivosti na lijek (u tablicama označeno kao S; ukoliko se statistički značajna razlika u preživljenju između stanica transficiranih nespecifičnom siRNA i integrin-specifičnom siRNA (ili negativne kontrole i stanica izloženih PF-228), povećala s dozom lijeka); 3. slučaj kada nije pronađeno međudjelovanje, ali samo utišavanje integrinske podjedinice (ili PF-228) je neovisno o lijeku izazvalo smanjeno preživljenje stanica, označen je kao povoljni aditivni učinak na djelovanje lijeka.

2.2.7. Utvrđivanje apoptoze protočnom citometrijom nakon istovremenog bojenja aneksin V fluoresceinom i propidij jodidom

Supernatant stanica, izloženih djelovanju protumorskog lijeka tijekom 72 sata, pomiješan je sa stanicama odvojenim od površine pomoću tripsina. Takva stanična suspenzija je centrifugirana 5 minuta pri $1100 \times g$, a talog resuspendiran u 1 mL DMEM-FCS. Nakon ponovljenog centrifugiranja na isti način kao i prethodno, talog je resuspendiran u 1 mL PBS Δ . Stanice su izbrojene i $3-5 \times 10^5$ stanica po uzorku je prebačeno u mikroepuvete za protočni citometar i ponovno centrifugirano 5 minuta pri $1100 \times g$. Talog je resuspendiran u 1 mL pufera ABB. Nakon ponovljenog

centrifugiranja na isti način kao i prethodno, talog je resuspendiran u mraku u 100 μL 4 različite kombinacije otopina boja prema Tablici 17.

Tablica 17. Shema bojanja uzoraka stanica za utvrđivanje apoptoze metodom protočne citometrije.

Uzorak	Otopina
neobojan	100 μL 1 \times ABB
A	2,5 μL Aneksin-FITC + 97,5 μL 1 \times ABB
PI	10 μL propidij jodid (PI) + 90 μL 1 \times ABB
A+PI	2,5 μL Aneksin-FITC + 10 μL PI + 87,5 μL 1 \times ABB

Kao pozitivna kontrola apoptoze, stanice su izložene cispladini (IC_{50}) tijekom 96 sati. Nakon inkubacije uzoraka s otopinom boja tijekom 15 minuta u mraku, stanicama je dodano 400 μL 1 \times ABB i zatim su analizirane protočnim citometrom FACSCalibur. Na uređaju je prvo određen postotak kompenzacije signala između kanala FL2-FL1 nakon čega su stanice analizirane na kanalu FL-2 za signal PI i FL-1 za signal FITC-a, a rezultati su obrađeni pomoću FCS Express Flow Cytometry Data Analysis i prikazani kao histogram presjeka FL2-FL1 kanala na temelju čega je određen postotak živih stanica (PI-FITC⁻), stanica u ranoj apoptozi (PI-FITC⁺), nekrotičnih stanica (PI+FITC) i na kraju stanica u kasnoj apoptozi ili sekundarnoj nekrozi (PI+FITC⁺).

2.2.8. Mjerenje migracije i invazije stanica pomoću komorica za migraciju i invaziju

Sposobnost usmjerene migracije i invazije stanica prema kemoatraktantu (FCS) je određena uz pomoć komorica za migraciju (Permeable Support for 24 Well Plate with 8.0 μm Transparent PET Membrane, Falcon) i invaziju (BioCoat Growth Factor Reduced Matrigel Invasion Chamber, Falcon). Stanice su nasadene u DMEM-FCS i nakon 24 sata im je zamijenjena hranjiva podloga sa DMEM bez FCS s ciljem izgladnjivanja stanica. Nakon 24 sata, stanice su odvojene od površine pomoću 0,5 mM EDTA, stanice u suspenziji su isprane dva puta s DMEM-BSA bez FCS (podrazumijeva resuspendiranje stanica i centrifugiranje tijekom 5 minuta pri 1100 \times

g), izbrojane i nasađene u DMEM-BSA bez FCS u komorice za migraciju ili invaziju koje su uronjene u DMEM-FCS stavljanjem u pločicu s 24 bunarića. Komorice za migraciju i invaziju na svom dnu imaju membranu s rupama veličine 8 μm , a jedina je razlika među njima da komorice za invaziju s gornje strane membrane imaju dodatni sloj koji oponaša bazalnu laminu (Matrigel). Matrigel se u komoricama za invaziju treba prije pokusa rehidrirati u DMEM bez FCS pri 37°C tijekom dva sata. U komorice je nasađivano 6×10^4 stanica u 500 μL za pokuse migracije te $1,2-1,8 \times 10^5$ stanica u istom volumenu za invazije. Kao kontrola nasađivanja jednakog broja stanica, uz svaku eksperimentalnu grupu, isti broj stanica je nasađen u dodatan bunarić pločice sa 24 bunarića čiji je broj određen nakon 24 sata. Stanice su u komoricama ostavljene da migriraju ili invadiraju tijekom 24 sata, nakon čega je membrana komorice isprana dva puta po 5 minuta uranjanjem u 1 mL PBS Δ u bunarić pločice sa 24 bunarića. Stanice s gornje strane membrane koje nisu migrirale/invadirale se uklanjaju kružnim pokretima pamučnim štapićem za uši prethodno navlaženim u PBS Δ . Stanice preostale na donjoj strani membrane komorice se zatim fiksiraju uranjanjem u 4%-tni PFA tijekom 15 minuta. Nakon dva ispiranja u trajanju od 5 minuta uranjanjem u 1 mL PBS Δ , stanice fiksirane s donje strane membrane komorice se bojaju uranjanjem u 1%-tnu otopinu boje kristal ljubičasto pri sobnoj temperaturi. Nakon 90 minuta bojenja, membrana komorice je pažljivo isprana mlazom vodovodne vode, pazeći pritom da mlaz ne udara direktno na donji dio membrane gdje su stanice. Membrane su izrezane pomoću skalpela u obliku zarez a i uklopljene u medij za uklapanje na predmetno stakalce tako da je strana membrane na kojoj su stanice okrenuta prema gore i analizirane svjetlosnim mikroskopom. Svaka membrana je snimana na najmanje 5 mjesta izbjegavajući pritom rubove. Stanice su izbrojane pomoću programa ImageJ, a računao se prosječni broj stanica koje su migrirale ili invadirale relativno prema kontrolu.

2.2.9. Analiza ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot

Promjene u ekspresiji gena ili fosforilaciji proteina analizirane su denaturirajućom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) i metodom western blot.

Priprema uzoraka proteina za SDS-PAGE i western blot

Stanice u pločici sa 6 bunarića su stavljene na pingvine (engl. *ice pack*) ohlađene pri -20°C i nakon dvostrukog ispiranja hladnim PBS Δ lizirane u hladnom puferu za pripremu lizata stanica kroz 5 minuta. Lizati su pomoću uređaja za razbijanje stanica djelovanjem ultrazvuka izloženi djelovanju ultrazvučnih valova (3 x 5 sekundi s 30% amplitude), nakon čega su centrifugirani 15 minuta pri 14 000 \times g, a supernatant s proteinima je odvojen u nove mikroeprovete. Tako dobivenim lizatima je određena koncentracija proteina pomoću BCA testa izvedenog prema uputama proizvođača. Lizati su čuvani pri -20°C do upotrebe.

Priprema gelova za SDS-PAGE

Sastavi gela za sabijanje (gornji gel) i razdvajanje (donji gel) prikazani su u Tablici 18. Svježe pripremljena smjesa za gel za sabijanje izlivena je u aparaturu za pripremu gelova i natkrivena 96%-tnim etanolom kako bi se spriječila inhibicija polimerizacije pri vrhu zbog doticaja sa zrakom. Nakon pola sata, etanol je uklonjen i na gel za razdvajanje je dodana smjesa za gel za sabijanje u kojeg se prije polimerizacije uronio češalj sa 10 jažica. Pripremani su diskontinuirani gelovi s različitim postotcima gelova za razdvajanje u ovisnosti o potrebi razlučivanja proteina s manjom ili većom molekularnom masom.

Tablica 18. Sastav poliakrilamidnog gela za sabijanje i gelova za razdvajanje.

Početna koncentracija sastojka	Gel za sabijanje		Gel za razdvajanje	
	5%	10%	12%	15%
	Volumen/mL			
H ₂ O	4	4	3,3	2,3
30%-tni akrilamid/ bisakrilamid	3,3	3,3	4	5
pufer za gel	2,5*	2,5**	2,5**	2,5**
10%-tni SDS	0,1	0,1	0,1	0,1
10%-tni APS	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,004	0,004	0,004

*pufer za gel za sabijanje, **pufer za gel za razdvajanje

SDS-PAGE

Proteini liziranih stanica razdvojeni su denaturirajućom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Prethodno pripremljeni gelovi su umetnuti u aparaturu za elektroforezu te je dodan pufer za elektroforezu. Stanični lizati su odmrznuti na ledu i volumen koji odgovara 30 µg proteina je pomiješan s 5 x puferom za nanošenje uzoraka (engl. *sample buffer*, SB) do 1 ×. Zatim su uzorci grijani 3 minute pri 96°C, kratko centrifugirani i nanieseni u jažice gela. Istovremeno je u jednu jažicu gela uvijek nanieseno 3 µL standarda za određivanje molekulske mase proteina. Elektroforeza je provedena pri konstantnom naponu od 100V i zaustavljena prije nego boja bromofenolno plavilo (sastojak SB-a) izađe iz gela, a nakon otprilike 2 sata. Gel izvađen iz aparature je uronjen u pufer za prijenos proteina tijekom 5 minuta prije prijenosa razdvojenih proteina s gela na membranu.

Prijenos proteina na membranu

Proteini su s gela preneseni na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,4 µm mokrim prijenosom u polju struje jakosti 400 mA tijekom 90 minuta. Gel položen na membranu je složen u „sendvič“ između po dva filter papira i spužve i to tako da je bliže negativno nabijenoj anodi u odnosu na membranu koja je bliže pozitivnoj nabijenoj katodi. Tako složena konstrukcija je umetnuta u aparaturu za prijenos proteina. Kako bi se provjerila uspješnost prijenosa proteina, membrana je bojana

otopinom boje amido crno tijekom 1 minute na zibalici, nakon čega je odbojavana u otopini za odbojavanje, uzastopnim izmjenama svježe otopine za odbojavanje (obično 3 puta, ali po potrebi i više), i snimljena pomoću skenera. Membrana je nakon toga isprana u TBST puferu tijekom 5 minuta i blokirana u 5%-tnom mlijeku u TBST-u sat vremena na zibalici pri sobnoj temperaturi.

Imunodetekcija proteina

Blokirana membrana je inkubirana s odgovarajućim primarnim protutijelima razrijeđenim u 5%-tnom mlijeku u TBST-u preko noći na 4°C, a sutradan je nakon 5 ispiranja po 5 minuta u TBST inkubirana odgovarajućim sekundarnim protutijelom obilježenim enzimom peroksidaza tijekom 2 sata na zibalici pri sobnoj temperaturi. Vezanje sekundarnog protutijela vizualizirano je uz pomoć kemiluminiscentnog reagensa prema uputama proizvođača i uređaja Uvitec ili Ibright ili izlaganjem membrane fotografskom filmu u tamnoj komori. Signali na skeniranim filmovima ili fotografijama su analizirani i pomoću računalnog programa ImageJ denzitometrirani. Iako je na membrane nanošena jednaka količina proteina, ekspresija fosforiliranog oblika proteina je procijenjena s obzirom na ekspresiju ukupne forme ili signala amido crno.

Na istoj membrani moguće je napraviti imunodetekciju više različitih proteina. Kako bi se uklonila vezana protutijela, membrana je inkubirana u puferu za uklanjanje vezanih protutijela tijekom 40 minuta na zibalici pri sobnoj temperaturi, i nakon kratkog ispiranja u TBST, blokirana u 10%-tnom mlijeku u TBST-u nakon čega je ponovno inkubirana s primarnim i zatim sekundarnim protutijelom po postupku opisanom gore.

2.2.10. Analiza fokalnih adhezija imunofluorescencijskom mikroskopijom i mikroskopijom refleksijskog interferencijskog kontrasta

Za vizualizaciju fokalnih adhezija, fosforiliranog proteina paksilina (pPAX) karakterističnog za fokalne adhezije i staničnog kostura (tubulin i aktin) korištena je kombinacija imunofluorescencijske mikroskopije i mikroskopije refleksijskog interferencijskog kontrasta (engl. *reflection interference contrast microscopy*, RICM) (Holt i ostali, 2008.; Weber, 2003.).

Stanice su nasađene na prethodno alkoholom (96%) i UV zračenjem (15 minuta) sterilizirano pokrovno stakalce u 500 μ L DMEM-FCS u bunarić pločice za uzgoj stanica s 24 bunarića. Odvojeno su bojane stanice za analizu RICM i vizualizaciju tubulina koje su fiksirane hladnim metanolom, a stanice za vizualizaciju pPAX i aktinske mreže fiksirane 2%-tnim PFA.

Vizualizacija tubulina imunofluorescencijskom mikroskopijom i analiza fokalnih adhezija mikroskopijom refleksijskog interferencijskog kontrasta

Nakon jednog dana rasta, stanice na stakalcima su isprane dva puta s PBS Δ , a potom fiksirane hladnim metanolom (-20°C) 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon dva ispiranja s PBS, stanice su blokirane s BSA 3%, tijekom 30 minuta. Zatim su inkubirane s primarnim protutijelom usmjerenim na tubulin tijekom 60 minuta. Nakon dva ispiranja s PBS, inkubirane su sa sekundarnim protutijelom odgovarajuće specifičnosti tijekom 60 minuta u mraku. Stanice su zatim isprane dva puta s PBS, uklopljene u medij za uklapanje stakalaca s dodatkom DAPI Fluoromount-G boje (za bojenje jezgre) i analizirane na konfokalnom mikroskopu LeicaTSC SP2. Snimljeno je minimalno 10 stanica i prikazana je reprezentativna fotografija.

Vizualizacija aktina i pPAX imunofluorescencijom

Nakon jednog dana rasta, stanice na stakalcima su isprane dva puta u PBS, nakon čega su fiksirane 2%-tnim PFA tijekom 12 minuta. Nakon dva ispiranja s PBS Δ i permeabilizacije s 0,1% Triton X-100-PBS Δ tijekom 2 minute, stanice su ponovno isprane dva puta s PBS. Nakon blokiranja s BSA 3%, 30 minuta stanice su inkubirane

s primarnim protutijelom na pPAX tijekom 60 minuta, isprane dva puta s PBS i zatim inkubirane sa sekundarnim protutijelom 60 minuta u mraku. Kako bi se obojao aktin, stanice su dodatno inkubirane s otopinom fluorescentno obilježenog faloidina. Nakon završnog ispiranja u PBS, stanice su uklopljene u medij medij za uklapanje stakalaca s dodatkom DAPI Fluoromount-G boje (za bojenje jezgre) i analizirane pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TSC SP2.

2.2.11. Analiza sastava kompleksa adhezije integrina (adhesoma) masenom spektrometrijom

Izdvajanje kompleksa adhezije integrina

Za izdvajanje kompleksa adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complexes*, IAC) korištena je metoda objavljena u Jones i ostali (2015.). Stanice su nasadene u Petrijeve zdjelice u broju od 1×10^6 kako bi nakon tri dana, na dan izdvajanja IAC-a, zdjelica bila 90% popunjena. IAC-i svake eksperimentalne skupine su skupljeni iz od četiri do šest Petrijevih zdjelica. U svakoj eksperimentalnoj skupini je dodatno nasaden isti broj stanica u jednu Petrijevu zdjelicu kako bi se na dan pokusa one mogle izbrojati i prema tome prilagoditi broj Petrijevih zdjelica s ciljem analize - iz istog broja stanica po eksperimentalnoj skupini. Za svaku je skupinu sakupljen i stanični lizat u puferu RIPA prema opisu iz jedne dodatne Petrijeve zdjelice.

Stanice su dva puta isprane s 5 mL DMEM-HEPES i zatim umrežene s 5 mL 6 mM DTBP tijekom 15 minuta pri 37°C . Umrežavanje je zaustavljeno dodavanjem $150 \mu\text{L}$ 1 M TrisHCl pH 8, tijekom 2 minute pri sobnoj temperaturi. Nakon dva ispiranja stanica hladnim PBS-om, stanice su lizirane dodatkom 5 mL modificiranog RIPA pufera $1 \times$ kroz 2-3 minute pri sobnoj temperaturi. Ostatci stanica u Petrijevim zdjelicama su isprani jednoličnim jakim mlazom vodovodne vode, direktno iz slavine; u horizontalnom i vertikalnom smjeru i zatim spiralno izvana prema unutra i iznutra prema van. Petrijeve zdjelice su zatim isprane hladnim PBS i ocijeđene na pingvinima ohlađenim na -20°C . Uzorak IAC-a svake od eksperimentalnih skupina skupljen je u $400 \mu\text{L}$ ARS na način da je u prvu Petrijevu zdjelicu skupine dodano $200 \mu\text{L}$ ARS nakon čega su proteini sastrugani strugačem za stanice. ARS iz prve Petrijeve zdjelice

sa skupljenim proteinima je prenesen mikropipetom u iduću Petrijevu zdjelicu itd. do zadnje kada je uzorak IAC-a prebačen u mikroepruvetu i čuvan na ledu. Preostalih 200 µL ARS je zatim nanešeno na zadnje struganu Petrijevu zdjelicu i postupak je ponovljen do prve, kada je skupljen u istu mikroepruvetu. Na uzorak IAC-a je, kako bi se istaložili proteini, dodan aceton ohlađen na -20°C u četiri puta većem volumenu i zatim spremljen pri -80°C do analize.

Utvrđivanje optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om za izdvajanje proteina kompleksa adhezije integrina

Kako bi se utvrdilo optimalno vrijeme umrežavanja DTBP-om, prije izdvajanja proteina IAC-a za analizu spektrometrijom masa, uzorci su skupljeni na način opisan u prethodnom poglavlju nakon različitih vremena umrežavanja, i analizirani metodama SDS-PAGE i western blot. Proteini u acetonu su centrifugirani pri 14 000 × g, nakon čega je pažljivo uklonjen supernatant, a talog dodatno osušen na zraku u digestoru. Proteini su zatim otopljeni u 40 µL 2x pufera za nanošenje uzorka za SDS-PAGE i razdvojeni u komercijalnom gradijentnom poliakrilamidnom gelu 4 - 15%-tnom (BioRad, SAD). Na temelju najboljeg omjera ekspresije specifičnih i nespecifičnih proteina za FA utvrđeno je pogodno vrijeme umrežavanja DTBP-om.

Identifikacija proteina kompleksa adhezije integrina spektrometrijom masa

Proteinski sastav IAC-a je analiziran metodom masene spektrometrije u laboratoriju prof. dr. sc. Martina J. Humphriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, Sveučilište u Manchesteru, Ujedinjeno Kraljevstvo) na uređaju Orbitrap Elite (Jones i ostali, 2015.). Postupak pripreme uzoraka opisan je detaljno u Prilogu 9.1.

Analiza identificiranih proteina kompleksa adhezije integrina (adhesoma)

Ukupan broj proteina IAC-a identificiran masene spektrometrije s minimalnim brojem spektara 1 je prikazan tablično uz pomoć programa Scaffold. Kako bismo provjerili da su ukupni izolirani proteini zaista proteini IAC-a, korišten je javno dostupan DAVID (engl. *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) Gene Functional Classification alat kojim su proteini provučeni kroz

GO_TERM_CC (engl. *gene ontology, cellular component*) direkt bazu (Huang i ostali, 2009b., 2009a.; Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics, 2018.) kako bi se odredilo kojim biološkim funkcionalnim skupinama, odnosno dijelovima stanice pripadaju identificirani proteini.

Kako bi se utvrdili proteini IAC-a čija se količina promjenila nakon utišavanja integrinske podjedinice α_v , ukupni proteini identificirani s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom uzorku su analizirani u javno dostupnom programu QSpec/QProt (Choi i ostali, 2015.). Programom su izračunate vrijednosti pogrešnih pogodaka (engl. *false discovery rate*, FDR) i relativne promjene (engl. *fold change*) na temelju kojih se određivala značajnost promjene: vrijednosti pogrešnih pogodaka manje od 0,05 (tj. negativni logaritam FDR veći od 1,3), a relativne promjene veće od 1,5 puta (tj. \ln (fold change) veći ili manji od 0,405).

Interakcije između proteina od interesa (predviđeni interaktom) su prikazane javno dostupnim programom STRING (Szklarczyk i ostali, 2017.) .

2.2.12. Statistička obrada podataka

Svaki eksperiment je ponavljen barem tri puta. Značajnost rezultata je utvrđena odgovarajućim statističkim testovima uz program GraphPad Prism. Na slikama rezultata oznakom zvjezdica („*“) je naveden statistički značaj, a značaj broja zvjezdica je opisan u Tablici 19. U opisu svake slike rezultata naveden je korišteni statistički test i broj ponavljanja pokusa.

Tablica 19. Značaj broja zvjezdica na prikazima rezultata.

Oznaka	P-vrijednost manja od
*	0,05
**	0,01
***	0,001
****	0,0001

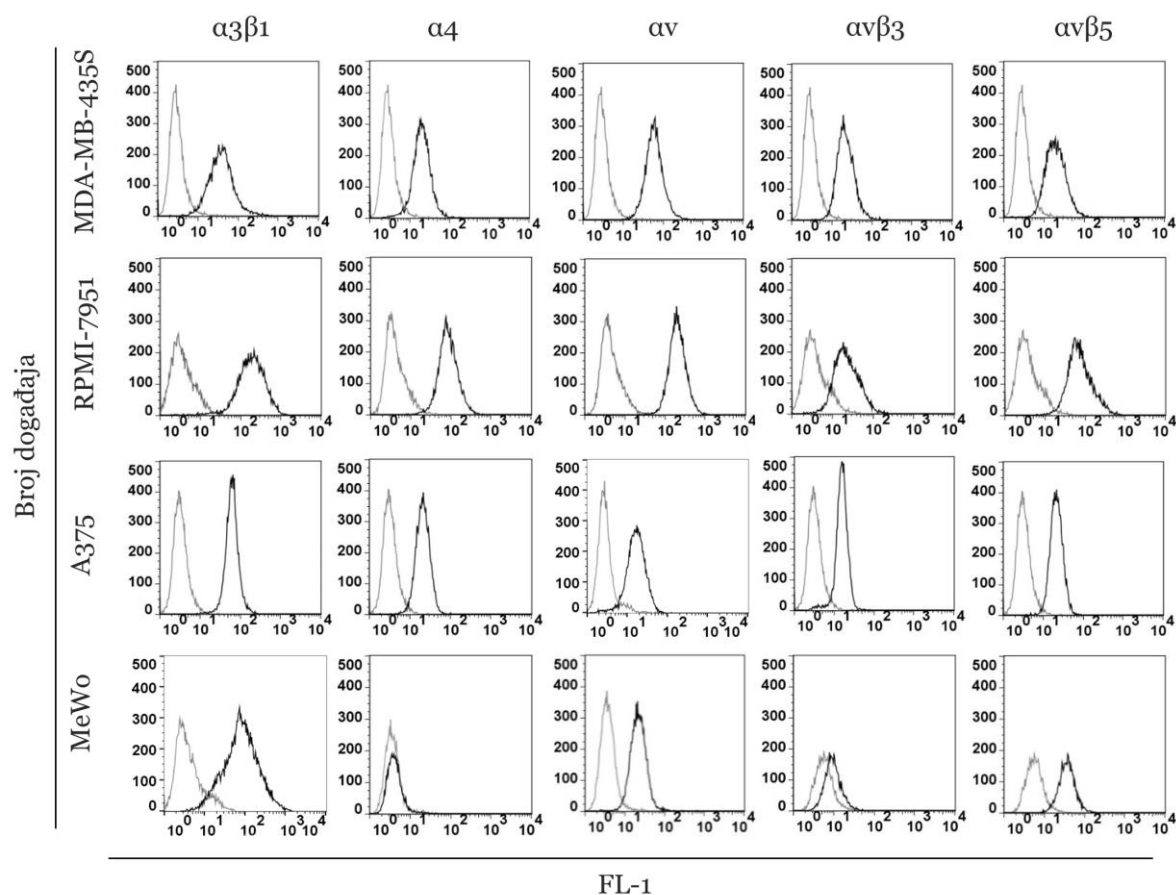
3. REZULTATI

3.1. Ekspresija integrina u stanicama melanoma čovjeka

Kako bismo istražili utjecaj utišavanja ekspresije podjedinica integrina α_3 , α_4 i α_v u stanicama melanoma na osjetljivost na protutumorske lijekove i pokretljivost, ekspresija integrinskih podjedinica α_v i α_4 i heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ i $\alpha_3\beta_1$ je analizirana u četiri stanične linije melanoma čovjeka: RPMI-7951, MeWo, A375 i MDA-MB-435S. Stanična linija MDA-MB-435S je godinama korištena kao stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke, ali nedavni podatci jasno pokazuju da ove stanice potječu od melanoma (Korch i ostali, 2018.). Ekspresija integrina na površini živih stanica je određena metodom protočne citometrije uz specifična primarna protutijela za integrinske podjedinice ili heterodimere i odgovarajućim fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelom (Slika 6).

Podjedinica integrina α_3 veže se samo s β_1 (Raab-Westphal i ostali, 2017.), te se stoga ekspresija $\alpha_3\beta_1$ može mjeriti i na temelju ekspresije samo α_3 . Međutim, za mjerenje ekspresije integrina $\alpha_3\beta_1$ koristili smo protutijelo za heterodimer te pokazali da je integrin $\alpha_3\beta_1$ visoko eksprimiran u svim stanicama. Podjedinica α_4 tvori heterodimer s β_1 ili β_7 , s tim da su integrini β_7 eksprimirani isključivo na leukocitima (Kuphal i ostali, 2005.; Raab-Westphal i ostali, 2017.). Stoga mjerenjem ekspresije integrinske podjedinice α_4 u stvari mjerimo heterodimer integrina $\alpha_4\beta_1$. Integrin α_4 visoko je eksprimiran u MDA-MB-435S, RPMI-7951 i A375, dok je odsutan u MeWo. Integrinska podjedinica α_v može tvoriti heterodimere s podjedinicama β_1 , β_3 , β_5 , β_6 i β_8 (Raab-Westphal i ostali, 2017.). Od integrina α_v koji su eksprimirani u svim stanicama melanoma, posebno nas je zanimala ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ za koje je pokazana važna uloga u biologiji melanoma (Huang i Rofstad, 2018.), a kako su integrini $\alpha_v\beta_6$ i $\alpha_v\beta_8$ nisko eksprimirani ili odsutni na stanicama melanoma (Goodman i ostali, 2012.), a protutijelo za integrin $\alpha_v\beta_1$ ne postoji, te integrinske heterodimere dalje nismo istraživali. Analiza protočnom citometrijom pokazala je da je integrin $\alpha_v\beta_3$ visoko eksprimiran u stanicama MDA-MB-435S i A375, umjereno u stanicama RPMI-7951, a ekspresija je vrlo niska u stanicama MeWo. Integrin $\alpha_v\beta_5$ je

visoko eksprimiran u svim staničnim linijama. Ekspresija integrina je sažeto prikazana u Tablici 20.



Slika 6. Površinska ekspresija integrina $\alpha3\beta1$, podjedinica $\alpha4$ i αv te heterodimera integrina $\alpha v\beta3$ i $\alpha v\beta5$ u stanicama melanoma čovjeka MDA-MB-435S, RPMI-7951, A375 i MeWo. Stanice su odvojene od podloge pomoću EDTA i analizirane protočnom citometrijom uz primarna protutijela usmjerena na integrinske podjedinice αv , $\alpha4$, ili integrine $\alpha3\beta1$, $\alpha v\beta3$ i $\alpha v\beta5$ (crni histogram) i izotipsku kontrolu (sivi histogram) i odgovarajuće sekundarno protutijelo obilježeno FITC-om. Pokazan je jedan pokus od minimalno tri koji su pokazali slične rezultate. FITC, fluorescein izotiocijanat.

Tablica 20. Ekspresija integrina u stanicama MDAMB-435S, RPMI-7951, A375 i MeWo. Podatci su temeljeni na rezultatima mjerenja fluorescencije protočnom citometrijom uz integrin-specifična primarna i zatim FITC-om obilježena sekundarna protutijela (Slika 6). FITC, fluorescein izotiocijanat.

Integrinska podjedinica	MDAMB-435S	RPMI-7951	A375	MeWo
$\alpha 3$	+++	+++	+++	+++
$\alpha 4$	++	+++	++	-
αv	+++	++	++	++
$\alpha v \beta 3$	++	+	++	-
$\alpha v \beta 5$	++	+++	++	++

Razina ekspresije procjenjena je prema srednjoj geometrijskoj vrijednosti fluorescencije (engl. *geomean*) normaliziranoj na fluorescenciju izotipske kontrole (gdje je 1 fluorescencija izotipske kontrole, 2 dvostruka, itd.). -, GeoMean < 2; +, GeoMean 2-4; ++, GeoMean 4-9; +++, GeoMean > 10. (modificirano prema (Goodman i ostali, 2012.).

3.2. Povoljan učinak utišavanja gena za integrinske podjedinice $\alpha 4$, αv ili $\beta 5$ na odgovor stanica na paklitaksel i vinkristin u stanicama MDA-MB-435S

Istraživanje je započeto sa stanicama MDA-MB-435S jer je prethodno pokazano da utišavanje integrinske podjedinice αv u ovoj staničnoj liniji povećava osjetljivost stanica na zračenje (Cao i ostali, 2006.). Drugi razlog za korištenje ove stanične linije je bio taj, da su rezultati diplomskih radova laboratorija u kojem je izrađena i ova doktorska disertacija, na temelju testa MTT, pokazali da utišavanje integrina modulira odgovor ovih stanica na protutumorske lijekove. Naime, utišavanje podjedinice αv , $\alpha 4$ ili $\beta 5$ je povećalo osjetljivost stanica MDA-MB-435S na paklitaksel ili vinkristin, dok utišavanje $\beta 3$ ili $\alpha 3$ nije imalo utjecaj na preživljenje stanica. Utišavanje $\beta 3$, $\beta 5$, αv ili $\alpha 4$ je pak povećavalo osjetljivost, a podjedinica $\alpha 4$ nije imala utjecaj na preživljenje stanica MDA-MB-435S izloženih cisplatinu (Dekanić, 2012.; Ferenčak, 2013.)¹. Međutim, rezultati testa MTT su analizirani jednostavnim t-testom koji nije u potpunosti primjeren za analizu međudjelovanja dviju varijabli (utišavanje integrinske podjedinice i protutumorski lijek). Tako da su u sklopu ovog doktorskog rada prvo ponovno analizirani rezultati preživljenja stanica MDA-MB-435S s utišanim integrinskim podjedinicama $\alpha 3$, $\alpha 4$, αv , $\beta 3$ ili $\beta 5$ nakon djelovanja sva tri

¹ Diplomski radovi izrađeni pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice.

protutumorska lijeka. Korištena je statistička metoda dvostruke ANOVA-e s Bonferroni posttestom koja uzima u obzir kako djelovanje pojedinačnih varijabli na ukupni učinak, tako i njihovo međudjelovanje. Rezultati analizirani na ovaj način, statističkim testom dvostruke ANOVA-e, pokazali su razlike u utjecaju utišavanja integrinskih podjedinica na sva tri lijeka. Ukupno, nova analiza je pokazala povoljan učinak utišavanja gena za integrinske podjedinice α_4 , α_v ili β_5 na odgovor stanica na paklitaksel i vinkristin u stanicama MDA-MB-435S, dok je utišavanje podjedinica α_3 i β_3 smanjilo osjetljivost stanica na paklitaksel i vinkristin. Rezultati pokazuju kako na djelovanje cisplatine povoljan aditivni učinak ima jedino utišavanje integrinske podjedinice α_4 (Stojanović i ostali, 2018.). Sažetak djelovanja kombinacija utišavanja različitih integrinskih podjedinica i tri protutumorska lijeka je prikazan u Tablici 21.

Zaključujemo da utišavanje integrinske podjedinice α_v , β_5 ili α_4 djeluje povoljno na povećanje osjetljivosti stanica MDA-MB-435S na vinkristin i paklitaksel, dok kod kombinacije s cisplatinom utišavanje jedino integrinske podjedinice α_4 ima povoljan učinak (Tablica 21).

Tablica 21. Utjecaj utišavanja integrinskih podjedinica α_3 , α_4 , α_v , β_3 ili β_5 na osjetljivost stanica MDA-MB-435S na djelovanje cisplatine, paklitaksela i vinkristina. Tablica predstavlja rezultat statističke obrade rezultata MTT-testa (Dekanić, 2012.; Ferenčak, 2013.; Stojanović i ostali, 2018.), dvostrukom ANOVA-om s Bonferroni post-testom. Ukoliko je utišavanje povećalo osjetljivost, učinak je označen sa S (engl. *sensitivity*), ukoliko je smanjilo označeno je kao R (engl. *resistance*), a ako nije bilo utjecaja označeno je kao NI (engl. *no interaction*). NI se smatra također povoljnim učinkom na djelovanje lijeka ukoliko je preživljenje stanica s utišanom ekspresijom integrina manje u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA. R, smanjenje osjetljivosti; NI, nema međudjelovanja; S, povećanje osjetljivosti.

MDA-MB-435S	Protutumorski lijek		
Podjedinica integrina	Cisplatina	Paklitaksel	Vinkristin
α_3	R	R	R
α_4	NI	S	S
α_v	R	S	S
β_3	R	R	R
β_5	R	S	NI

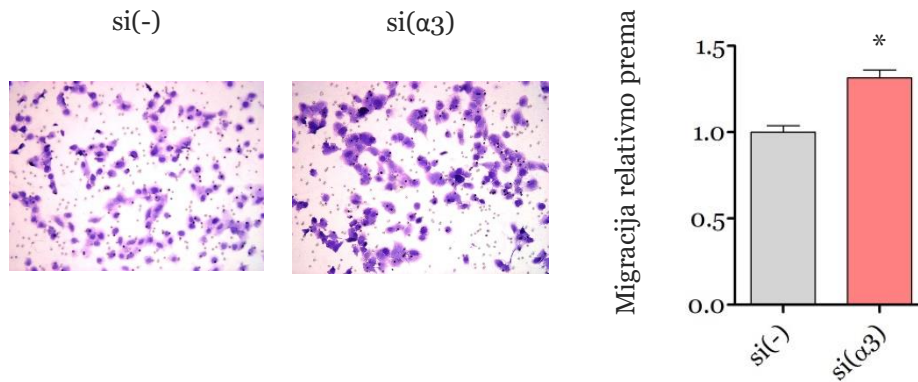
3.3. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice $\alpha 3$ povećava *in vitro* migraciju, a utišavanje αv smanjuje *in vitro* invaziju stanica MDA-MB-435S

Integrini su glavne molekule kojima se stanica pričvršćuje za podlogu i koje sudjeluju u procesima migracije i invazije stanica pa prema tome i u metastaziranju tumora (Seguin i ostali, 2015.). U modelu stanica MDA-MB-435S je pokazano da utišavanje integrinskih podjedinica αv snažno smanjuje, dok utišavanje $\alpha 4$ povećava *in vitro* migraciju u komoricama (engl. *transwell inserts*) kroz membranu s rupama veličine 8 μm prema FBS-u kao kemoatraktantu. Utišavanje bilo koje od integrinskih podjedinica, $\beta 3$ ili $\beta 5$, nije imalo utjecaj na migraciju stanica MDA-MB-435S zbog fenomena integrinskog preslagivanja, tj. učinka vage koji je uočen između $\beta 3$ i $\beta 5$ podjedinice u $\alpha v\beta 1$ -negativnim stanicama MDA-MB-435S (Stojanović i ostali, 2018.).

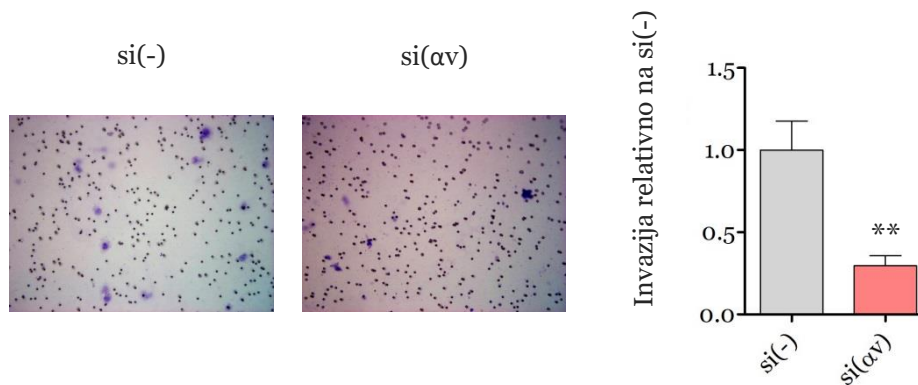
Kako smo htjeli imati podatke o utjecaju sve tri α podjedinice od interesa ($\alpha 3$, $\alpha 4$ i αv) na pokretljivost stanica, istražili smo sposobnost migracije stanica MDA-MB-435S nakon transfekcije kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za integrinske podjedinice $\alpha 3$, kroz membranu s rupama veličine 8 μm prema FBS-u kao kemoatraktantu. Uz pokus je provjerena uspješnost utišavanja protočnom citometrijom (rezultati nisu prikazani). Migracija MDA-MB-435S transficiranih kontrolnom siRNA nalik je roditeljskim stanicama (rezultati nisu prikazani). Migracija stanica MDA-MB-435S transficiranih siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu $\alpha 3$ je povećana u odnosu na kontrolne stanice (Slika 7 A).

Dalje smo istražili sposobnost *in vitro* invazije stanica MDA-MB-435S nakon transfekcije kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu αv *in vitro* u komoricama za invaziju, kroz membranu sa slojem Corning Matrigel Matrixa koji oponaša bazalnu membranu s rupama veličine 8 μm prema FBS-u kao kemoatraktantu. Uz svaki pokus provjerena je uspješnost utišavanja protočnom citometrijom (podatci nisu prikazani). Rezultati su pokazali da utišavanje integrina αv jako smanjuje invaziju stanica MDA-MB-435S (Slika 7 B).

A) Migracija MDA-MB-435S



B) Invazija MDA-MB-435S



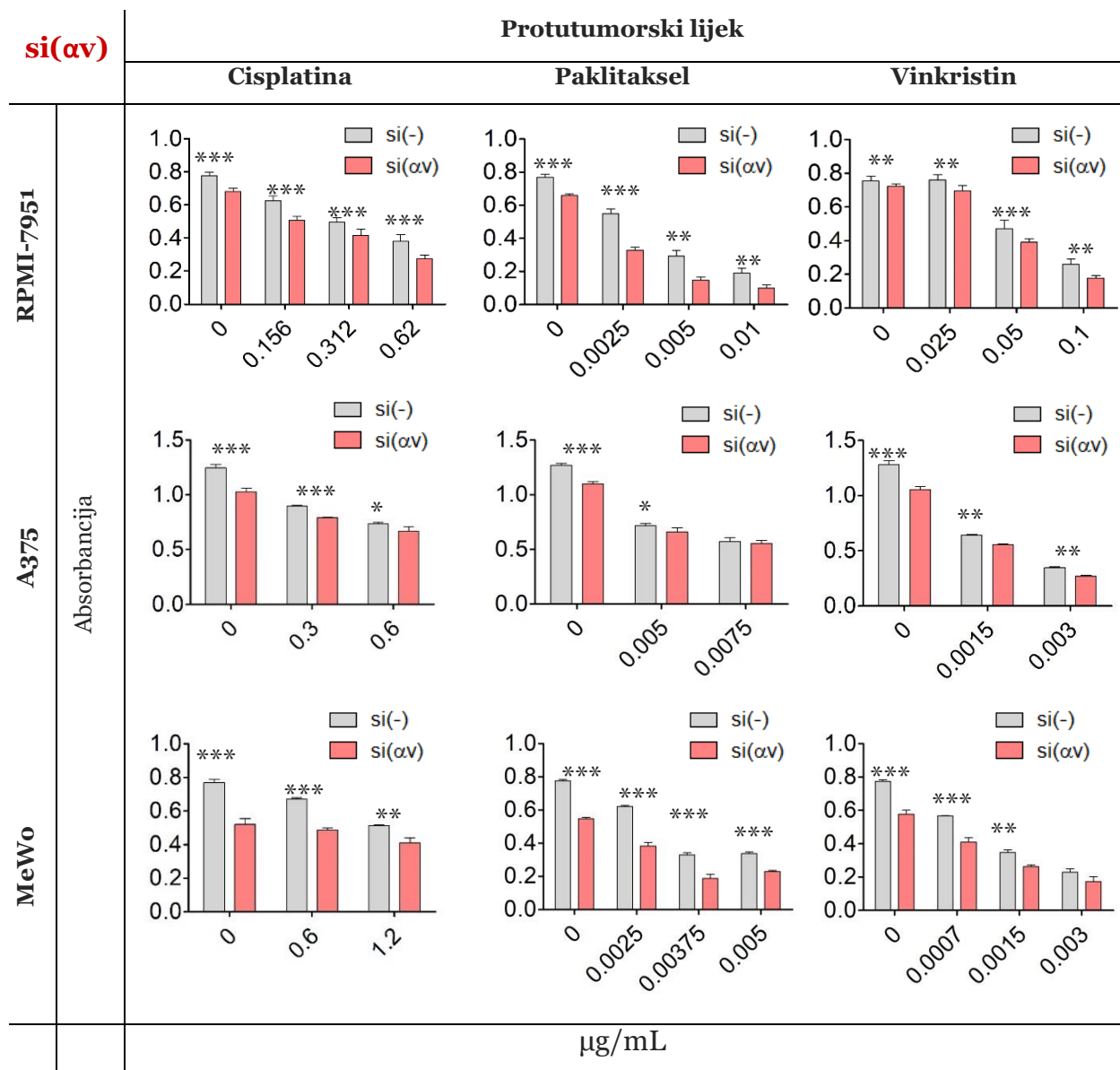
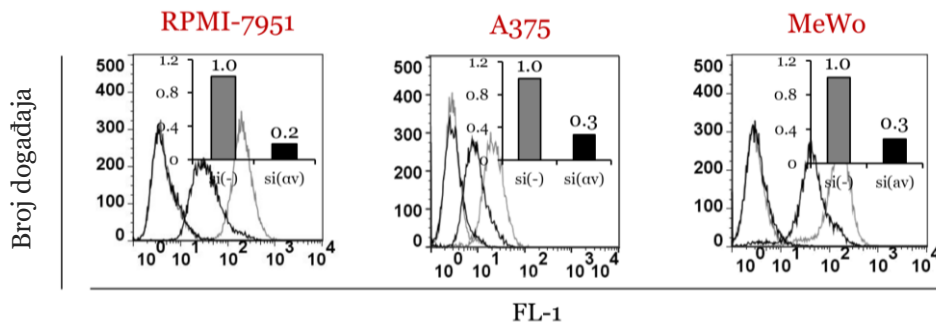
Slika 7. Utišavanje integrinske podjedinice α_3 povećava migraciju, a utišavanje α_v smanjuje invaziju u stanicama MDA-MB-435S. Stanicama je dan nakon transfekcije kontrolnom si(-) ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu α_v (si(α_v)) ili α_3 (si(α_3)) zamijenjena hranjiva podloga DMEM-FCS s podlogom bez seruma tijekom 24 sata. Stanice su odvojene od površine i nanese u migracijsku ili invazijsku komoricu koja je uronjena u DMEM-FCS. Nakon 22 sata stanice koje nisu prošle kroz rupe u membrani su uklonjene, a membrana je isprana, fiksirana i obojana bojom kristal ljubičasto. Membrana je izrezana i uklopljena u podlogu za uklapanje i analizirana pod svjetlosnim mikroskopom. Snimljeno je minimalno 5 različitih polja, reprezentativne fotografije su prikazane pod A), a kvantifikacija pod B). Grafovi prikazuju prosječan broj stanica koje su prošle kroz rupe na membrani nakon utišavanja integrina α_v relativno na kontrolne stanice si(-). Podatci su analizirani neparametrijskim t-testom Mann-Whitney. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: **, $P < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.4. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice αv ima različit učinak na osjetljivost stanica melanoma RPMI-7951, A375 i MeWo na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin

Kako je pokazano da utišavanje integrinske podjedinice αv povećava osjetljivost MDA-MB-435S na paklitaksel ili vinkristin, a u isto vrijeme smanjuje pokretljivost, odlučili smo usmjeriti istraživanje na integrinsku podjedinicu αv i njene partnere $\beta 3$ i $\beta 5$ u odgovoru tri dodatne stanične linije melanoma čovjeka RPMI-7951, A375 i MeWo, na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin.

Uz svaki test MTT provjerena je uspješnost utišavanja protočnom citometrijom (podatci nisu prikazani). Mjerenje površinske ekspresije integrinske podjedinice αv nakon transfekcije specifičnom siRNA pokazuje uspješnost utišavanja integrina αv (Slika 8 A). Stanice transficirane integrin αv -specifičnom ili kontrolnom siRNA su izložene djelovanju protutumorskih lijekova, a preživljenje je mjereno testom MTT (Slika 8 B). Kontrolna siRNA (si(-)) je imala minimalni učinak na preživljenje stanica (podatci nisu prikazani). Rezultati su obrađeni statističkim testom ANOVA, a u Tablici 22 sažet je utjecaj utišavanja integrinske podjedinice αv na djelovanje lijekova, gdje povećanje osjetljivosti tj. sinergistički učinak označava S, učinak bez međudjelovanja tj. aditivni učinak označava NI, a smanjenje osjetljivosti tj. antagonistički učinak označava R. Povoljnim utjecajem utišavanja na djelovanje protutumorskog lijeka smatra se sinergistički (S) i aditivni učinak (NI) i to samo onda ukoliko je ukupno preživljenje stanica nakon utišavanja αv integrina i izlaganja protutumorskom lijeku manje u odnosu na kontrolne stanice. Slično kao i u stanicama MDA-MB-435S, smanjenje ekspresije podjedinice integrina αv povećava osjetljivost stanica RPMI-7951 na paklitaksel, dok je na djelovanje vinkristina i cisplatine vidljiv povoljan aditivni učinak (Slika 8 B, gornji red). Utišavanje integrina αv smanjuje osjetljivost stanica A375 i MeWo na sva tri protutumorska lijeka (Slika 8 B, donja dva reda).

A)



Slika 8. Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice αv na ekspresiju integrina αv i na osjetljivost stanica RPMI-7951, A375 i MeWo na djelovanje cisplatine, paklitaksela ili vinkristina. A) Ekspresija integrina αv nakon utišavanja integrinske podjedinice αv . Stanice su odvojene od podloge s EDTA i analizirane protočnom citometrijom uz primarna protutijela usmjerena na integrinske podjedinice αv (crni histogram) i izotipsku kontrolu (sivi histogram), i odgovarajuće sekundarno protutijelo obilježeno FITC-om. Pokazan je jedan pokus od minimalno tri koja su pokazala slične rezultate. Geometrijska srednja vrijednost fluorescencije od koje je oduzeta fluorescencija izotipske kontrole za svaki histogram je prikazana na grafu u gornjem desnom kutu, relativno na kontrolu. **B) Preživljenje stanica tri dana nakon izlaganja cisplatinu, paklitakselu ili vinkristinu.** Stanice su dan nakon transfekcije integrin αv -specifičnom siRNA i kontrolnom siRNA nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. 24 sata nakon nasađivanja izložene su djelovanju različitih koncentracija protutumorskih lijekova. Nakon tri dana, preživljenje stanica je mjereno testom MTT, a na grafovima su prikazane vrijednosti apsorbancije umanjene za apsorbanciju slijepe probe. Sivi stupići predstavljaju stanice transficirane kontrolnom siRNA (si(-)), a stupići u boji stanice transficirane integrin αv -specifičnom siRNA (si(αv)). Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama jednog, od najmanje tri pokusa sa sličnim rezultatima. Podatci su analizirani dvosmjernom ANOVA-om s Bonferroni post-testom. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Tablica 22. Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice αv na osjetljivost stanica RPMI-7951, A375 i MeWo na djelovanje cisplatine, paklitaksela i vinkristina. Tablica predstavlja rezultat statističke obrade rezultata testa MTT prikazanih na Slici 8 s testom dvostruke ANOVA-e. R, smanjenje osjetljivosti; NI, nema međudjelovanja; S, povećanje osjetljivosti.

si(αv)	Protutumorski lijek		
	Cisplatina	Paklitaksel	Vinkristin
RPMI-7951	NI	S	NI
A375	R	R	R
MeWo	R	R	R

3.5. Uključenost integrina $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ u odgovor stanica RPMI-7951 i MeWo na protutumorske lijekove

Kako bismo analizirali uključenost integrina $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ u uočenoj modulaciji osjetljivosti stanica RPMI-7951 (povećanje osjetljivosti tj. sinergistički i aditivni učinak) i MeWo (smanjenje osjetljivosti tj. antagonistički učinak) na protutumorske lijekove, mjereno je preživljenje stanica transficiranih s $\beta3$ i $\beta5$ -specifičnim siRNA nakon izlaganja djelovanju protutumorskih lijekova pomoću testa MTT u odnosu na stanice transficirane kontrolnom nespecifičnom siRNA. Rezultati za stanice RPMI-7951 i MeWo su prikazani u posebnim poglavljima.

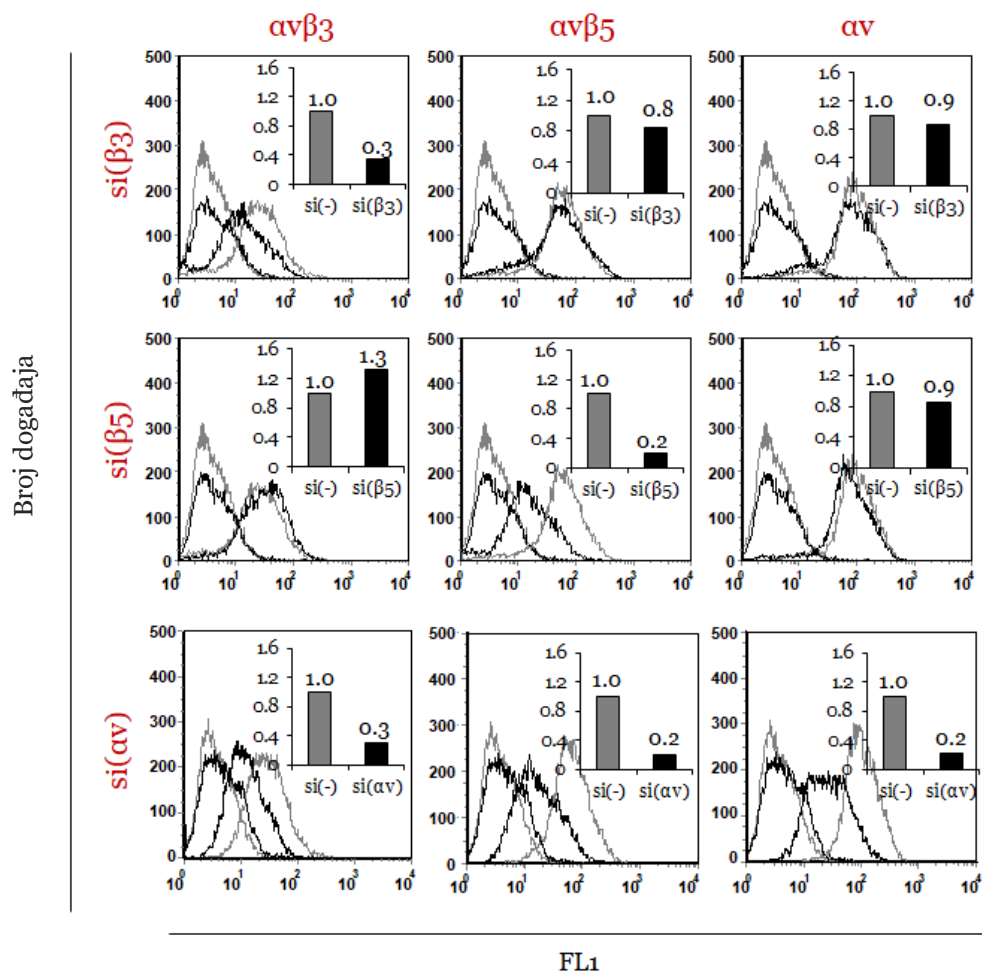
3.5.1. Utišavanje integrinske podjedinice $\beta3$ ili $\beta5$ u stanicama RPMI-7951 povećava osjetljivost stanica na paklitaksel i vinkristin

Kako bismo analizirali uključenost integrina $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ u uočenoj modulaciji osjetljivosti stanica RPMI-7951 prvo smo željeli potvrditi uspješnost utišavanja, ali isto tako provjeriti moguću pojavu preslagivanja integrina nakon utišavanja podjedinica $\beta3$ ili $\beta5$. Zato je stanicama RPMI-7951, dva dana nakon transfekcije siRNA specifičnih za integrinske podjedinice $\beta3$ ili $\beta5$, mjerena površinska ekspresija integrina α , $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ protočnom citometrijom (Slika 9 A). Rezultati pokazuju uspješno smanjenje ekspresije integrina $\alpha\beta3$ na 34% nakon transfekcije $\beta3$ -specifičnom siRNA i smanjenje ekspresije $\alpha\beta5$ na 19% nakon transfekcije $\beta5$ -specifičnom siRNA. Utišavanje $\beta3$ integrinske podjedinice malo smanjuje ekspresiju integrina $\alpha\beta5$ (na 84%) i ukupne podjedinice α (na 89%), dok utišavanje integrinske podjedinice $\beta5$ povećava ekspresiju $\alpha\beta3$ na 132%, a ekspresiju ukupne podjedinice α malo smanjuje na 85% u odnosu na ekspresiju izmjerenu u stanicama transficiranim s kontrolnom siRNA (Slika 9 A). Moguće je da u efektu preslagivanja u stanicama RPMI-7951 sudjeluje i integrin $\alpha\beta1$ što međusobne odnose integrina α u ovim stanicama čini još složenijima.

Stanice RPMI-7951 su nakon utišavanja integrinske podjedinice $\beta3$ ili $\beta5$ izložene djelovanju paklitaksela i vinkristina te je mjereno preživljenje testom MTT (Slika 9 B). Međudjelovanje utišavanja integrina i protutumorskog lijeka određeno je

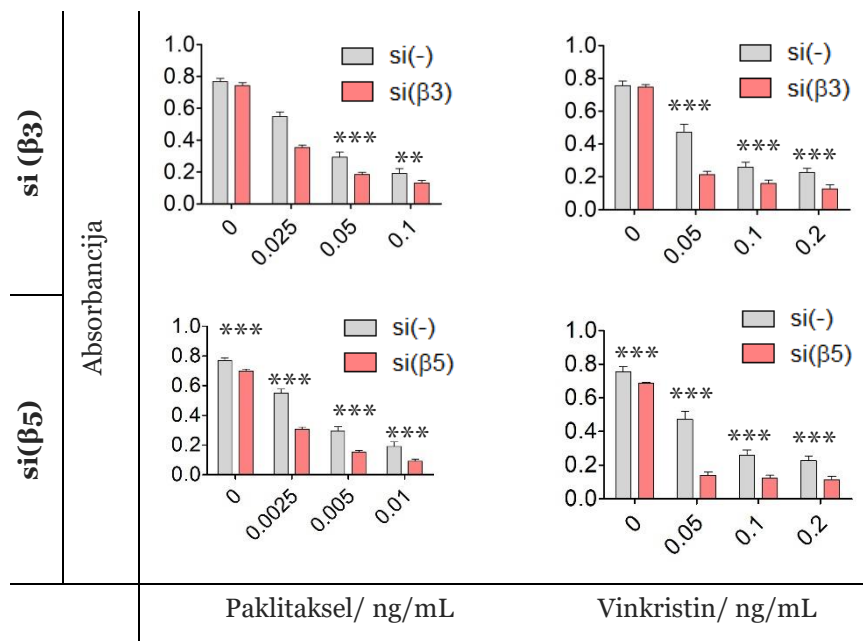
dvostrukom ANOVA-om i sažeto prikazano u Tablici 23. Kao što je već prethodno opisano, povoljan utjecaj utišavanja u kombinaciji s protutumorskim lijekom smatra se opažanje sinergističkog (S) ili povoljnog aditivnog učinka (NI). Utišavanje integrinske podjedinice β_3 ili β_5 dovodi do povećane osjetljivosti na vinkristin ili paklitaksel što je u skladu s pozitivnim učinkom utišavanja integrinske podjedinice α_v na oba lijeka. Kako utišavanje β_3 djeluje na smanjenje ekspresije i β_5 i α_v podjedinice, a utišavanje β_5 na povećanje integrinske podjedinice β_3 , moguće je pretpostaviti da je integrin odgovoran za učinak povećanja osjetljivosti upravo $\alpha_v\beta_5$. Međutim, ne možemo isključiti da na povećanje osjetljivosti djeluje i utišavanje integrina $\alpha_v\beta_3$.

A)



B)

RPMI-7951



Slika 9. Uloga integrina $\alpha\beta 5$ i $\alpha\beta 3$ u odgovoru stanica RPMI-7951 na vinkristin i paklitaksel. A) Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice $\beta 3$ ili $\beta 5$ na ekspresiju integrina $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ i podjedinice integrina αv u stanicama RPMI-7951. Površinska ekspresija integrina $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ i podjedinice integrina αv u stanicama RPMI-7951 dva dana nakon transfekcije $\beta 3$ -, $\beta 5$ - ili αv -specifičnim siRNA (crno) u usporedbi sa stanicama transficiranim kontrolnom siRNA (sivo). Lijevi histogrami predstavljaju fluorescenciju izotipske kontrole u kontrolnim (sivo) i transficiranim (crno) stanicama. 48 sati nakon transfekcije, stanice su odvojene od podloge s EDTA i inkubirane integrin specifičnim primarnim protutijelom ili izotipskom kontrolom i zatim odgovarajućim sekundarnim protutijelom obilježenim FITC-om. Stanice su analizirane protočnim citometrom. Prikazan je jedan pokus od dva koji pokazuju slične rezultate. Geometrijska srednja vrijednost fluorescencije od koje je oduzeta fluorescencija izotipske kontrole za svaki histogram je prikazana na grafu u gornjem desnom kutu, relativno prema kontroli. **B) Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice $\beta 3$ ili $\beta 5$ u stanicama RPMI-7951 na osjetljivost stanica na paklitaksel i vinkristin.** Stanice su dan nakon transfekcije kontrolnom siRNA (si(-)) ili siRNA specifičnom za integrinske podjedinice $\beta 3$ ili $\beta 5$ nasadne u pločicu s 96 jažica. Sutradan su izložene djelovanju paklitaksela ili vinkristina i nakon 72 sata je preživljenje mjereno testom MTT. Grafovi predstavljaju rezultate izmjerene apsorbancije sa standardnim devijacijama jednog od najmanje tri pokusa sa sličnim rezultatima. Sivi stupići predstavljaju stanice transficirane kontrolnom siRNA (si(-)), a stupići u boji stanice transficirane integrin-specifičnom siRNA. Podatci su analizirani dvosmjernom ANOVA-om s Bonferroni post-testom. ** P, 0,01; *** P, 0,001.

Tablica 23. Utjecaj utišavanja integrinskih podjedinica αv , $\beta 3$ ili $\beta 5$ na osjetljivost stanica RPMI-7951 na djelovanje paklitaksela ili vinkristina. Tablica predstavlja rezultat statističke obrade rezultata testa MTT prikazanih na Slici 8 i Slici 9 sa statističkim testom dvostruke ANOVA-e. NI, nema međudjelovanja; S, povećanje osjetljivosti.

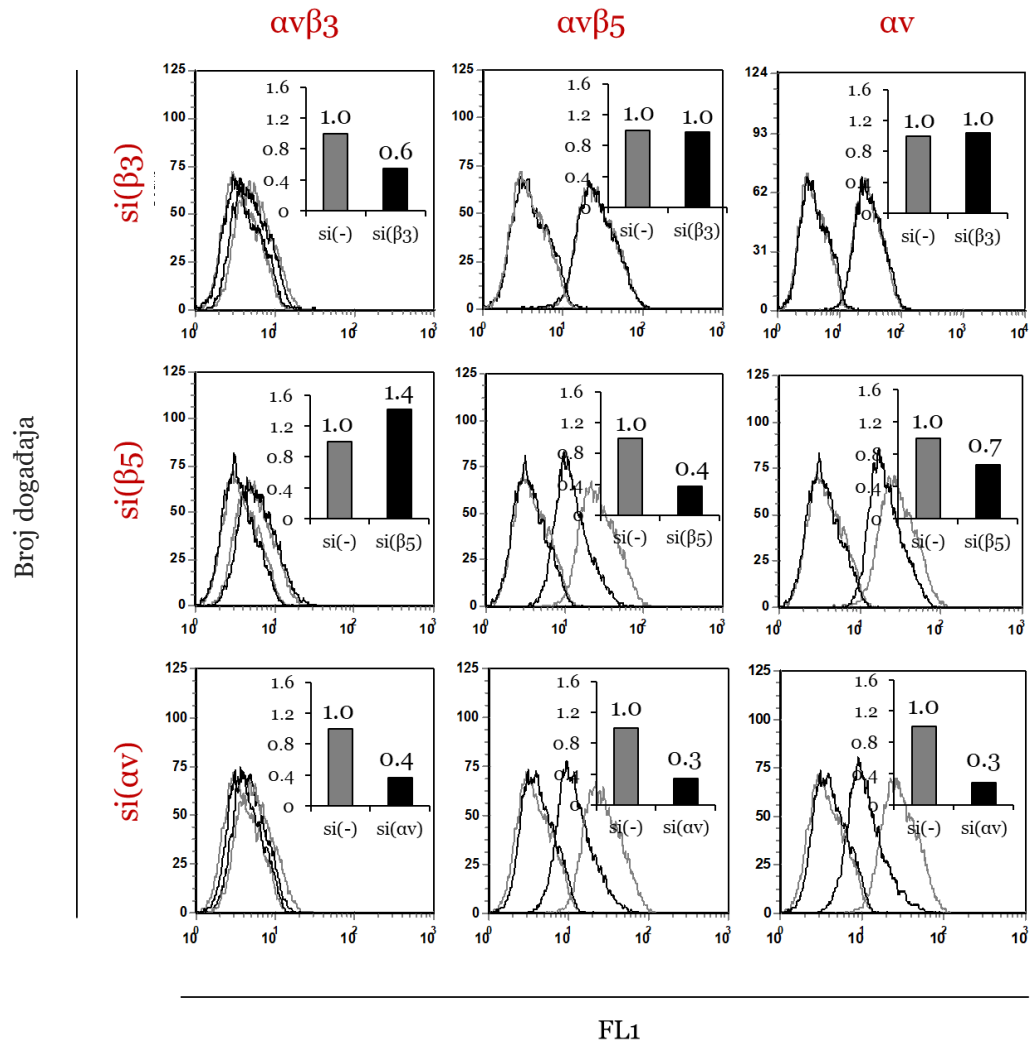
RPMI-7951	Paklitaksel	Vinkristin
si(αv)	S	NI
si($\beta 3$)	S	S
si($\beta 5$)	S	S

3.5.2. Utišavanje integrinskih podjedinica $\beta 3$ ili $\beta 5$ u stanicama MeWo smanjuje osjetljivost stanica na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin

Budući da je utišavanje integrinske podjedinice αv smanjilo osjetljivost stanica MeWo na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin (Tablica 22), zanimala nas je uloga pojedinačnih integrinskih podjedinica $\beta 3$ i $\beta 5$ u ovom fenomenu. Stanice MeWo eksprimiraju integrin $\alpha\beta 5$ i vrlo malo integrina $\alpha\beta 3$ (Slika 6, zadnji red). Utišavanje integrina $\beta 3$ smanjuje ekspresiju $\alpha\beta 3$ na 60%, međutim ne djeluje na ekspresiju integrina $\alpha\beta 5$ ni na ukupnu ekspresiju integrinske podjedinice αv (Slika 10 A, gornji red). Utišavanje integrina $\beta 5$ uspješno smanjuje ekspresiju $\alpha\beta 5$ na 40% i αv na 70%, ali povećava ekspresiju $\alpha\beta 3$ na 140% u odnosu na ekspresiju izmjerenu u stanicama transficiranim s kontrolnom siRNA. Utišavanje podjedinice αv smanjuje ekspresiju αv na 30%, kao i ekspresiju $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$. Nije poznato eksprimiraju li ove stanice i integrin $\alpha\beta 1$, koji može biti uključen u preslagivanje, ali zbog nepostojanja protutijela specifičnog na integrin $\alpha\beta 1$, njegovu ekspresiju nismo mogli mjeriti.

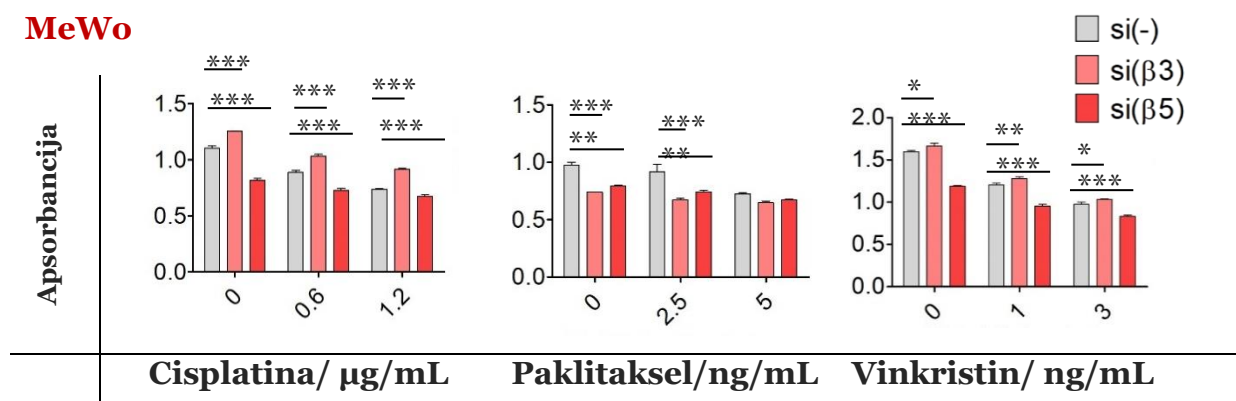
Kako bismo provjerili kako utišavanje podjedinica integrina $\beta 3$ ili $\beta 5$ utječe na osjetljivost stanica na cisplatinu, paklitaksel ili vinkristin, preživljenje je mjereno testom MTT (Slika 10 B). Utjecaj utišavanja je sažet u Tablici 24. Rezultati pokazuju da utišavanje integrinske podjedinice $\beta 5$ ili αv smanjuje osjetljivost na sva tri protutumorska lijeka. Slično je pokazano i s utišavanjem podjedinice $\beta 3$ za paklitaksel, dok je za cisplatinu i vinkristin pokazan nepovoljni aditivni učinak.

A)



B)

MeWo



Slika 10. Uloga integrina $\alpha\beta5$ i $\alpha\beta3$ u odgovoru stanica MeWo na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin. (A) Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ i podjedinice $\alpha\beta$ u stanicama MeWo. Površinska ekspresija integrina $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ i podjedinice $\alpha\beta$ u stanicama RPMI-7951 dva dana nakon transfekcije $\beta3$ -, $\beta5$ - ili $\alpha\beta$ -specifičnim siRNA (svjetlija boja) u usporedbi sa stanicama transficiranim kontrolnom siRNA (tamnija boja). Sivi histogram predstavlja fluorescenciju izotipske kontrole u kontrolnim stanicama koja je podjednaka u stanicama transficiranim integrin specifičnom siRNA pa je zbog jednostavnosti prikaza izostavljena. 48 sati nakon transfekcije, stanice su odvojene od površine s EDTA i inkubirane specifičnim primarnim protutijelom te zatim odgovarajućim sekundarnim protutijelom obilježenim FITC-om. Stanice su analizirane protočnim citometrom. Prikazan je reprezentativni pokus od dva slična. Geometrijska srednja vrijednost fluorescencije od koje je oduzeta fluorescencija izotipske kontrole za svaki histogram je prikazana na grafu u gornjem desnom kutu, relativno na kontrolu. B) Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice $\beta3$ ili $\beta5$ u stanicama MeWo na osjetljivost na paklitaksel, vinkristin ili cisplatinu. Stanice su dan nakon transfekcije kontrolnom siRNA (si(-)) ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu $\beta3$, $\beta5$ ili $\alpha\beta$ nasadene u pločicu s 96 bunarića. Sutradan su izložene djelovanju paklitaksela, vinkristina ili cisplatine i nakon 72 sata je preživljenje mjereno testom MTT. Grafovi predstavljaju rezultate izmjerene apsorbancije sa standardnim devijacijama jednog od najmanje tri pokusa sa sličnim rezultatima. Sivi stupići predstavljaju stanice transficirane kontrolnom siRNA (si(-)), a stupići u boji stanice transficirane integrin-specifičnom siRNA. Podatci su analizirani dvosmjernom ANOVA-om s Bonferroni post-testom. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,001$.**

Tablica 24. Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice $\alpha\beta$, $\beta3$ ili $\beta5$ na osjetljivost stanica MeWo na djelovanje cisplatine, paklitaksela i vinkristina. Tablica predstavlja rezultat statističke obrade rezultata testa MTT prikazanih na Slici 8 i Slici 10 sa statističkim testom dvostruke ANOVA-e. NI, nema međudjelovanja, S, povećanje osjetljivosti.

MeWo	Cisplatina	Paklitaksel	Vinkristin
si($\alpha\beta$)	R	R	R
si($\beta3$)	NI	R	NI
si($\beta5$)	R	R	R

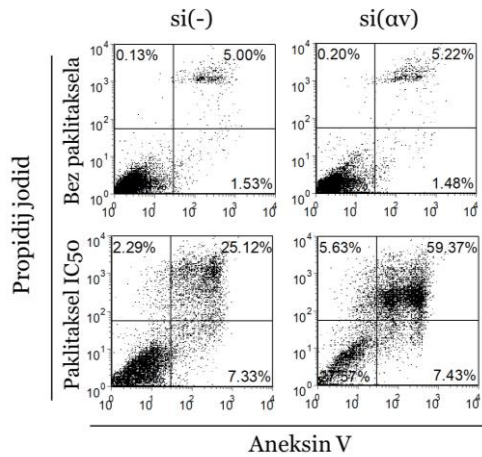
3.6. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice αv u stanicama melanoma MDA-MB-435S i RPMI-7951 povećava paklitakselom izazvanu apoptozu

Apoptoza je preferencijalna vrsta stanične smrti izazvane protutumorskim lijekovima jer je to programirana i organizirana smrt stanice, za razliku od nekroze, kojom stanična membrana puca, stanični sadržaj se izlijeva u okolinu i izaziva upalu (Elmore, 2007.). Paklitaksel vezivanjem na β -tubulin stabilizira mikrotubule, onemogućuje pravilnu diobu stanica što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa (Weaver, 2014.). Kako bi istražili povećava li utišavanje podjedinice integrina αv u stanicama MDA-MB-435S i RPMI-7951 djelovanje paklitaksela putem povećanja udjela stanica koje umiru apoptozom, koristili smo kombinacijsko bojenje FITC-aneksinom i propidij jodidom (Slika 11). Uz svaki pokus provjerena je uspješnost utišavanja protočnom citometrijom (podatci nisu prikazani). MDA-MB-435S transficirane integrin αv -specifičnom siRNA pokazuju više nego dvostruko veći broj stanica u apoptozi 48 sati nakon izlaganja paklitakselu u usporedbi sa stanicama transficiranim kontrolnom siRNA (Slika 11 A). U stanicama RPMI-7951 transficiranim sa siRNA specifičnom za αv u usporedbi sa stanicama transficiranim kontrolnom siRNA, 3 dana nakon izlaganja paklitakselu u tri neovisno izvedena pokusa uočeno je malo, ali konzistentno povećanje udjela stanica u apoptozi za oko 5% (Slika 11 B). S obzirom da je nakon transfekcije nespecifične siRNA u stanicama koje nisu izlagane paklitakselu primijećen neočekivano veći broj stanica u ranoj i kasnoj apoptozi za oko 2% u odnosu na si(αv), razlika u apoptozi je i nešto veća, no još uvijek puno manja nego što je to zabilježeno za stanice MDA-MB-435S.

Zaključujemo da utišavanje integrinske podjedinice αv povećava osjetljivost MDA-MB-435S kroz mehanizam koji povećava apoptozu, dok je kod stanica RPMI-7951 taj mehanizam uključen samo djelomično.

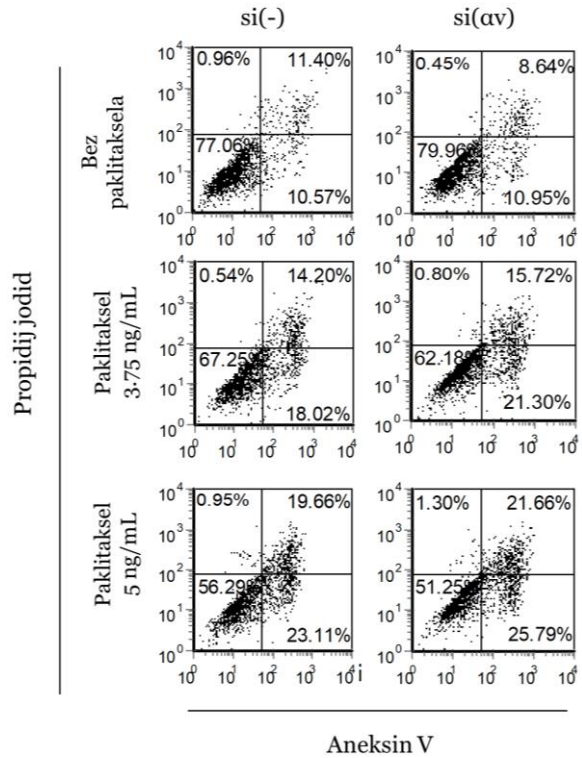
A)

MDA-MB-435S



B)

RPMI-7951



Slika 11. Utišavanje integrinske podjedinice α v povećava udio stanica u apoptozi izazvanoj paklitakselom u stanicama melanoma čovjeka MDA-MB-435S i RPMI-7951. Stanice MDA-MB-435S (A) i RPMI-7951 (B) su dva dana nakon transfekcije kontrolnom siRNA (si(-)) ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu α v (si(α v)), izložene djelovanju paklitaksela te nakon 48 sati (A) ili 72 sata (B) su bojane kombinacijama aneksin-FITC i propidij jodid. Obojane stanice su analizirane protočnim citometrom, a rezultati FCS Express programom. Prikazan je rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

3.7. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice αv u stanicama RPMI-7951 smanjuje pokretljivost: ključna uloga integrina $\alpha v \beta 5$

Integrini su glavne molekule kojima se stanica pričvršćuje za podlogu i koje sudjeluju u procesima migracije i invazije stanica pa prema tome i u metastaziranju tumora (Seguin i ostali, 2015.).

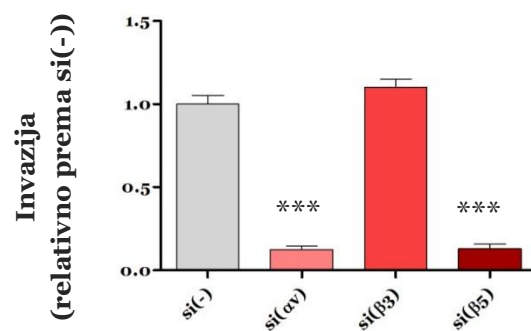
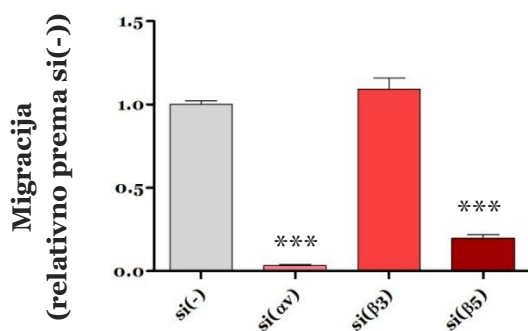
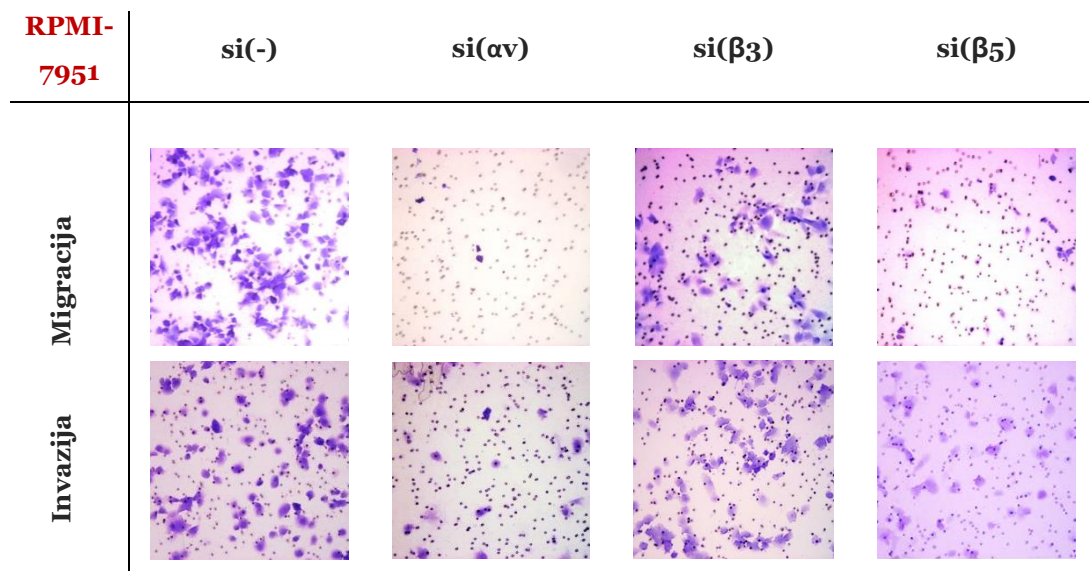
Budući da je utišavanje integrinske podjedinice αv snažno smanjilo migraciju stanica MDA-MB-435S (Ferenčak, 2013.), odlučili smo istražiti vrijedi li isto za stanice RPMI-7951, A375 i MeWo. Istražili smo sposobnost migracije stanica nakon transfekcije kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za integrinske podjedinice αv , $\beta 3$ ili $\beta 5$ *in vitro* u komoricama za migraciju kroz membranu s rupama veličine 8 μm prema FBS-u kao kemoatraktantu (Slika 12). Uz svaki pokus provjerena je uspješnost utišavanja protočnom citometrijom (podatci nisu prikazani).

Migracija stanica RPMI-7951 (Slika 12 A) znatno je smanjena u stanicama transficiranim integrin αv -specifičnom siRNA u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA. Iako u stanicama A375, nakon utišavanja integrina αv , nije zabilježeno povećanje već, naprotiv, smanjenje osjetljivosti na paklitaksel i vinkristin, primijećeno je snažno smanjenje migracije (Slika 12 B). Stanice MeWo su u našim pokusima bile slabo migratorne i stoga u njima nismo mjerili utjecaj utišavanja integrina αv na migraciju.

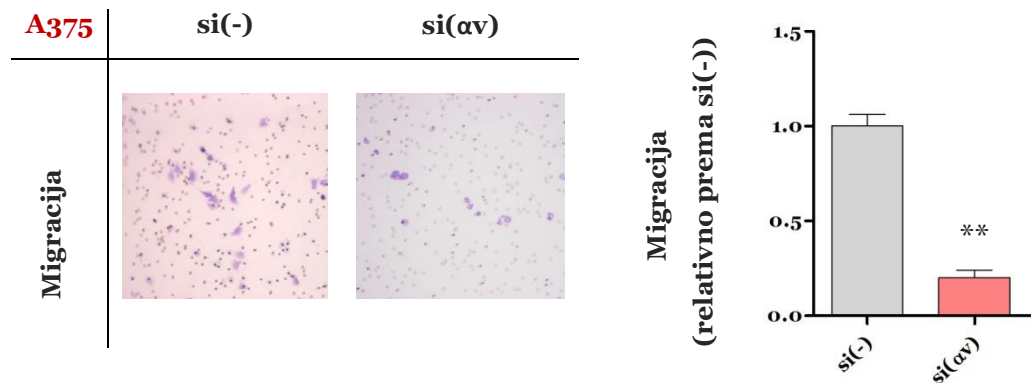
U stanicama RPMI-7951 smo odlučili istražiti koji je heterodimer integrina αv odgovoran za smanjenu migraciju, te smo je mjerili nakon transfekcije $\beta 3$ ili $\beta 5$ specifičnom siRNA (Slika 12 A prvi red). Migracija stanica se nije mijenjala nakon utišavanja ekspresije integrina $\beta 3$, međutim utišavanje ekspresije $\beta 5$ je značajno smanjilo migraciju na vrijednost 15% od migracije kontrole (Slika 12 A, prvi red treći i četvrti stupac). Osim toga učinak utišavanja integrina $\alpha v \beta 5$ na migraciju usporediv je s učinkom kojeg je imalo utišavanje ekspresije ukupnih αv podjedinica (Slika 12 A, prvi red, drugi stupac).

U stanicama RPMI-7951 smo istražili i utjecaj utišavanja integrina αv na invaziju (Slika 12 A drugi red). Dobiveni rezultati su gotovo jednaki onima dobivenima mjerenjem migracije. Smanjenje invazije bilo je usporedivo s učinkom kojeg je imalo smanjenje ekspresije ukupnih αv podjedinica u obje stanične linije (Slika 12 A drugi red, drugi stupac). Invazija stanica RPMI-7951 se nije mijenjala nakon utišavanja ekspresije integrina $\beta 3$, međutim utišavanje ekspresije $\beta 5$ je značajno smanjilo invaziju (Slika 12 A drugi red, treći i četvrti stupac).

A)



B)



Slika 12. Utišavanje integrinske podjedinice αv smanjuje migraciju i invaziju u stanicama RPMI-7951 i migraciju u A375. Ključna uloga integrina $\alpha v\beta 5$ u stanicama RPMI-7951. Stanicama je dan nakon transfekcije kontrolnom si(-) ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu αv (si(αv)), $\beta 3$ (si($\beta 3$)) ili $\beta 5$ (si($\beta 5$)) zamijenjena hranjiva podloga DMEM-FCS s podlogom bez seruma na 24 sata. Stanice su odvojene od površine i nanesene na migracijsku ili invazijsku komoricu koja je uronjena u DMEM-FCS. Nakon 22 sata stanice koje nisu prošle kroz rupe u membrani su uklonjene, a membrana je isprana, fiksirana i obojana bojom kristal ljubičasto. Membrana je izrezana i uklopljena u podlogu za uklapanje i analizirana pod svjetlosnim mikroskopom. Snimljeno je minimalno 5 različitih polja, reprezentativne fotografije i kvantifikacija za RPMI-7951 prikazane na A), a fotografije i kvantifikacija za stanice A375 pod B). Migracija i invazija su prikazane kao prosječan broj stanica koje su prošle kroz rupe na membrani nakon utišavanja specifičnih integrina relativno prema kontrolnim stanicama si(-). Podatci su analizirani neparametrijskim t-testom Mann-Whitney. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

3.8. Inhibicija pFAK-a (Y397) smanjuje osjetljivost tri od četiri stanične linije melanoma na paklitaksel

Naši rezultati su pokazali da utišavanje integrinske podjedinice αv u dvije od četiri stanične linije (MDA-MB-435S i RPMI-7951) povećava osjetljivost na paklitaksel, dok se u stanicama A375 i MeWo događa upravo suprotno. Dodatno, stanice MDA-MB-435S i RPMI-7951 nakon utišavanja integrina αv pokazuju snažno smanjenje pokretljivosti: migracije i invazije (Slika 7, Slika 12, Stojanovic i ostali, 2018.).

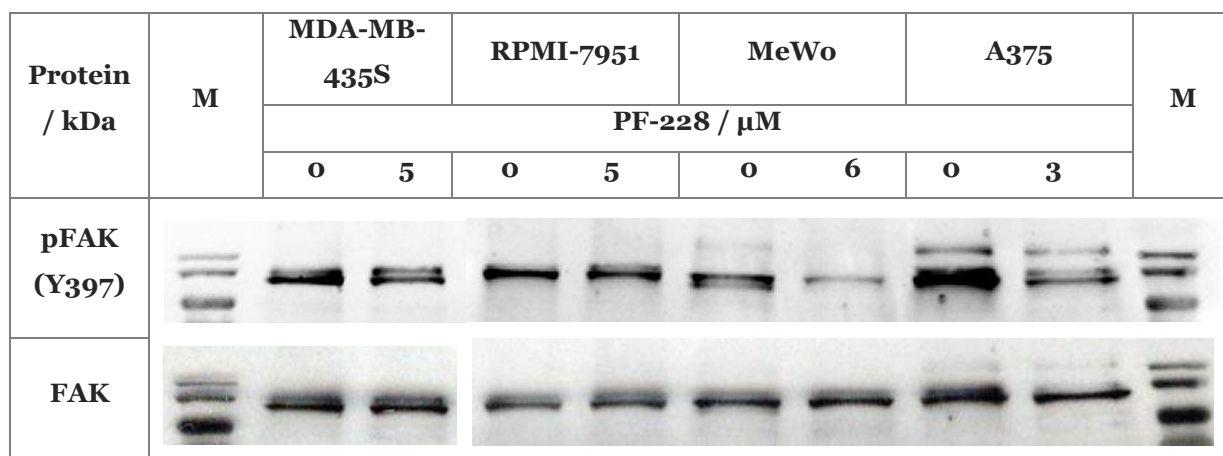
Kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) uključena je u prijenos signala preko integrina, a prijenos signala preko FAK-a ima ulogu u progresiji tumora i metastaziranju. Povećana ekspresija i aktivacija FAK-a pronađena je u raznim tumorima čovjeka, a FAK-inhibitori imaju potencijal u liječenju tumora, bilo da povećavaju osjetljivost na protutumorske lijekove ili inhibiraju metastaziranje (Sulzmaier i ostali, 2014). Do sada je otkriveno nekoliko mjesta fosforilacije tirozina u FAK-u, a tirozin 397 (Y397) je glavno mjesto autofosforilacije za koje je pokazana važnost za većinu funkcija FAK-a (Zhao i Guan, 2011). Kako je FAK u direktnom dodiru s citoplazmatskim repom integrina, prepostavili smo da utišavanje integrinske podjedinice αv djeluje na inhibiciju fosforilacije FAK-a na tirozinu 397 (pFAK (Y397)) i da upravo to može biti ključni događaj u modulaciji osjetljivosti stanica melanoma na paklitaksel. Stoga je u diplomskom radu Supina (2018)² i našem radu (Stojanović i ostali, 2018.) istražena uloga pFAK (Y397) u modulaciji osjetljivosti stanica melanoma na paklitaksel i to nakon utišavanja integrina αv ili nakon izlaganja cilengitidu, specifičnom inhibitoru integrina $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ (Mas-Moruno i ostali, 2010). Korelacija ekspresije pFAK (Y397) (mjerene metodom western blota) i povećanja osjetljivosti nakon utišavanja integrinske podjedinice αv uočena je samo u stanicama MDA-MB-435S. Međutim, pokazana je povezanost između smanjenja ekspresije pFAK (Y397) i modulacije osjetljivost stanica melanoma na paklitaksel nakon izlaganja cilengitidu. Usprkos odsustvu korelacije ekspresije pFAK (Y397) vs učinak kombinirane terapije, prepostavili smo da pFAK (Y397) ipak

² Diplomski rad izrađen pod mojim neposrednim voditeljstvom i mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice.

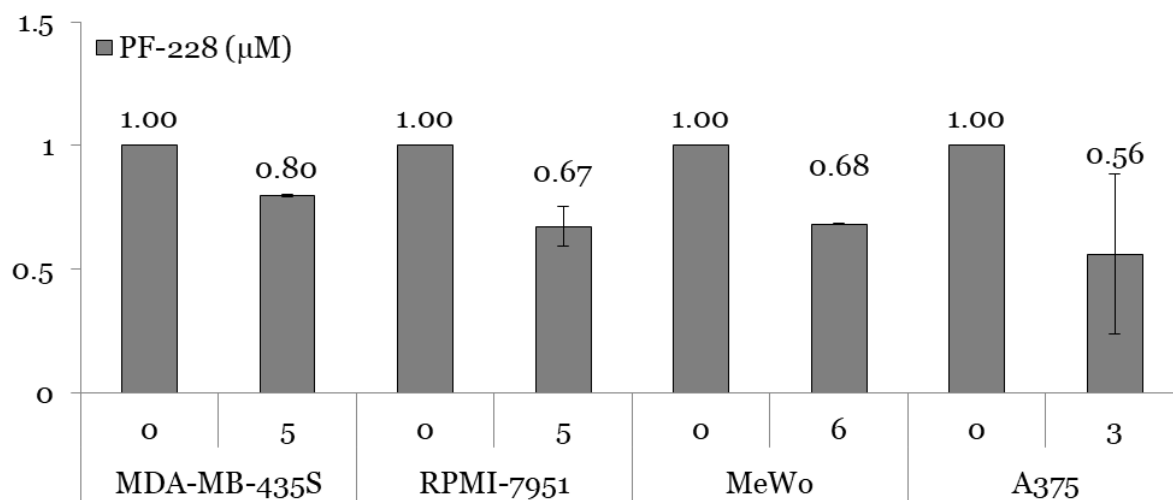
može imati ulogu u promjeni osjetljivosti na paklitaksel, jer su procesi preslagivanja integrina puno vjerojatniji nakon utišavanja integrina αv nego nakon izlaganja cilengitidu (Stojanović i ostali, 2018.).

Stoga smo u ovom doktorskom radu istražili ulogu pFAK-a (Y397) u modulaciji osjetljivosti stanica melanoma na paklitaksel korištenjem specifičnog inhibitora pFAK (Y397), PF-228 (Slack-Davis i ostali, 2007). U tu svrhu smo prvo provjerili djelovanje inhibitora PF-228 na pFAK (Y397) koristeći metodu western blota (Slika 13). Zatim je kombinirani učinak PF-228 i paklitaksela analiziran u svim staničnim linijama melanoma pomoću testa MTT (Slika 14), a rezultati su sažeto prikazani u Tablici 25. Iznenadujuće, PF-228 je pokazao smanjenje osjetljivosti stanica melanoma MDA-MB-435S, RPMI-7951 i MeWo na paklitaksel dok je u stanicama A375 primijećen povoljan aditivni učinak u smjeru povećane osjetljivosti na kombinaciju (Tablica 25). To se može objasniti činjenicom da je FAK citoplazmatska kinaza koja osim u prenošenju signala preko integrina djeluje i u signalnim putevima drugih staničnih receptora (Kleinschmidt i Schlaepfer, 2017). Međutim, vrlo je važan zaključak ovih pokusa da se inhibitor pFAK-a (Y397) u kombinaciji s paklitakselom ne preporučuje za terapiju melanoma.

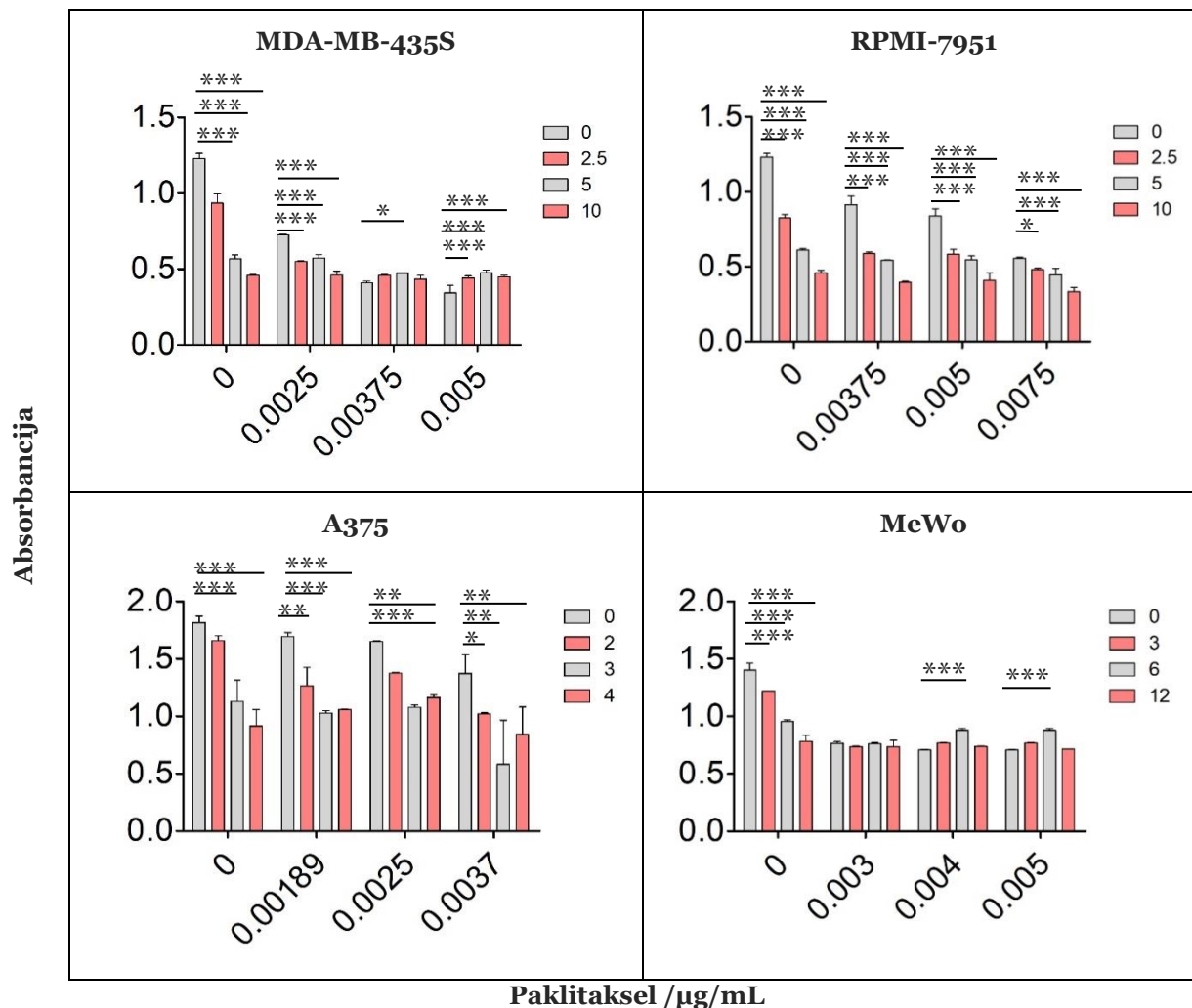
A)



B)



Slika 13. Utjecaj inhibitora pFAK-a (Y397) PF-228 na razinu pFAK (Y397). Stanični lizati su skupljeni 3 sata nakon izlaganja PF-228. Proteini su razdvojeni SDS-PAGE i analizirani metodom western blota pomoću specifičnih protutijela na pFAK (Y397) i FAK te sekundarnim protutijelima obilježenim peroksidazom. Kemiluminiscentni signal je očitao na uređaju Uvitec a fotografije signala prikazane na A). Densitometrija signala prikazana je pod B). M, proteinski standard, marker.



Slika 14. Osjetljivost stanica melanoma MDA-MB-435S, RPMI-7951, A375 i MeWo na paklitaksel nakon izlaganja inhibitoru pFAK-a (Y397) PF-228. Stanice su nasadene u pločice s 96 bunarića i 24 sata kasnije izložene različitim koncentracijama PF-228 i paklitaksela. Preživljenje je mjereno testom MTT 72 sata kasnije. Prikazani su podaci sa standardnim devijacijama jednog od najmanje tri neovisna pokusa sa sličnim rezultatima. Prvi stupić predstavlja kontrolne stanice koje nisu izložene inhibitoru („0“), a ostala tri stupića stanice izložene inhibitoru (legenda ukazuje na koncentraciju u μM). Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama jednog, od najmanje tri pokusa sa sličnim rezultatima. Podatci su analizirani dvosmjernom ANOVA-om s Bonferroni post-testom. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Tablica 25. Utjecaj djelovanja PF-228 na osjetljivost stanica na paklitaksel. Tablica prikazuje rezultat statističke obrade rezultata testa MTT prikazanih na Slici 14 s testom dvostruke ANOVA-e. NI, nema međudjelovanja, R, smanjenje osjetljivosti.

PF-228	Utjecaj na djelovanje paklitaksela
MDA-MB-435s	R
RPMI-7951	R
A375	NI
MeWo	R

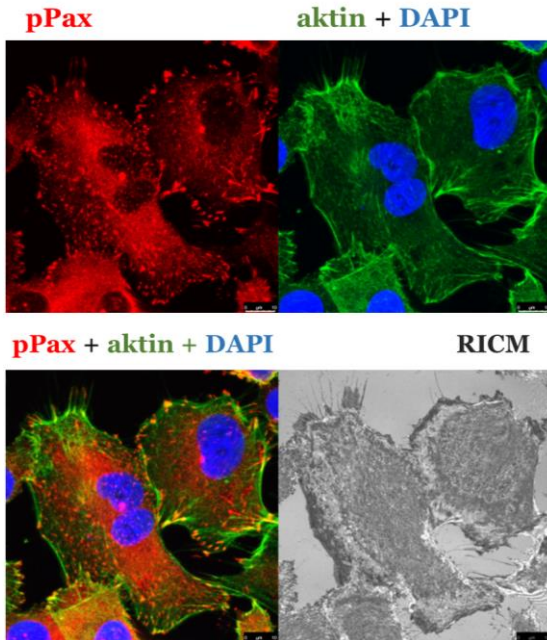
3.9. Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice αv u stanicama RPMI-7951 na lokalizaciju pPax-a (Y113), tubulina i aktinskog citoskeleta

U daljnjim pokusima odlučili smo pobliže istražiti utjecaj integrina αv u stanicama RPMI-7951 u kojima utišavanje njihove ekspresije povećava osjetljivost stanica na otrove mikrotubula. Kako bi se istražio utjecaj utišavanja integrinske podjedinice αv na izgled i veličinu fokalnih adhezija i organizaciju citoskeleta tubulina i aktina, stanice transficirane integrin αv -specifičnom siRNA, kao i kontrolne stanice transficirane kontrolnom siRNA, nasadene su na pokrovnice i analizirane imunofluorescencijskom i svjetlosnom mikroskopijom refleksijskog interferencijskog kontrasta (engl. *reflection interference contrast microscopy*, RICM). Pomoću specifičnih primarnih protutijela i odgovarajućih fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela, vizualiziran je pPax (Y113), jedan od glavnih sastojaka FA (Nakamura i ostali, 2000.) i tubulin. Stanice su bojane i faloidinom obilježenim FITC-om kako bi se vizualizirao aktinski citoskelet. RICM je korišten za snimanje dijela stanice gdje je ona najbliža podlozi kako bi se lokalizirale fokalne adhezije. Naime, slika snimana pomoću RICM-a se stvara interferencijom bliskih svjetlosnih zraka koje se reflektiraju od medija različitih indeksa loma. Tako će mjesta gdje stanica čvrsto prijanja uz staklo (gdje je FA) biti tamne boje. Intenzitet zatamnjenja mjera je blizine objekta staklenoj površini (Holt i ostali, 2008.; Weber, 2003.).

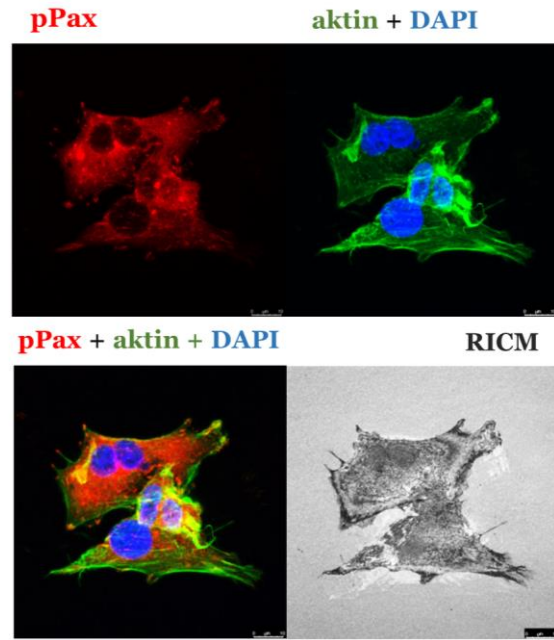
Stanice RPMI-7951 transficirane kontrolnom siRNA nalik su roditeljskim stanicama RPMI-7951 (podatci nisu prikazani). Kontrolne stanice su dobro raširene po površini s naglašenim aktinskim stresnim vlaknima i kortikalnim aktinom. Signal pPax (Y113) je lokaliziran u fokalnim adhezijama na vrhovima stresnih niti (Slika 15 A gornja), a tubulinska mreža je uredno organizirana (Slika 15 C gornja). Stanice transficirane integrin α -specifičnom siRNA su manje raširene od kontrolnih stanica (Slika 15 B), iako je njihova veličina u suspenziji (nakon odvajanja od podloge) slična kontrolnim stanicama, što smo provjerili protočnom citometrijom (podatci nisu prikazani). Nakon utišavanja integrinske podjedinice α , stanice RPMI-7951 gube točkasto bojenje pPax (Y113), imaju slabo organiziran aktin s manje stresnih vlakana (Slika 15 A donja). Kvantifikacija FA ukazuje na smanjenje veličine i broja FA po stanici nakon utišavanja integrina α (Slika 15 B). Međutim, nije uočena razlika u organizaciji tubulinskog citoskeleta (Slika 15 C donja). Smanjenje signala pPax-a (Y113) i gubitak stresnih vlakana nakon utišavanja integrinske podjedinice α je u skladu s uočenom smanjenom migracijom i invazijom u ovom staničnom modelu (Slika 12 D).

A)

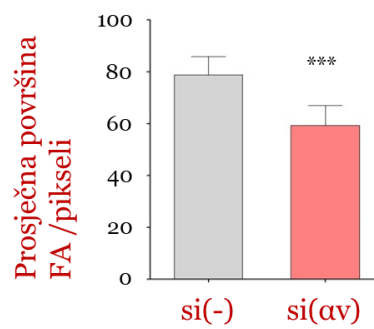
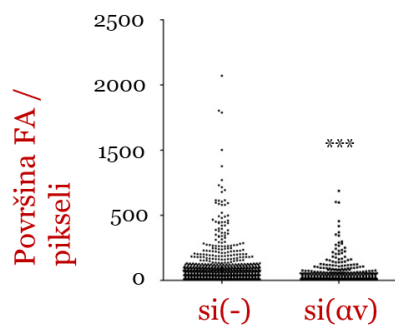
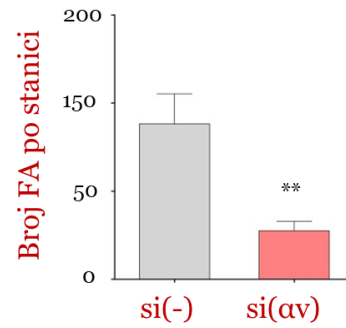
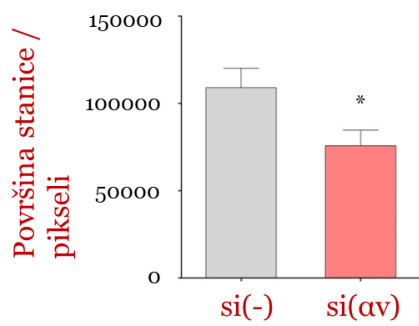
RPMI-7951 si(-)



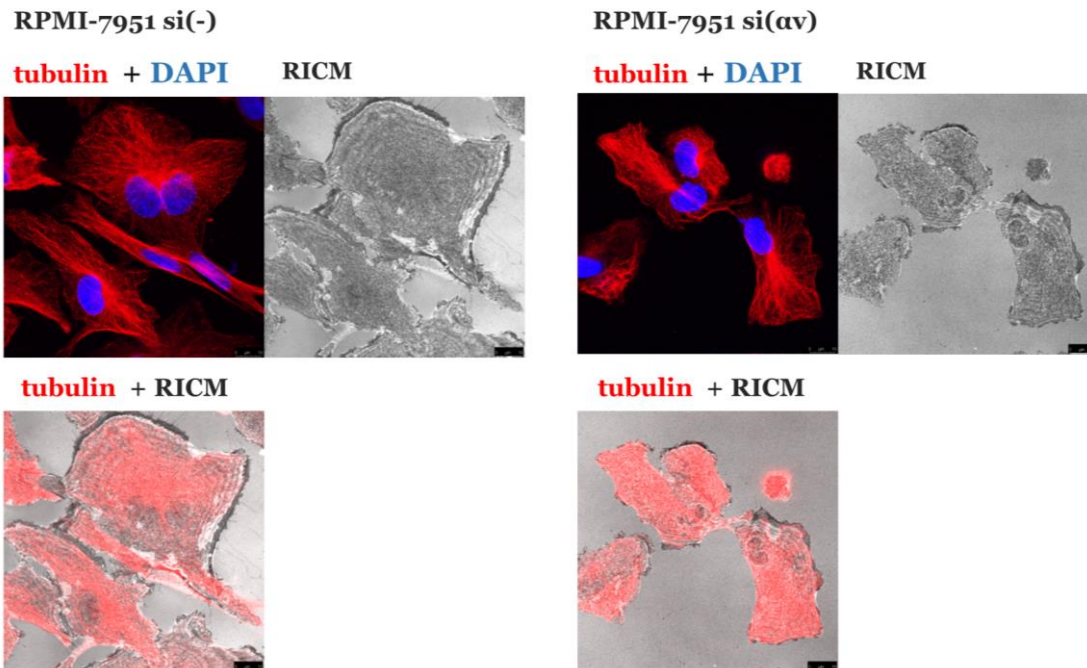
RPMI-7951 si(av)



B)



C)



Slika 15. Utjecaj utišavanja ekspresije integrinske podjedinice αv na lokalizaciju pPax (Y113), organizaciju citoskeleta aktina i tubulina, raširenost stanice na površini, broj i veličinu FA u stanicama RPMI-7951. Dan nakon transfekcije kontrolnom siRNA (si(-)) ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu αv (si(αv)), stanice su u istom broju nasadene na pokrovnice, sutradan fiksirane, permeabilizirane i inkubirane s primarnim protutijelima specifičnim za pPax (Y113) ili tubulin nakon čega je slijedila inkubacija sa sekundarnim Alexa-Fluor 555-konjugiranim protutijelom (crveno). Lokalizacija aktina je provedena pomoću faloidin-FITC-a (zeleno). Svi uzorci su uklopljeni u podlogu za uklapanje Fluoromount-G koji sadrži DAPI za vizualizaciju jezgre (plavo). Crno-bijele fotografije su snimljene uz RICM. Analiza stanica je provedena na mikroskopu TCS SP Leica. Prikazane su maksimalne projekcije reprezentativnih z-prereza izrađene programom LasX. **A) Utišavanje integrinske podjedinice αv uzrokuje smanjeni broj pPax(Y113)-pozitivnih FA koje se nalaze na vrhovima aktinskih niti koje pokazuju manji stupanj organizacije. B) Kvantifikacija fotografija pod A): površina stanice, broj FA po stanici, veličina FA i prosječna veličina FA.** Analiza je provedena ImageJ programom, a statistika neparametrijskim t-testom na barem 10-25 pojedinačnih stanica iz dva različita pokusa. Graf dolje lijevo prikazuje površine pojedinačne FA u pikselima, a svaka točka predstavlja jednu analiziranu FA. Ostali grafovi prikazuju prosječnu vrijednost sa standardnim devijacijama. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. **C) Utišavanje integrinske podjedinice αv ne uzrokuje promjenu izgleda tubulinskog citoskeleta.**

3.10. Stabilno transficirani klonovi stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrina αv su smanjeno osjetljivi na paklitaksel i vinkristin i nisu sposobni dugotrajno rasti u kulturi

Zbog utvrđenog utjecaja utišavanja integrinske podjedinice αv na povećanje osjetljivosti stanica RPMI-7951 na djelovanje paklitaksela i istovremenog smanjenja migracije i invazije, odlučili smo upravo u toj staničnoj liniji analizirati sastav IAC-a, tj. adhesoma kako bismo odredili proteine bitne za uočeni fenotip. Kako je za analizu adhesoma potreban relativno veliki broj stanica (za RPMI-7951 je to šest Petrijevih zdjelica promjera 10 cm popunjenosti površine 90%) odlučili smo izdvojiti stabilne klonove stanica RPMI-7951 s konstitutivno smanjenom ekspresijom integrinske podjedinice αv .

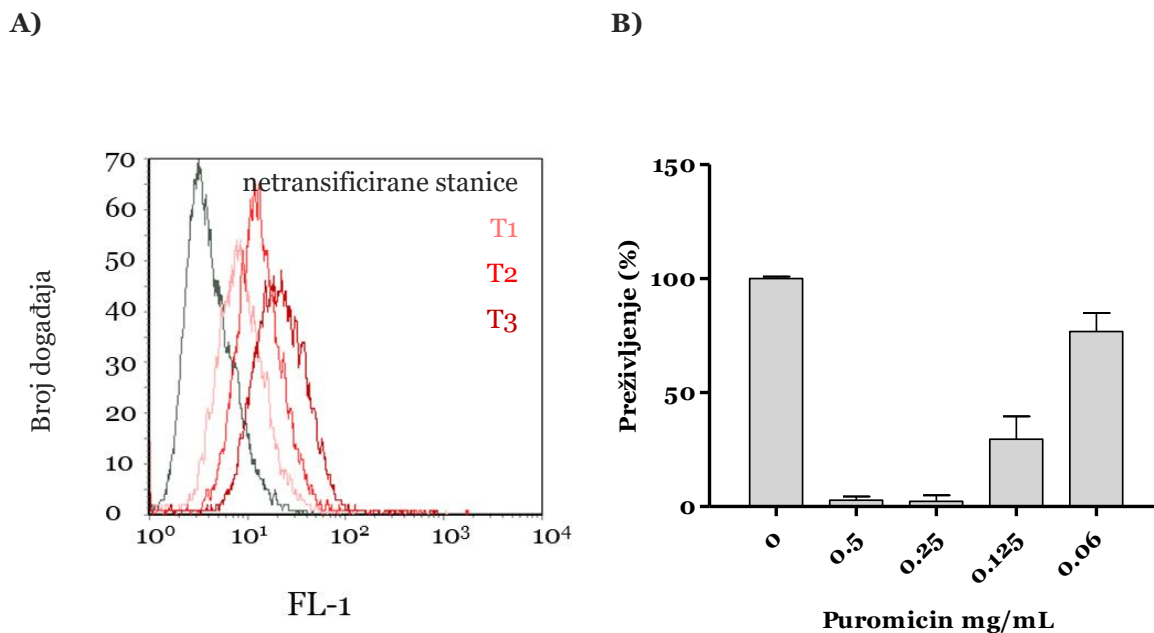
Klonovi stanica su dobiveni transfekcijom s pSUPER.puro. αv koji sadrži shRNA specifičnu za podjedinicu integrina αv jednakog slijeda kao i siRNA koja je korištena u pokusima prolazne transfekcije (Paradžik i ostali, neobjavljeni rezultati). Ovaj plazmid sadrži gen za otpornost na puromicin za odabir uspješno transficiranih stanica.

3.10.1. Optimizacija transfekcije i određivanje količine puromicina za odabir stabilno transficiranih klonova

U izdvajanju stabilnih klonova sa smanjenom ekspresijom integrina αv , koji će se posljedično tome značajno manje vezati na površinu na kojoj rastu, iznimno je važno dobro odabrati uvjete transfekcije i odabira puromicinom. Kako bi se utvrdila optimalna koncentracija reagensa za transfekciju pSUPER.puro. αv , stanice su prvo transficirane plazmidom pEGFP-C1 (Clontech, SAD) s tri različite koncentracije transfekcijskog reagensa, a učinkovitost transfekcije je analizirana protočnom citometrijom. Prema signalu fluorescencije EGFP odabrana je konačna koncentracija Lipofectamin Reagenta od 0,75% (Slika 16 A, histogram T3).

Kako bi se nakon transfekcije izdvojili klonovi stanica RPMI-7951 sa stabilno ugrađenim plazmidom i posljedično sa smanjenom ekspresijom integrinske

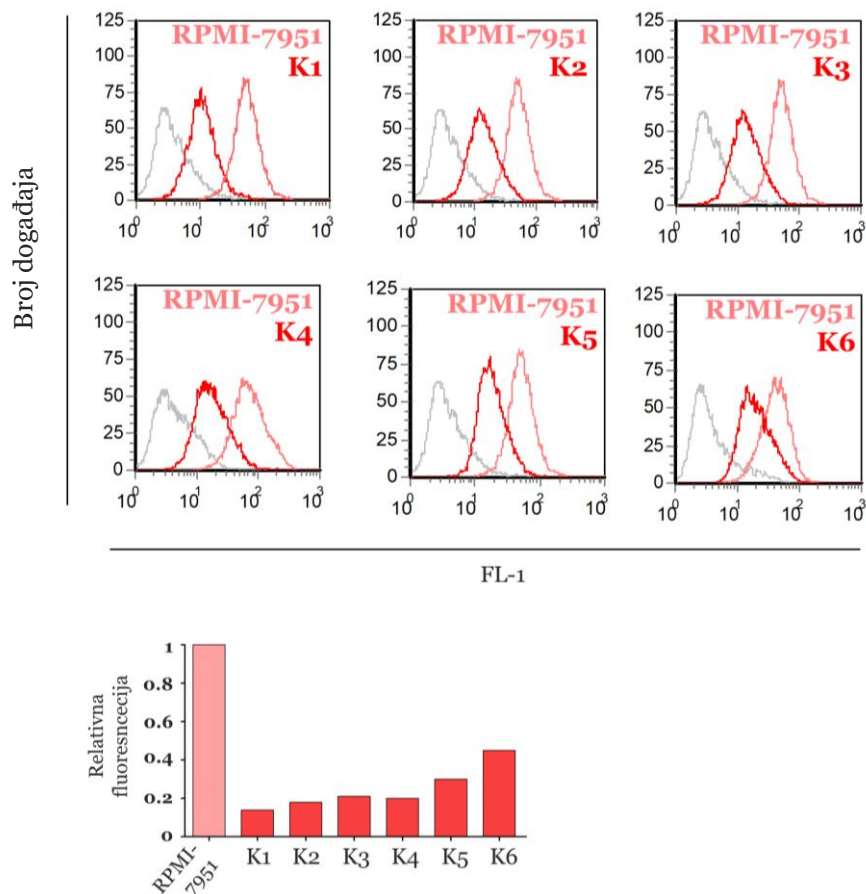
podjedinice av, bilo je potrebno utvrditi i optimalnu koncentraciju puromicina za odabir transficiranih stanica. To je učinjeno određivanjem citotoksičnosti serije razrjeđenja puromicina tijekom pet dana pomoću testa MTT (Slika 16 B). Odabrana je najniža koncentracija puromicina koja ima potpuni citotoksični učinak na stanice: 0,25 mg/mL.



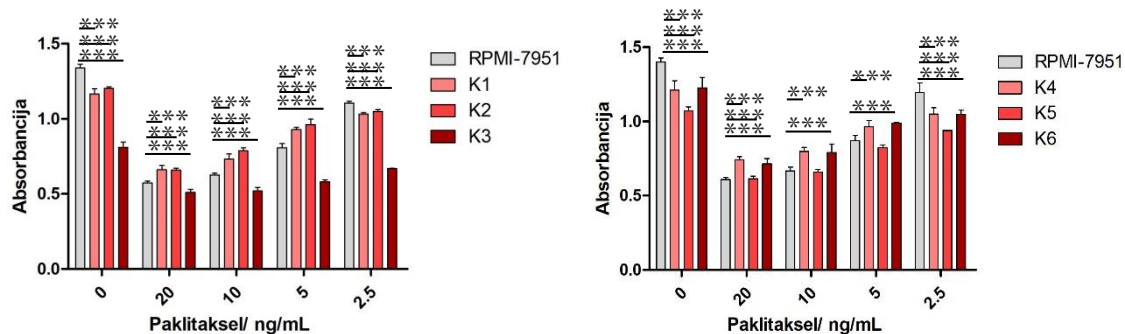
Slika 16. Odabir optimalne koncentracije Lipofectamin Reagenta za stabilnu transfekciju i koncentracije puromicina za uspješno izdvajanje stabilno transficiranih klonova stanica RPMI-7951. A) Fluorescentni signal stanica RPMI-7951 nakon transfekcije pEGFP-C1 plazmidom (Clontech, SAD) s tri različite koncentracije Lipofectamin Reagenta. Dan nakon transfekcije, stanice su odvojene od površine, isprane i analizirane na protočnom citometru. Sivi histogram prikazuje fluorescenciju stanica RPMI-7951 koje nisu transficirane, tri različite nijanse crvene histograma pokazuju fluorescenciju stanica RPMI-7951 nakon transfekcije s 0,75 % (T1), 0,5 % (T2) i 0,25 % (T3) konačnog udjela Lipofectamin Reagenta. B) Preživljenje stanica RPMI-7951 5 dana nakon izlaganja puromicinu. Stanice RPMI-7951 su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. 24 sata nakon nasadivanja izložene su djelovanju raspona koncentracija puromicina. Nakon 5 dana, preživljenje stanica je mjereno testom MTT, a rezultati su prikazani relativno prema stanicama koje nisu bile izložene puromicinu. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

3.10.2. Stabilno transficirani klonovi stanica RPMI-7951 pokazuju smanjenu ekspresiju integrina αv , smanjenu osjetljivost na paklitaksel i vinkristin i nisu sposobni dugotrajno rasti u kulturi

Klonovi stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrinske podjedinice αv dobiveni stabilnom transfekcijom plazmidom koji kodira za integrin αv specifičnu shRNA, odabrani su na temelju mjerenja ekspresije integrina αv protočnom citometrijom. Odabrali smo šest klonova sa smanjenom ekspresijom integrina αv (Slika 17). Ekspresija integrina αv se razlikovala u klonovima od 10 do 50% vrijednosti ekspresije u staničnoj liniji RPMI-7951 (Slika 17). Na ovaj smo način željeli umanjiti mogućnost utjecaja ugradnje plazmida na različita mjesta u genomu na osjetljivost na paklitaksel. Osjetljivost klonova na paklitaksel u usporedbi s kontrolnim stanicama mjerena je zatim pomoću testa MTT. Također je mjerena osjetljivost na vinkristin koja je u svim ispitanim klonovima pokazala smanjenje osjetljivosti u odnosu na roditeljske stanice (rezultati nisu prikazani). Iznenađujuće, svi testirani klonovi pokazali su smanjenu osjetljivost na paklitaksel i vinkristin što je u suprotnosti s rezultatima prolazne transfekcije (Slika 18).



Slika 17. Površinska ekspresija integrinske podjedinice αv u klonovima stanica RPMI-7951 stabilno transficiranim plazmidom koji kodira za integrin αv -specifičnu shRNA. Stanice su odvojene od površine EDTA-om i analizirane protočnom citometrijom nakon inkubacije s primarnim protutijelima specifičnim za integrinsku podjedinicu αv (crveni histogram) i izotipskom kontrolom kao negativnom kontrolom (sivi histogram), i sekundarnim protutijelom obilježenim FITC-om. Prikazani su reprezentativni pokusi od barem dva neovisna pokusa sa sličnim rezultatima. Sivi histogram predstavlja izotipsku kontrolu stanica. Radi jednostavnosti prikaza na grafu nije pokazana izotipska kontrola stabilno transficiranih klonova, koja je odgovarala signalu izotipske kontrole stanica RPMI-7951. Crveni signal označava ekspresiju integrina αv stanica RPMI-7951, a svijetlo crveni odgovarajućeg klona. Kvantifikacija histograma je prikazana na grafu dolje. Prikazana je srednja geometrijska vrijednost fluorescentnog signala umanjena za signal izotipske kontrole relativno na stanice RPMI-7951.

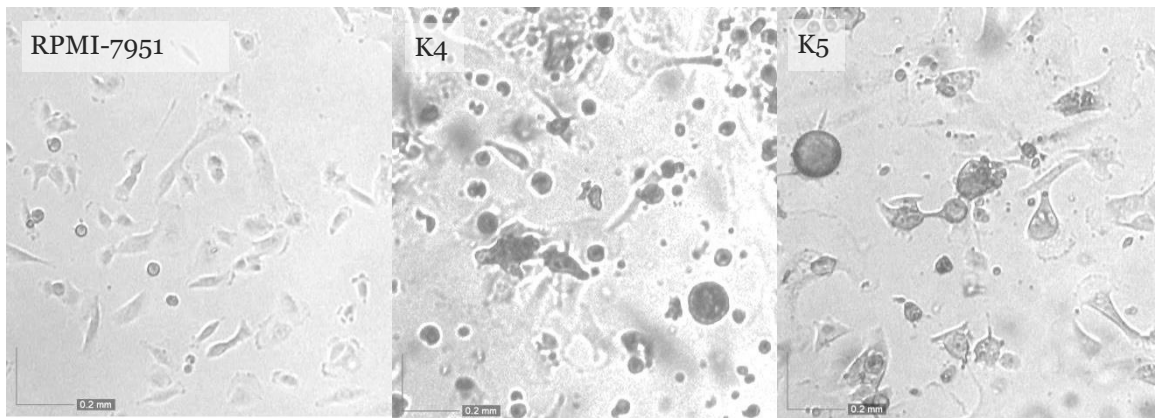


Slika 18. Osjetljivost klonova stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrinske podjedinice αv dobivenih stabilnom transfekcijom plazmidom koji kodira za integrin αv specifičnu shRNA na paklitaxsel. Stanice RPMI-7951 i klonovi stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrinske podjedinice αv K1, K2, K3, K4, K5 ili K6 su nasađeni u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. 24 sata nakon nasađivanja izložene su djelovanju raspona koncentracija paklitaxsela. 96 sati nakon, preživljenje stanica je mjereno testom MTT. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima. Sivi stupići predstavljaju netransficirane stanice RPMI-7951, a stupići u boji stabilno transficirane klonove stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrina αv . Podatci su analizirani dvosmjernom ANOVA-om s Bonferroni post-testom. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: ***, $P < 0,001$.

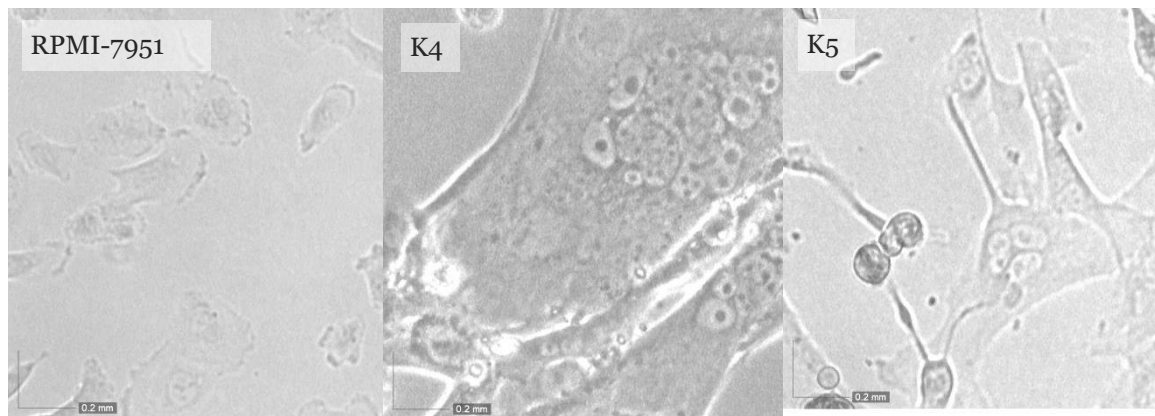
Svi su se klonovi mogli uzgajati ograničeni period u kulturi. U pokušaju da se dobije veća količina stanica za analizu (MTT, adhesom), primijećeno je da su stanice počele ubrzano umirati. Stanice su se zaokruživale, odvajale od površine i umirale, dok su stanice koje su ostale prihvaćene na površinu bile veće, nepravilnog oblika i često s više jezgara. Na Slici 19 prikazane su fotografije dobivene svjetlosnim mikroskopom klonova K4 i K5 nakon mjesec dana u kulturi na kojima se primjećuje veliki broj zaokruženih stanica koje nisu prihvaćene za površinu kao i veliki broj mrtvih stanica. Na Slici 19. B vidljiva je pojava neproporcionalno velikih stanica s više jezgara u usporedbi s kontrolnim stanicama RPMI-7951. Slično ponašanje je primijećeno u svim istraživanim klonovima. Uspjeli smo umnožiti samo klon 6 za jednu analizu adhesoma (rezultati nisu prikazani).

Zbog toga, ali i zbog činjenice da se stabilno transficirani klonovi drugačije ponašaju od prolazno transficiranih stanica nakon izlaganja paklitaxselu i vinkristinu, adhesom smo analizirali nakon prolazne transfekcije.

A)



B)



Slika 19. Fotografije svjetlosnim mikroskopom stabilno transficiranih klonova stanica RPMI-7951 plazmidom koji eksplicira integrin αv -specifičnu shRNA: povećanje A) 725 \times i B) 1125 \times . Klonovi su nakon probira uzgajani u hranjivoj podlozi DMEM-FCS, međutim nisu bili sposobni opstati duže u kulturi. Na slikama se može uočiti pojava zaokruženih stanica i stanica odvojenih od podloge kao na slici A, stanica s više jezgara i neproporcionalno velikih stanica kao na slici B.

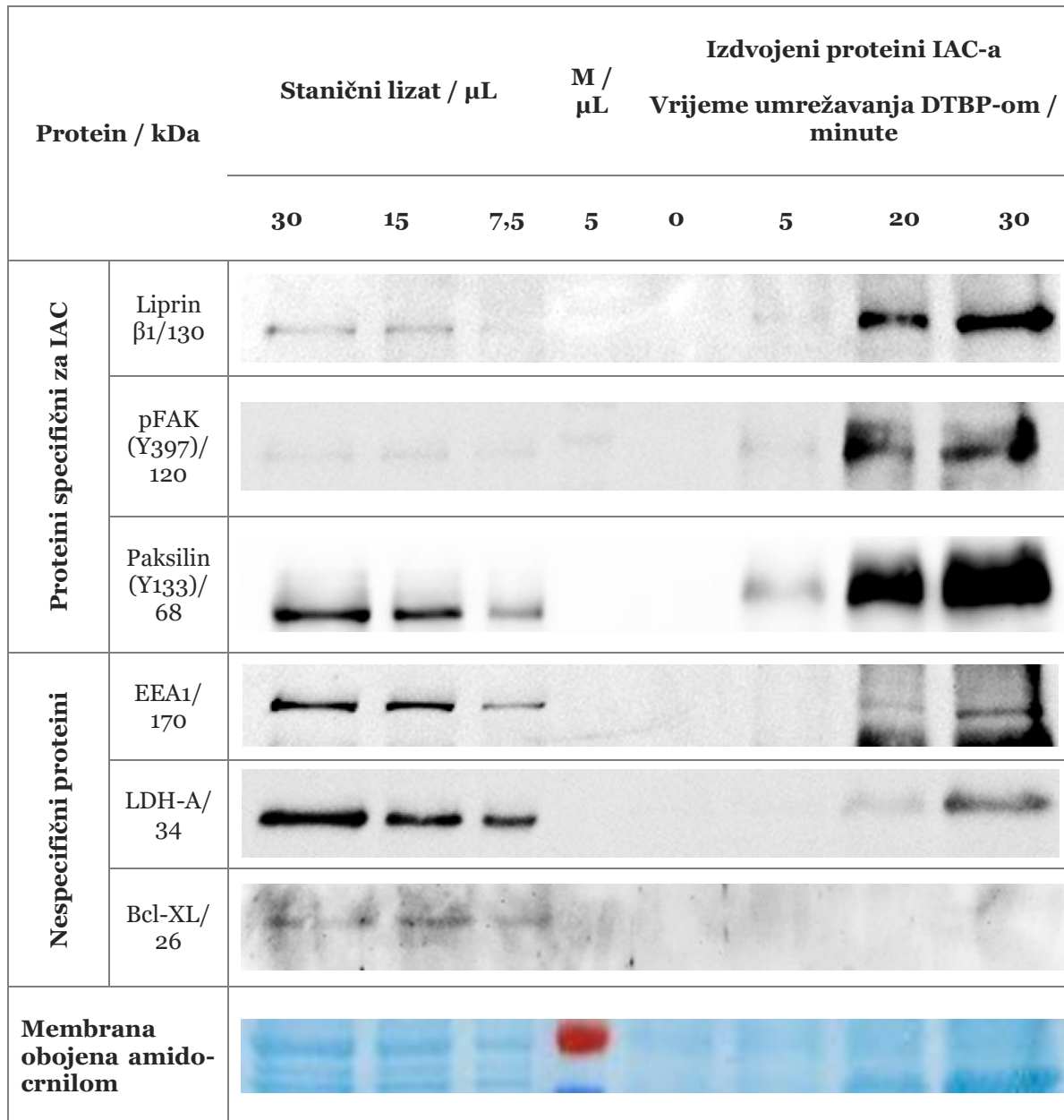
3.11. Promjena adhesoma nakon utišavanja integrinske podjedinice αv u stanicama RPMI-7951

3.11.1. Utvrđivanje optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om za izdvajanje proteina IAC-a

Za analizu adhesoma spektrometrom masa, bitno je kvalitetno izolirati IAC pri čemu je kritični korak vrijeme umrežavanja DTBP-om. Kako bi se utvrdilo optimalno vrijeme umrežavanja, uzorci IAC-a stanica RPMI-7951 su skupljeni nakon tri različita vremena umrežavanja i analizirani metodom western blot s primarnim protutijelima specifičnim za odabrane proteine IAC-a: fosforilirani oblici proteina FAK-a (Y397) i Pax-a (Y133) koji su dio konsenzus-adhesoma (Horton i ostali, 2015.), liprin $\beta 1$ koji nije dio konsenzus-adhesoma, ali je dio meta adhesoma potvrđenog literaturom u 3 seta podataka (ovaj protein se još pojavljuje u literaturi pod nazivom PTPRF (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type F*) interacting protein 1, PPFIBP1) (Horton i ostali, 2015.; Mana i ostali, 2016.) i protutijelima za proteine koji nisu dio konsenzus-adhesoma i koje ne očekujemo u adhesomu: antigen ranog endosoma EEA1 (engl. *Early Endosome Antigen 1*), laktat dehidrogenaza-A, LDH-A. EEA1 i LDH-A su na popisu proteina meta adhesoma, međutim nisu potvrđeni literaturom (Horton i ostali, 2015.). Koristili smo još i protutijela usmjerena protiv antiapoptotskog proteina Bcl-XL (engl. *B-cell lymphoma-extra large*) (kodiran genom BCL2L1) koji nije dio meta adhesoma, a nalazi se u citosolu ili mitohondriju (Horton i ostali, 2015.; UniprotKB, 2018.; Zhou i ostali, 2011.) (Slika 20). Kao pozitivna kontrola korišten je ukupni stanični lizat u dvostrukim razrjeđenjima kako bi se time odredila i osjetljivost metode.

Rezultati pokazuju da izolati IAC-a umreženi DTBP-om tijekom 5 minuta imaju malo liprina $\beta 1$, pFAK (Y397) i pPax (Y133) proteina specifičnih za IAC, dok izolati umreženi 30 minuta pokazuju veliku ekspresiju sva tri proteina, ali istovremeno i jači signal EEA1 i LDH-A, proteini koji nisu specifični za IAC. Protein Bcl-XL nije dobiven niti u jednom uzorku nakon umrežavanja, dok je slabi signal vidljiv u lizatima stanica. Tako smo na temelju omjera specifičnih i nespecifičnih proteina IAC-a odabrali vrijeme umrežavanja DTBP-om od 20 minuta kao optimalno. Uspješnost izdvajanja

IAC-a potvrđuje obogaćenje liprina β 1, pFAK-a (Y397) i pPax-a (Y113) bez obogaćenja ekspresije EEA1 i LDH-A u odnosu na ukupni stanični lizat (Slika 20).



Slika 20. SDS-PAGE i western blot analiza staničnog lizata i izdvojenih proteina IAC-a u stanicama RPMI-7951 za odabir optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om. Ukupni stanični lizati i izolirani IAC-i nakon tri različita vremena umrežavanja DTBP-om su razdvojeni koristeći SDS-PAGE, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je zatim obojana bojom amido-crninom kako bi se provjerila uspješnost prijenosa. Membrana je inkubirana s primarnim protutijelima specifičnim za liprin β 1, pFAK (Y397), pPax (Y113), EEA1, LDH-A i Bcl-XL, te nakon toga sekundarnim protututijelima obilježenim enzimom peroksidaza. Signal je razvijen kemiluminiscentnim reagensom i očitao na uređaju Uvitec.

3.11.2. Promjena sastava adhesoma stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice αv

Ukupno su analizirana tri biološka seta uzoraka stanica RPMI7951 nakon transfekcije kontrolnom siRNA (si(-)) ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu αv (si(αv)). Za svaki set uzoraka protočnom citometrijom je provjerena uspješnost utišavanja integrinske podjedinice αv (podatci nisu prikazani). Uzorci su analizirani masenom spektrometrijom u laboratoriju prof. dr. sc. M. J. Humphriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester) pod istim uvjetima (Prilog, Poglavlje 9.1). Korištena je metoda ionizacije elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionisation*, ESI), a kao detektor masa korišten je Orbitrap Elite.

Masenom spektrometrijom u programu Scaffold identificirano je 624 proteina s minimalnim brojem spektara 1 u barem jednom od šest analiziranih uzoraka, s 99,9% *protein threshold* i 95% *peptide threshold*, i to prema opciji kvantitativnih vrijednosti ukupnih spektara (engl. *quantitative value total spectra*) (Tablica 28). Kako bi se razdvojili bitni proteini od šuma ukupnog broja identificiranih proteina, za detaljniju analizu probrani su proteini pronađeni s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom od šest analiziranih uzoraka. Takvi stroži uvjeti rezultirali su smanjenjem ukupnog broja na 344 proteina koji su navedeni u istoj tablici popisa proteina na prvih 344 mjesta (Tablica 28).

Korištenjem alata DAVID Functional Annotation (Huang i ostali, 2009a., 2009b.) prema bazi GOTERM_CC_DIRECT utvrđeno je da je od 333 proteina prepoznatih u bazi, 105 proteina povezano s fokalnim adhezijama (31,9% ukupnog broja identificiranih proteina), a 84 proteina s izvanstaničnim matriksom (25,5% od ukupnog broja identificiranih proteina). Značajnost ovih rezultata vidljiva je iz P-vrijednosti koja za proteine fokalnih adhezija iznosi $1,4 \times 10^{-94}$, a za proteine izvanstaničnog matriksa $1,1 \times 10^{-76}$. Korigirane P-vrijednosti dobivene pomoću metode Benjamini-Hochberg iznose $2,9 \times 10^{-92}$ za proteine fokalnih adhezija, odnosno $1,6 \times 10^{-74}$ za proteine izvanstaničnog matriksa.

Od ukupno detektiranih proteina njih 29 su dio konsensus-adhesoma (Horton i ostali, 2015), a navedeni su u Tablici 26.

Tablica 26. Popis proteina koji su dio konsensus-adhesoma (Horton i ostali, 2015) od ukupno pronađenih proteina u adhesomu stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu αv s minimalnim brojem spektara 4. Dva dana nakon prolaznog utišavanja kontrolne stanice RPMI-7951 transficirane sa siRNA su umrežene DTBP-om, lizirane i isprane, a proteini IAC-a su sakupljeni u ARS-u i taloženi acetonom. Proteini su unešeni u gel, metilirani, rezani tripsinom i analizirani na masenom spektrometru. Identifikacija je provedena programom Mascot i potvrđena programom Scaffold. Proteini identificirani s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom od uzoraka su navedeni u tablici na engleskom jeziku, poredani po imenu.

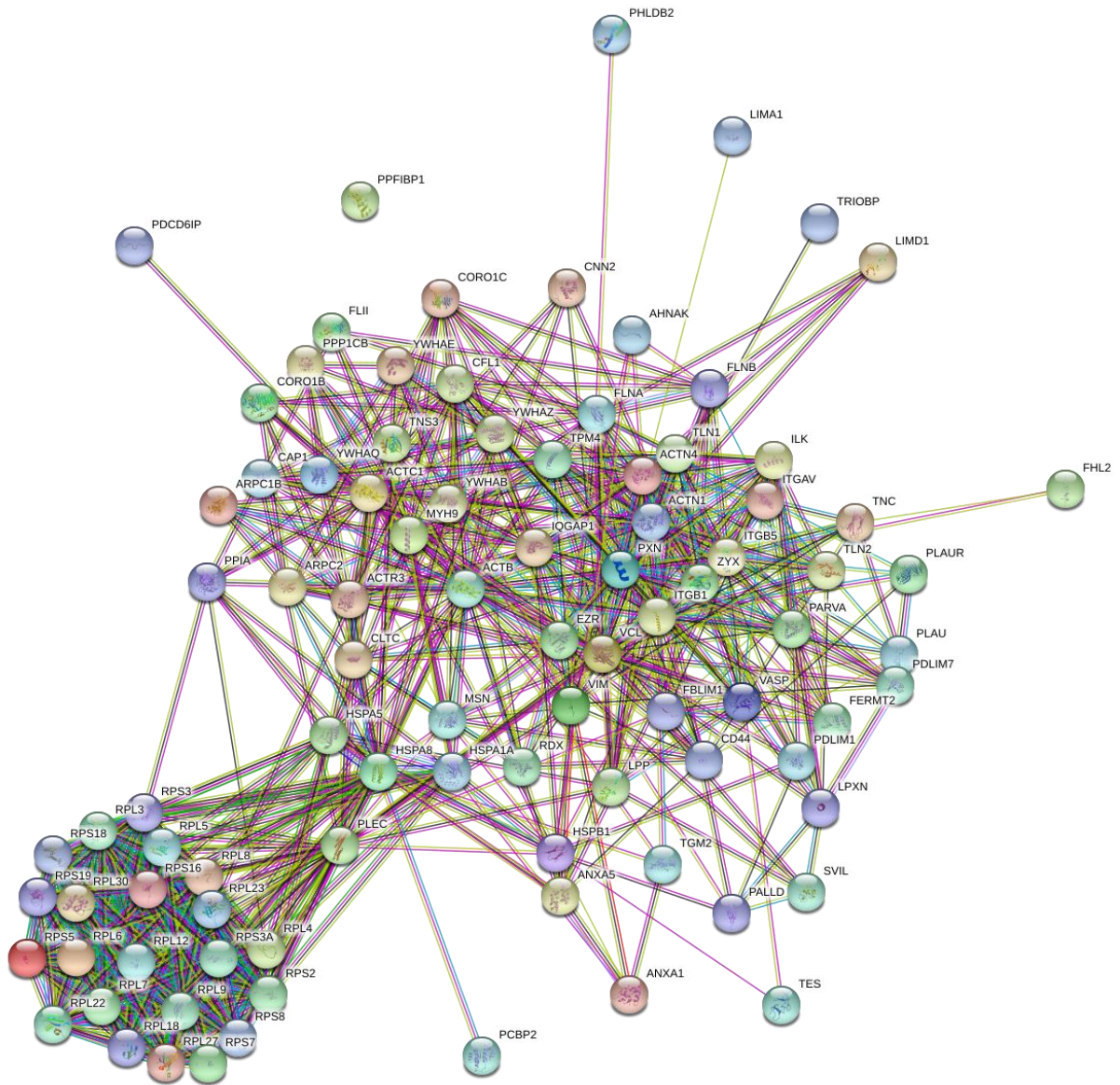
Proteini konsensus-adhesoma u adhesomu stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu αv		
Ime proteina na engleskom jeziku	Kratica	Pristupna oznaka UniProtKB
<i>actinin, alpha 1</i>	ACTN1	P12814
<i>actinin, alpha 4</i>	ACTN4	O43707
<i>annexin A1</i>	ANXA1	P04083
<i>caldesmon 1</i>	CALD1	Q05682
<i>calponin 2</i>	CNN2	Q99439
<i>fermitin family member 2</i>	FERMT2	Q96AC1
<i>filamin binding LIM protein 1</i>	FBLIM1	Q8WUP2
<i>four and a half LIM domains 2</i>	FHL2	Q14192
<i>integrin, alpha v</i>	ITGAV	P06756
<i>integrin, beta 1</i>	ITGB1	P05556
<i>integrin-linked kinase</i>	ILK	Q13418
<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i>	IQGAP1	P46940

<i>LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma</i>	LPP	Q93052
<i>LIM domains containing 1</i>	LIMD1	Q9UGP4
<i>palladin, cytoskeletal associated protein</i>	PALLD	Q8WX93
<i>parvin, alpha</i>	PARVA	Q9NVD7
<i>paxillin</i>	PXN	P49023
<i>PDZ and LIM domain 1</i>	PDLIM1	O00151
<i>PDZ and LIM domain 5</i>	PDLIM5	Q96HC4
<i>PDZ and LIM domain 7 (enigma)</i>	PDLIM7	Q9NR12
<i>plastin 3</i>	PLS3	P13797
<i>ribosomal protein L23a</i>	RPL23A	P62750
<i>talin 1</i>	TLN1	Q9Y490
<i>tensin 3</i>	TNS3	Q68CZ2
<i>testis derived transcript (3 LIM domains)</i>	TES	Q9UGI8
<i>transglutaminase 2</i>	TGM2	P21980
<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>	VASP	P50552
<i>vinculin</i>	VCL	P18206
<i>zyxin</i>	ZYX	Q15942

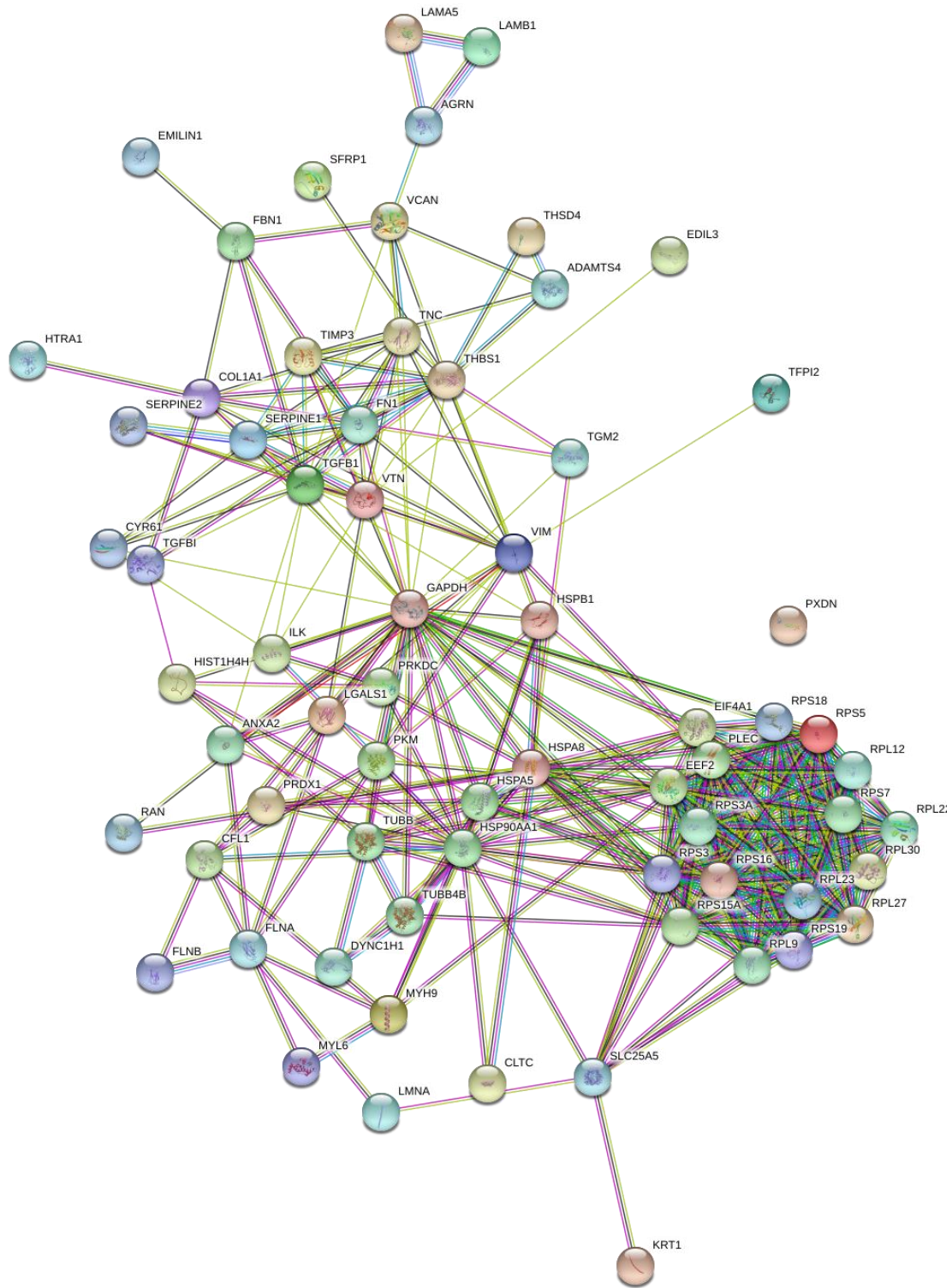
Kako bi se definirao adhesom stanica RPMI-7951, zasebno su analizirani proteini pronađeni u uzorcima transficiranih kontrolnom siRNA i to oni s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom od tri uzorka. Ukupno je pronađeno 278 proteina, alat

DAVID Functional annotation ih je prepoznao 270 prema bazi GOTERM_CC_DIRECT, od kojih je 34,8% proteina povezanih s fokalnim adhezijama s P-vrijednosti od $3,0 \times 10^{-87}$ i Benjamini korigiranom P-vrijednosti $6,0 \times 10^{-85}$, a 25,5% s ECM-om, vjerojatnosti $3,1 \times 10^{-61}$ i korigirane $3,1 \times 10^{-59}$. Proteini povezani s FA-om (Slika 21 A) i posebno ECM-om (Slika 21 B) su analizirani programom STRING kako bi se vizualizirao interaktom (moguće interakcije) (Slika 21). Iako su samo veze prikazane ljubičastom bojom temeljene na eksperimentalnim podacima, jasno je iz ovog prikaza da su proteini unutar interaktoma višestruko povezani. Skupina proteina na donjem dijelu slike A i desnom dijelu slike B čini ribosomalne proteine, za koje je pokazano da se nalaze u bliskom kontaktu s rastućom fokalnom adhezijom kako bi osigurali brzu sintezu proteina za tako visokodinamičnu strukturu (Willett i ostali, 2010.).

A)



B)

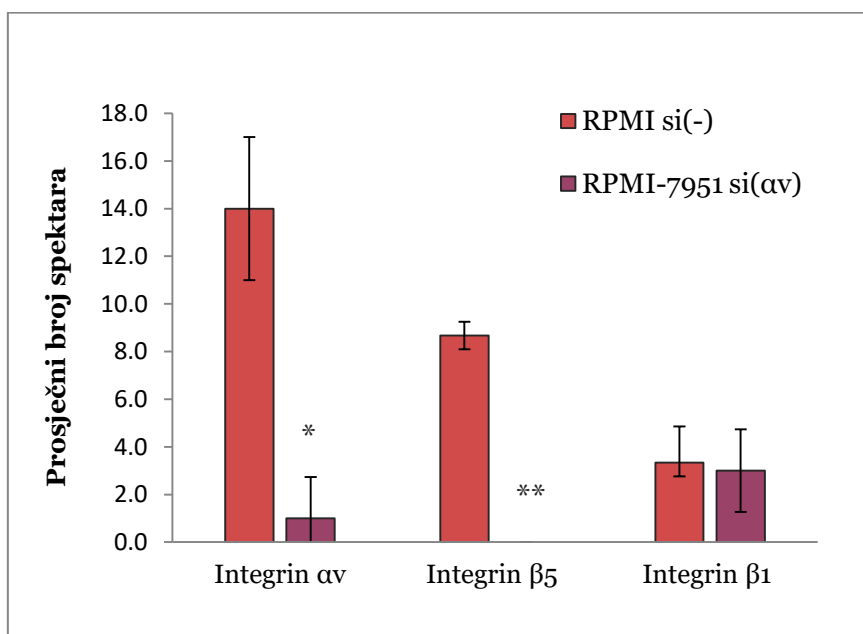


Slika 21. Predviđeni interaktom proteina povezanih s A) FA i B) ECM-om u stanicama RPMI-7951 transficiranim kontrolnom siRNA. Dva dana nakon transfekcije stanica RPMI-7951 kontrolnom siRNA izoliran je IAC i analiziran masenom spektrometrom. Proteini su identificirani programom Mascot i potvrđeni programom Scaffold. Za analizu su odabrani proteini identificirani s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom od tri uzorka RPMI-7951. Za probir proteina povezanih s FA-om i ECM-om korišten je alat DAVID Functional Annotation prema bazi GOTERM_CC_DIRECT. Kako bi se prikazao predviđeni interaktom korišten je program STRING. Svaki krug predstavlja jedan protein određene boje. Ispunjeni krug predstavlja protein kojemu je 3D struktura poznata ili predviđena. Poveznice označavaju izravne fizičke interakcije proteina. Značenje boja poveznica: plava, poznata interakcija potvrđena literaturom; ljubičasta, interakcija potvrđena pokusima; zelena, predviđena interakcija (sličan genomski kontekst u različitim vrstama sugerira sličnu funkciju proteina); žuta, statistički značajno pojavljivanja naziva gena zajedno u literaturi; crna, predviđena interakcija zasnovana na obrascima zajedničke ekspresije gena; svijetlo plava, predviđena interakcija proteina koji imaju sličnu funkciju ili su na istom metaboličkom putu. Značenje kratica imena proteina je navedeno na engleskom jeziku u Prilogu 9.3 u Tablici 29.

Prvi podatak koji smo željeli dobiti ovim pokusima jest kojim se integrinima stanice RPMI-7951 preferencijalno vežu za površinu prilikom rasta u kulturi. Zbog toga smo IAC izolirali iz stanica nasađenih na podlogu koja nije obložena nekim od proteina izvanstaničnog matriksa. To se značajno razlikuje od do sada objavljenih rezultata istraživanja adhesoma koji se temelje na nasađivanju stanica na neki od proteina izvanstaničnog matriksa, uglavnom fibronektin, čime se već unaprijed odabire koji integrini se mogu naći u adhesomu (Horton i ostali, 2015.; Horton, Humphries, James, i ostali, 2016.; Ng i ostali, 2014.; Robertson i ostali, 2015.; Schiller i ostali, 2011., 2013.). Analiza adhesoma u stanicama RPMI-7951 pokazuje ekspresiju integrinskih podjedinica αv , $\beta 5$ i $\beta 1$ s tim da je broj spektara najmanji za integrin $\beta 1$. Na temelju toga možemo zaključiti da stanice RPMI-7951 preferencijalno stvaraju IAC preko heterodimera integrina $\alpha v\beta 5$.

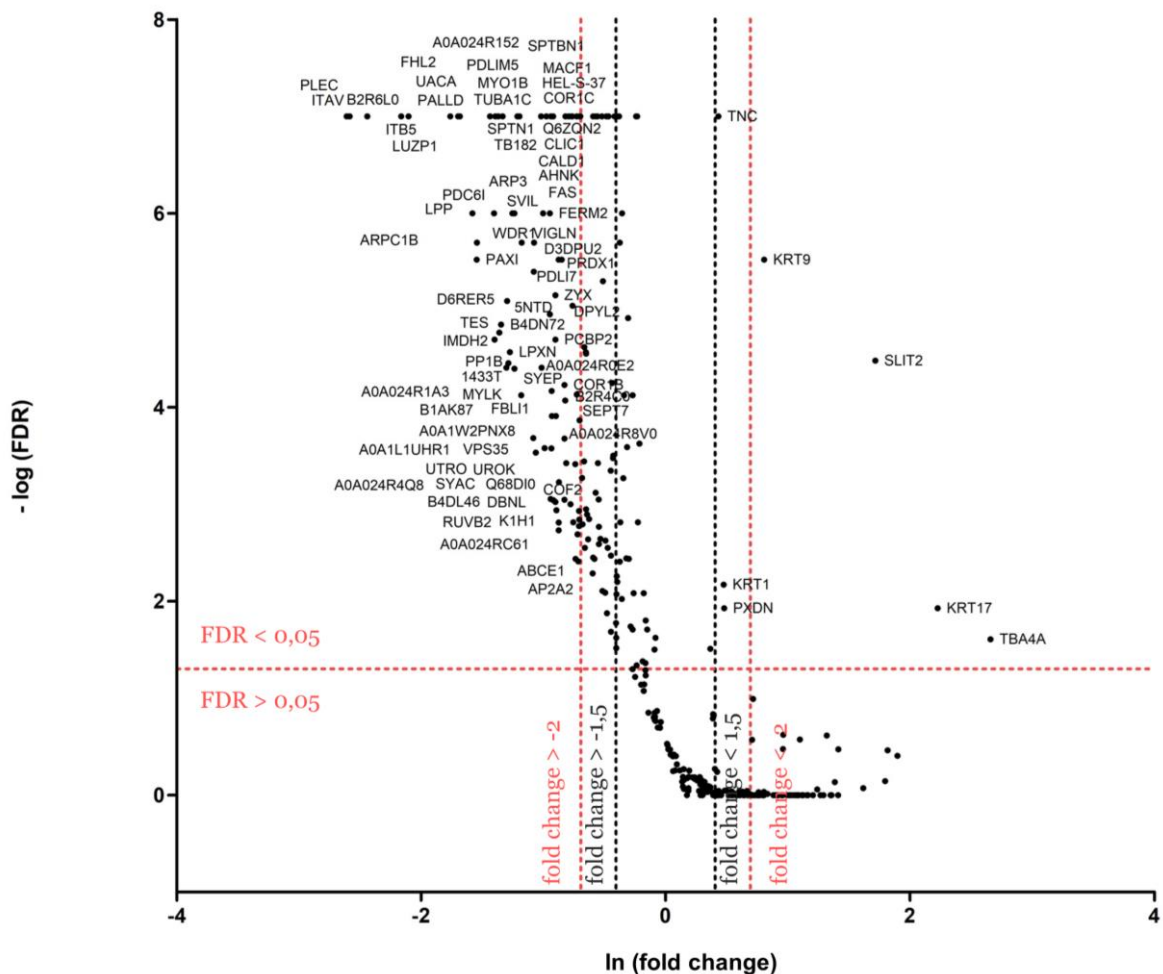
Drugi važan podatak je određivanje adhesoma integrina αv . Usporedbom broja spektara u adhesomu stanica RPMI-7951 transficiranih integrin αv -specifičnom siRNA u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA, identificirali smo proteine čija je količina različita i koji na temelju toga mogu biti smatrani dijelom adhesoma integrina αv . Tako je zabilježeno smanjenje količine integrinskih podjedinica αv i $\beta 5$ u uzorcima transficiranim integrin αv specifičnom siRNA, dok se količina integrina $\beta 1$ nije promijenila (Slika 22). Prema tome vrlo je vjerojatno da se stanice ne vežu putem integrina $\alpha v\beta 1$, a da se utišavanjem integrina αv smanjuje ekspresija glavnog integrina kojim se stanice RPMI-7951 vežu na površinu, integrina

$\alpha\beta 5$. Budući da smo prethodnim pokusima pokazali važnost integrina $\alpha\beta 5$ ne samo u preživljenju nego i u osjetljivosti na protutumorske lijekove i pokretljivosti, pronalazak da je integrin $\alpha\beta 5$ najzastupljeniji u stanicama RPMI-7951 dodatno potvrđuje naše rezultate.



Slika 22. Integrini identificirani u adhesomu stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom i integrin αv -specifičnom siRNA. Dva dana nakon transfekcije stanica RPMI-7951 kontrolnom siRNA (si(-)) ili integrin αv -specifičnom siRNA (si(αv)) izolirani su IAC-i i analizirani masenim spektrometrom. Spektri su identificirani programom Mascot i potvrđeni programom Scaffold. Prikazan je prosječni broj spektara sa standardnim devijacijama iz tri nezavisna pokusa. Značaj rezultata je testiran dvostrukim t-testom. Zvezdice označavaju P-vrijednosti: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Kako bi utvrdili proteini IAC-a ovisni o integrinu αv , proteini koji su pronađeni s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom uzorku, bilo RPMI-7951 si(-) ili RPMI-7951 si(αv) analizirani su u javno dostupnom programu QSpec/QProt (Choi i ostali, 2015.). Programom su izračunate vrijednosti pogrešnih pogodaka (engl. *false discovery rate*, FDR) i relativne promjene (engl. *fold change*) na temelju kojih se određivala značajnost promjene. Analizirani su dalje proteini čije su vrijednosti pogrešnih pogodaka bile manje od 0,05 (tj. negativni logaritam FDR veći od 1,3), a relativne promjene veće od 1,5 puta (tj. $\ln(\textit{fold change})$ veći ili manji od 0,405) (Slika 23).



Slika 23. Vulkano prikaz relativne promjene ekspresije proteina adhesoma i vrijednosti lažnih pogodaka u stanicama RPMI-7951 transficiranim integrin α -specifičnom siRNA u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA. Dva dana nakon transfekcije stanice RPMI-7951 kontrolnom siRNA ili integrin α -specifičnom siRNA izolirani su IAC-i i analizirani masenim spektrometrom. Proteini identificirani s minimalno 4 peptida su analizirani programom QSPEC/QPROT, a izračunate relativne promjene (engl. *fold change*, FC) i vrijednosti lažnih pogodaka (engl. *false discovery rate*, FDR) su prikazane na grafu. Crvene i crne isprekidane linije prikazuju granice značajnosti. Proteini sa smanjenom ekspresijom barem 2 puta i proteini povećani barem 1.5 puta su označeni kraticom, a popis svih značajno promijenjenih proteina, kao i objašnjenje kratica nalazi se u Tablici 30.

Nakon utišavanja integrinske podjedinice α v ekspresija 130 proteina je značajno promijenjena barem za 1,5 puta (Slika 23, crna isprekidana okomita crta). Ekspresija većine proteina je smanjena (123 proteina, lijevo od crne okomite isprekidane crte na grafu, a iznad crvene isprekidane paralelne crte), dok je samo njih 7 povećano: citoskeletni keratin 17 tip I, citoskeletni keratin 9 tip I, citoskeletni keratin 1 tip II,

tenascin C, homolog slit 2, homolog peroksidazina i α tubulin 4A (desno od crne okomite isprekidane crte na grafu, a iznad crvene isprekidane paralelne crte). Analiza ukupne liste značajno promijenjenih proteina adhesoma alatom DAVID Functional Annotation prema bazi GOTERM_CC_DIRECT pokazuje da je 31,9% proteina povezano s FA-om, a 25,5 % s ECM-om, 5 od 7 proteina povećane ekspresije povezano je s izvanstaničnim prostorom, a 3 od 7 s ECM-om. Proteini tenascin C, homolog slit 2 i homolog peroksidazina jedni su od malobrojnih proteina koji su povećano eksprimirani, ali imaju zajedničku karakteristiku da čine dio izvanstaničnog okoliša. Pojedinačnom analizom svakog od proteina integrin α v adhesoma u javno dostupnoj bazi podataka UniProt, a prema GO (engl. *gene ontology*) molekulskoj funkciji ili biološkom procesu, utvrđeno je da 49% adhesoma integrina α v čine proteini koji sudjeluju u organizaciji citoskeleta, najviše aktina; 18% čine enzime; 8% proteina citoskeleta uključujući aktin, tubulin, keratin; po 5% transmembranske proteine, gdje spadaju i integrini α v i β 5; proteine uključene u translaciju; i u transport proteina; 4% šaperone, a po 2% su proteini ECM-a; proteini koji vežu nukleinske kiseline; i proteini nepoznate funkcije (Tablica 30).

Kada smo postrožili uvjete relativne promjene za 2 puta (Slika 23, crvena okomita isprekidana crta) broj značajno promijenjenih proteina se smanjio na 88 (Tablica 30), od kojih su tri najzastupljenije funkcionalne skupine prema alatu DAVID Functional Annotation prema bazi GOTERM_CC_DIRECT (Huang, Brad T Sherman, i ostali, 2009; Huang, Brad T. Sherman, i ostali, 2009): FA (40,2% od ukupno promijenjenih proteina), stresna vlakna / aktin (40,%) i citoskelet (23,2%) (Tablica 27), a 19,5% sa staničnim izdancima, dok je manje od 5% proteina povezano s intermedijarnim filamentima, kompleksom miozina, integrinima, melanosomom ili mikrotubulima.

Od ukupno promijenjenih proteina, ekspresija samo njih četiri se povećala, i to: citoskeletni keratin 17 tip I, citoskeletni keratin 9 tip I, homolog slita 2 i α tubulin 4A (desno od crvene okomite isprekidane crte na grafu, a iznad crvene isprekidane paralelne crte). Nijedan od ovih proteina nije dio konsensus-adhesoma. Dva proteina

povećane ekspresije su povezani s ECM-om: homolog slita 2 i homolog peroksizadina. Ekspresija pak 84 proteina IAC-a se smanjila u stanicama sa smanjenom ekspresijom integrina α_v , od kojih je 33 povezano s fokalnim adhezijama prema alatu DAVID Functional Annotation i sadrži 12 proteina konsenzus-adhesoma: filamin-vezujući LIM protein 1 (FBLIM1, migfilin), homolog fermitin obitelj 2 (FERMT2, kindlin-2, MIG-2), protein 2 s četiri i pol LIM domene (FHL2), integrin α_v , preferentni partner lipoma proteina, paladin, α parvin, paksilin, protein 1 s PDZ i LIM domenom, protein 7 s PDZ i LIM domenom, testin i ziksin. Protein 5 s PDZ i LIM domenom (izoforna CRA_c) i kaldezmon (izoforna CRA_i) su također smanjeni u stanicama sa smanjenom ekspresijom integrina α_v i dio su konsenzus-adhesoma, međutim prema DAVID-analizi nisu svrstani u proteine FA.

Tablica 27. Funkcionalno tumačenje proteina promijenjenih barem 2 puta u IAC-u stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice α_v . Dva dana nakon prolaznog utišavanja kontrolnom ili integrin α_v -specifičnom siRNA iz stanica su izolirani IAC-i i analizirani na masenom spektrometru. Identifikacija je provedena programom Mascot i potvrđena programom Scaffold. Proteini identificirani s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom od uzoraka su analizirani u javno dostupnom programu QSpec/QProt (Choi i ostali, 2015). Programom su izračunate vrijednosti pogrešnih pogodaka (engl. *false discovery rate*, FDR) i relativne promjene (engl. *fold change*) na temelju kojih se određivala značajnost promjene u ekspresiji, točnije proteini čije su vrijednosti lažnih pogrešnih pogodaka bile manje od 0,05 a relativne promjene veće od 2 puta. Korištenjem alata DAVID Functional Annotation prema bazi GOTERM_CC_DIRECT i proteini su podijeljeni u funkcionalne skupine (% od ukupnih proteina), naznačene podebljanim slovima u tablici. Slične funkcionalne skupine su spojene u jednu. Imena proteina su na engleskom jeziku.

Broj	Pristupna oznaka proteina	Ime proteina na engleskom jeziku
Fokalne adhezije (40,2%)		
1	AHNK	<i>AHNAK nucleoprotein</i>
2	ARP3	<i>ARP3 actin related protein 3 homolog</i>
3	LIMA1	<i>LIM domain and actin binding 1</i>
4	LPP	<i>LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma</i>
5	PDLI1	<i>PDZ and LIM domain 1</i>
6	PDLI7	<i>PDZ and LIM domain 7</i>
7	TARA	<i>TRIO and F-actin binding protein</i>
8	CAP1	<i>adenylate cyclase associated protein 1</i>
9	ANXA5	<i>annexin A5</i>

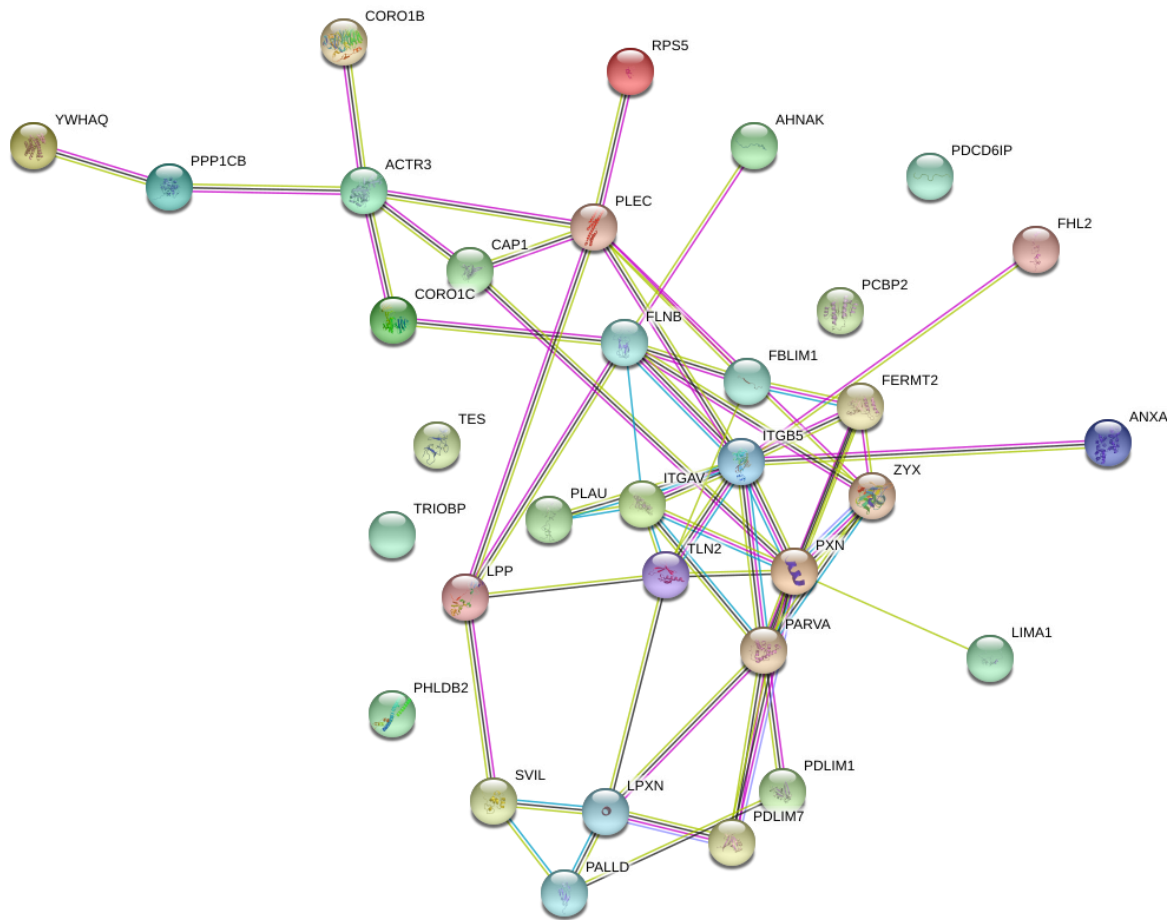
10	COR1B	<i>coronin 1B</i>
11	COR1C	<i>coronin 1C</i>
12	FERM2	<i>fermitin family member 2</i>
13	FLNB	<i>filamin B</i>
14	FBLI1	<i>filamin binding LIM protein 1</i>
15	FHL2	<i>four and a half LIM domains 2</i>
16	ITAV	<i>integrin subunit alpha V</i>
17	ITB5	<i>integrin subunit beta 5</i>
18	LPXN	<i>leupaxin</i>
19	PALLD	<i>palladin, cytoskeletal associated protein</i>
20	PARVA	<i>parvin alpha</i>
21	PAXI	<i>paxillin</i>
22	UROK	<i>plasminogen activator, urokinase</i>
23	E9PFQ4	<i>pleckstrin homology like domain family B member 2</i>
24	E9PMV1	<i>plectin</i>
25	PCBP2	<i>poly (rC) binding protein 2</i>
26	PDC6I	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>
27	PP1B	<i>protein phosphatase 1 catalytic subunit beta</i>
28	RPS5	<i>ribosomal protein S5</i>
29	SVIL	<i>supervillin</i>
30	TLN2	<i>talin 2</i>
31	TES	<i>testin LIM domain protein</i>
32	1433T	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta</i>
33	ZYX	<i>zyxin</i>
Aktin /stresna vlakna (40,2%)		
1	AHNK	<i>AHNAK nucleoprotein</i>
2	ARP3	<i>ARP3 actin related protein 3 homolog</i>
3	LIMA1	<i>LIM domain and actin binding 1</i>
4	AoA024RDE8	<i>PDZ and LIM domain 5</i>
5	PDLI7	<i>PDZ and LIM domain 7</i>
6	TARA	<i>TRIO and F-actin binding protein</i>
7	AoA140VKA0	<i>caldesmon 1</i>
8	AoA024RoE5	<i>capping actin protein of muscle Z-line alpha subunit 1</i>
9	B1AK87	<i>capping actin protein of muscle Z-line beta subunit</i>

10	COF2	<i>cofilin 2</i>
11	COR1B	<i>coronin 1B</i>
12	COR1C	<i>coronin 1C</i>
13	FLNB	<i>filamin B</i>
14	FHL2	<i>four and a half LIM domains 2</i>
15	MYH10	<i>myosin heavy chain 10</i>
16	PALLD	<i>palladin, cytoskeletal associated protein</i>
17	PARVA	<i>parvin alpha</i>
18	SEPT7	<i>septin 7</i>
19	AoA024R8Vo	<i>septin 9</i>
20	SVIL	<i>supervillin</i>
21	TLN2	<i>talin 2</i>
22	WDR1	<i>WD repeat domain 1</i>
23	D3DPU2	<i>adenylate cyclase associated protein 1</i>
24	UTRO	<i>utrophin</i>
25	IMA1	<i>LIM domain and actin binding 1</i>
26	FERM2	<i>fermitin family member 2</i>
27	FBLI1	<i>filamin binding LIM protein 1</i>
28	ML12A	<i>myosin light chain 12A</i>
29	MYLK	<i>myosin light chain kinase</i>
30	PAXI	<i>paxillin</i>
31	D6RER5	<i>septin 11</i>
32	ZYX	<i>zyxin</i>
33	MYO1B	<i>myosin IB</i>
Stanični izdanci: lamelipodij /filopodij/ podosom (19,5%)		
1	ARP3	<i>ARP3 actin related protein 3 homolog</i>
2	B1AK87	<i>capping actin protein of muscle Z-line beta subunit</i>
3	COR1B	<i>coronin 1B</i>
4	COR1C	<i>coronin 1C</i>
5	DBNL	<i>drebrin like</i>
6	MYH10	<i>myosin heavy chain 10</i>
7	MYLK	<i>myosin light chain kinase</i>
8	PALLD	<i>palladin, cytoskeletal associated protein</i>
9	PARVA	<i>parvin alpha</i>
10	PAXI	<i>paxillin</i>

11	WDR1	<i>WD repeat domain 1</i>
12	ITAV	<i>integrin subunit alpha V</i>
13	UTRO	<i>utrophin</i>
14	FERM2	<i>fermitin family member 2</i>
15	LPXN	<i>leupaxin</i>
16	SVIL	<i>supervillin</i>
Citoskelet (23,2 %)		
1	PDLI1	<i>PDZ and LIM domain 1</i>
2	AoA140VKA0	<i>caldesmon 1</i>
3	AoA024RoE5	<i>capping actin protein of muscle Z-line alpha subunit 1</i>
4	B1AK87	<i>capping actin protein of muscle Z-line beta subunit</i>
5	DPYL2	<i>dihydropyrimidinase like 2</i>
6	FERM2	<i>fermitin family member 2</i>
7	H3BQK9	<i>microtubule-actin crosslinking factor 1</i>
8	PARVA	<i>parvin alpha</i>
9	PAXI	<i>paxillin</i>
10	E9PMV1	<i>plectin</i>
11	TB182	<i>tankyrase 1 binding protein 1</i>
12	UTRO	<i>utrophin</i>
13	UACA	<i>uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats</i>
Intermedijarni filamenti (4,9%)		
1	K1C17	<i>keratin 17</i>
2	K1H1	<i>keratin 31</i>
3	KRT86	<i>keratin 86</i>
4	K1C9	<i>keratin 9</i>
Kompleks miozina (3,7%)		
1	MYO1B	<i>myosin IB</i>
2	MYH10	<i>myosin heavy chain 10</i>
3	ML12A	<i>myosin light chain 12A</i>
Integrini (2.4%)		
1	ITAV	<i>integrin subunit alpha v</i>
2	ITB5	<i>integrin subunit beta 5</i>
Melanosom (4,9%)		
1	FAS	<i>fatty acid synthase</i>
2	HS90B	<i>heat shock protein 90 alpha family class B member 1</i>

3	PRDX1	<i>peroxiredoxin 1</i>
4	PDC6I	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>
Mikrotubuli (6,1%)		
1	DPYL2	<i>dihydropyrimidinase like 2</i>
2	H3BQK9	<i>microtubule-actin crosslinking factor 1</i>
3	AoA024R8Vo	<i>septin 9</i>
4	F5H5D3	<i>tubulin alpha 1c</i>
5	TBA4A	<i>tubulin alpha 4a</i>

Predviđeni interaktom promijenjenih proteina povezanih s FA-om čija je ekspresija značajno promijenjena barem dva puta u RPMI-7951 si(α) naspram RPMI-7951 si(-) izrađen je programom STRING i prikazan na Slici 24. Ova analiza je pokazala da su promijenjeni proteini u bliskom kontaktu te da između njih postoji veliki broj mogućih interakcija.



Slika 24. Predviđeni interaktom proteina FA integrin αv adhesoma stanica RPMI-7951. Dva dana nakon transfekcije stanica RPMI-7951 kontrolnom ili integrin αv -specifičnom siRNA izolirani su IAC-i i analizirani spektrometrom masa. Proteini su identificirani programom Mascot i potvrđeni programom Scaffold. Za analizu su odabrani proteini identificirani s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom od tri uzorka, bilo RPMI-7951 si(-) ili RPMI-7951 si(αv). Za probir proteina povezanih s FA-om korišten je alat DAVID Functional Annotation prema bazi GOTERM_CC_DIRECT. Proteini čija se ekspresija značajno razlikuje između RPMI-7951 si(-) i RPMI-7951 (αv) analizirani su programom STRING. Svaki krug predstavlja jedan protein određene boje. Ispunjeni krug predstavlja protein kojemu je 3D struktura poznata ili predviđena. Poveznice označavaju izravne fizičke interakcije proteina. Značaj boje poveznica: tamno plava, poznata interakcija potvrđena literaturom; ljubičasta, interakcije potvrđena pokusima; zelena, predviđena interakcija na temelju pretpostavke da sličan genomski kontekst u različitim vrstama sugerira sličnu funkciju proteina; žuta, predviđena interakcija na temelju statistički značajnog pojavljivanja naziva gena zajedno u literaturi; crna, predviđena interakcija zasnovana na obrascima zajedničke ekspresije gena; svijetlo plava, predviđena interakcija proteina na temelju slične funkcije ili dijeljenja istog metaboličkog puta. Kratice su objašnjene u Tablici 27.

4. RASPRAVA

Iako terapija klasičnim protutumorskim lijekovima više nije metoda odabira za liječenje metastatskog melanoma, i dalje ima ulogu u liječenju melanoma bez mutacija i onih koji su postali neosjetljivi na ciljanu terapiju (Leon-Ferre i Marković, 2015). Brža pojava otpornosti melanoma liječenog jednom ciljanom terapijom u usporedbi s kombinacijskim liječenjem sugerira da je potrebno ciljati više signalnih puteva za maksimalnu učinkovitost.

Integrini su adhezivni transmembranski proteini preko kojih se aktivno prenose signali preživljenja, proliferacije, diferencijacije i migracije stvaranjem višemolekulskog kompleksa proteina s unutrašnje strane stanične membrane koji se naziva IAC. Pokazano je da tumorske stanice mogu preživjeti u prisutnosti protutumorskog lijeka putem povećanja ekspresije ili promjene repertoara integrina na svojoj površini i zato integrini predstavljaju potencijalno dobre ciljane molekule za terapiju (Dickreuter i Cordes, 2017.; Raab-Westphal i ostali, 2017.).

Ciljanje najveće obitelji integrina $\beta 1$ pokazalo se u mnogim modelima tumora povoljnim za povećanje osjetljivosti na protutumorske lijekove i smanjenje metastatskog potencijala (Aoudjit i Vuori, 2001.; Lahlou i Muller, 2011.). Međutim, integrin $\beta 1$ stvara heterodimere s velikim brojem podjedinica α (Hynes i Naba, 2012.) te njegovo utišavanje može dovesti do neočekivanog učinka na repertoar heterodimera integrina koji ne moraju nužno imati pozitivan učinak na terapiju. Tako je u modelu nekoliko staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke čovjeka nakon utišavanja integrina $\beta 1$ pokazan fenomen preslagivanja integrina, odnosno povećanje ekspresije integrina $\alpha v \beta 3$ koje je dovelo do povećanog metastaziranja (Parvani i ostali, 2013.; Truong i ostali, 2014.). Zato smo u ovom radu odlučili usmjeriti naše istraživanje na integrinske podjedinice α koje imaju manje β partnere za vezivanje, čime smo očekivali manju vjerojatnost za preslagivanje integrina. Odabir integrinskih podjedinica α temeljili smo na literaturnim podacima ekspresije integrina u metastatskom melanomu. Integrinske podjedinice $\alpha 3$, $\alpha 4$ ili αv povećano su eksprimirane u stanicama metastatskog melanoma (Huang i Rofstad, 2018.;

Melchiori i ostali, 1995.) te smo željeli istražiti može li se utišavanjem ekspresije jedne od tih podjedinica stanične linije melanoma čovjeka učiniti osjetljivijima na jedan od tri protutumorska lijeka (cisplatinu, paklitaksel ili vinkristin) i istovremeno smanjiti pokretljivost, odnosno migratornu i invazivnu sposobnost stanica *in vitro*.

Istraživanje smo započeli na modelnoj staničnoj liniji melanoma MDA-MB-435S koja ne eksprimira integrin $\alpha\beta_1$ što pojednostavljuje istraživanje $\alpha\gamma$ podjedinica, jer su jedini $\alpha\gamma$ heterodimeri na površini ovih stanica integrini $\alpha\beta_3$ i $\alpha\beta_5$ (Wong i ostali, 1998.). Pokazali smo da utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_4 ili $\alpha\gamma$ povećava osjetljivost stanica na paklitaksel ili vinkristin, dok utišavanje integrinske podjedinice α_3 ima suprotni učinak. Utvrdili smo kako utišavanje podjedinice β_3 ili β_5 pojedinačno (ciljajući time heterodimere integrina $\alpha\beta_3$ ili $\alpha\beta_5$) različito djeluje na osjetljivost na paklitaksel ili vinkristin. Utišavanje β_3 rezultiralo je smanjenom, dok utišavanje β_5 povećanom osjetljivošću. Zaključili smo da upravo signalni put koji potiče integrin $\alpha\beta_5$ štiti stanice MDA-MB-435S od djelovanja otrova mikrotubula. Također smo pokazali kako utišavanje integrina α_4 ima povoljan učinak na djelovanje cisplatine u istom staničom modelu, dok je utišavanje ostalih podjedinica smanjilo osjetljivost stanica na lijek (Stojanovic i ostali, 2018. i ovaj rad). Kako u pravilu u stanicama tumora integrini okidaju signale preživljenja, očekivali smo da će utišavanje integrina uglavnom povećavati osjetljivost na protutumorske lijekove (Desgrosellier i Cheresch, 2010.) te su nas iznenadili primjeri smanjenja osjetljivosti stanica MDA-MB-435S na lijekove nakon utišavanja integrinskih podjedinica. Budući da je cilj našeg rada bio pronalazak kombinacije integrin/protutumorski lijek pri čemu utišavanje integrina povećava osjetljivost na protutumorski lijek, nismo dalje istraživali uzroke uočene smanjene osjetljivosti. S obzirom da utišavanje podjedinica β_3 i β_5 nema jednaki učinak na modulaciju osjetljivosti na otrove mikrotubula (paklitaksel i vinkristin) i cisplatinu može se pretpostaviti da ova dva integrina imaju odvojene signalne puteve. U literaturi postoji više primjera o pojavi istovremene osjetljivosti na cisplatinu u stanicama koje su razvile otpornost na paklitaksel, a za neke je pokazano da su posredovane smanjenjem ekspresije gena *BRCA1* (Stordal i Davey, 2007.).

Integrini imaju važnu ulogu u migraciji i invaziji (Ganguly i ostali, 2013.). Kako nam je cilj bio pronaći integrinsku podjedinicu čije će utišavanje povećati osjetljivost na protutumorske lijekove i istovremeno smanjiti pokretljivost stanica, provjerena je migracijska i invazijska sposobnost stanica MDA-MB-435S *in vitro* (Stojanović i ostali, 2018. i ovaj rad). Iznenadujuće, utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_4 je povećalo migraciju, broj fokalnih adhezija i količinu stresnih vlakana (Stojanović i ostali, 2018.). To je u suprotnosti s drugim podacima iz literature, koji su u stanicama melanoma miša B16-F1 pokazali korelaciju ekspresije α_4 s metastaziranjem u limfne čvorove (Rebhun i ostali, 2010.). Budući da u stanicama MDA-MB-435S integrin α_4 tvori heterodimer samo s β_1 (Hynes i Naba, 2012.), pretpostavili smo da je uzrok tome preslagivanje integrina tj. da utišavanje integrinske podjedinice α_4 oslobađa podjedinicu β_1 koja može stvoriti heterodimer sa slobodnim α podjedinicama u stanici. Kako bi osnažili ovu hipotezu, utišali smo ekspresiju integrina α_3 (integrin α_3 također tvori heterodimer samo s β_1 (Hynes i Naba, 2012.)) za kojeg je pokazano da korelira sa sposobnošću metastaziranja (Melchiori i ostali, 1995.; Yoshinaga i ostali, 1993.). Zabilježili smo mali porast migratorne sposobnosti stanica. To govori u prilog hipotezi da je oslobađanje podjedinice β_1 , nakon utišavanja podjedinica α_4 ili α_3 , mogući uzrok povećane migracije stanica MDA-MB-435S. U prilog hipotezi o preslagivanju integrina kao uzroku povećane migracije nakon utišavanja podjedinica α_3 ili α_4 u našem modelu govori i podatak da je u kulturi stanica primarnog i metastatskog melanoma iz istog pacijenta pokazano da inhibicija α_3 integrina blokirajućim protututijelima smanjuje pokretljivost stanica (Yoshinaga i ostali, 1993.). Naime, kod inhibicije integrina $\alpha_3\beta_1$ blokirajućim protututijelima neće doći do oslobađanja podjedinice β_1 te je vjerojatnost za preslagivanje integrina manja. Ipak, iz literature saznajemo da je preslagivanje integrina moguće i nakon inhibicije protututijelima. Naime, Lichtner i ostali (1998) su u modelu stanica karcinoma dojke čovjeka MDA-MB-231 pokazali da inhibicija $\alpha_3\beta_1$ dvama različitim monoklonskim protututijelima povećava adheziju na kolagen, što bi upućivalo na povećanje ekspresije kolagen-vezujućih integrina. Budući da je repertoar integrina jedinstven za svaku stanicu, posebice za stanice tumora, teško je

predvidjeti ishod nakon utišavanja integrina koji sudjeluju u različitim heterodimerima. Osim toga, vrlo je vjerojatno da je preslagivanje integrina specifično za vrstu stanice. Činjenice koje potvrđuju tu hipotezu objavila je grupa u kojoj je izrađena ova doktorska disertacija. U stanicama karcinoma grkljana čovjeka HEP2 je umjerena *de novo* ekspresija integrina $\beta 3$ povećala ekspresiju integrina $\alpha \beta 3$, ali nije mijenjala ekspresiju integrina $\alpha \beta 5$. Međutim u klonovima stanica HEP2, u kojima je ekspimirana velika količina integrina $\alpha \beta 3$, došlo je do smanjene ekspresije integrina $\alpha \beta 5$ zbog natjecanja za slobodnu podjedinicu α (Ambriović-Ristov i ostali, 2004). Potpuno drugačiji profil integrinskog preslagivanja primijećen je u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka Cal27. *De novo* ekspresija integrina $\beta 3$ je istovremeno dovela do povećane ekspresije heterodimera integrina $\alpha \beta 3$, ali i $\alpha \beta 5$. Međutim, upravo je integrin $\alpha \beta 3$, a ne integrin $\alpha \beta 5$, bio odgovoran za smanjenje osjetljivosti na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C (Stojanović i ostali, 2016). Neobjavljeni rezultati na istom staničnom modelu Cal27 pokazali su da je u ovim stanicama došlo do još jednog primjera preslagivanja integrina. Točnije, *de novo* ekspresija gena integrina $\beta 3$ dovela je i do povećane ekspresije lamininskog receptora, integrina $\alpha 6 \beta 4$ (Dekanić i ostali, neobjavljeni rezultati).

Za integrine $\alpha \nu$ je poznato da imaju ulogu u migraciji i invaziji tumorskih stanica (Desgrosellier i Cheresch, 2010). Pokazali smo da utišavanje integrinske podjedinice $\alpha \nu$ snažno smanjuje migraciju (Stojanović i ostali, 2018) i invaziju (ovaj rad) stanica MDA-MB-435S. U radu Stojanović i ostali (2018) istražili smo koji od heterodimera integrina $\alpha \nu$, $\alpha \beta 3$ ili $\alpha \beta 5$, je za to odgovoran. Zanimljivo je da utišavanje integrinskih podjedinica $\beta 3$ ili $\beta 5$ nema utjecaj na migraciju što je vrlo vjerojatno zbog uočenog fenomena integrinskog preslagivanja između $\alpha \beta 3$ i $\alpha \beta 5$ integrina primijećenog analizom površinske ekspresije. Naime, utišavanje $\beta 3$ podjedinice povećava ekspresiju heterodimera $\alpha \beta 5$, a utišavanje $\beta 5$ povećava ekspresiju heterodimera $\alpha \beta 3$ na površini MDA-MB-435S stanica, dok se ukupna površinska ekspresija $\alpha \nu$ podjedinice ne mijenja. To upućuje na zaključak da su u ovim stanicama oba integrina, $\alpha \beta 3$ i $\alpha \beta 5$, uključena u migraciju. Ovaj fenomen preslagivanja integrina koji smo nazvali „učinak vage“ također može objasniti rezultat oprečne

modulacije osjetljivosti stanica na paklitaksel nakon utišavanja integrina β_3 i β_5 . Naime, u ovom radu je pokazano da utišavanje integrinske podjedinice β_5 povećava osjetljivost na paklitaksel, dok ju utišavanje β_3 smanjuje, i to vrlo vjerojatno zbog povećanja ekspresije integrina $\alpha\beta_5$. U literaturi postoji iznimno malo podataka o regulaciji ekspresije heterodimera integrina $\alpha\beta_3$ i $\alpha\beta_5$, ali i vrlo malo podataka o preslagivanju integrina. No u stanicama melanoma WM-266-4 istražena je regulacija ekspresije heterodimera $\alpha\beta_3$, $\alpha\beta_5$ i $\alpha\beta_1$ na površini. Pokazano je da je ekspresija $\alpha\beta_3$ i $\alpha\beta_5$ regulirana na razini β_3 i β_5 gena, a da ekspresija α gena diktira ekspresiju $\alpha\beta_1$ (Koistinen i ostali, 2004.). Budući da MDA-MB-435S stanice nemaju integrin $\alpha\beta_1$ (Wong i ostali, 1998.), uočeno integrinsko preslagivanje je u skladu s predloženim modelom regulacije.

S obzirom na rezultate dobivene u staničnoj liniji MDA-MB-435S, odlučili smo ne nastaviti s istraživanjem integrina α_3 ili α_4 , jer je pokazana ili smanjena osjetljivost na protutumorske lijekove ili povećana *in vitro* migracija nakon utišavanja njihove ekspresije, što ne bi išlo u korist uspješnoj terapiji melanoma. Na temelju prethodno opisanih rezultata u stanicama melanoma MDA-MB-435S, izabrana je integrinska podjedinica α_v kao potencijalna meta čije bi utišavanje moglo povećati učinak protutumorskog lijeka i istovremeno smanjiti metastaziranje. Kako bismo dodatno potvrdili rezultate nakon utišavanja α_v u stanicama MDA-MB-435S, pokuse mjerenja ekspresije integrina protočnom citometrijom i MTT nakon djelovanja paklitaksela smo ponovili s drugom integrin α_v -specifičnom siRNA (ID s7569, Thermo Fisher Scientific, SAD) koja cilja drugi slijed nukleotida u mRNA i pokazali slične rezultate (rezultati nisu pokazani). Time smo potvrdili da rezultati povećanja osjetljivosti na lijekove nakon utišavanja integrinske podjedinice α_v koje smo dobili nisu rezultat nespecifičnog učinka korištene siRNA (engl. *off target effect*).

Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_v prolaznom transfekcijom specifičnih siRNA je provedeno u tri dodatne stanične linije melanoma čovjeka (RPMI-7951, A375 i MeWo). Rezultati u stanicama RPMI-7951 su pokazali povećanje osjetljivosti na cisplatinu, paklitaksel ili vinkristin nakon utišavanja integrina α_v , što je pozitivno

za terapiju. Suprotno tome, utišavanje ekspresije integrina αv u stanicama A375 i MeWo dovelo je do smanjenja osjetljivosti na sva tri protutumorska lijeka. Istražujući dalje koji od αv integrina, $\alpha v\beta 3$ ili $\alpha v\beta 5$, je uključen u mehanizam povećanja osjetljivosti na paklitaksel ili vinkristin u stanicama RPMI-7951, pokazali smo da se utišavanjem oba integrina povećava osjetljivosti na ove lijekove, što je u skladu s pozitivnim učinkom utišavanja integrinske podjedinice αv . Međutim, analiza ekspresije integrina $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ je pokazala da utišavanje $\beta 3$ smanjuje ekspresiju heterodimera $\alpha v\beta 5$ i ukupne αv podjedinice, a utišavanje $\beta 5$ povećava ekspresiju $\alpha v\beta 3$, ali smanjuje ukupnu količinu podjedinice αv , ukazujući ponovo na fenomen preslagivanja integrina. Stoga je moguće pretpostaviti da je glavni integrin odgovoran za povećanje osjetljivosti upravo $\alpha v\beta 5$, ali se ne može u potpunosti isključiti integrin $\alpha v\beta 3$. Važnost integrina $\alpha v\beta 5$ u osjetljivosti na otrove mikrotubula u stanicama RPMI-7951 je u skladu s rezultatima dobivenim u modelu stanica MDA-MB-435S.

Iako je u stanicama MeWo i A375 zabilježena smanjena osjetljivost na paklitaksel, vinkristin i cisplatinu, u stanicama MeWo smo istražili kako utišavanje podjedinica integrina $\beta 3$ ili $\beta 5$ djeluje na osjetljivost na paklitaksel ili vinkristin. U oba slučaja pokazano je smanjenje osjetljivosti u skladu s učinkom utišavanja ukupnih integrina αv . U stanicama MeWo nije uočen „učinak vage“ kao u stanicama MDA-MB-435S (Stojanović i ostali, 2018.), ali je uočeno integrinsko preslagivanje: utišavanje $\beta 5$ je povećalo ekspresiju $\alpha v\beta 3$ pa se može pretpostaviti da, kao i u stanicama RPMI-7951 i MDA-MB-435S, integrin $\alpha v\beta 5$ ima ključnu ulogu u modulaciji osjetljivosti na protutumorske lijekove.

Utvrđena važnost integrina $\alpha v\beta 5$ u modulaciji osjetljivosti staničnih linija melanoma na otrove mikrotubula, ali i na cisplatinu, razlikuje se od objavljenih rezultata grupe u kojoj je izrađen ovaj rad u modelu stanica tumora glave i vrata, HEP2 i Cal27, ali i od rezultata dobivenih u nekoliko staničnih linija glioblastoma. Ti rezultati su pokazali važnost *de novo* ekspresije integrina $\alpha v\beta 3$ u smanjenju osjetljivosti na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C, dok promjena ekspresije integrina $\alpha v\beta 5$ nije imala utjecaj na osjetljivost (Brozović i ostali, 2008.; Stojanović i ostali, 2016.). Zanimljivo

je da u nekoliko staničnih linija glioblastoma utišavanje sve tri integrinske podjedinice α , koje smo istraživali u ovoj doktorskoj disertaciji, α_v , α_3 i α_4 , ali i podjedinica β_3 i β_5 povećava osjetljivost stanica na temozolomid. Ipak, ovaj učinak je bio najizraženiji za utišavanje β_3 (Christmann i ostali, 2017.)

Utišavanje α_v u stanicama RPMI-7951 snažno smanjuje *in vitro* migraciju i invaziju, a osim toga pokazana je i ključna uloga integrina $\alpha_v\beta_5$ u migraciji. Iako pozitivan učinak kombinacije utišavanja integrina α_v i paklitaksela nije pokazan u staničnim linijama melanoma A375 i MeWo, u stanicama A375 utišavanje α_v također snažno smanjuje *in vitro* migraciju. To pokazuje da su signalni putevi koji određuju osjetljivost na protutumorske lijekove i migraciju različiti. U stanicama glioblastoma U138MG utišavanje integrina α_v , α_3 , α_4 , β_3 ili β_5 je smanjilo migraciju, gdje je nasnažniji učinak na migraciju imao integrin α_v (Christmann i ostali, 2017.).

Poznato je da je fosforilacija Pax-a (Y31 i Y113) nakon aktivacije integrina važna za stvaranje FA te organizaciju aktinskog citoskeleta i pokretljivost stanica (Nakamura i ostali, 2000). Stoga smo istražili utječe li utišavanje integrinske podjedinice α_v na pPax, preoblikovanje FA, aktinskog i tubulinskog citoskeleta u stanicama RPMI-7951. Stanice RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrina α_v su manje raširene, aktinska mreža je manje organizirana, dolazi do gubitka stresnih vlakana i značajnog gubitka pPax-a (Y113), kao i smanjenja broja FA po stanici. Zabilježili smo i smanjenje prosječne veličine FA što je u skladu sa smanjenjem migracije primjećenim nakon utišavanja α_v . Naime, u stanicama fibrosarkoma čovjeka HT-1080 i fibroblasta embrija miša pokazano je da migracija stanica ovisi o veličini FA prema Gausovoj distribuciji. Točnije, povećanjem veličine FA povećava se migracija stanica do optimalne vrijednosti, nakon čega se daljnjim povećanjem veličine FA migracija smanjuje (Kim i Wirtz, 2013). S obzirom na to da je pokazano da integrini potiču nukleaciju, rast i stabilizaciju mikrotubula u staničnom korteksu (LaFlamme i ostali, 2018.), iznenadilo nas je da utišavanje integrinske podjedinice α_v nije promijenilo organizaciju tubulinske mreže u stanicama RPMI-7951 promatranu metodom imunofluorescencije pomoću konfokalne mikroskopije. Međutim, naša istraživanja nisu obuhvatila promjene u dinamici mikrotubula.

Paklitaksel i vinkristin su otrovi mikrotubula koji protutumorsko djelovanje ostvaruju kinetičkom stabilizacijom dinamike diobenog vretena mikrotubula, koje vodi do zaustavljanja mitoze i smrti stanica (Jordan i Kamath, 2007.; Weaver, 2014.). Mehanizmi smanjene osjetljivosti na paklitaksel mogu biti prekomjerna ekspresija P-glikoproteina 1 (engl. *multi-drug resistance*, MDR-1), mutacija ciljne molekule beta-tubulina, promjene regulatora apoptoze i proteina kontrolnih točaka mitoze, promjene u sastavu lipida, prekomjerna ekspresija interleukina 6 (IL-6) te promjene u proteinima citoskeleta ili povezanih s citoskeletom (Yang i ostali, 2017.; Yusuf i ostali, 2003.). Kako smo zabilježili povećanu osjetljivost na otrove mikrotubula nakon utišavanja integrina, promjena u tubulinu mutacijom nije vjerojatna kao uzrok. U modelu stanica MDA-MB-435S nakon utišavanja podjedinice integrina αv provjerili smo sposobnost izbacivanja lijeka pomoću kalceina te nismo zabilježili nikakvu promjenu (Stojanović i ostali, 2018.). Ono što smo pokazali jest da stanice MDA-MB-435S, kao i stanice RPMI-7951, nakon utišavanja integrinske podjedinice αv i izlaganja paklitakselu, pokazuju povećani broj stanica u apoptozi. Povećanje apoptoze u stanicama MDA-MB-435S je dva puta, no u stanicama RPMI-7951 razlika je vrlo mala, samo je oko 5% više stanica u apoptozi nego u kontrolnim stanicama. Pretpostavljamo da u stanicama MDA-MB-435S povećanje osjetljivosti stanica na paklitaksel uključuje i promjene u putevima apoptoze, no u stanicama RPMI-7951 vrlo je vjerojatno da su za sinergistički učinak utišavanja podjedinice integrina αv i paklitaksela odgovorni i drugi mehanizmi. Na primjer, u stanicama tumora jajnika Hey otpornih na otrove mikrotubula je pokazano niz promjena u ekspresiji proteina povezanih s citoskeletom, kao što su galektin-1, 14-3-3 σ i fosforilirani statmin (Albrethsen i ostali, 2014.). Kako bismo detaljnije istražili uočeno povećanje osjetljivosti stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrina αv na protutumorske lijekove, naša istraživanja su uključila i istraživanja sastava IAC-a stanica RPMI-7951 (diskusija u daljnjem tekstu).

U literaturi nalazimo relativno malo podataka o modulaciji osjetljivosti stanica melanoma na protutumorske lijekove putem integrina i uglavnom su to podatci

temeljeni na jednoj staničnoj liniji. Tako su Tentori i ostali (2008.) cilengitidom povećali osjetljivosti stanica melanoma miša B16 na temozolomid (Tentori i ostali, 2008.). Hammouda i ostali (2018.) su uspjeli povećati osjetljivost stanica melanoma čovjeka SK-MEL-28 na cisplatinu *in vivo* uz makroviceptin (C-tip lektin-nalik protein izoliran iz zmijskog otrova) koji smanjuje ekspresiju i inhibira signale preko integrina $\alpha\beta3$ (Hammouda i ostali, 2018.). Obrnutim pristupom, aktivacijom integrina $\alpha6\beta1$ vezanjem za laminin 1 u stanicama MDA-MB-435, pokazana je smanjena osjetljivost na paklitaksel i vinkristin posredovana signalnim putem PI3K/Akt (Aoudjit i Vuori, 2001.). Aktivacija integrina manganom ili vezanjem na kolagen smanjila je osjetljivost stanica melanoma čovjeka MV3 na cisplatinu aktivacijom puta WNT (Piva i ostali, 2017.). Aktivacija integrina αv i $\alpha5\beta1$ križnim vezanjem multivalentnim otrovom zmijske disintegrin kontortrostatinom, kao i aktivacija integrinske podjedinice $\beta1$ monoklonskim protutijelom TS2/16, povećala je osjetljivost stanica melanoma čovjeka M21 na araC *in vivo* (Schwartz i ostali, 2008.). Ista grupa znanstvenika je također pokazala da pentavalentni fibronektin (FN-COMP) koji veže i aktivira $\alpha\beta3$ i $\alpha5\beta1$ može povećati osjetljivost stanica melanoma čovjeka M21 i VMM18 na cisplatinu *in vivo* (Andarawewa i ostali, 2015.). Konačno, aktivacijom integrina vinkulin aktivirajućim peptidom (engl. *vinculin activating peptide*) povećala se osjetljivost stanica melanoma *in vivo* na araC (Nelson i ostali, 2012.).

Kako bismo pobliže istražili važnost integrina $\alpha v\beta3$ i $\alpha v\beta5$ u modulaciji osjetljivosti na protutumorske lijekove, u radu Stojanović i ostali (2018) sve četiri stanične linije smo izložili djelovanju cilengitida, specifičnog inhibitora prijenosa signala integrinima $\alpha v\beta3$ i $\alpha v\beta5$, u kombinaciji s paklitakselom. Korištenjem ovog inhibitora željeli smo izbjeći fenomen preslagivanja integrina uočen nakon utišavanja $\beta3$ ili $\beta5$. Učinak kombinacije cilengitida s paklitakselom je pratio učinak utišavanja ekspresije integrinske podjedinice αv na osjetljivost na paklitaksel u stanicama MDA-MB-435S, RPMI-7951 i MeWo, međutim ne i u A375 gdje je cilengitid povećao osjetljivost na paklitaksel, što je u suprotnosti s učinkom utišavanja αv . Ta bi razlika mogla biti objašnjena činjenicom da utišavanje integrina αv utječe na sve heterodimere integrina αv (moguće kombinacije su $\alpha v\beta1$, $\alpha v\beta3$, $\alpha v\beta5$, $\alpha v\beta6$, $\alpha v\beta8$) dok cilengitid

inhibira prijenos signala samo preko integrina $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$. Razlika može biti i zbog integrinskog preslagivanja uzrokovanog utišavanjem podjedinice $\alpha\gamma$ gdje je moglo doći do ekspresije integrina koji smanjuje osjetljivost na paklitaksel.

Budući da je FAK jedna od ključnih kinaza vezanih za integrine i važan dio FA koja sudjeluje u otpornosti tumora na terapiju (Sulzmaier i ostali, 2014.), u radu Stojanović i ostali (2018.) ispitali smo sudjeluje li FAK u modulaciji osjetljivosti ove četiri stanične linije melanoma na paklitaksel u kombinaciji s cilengitidom ili utišavanjem ekspresije $\alpha\gamma$. Naši rezultati su pokazali da postoji povezanost povoljnog učinka cilengitida i paklitaksela s fosforilacijom FAK-a (Y397), međutim ne i povezanost povoljno učinka utišavanja integrina $\alpha\gamma$ i paklitaksela s ekspresijom pFAK-a (Y397). Usprkos odsutnosti povezanosti ekspresije pFAK-a (Y397) vs učinak kombinirane terapije, prepostavili smo da pFAK (Y397) ipak može imati ulogu u promjeni osjetljivosti na paklitaksel, jer su procesi preslagivanja integrina puno vjerojatniji nakon utišavanja integrina $\alpha\gamma$ nego nakon izlaganja cilengitidu (Stojanović i ostali, 2018.). Stoga smo u ovom doktorskom radu odlučili provjeriti ulogu pFAK-a (Y397) njegovom inhibicijom specifičnim inhibitorom PF-228. Potpuno neočekivano, PF-228 smanjuje osjetljivost stanica MDA-MB-435S, RPMI-7951 i MeWo na paklitaksel, dok ima povoljan aditivni učinak u stanicama A375. Ovaj rezultat jasno pokazuje da pFAK (Y397) nije prikladan cilj za povećanje osjetljivosti na paklitaksel, ali to ne znači da nije uključen u mehanizam promjene osjetljivosti. Naime, pFAK (Y397) sudjeluje u različitim signalnim putevima koji mogu, posredno ili neposredno, mijenjati konačni učinak lijeka. Prepostavljamo da bi to vrlo vjerojatno mogao biti razlog za ovakav rezultat. Zanimljivo je da je specifični inhibitor pFAK-a (Y397) VS-6063 u stanicama tumora jajnika HeyA8 povećao osjetljivost na paklitaksel i smanjio masu tumora *in vivo* u modelu miša (Kang i ostali, 2013.). Osim toga, utišavanje FAK-a je povećalo djelovanje još jednog otrova mikrotubula, strukturno bliskog paklitakselu, docetaksela, u staničnim linijama tumora jajnika HeyA8 i SKOV3 i to ne samo u osjetljivima nego i stanicama otpornima na ovaj lijek (Halder i ostali, 2005.).

Naša istraživanja u 4 stanične linije melanoma čovjeka su pokušala detaljnije objasniti ulogu integrina α u osjetljivosti na otrove mikrotubula. Iako smo utvrdili da je za migraciju i invaziju stanica melanoma u pravilu važniji integrin $\alpha\beta5$, nego $\alpha\beta3$, nismo otkrili mehanizam tih promjena. Činjenica da je u dvije od četiri stanične linije utišavanje integrina α povećalo osjetljivost na paklitaksel, a u druge dvije stanične linije ga je smanjilo, upućuje na zaključak da se ova kombinacija ne bi mogla koristiti za terapiju melanoma, osim u slučaju kada bi bilo moguće predvidjeti učinak takve terapije.

Drugi važan cilj ovog doktorskog rada bio je istražiti sastav IAC-a odnosno adhesom stanica RPMI-7951 i usporedbom s adhesomom istih stanica nakon utišavanja integrina α , odrediti sastav adhesoma integrina α s konačnim ciljem razumijevanja molekularnih mehanizama modulacije osjetljivosti stanica melanoma na protutumorske lijekove i pokretljivost.

Integrini vezanjem za ECM prenose signal stvaranjem višemolekulskog kompleksa proteina s unutrašnje strane stanične membrane koji se naziva FA, odnosno IAC (Eke i Cordes, 2015.; Horton i ostali, 2015.). Zbog dinamične i relativno nestabilne prirode IAC-a i neadekvatnosti do tada poznatih metoda izdvajanja, njihov sastav dugo nije bilo moguće reproducibilno istražiti metodom masene spektrometrije. Međutim, Jones i ostali (2015) su objavili metodu za izdvajanje proteina IAC-a koju smo koristili u ovom radu. Većina do sada poznatih podataka o sastavu adhesoma je dobivena nasadivanjem stanica na neki od proteina ECM, većinom fibronektin, čime se unaprijed odabire integrin/e čiji adhesom analiziramo (Horton i ostali, 2015.; Horton, Humphries, Stutchbury, i ostali, 2016.; Huang i ostali, 2014.; Humphries i ostali, 2009.; Kuo i ostali, 2011.; Ng i ostali, 2014.; Robertson i ostali, 2015.; Schiller i ostali, 2011., 2013.; Yue i ostali, 2014.). Mi smo pak odlučili analizirati sastav IAC-a izoliranih iz stanica uzgojenih u neobloženim Petrijevim zdjelicama, u „prirodnim“ uvjetima. Prema našem saznanju, samo su dvije grupe do sada radile na ovaj način (Yue i ostali, 2014; Lock i ostali, 2018). Konačno, želja nam je bila utvrditi promjene u sastavu IAC-a nakon utišavanja integrina α s ciljem definiranja tzv. integrin α -specifičnog adhesoma, tj. proteina IAC-a ovisnih o integrinu α .

Kako je za pokuse izdvajanja IAC-a potrebno mnogo stanica, izdvojili smo stabilno transficirane klonove RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom integrina αv . Svih šest izdvojenih klonova stanica iznenađujuće su pokazivali smanjenu osjetljivost na paklitaksel i vinkristin što je u suprotnosti s rezultatima prolazne transfekcije koja je povećala osjetljivost. Stabilni transfektanti su (za razliku od pokusa prolazne transfekcije) bili uzgajani kroz duži period sa smanjenom razinom integrinske podjedinice αv , što može biti selektivni pritisak za prilagodbu na tako nepovoljne uvjete. Naime, dokidanje vezanja putem integrina stanice vodi u posebnu vrstu apoptoze, anoikis (Paoli i ostali, 2013.). U našim pokusima prolazne transfekcije to je vidljivo u manjoj apsorbanciji u testu MTT stanica nakon utišavanja integrina αv u usporedbi sa stanicama transficiranim kontrolnom siRNA. Stoga je pri izdvajanju stabilno transficiranih klonova moglo doći do aktivacije signalnih puteva koji potiču preživljenje i koji mogu utjecati na osjetljivost na protutumorske lijekove. Vrlo je zanimljivo da usprkos uspješnom izdvajanju klonova nismo bili u mogućnosti dobiti veću količinu stanica nijednog od šest klonova za izdvajanje IAC-a zbog ubranog umiranja stanica i pojave stanica s više jezgara. Sličan problem s uzgojem nismo imali sa stabilno transficiranim klonovima sa smanjenom ekspresijom integrina αv stanica MDA-MB-435S i stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 (neobjavljeni podatci, Paradžik i ostali, radovi u pripremi). Zbog redovite pojave stanica s više jezgara u svim klonovima nakon dužeg uzgoja, pretpostavljamo da smanjenje količine integrina αv sprječava normalnu diobu stanice. Literaturni podatci podržavaju ovu hipotezu. Pokazano je da integrini reguliraju pravilno smještanje i orijentaciju diobenog vretena, kao i bipolarnost vretena i citokinezu (LaFlamme i ostali, 2008.). Kako ćemo malo kasnije komentirati, naši rezultati su pokazali da je u eksperimentalnim uvjetima koje smo koristili integrin $\alpha v\beta 5$ glavni integrin kojim stanice RPMI-7951 stvaraju IAC. Nedavno su Lock i ostali (2018.) opisali novu vrstu adhezija koje su nazvali retikularne adhezije i u kojima se nalazi preferencijalno integrin $\alpha v\beta 5$. Retikularne adhezije imaju potpuno drugačiji sastav od FA i imaju ulogu u diobi, što je pokazano utišavanjem integrina $\beta 5$ u stanicama HeLa pri čemu se smanjuje udio stanica u diobi i pojavljuju se stanice s više jezgara. Zaključujemo da bi inhibicija

retikularnih adhezija putem utišavanja integrina $\alpha\beta5$ u stanicama RPMI-7951 mogla biti razlog za neke od karakteristika rasta stabilno transficiranih klonova, posebice pojave stanica s više jezgara.

S obzirom na poteškoće u uzgoju klonova RPMI-7951 s utišanom integrinskom podjedinicom αv , sastav adhesoma metodom masene spektrometrije smo istražili u stanicama prolazno transficiranim kontrolnom siRNA ili integrin αv -specifičnom siRNA. Iako je ovaj pristup skup i zahtjevan, jer pri prikupljanju svakog para uzorka treba napraviti sve potrebne kontrole, bolji je u pogledu oponašanja uvjeta prolaznog utišavanja koje bi se potencijalno moglo koristiti u terapiji. Analiza adhesoma stanica RPMI-7951 je pokazala da se ove stanice preferencijalno vežu za površinu preko integrina $\alpha\beta5$, čije su podjedinice pronađene u velikoj količini sudeći po broju spektara što je u skladu s rezultatima Lock i suradnika (2018.). Treća integrinska podjedinica koja je identificirana s vrlo malim brojem spektara je integrin $\beta1$, pa postoji mogućnost da stanice stvaraju IAC i preko integrina $\alpha\beta1$ ili drugih heterodimera $\beta1$, ali se to mora dokazati eksperimentalno. Integrinska podjedinica $\beta1$ može se vezati čak s 12 podjedinica α (Hynes i Naba, 2012.). Bez obzira što nismo pronašli druge podjedinice α to ne znači da ih nema.

Stanice smo prije izdvajanja IAC-a uzgajali 72 sati u kulturi. Lock i ostali (2018.) su analizirali adhesom stanica osteosarkoma čovjeka U2OS 72 sata nakon nasađivanja i identificirali integrinske podjedinice αv i $\beta5$ kao najzastupljenije integrine u IAC, što je potvrđeno pokusima imunofluorescencije na šest dodatnih staničnih linija. Naši rezultati dobiveni u stanicama RPMI-7951 su u skladu s ovom tvrdnjom, ali isto je pokazano i u stanicama MDA-MB-435S i stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 (Paradžik i ostali, neobjavljeni rezultati). Jedina su iznimka stanice karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 koje preferencijalno koriste integrin $\alpha6\beta4$ koji je receptor za laminin i sudjeluje u stvaranju hemidesmosoma (Dekanić i ostali, neobjavljeni rezultati).

Analizom ukupnog sastava IAC-a stanica RPMI-7951 identificirano je 624 proteina s

minimalnim brojem spektara 1, a 344 s minimalnim brojem spektara 4, od kojih 31,9% čine proteine FA, a 25,5% proteine ECM-a. Iako smo imali poteškoće s uzgojem stabilnih klonova sa smanjenom ekspresijom integrina αv , uspjeli smo analizirati jedan uzorak klona K6. Zbog značajno manjeg broja stanica identificiran je manji broj proteina, ali je zabilježen gotovo isti udio proteina FA (28,8%) i ECM-a (25,9%) (rezultati nisu prikazani). S obzirom na nemogućnost statističke analize podataka dobivenih jednim pokusom ove rezultate nismo dalje analizirali. Sličnu raspodjelu dobili smo i u adhesomu stanica MDA-MB-435S i MDA-MB-231 (neobjavljeni rezultati, Paradžik i ostali, radovi u pripremi). U adhesomu stanica RPMI-7951 detektirali smo 29 od ukupno 60 proteina koji su dio konsensus-adhesoma, što pokazuje da je izdvajanje proteina IAC-a bila dobro optimizirana. U jednom od dva rada, gdje su istraženi adhesomi stanica uzgojenih na neobloženim Petrijevim zdjelicama, istražen je adhesom keratinocita čovjeka u kojem je identificirano samo 48 proteina (Yue i ostali, 2011). Međutim, kako su ovi autori koristili metodu Kuo i ostali (2012.) koja ne koristi umreživače mali broj identificiranih proteina je očekivan. Drugi rad su objavili Lock i ostali (2018.) gdje je u izolatima IAC-a stanica osteosarkoma čovjeka U2O6, koristeći metodu s umreživačem (Jones i ostali, 2015.), identificirano 214 proteina. Ostali radovi su objavili adhesome stanica nasadenih na fibronektin s kojima možemo djelomično usporediti naše rezultate, međutim kako fibronektin osigurava dodatno vezanje stanica za površinu Petrijeve zdjelice jer omogućuje vezanje više različitih integrina, logično je da je broj identificiranih proteina iz tako izoliranih IAC-a veći. Tako su Horton i ostali (2015.) izolirali IAC iz fibroblasta embrija miša i identificirali 1461 protein s minimalnim brojem spektara 4 u barem dva uzorka. Sličan broj (1174) ukupnih proteina su detektirali Robertson i ostali (2015.), u stanicama melanoma čovjeka A375SM.

Prema našem saznanju, postoje samo dva rada u kojima je istraženo razlikuju li se sastavi IAC-a ovisno o integrinu kojim stanica raspolaže. Tako su Schiller i ostali (2013) pokazali da se sastav adhesoma fibroblasta bubrega miša uzgajanih na fibronektinu, a koji eksprimiraju isključivo $\alpha 5\beta 1$; $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$; ili $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ razlikuje. Drugi rad je u stanicama eritroleukemije u suspenziji K562 pokazao razlike

između IAC-a ostvarenih preko integrina $\alpha_4\beta_1$ ili $\alpha_5\beta_1$, koristeći kuglice obložene s VCAM-1 ili fibronektinom (Humphries i ostali, 2009). Cilj naših pokusa je bio identificirati proteine adhesoma stanica RPMI-7951 čija se količina mijenja nakon utišavanja integrina α_v , a koji bi zbog toga mogli biti smatrani adhesomom integrina α_v . Budući da smo u adhesomu stanica RPMI-7951 pronašli preferencijalno integrine α_v i β_5 te vrlo malu količinu integrina β_1 , zaključujemo da te proteine možemo smatrati adhesomom povezanim s integrinom $\alpha_v\beta_5$. Nakon utišavanja integrina α_v otkrili smo značajnu promjenu (od barem 2 puta) u količini 88 proteina, od kojih je 33 funkcionalno povezano s FA-om, i od kojih je 14 dio konsensusnog adhesoma: integrini α_v i β_1 , filamin-vezujući LIM-protein 1 (migfilin), homolog fermitin obitelji 2 (kindlin 2), protein 2 s četiri i pol LIM-domene (FHL2), preferentni partner lipoma (LPP), paladin, α -parvin, paksilin, protein 1 s PDZ- i LIM-domenom (PDLIM1), protein 5 s PDZ- i LIM-domenom (PDLIM5), protein 7 s PDZ- i LIM-domenom (PDLIM7), testin, ziksin i kaldezmom. Iako smo analizom ukupnog popisa promijenjenih proteina računalnim alatima DAVID i STRING pokazali njihovu međusobnu povezanost, zbog velike količine podataka vrlo je teško prosuđivati o uključenosti ovih proteina u fenotip povećane osjetljivosti na otrove mikrotubula i smanjene pokretljivosti (migracije i invazije). Stoga ćemo u daljnjoj diskusiji samo kratko komentirati proteine koji su dio konsenzus-adhesoma (Horton i ostali, 2015.).

Migfilin i protein 2 s četiri i pol LIM-domene smanjeno su eksprimirani nakon utišavanja integrina α_v pa zaključujemo da su dio α_v adhesoma. Literaturni podatci pokazuju da je ekspresija ovih proteina povezana s nepovoljnom prognozom u pacijenata s melanomom (The human protein atlas, 2018.; Westphal i ostali, 2015.). Migfilin je citoskeletni adaptorski protein lokaliziran u FA koji ima snažan afinitet za filamin na mjestima na kojima se filamin veže za citoplazmatski rep β integrina čime djeluje kao molekularni prekidač za odvajanje filamina od integrina i regulira integrinsku aktivaciju (Ithychanda i ostali, 2009). Protein 2 s četiri i pol LIM-domene ima ulogu u stvaranju FA i integrin-posredovanoj aktivaciji signalnog puta ERK (Park i ostali, 2008.). Kindlin 2, koji je također dio α_v -adhesoma stanica RPMI-7951, zajedno s migfilinom povezuje FA na filamin i aktinski citoskelet i na taj način

modulira oblik stanica (Tu i ostali, 2003). Kindlin 2 je također povezan s talinom i sudjeluje u aktivaciji integrina $\beta 3$ (Ma i ostali, 2008.).

Adhesom manje migratornih i invazivnih stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrina αv sadrži manje količine aktin vezujućeg proteina- preferentnog partnera lipoma. Iz literature je poznato da utišavanje LPP povećava kolektivnu invaziju *in vitro* i metastaziranje stanica adenokarcinoma PC14PE6 u mišu *in vivo* (Kuriyama i ostali, 2016.). Prema tome smjer promjene količine ovog proteina u IAC-u u našim eksperimentima nije u skladu s fenotipom stanica koje smo proučavali, a koje su pokazale smanjenu pokretljivost. Međutim, koliko znamo nema literaturnih podataka o povezanosti ekspresije LPP u melanomu i prognoze bolesti. Osim toga moguće je da pojedini proteini imaju različitu ulogu u različitim tkivima.

U IAC stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrina αv nađene su smanjene količine proteina ziksina, enigme, paladina, α -parvina i testina pa prema tome ovi proteini također čine dio αv -adhesoma. Ziksin se nakuplja zajedno s protein kinazom 2 koja je u interakciji s homeodomenom (engl. *homeodomain-interacting protein kinase 2*, HIPK2) kao odgovor na oštećenje DNA u stanicama tumora jetre HepG2. Uklanjanje endogenog ziksina rezultiralo je smanjenim razinama HIPK2 i omelo fosforilaciju p53 (Ser46) uzrokovanu oštećenjem DNA i posljedičnu aktivaciju kaspaze (Crone i ostali, 2011.). Za ziksin je pokazano da je njegova ekspresija izravno povezana sa širenjem (engl. *spreading*) i proliferacijom stanica i obrnuto povezana s diferencijacijom staničnih linija melanoma (van der Gaag i ostali, 2002.). Enigma (LMP, PDLIM7) potiče preživljenje stanica hepatoma HLK3 i smanjenje osjetljivosti na adriamicin sprječavanjem p53-posredovane apoptoze u modelu ksenografta u miševima (Jung i ostali, 2010.). Paladin je protein koji se nalazi u stresnim vlaknima i izravno veže α -aktinin (Rönty i ostali, 2004.), a djeluje kao protein skela koji regulira stvaranje podosoma i invadopodija preko Rho GTPaza (Najm i El-Sibai, 2014.). α -parvin je u interakciji s ILK-om u osiguravanju pravilnog širenja (engl. *spreading*) stanica jajnika kineskog hrčka CHO i stanica mioblasta miša C2C12 (Tu i ostali, 2001.). Testin je protein lokaliziran u FA, veže se sa ziksinom i talinom i ima ulogu u adheziji

(Coutts i ostali, 2003). Opisana uloga ziksina, enigme, paladina, α -parvina i testina je u skladu s primijećenom povećanom osjetljivošću na otrove mikrotubula i smanjenom pokretljivošću stanica sa smanjenom ekspresijom integrina αv . Za opisane proteine ne postoje podaci o korelaciji s prognozom melanoma.

Naši rezultati su također pokazali smanjenu količinu proteina PDLIM1 u IAC-u stanica RPMI-7951 sa smanjenom količinom integrina αv . Za ovaj protein objavljeni su kontradiktorni rezultati o povezanosti ekspresije i prognoze bolesti. U tkivu metastatskih tumora debelog crijeva zabilježena je njegova smanjena ekspresija (Chen i ostali, 2016.), no u modelu stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 i BT549 pokazano je da njegova ekspresija potiče migraciju i invaziju *in vitro* te metastaziranje tumora *in vivo* (Liu i ostali, 2015.).

Naši su pokusi pokazali da utišavanje integrina αv smanjuje količinu paksilina u IAC-u stanica RPMI-7951, ali i količinu i lokalizaciju pPax-a (Y113). Poznato je da paksilin sudjeluje u proliferaciji i invaziji stanica melanoma SK-MEL-28-N s povećanom ekspresijom gangliozida GD3 (Hamamura i ostali, 2008). Smanjenje ekspresije pPax-a (Y113) u stanicama melanoma miša B16-F10 smanjuje metastaziranje *in vivo* (Velasco-Velázquez i ostali, 2008.). Dakle, smanjenje ekspresije pPax-a (Y113) u IAC-u je u skladu sa smanjenom pokretljivošću stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrina αv .

Od ukupno promijenjenih proteina IAC-a stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice αv , ekspresija samo njih sedam se povećala više od 1,5 puta, i to: tenascina C, proteina homologa slita 2 (SLIT2), α -tubulina 4A, peroksizadina i keratina: citoskeletnog keratina 17 tipa I, citoskeletnog keratina 9 tipa I i citoskeletnog keratina 1 tipa II. Ovi proteini nisu dio konsensus-adhesoma. Tenascin C, SLIT2 i peroksizadin su povezani s ECM-om. Tenascin-C je snažno eksprimiran u većini staničnih linija melanoma i uključen je u procese invazije i metastaziranja (Shao i ostali, 2015.). SLIT2 je protein kojeg izlučuju mnogi tipovi čvrstih tumora, a njegov receptor ROBO (engl. *roundabout*) je eksprimiran na stanicama endotela krvnih žila. Interakcija ova dva proteina ima ulogu u angiogenezi ksenografta

melanoma A375 (Wang i ostali, 2003). Međutim, upravo suprotno, interakcija ova dva receptora u stanicama melanoma LOX inhibirala je aktivaciju ARF6 i smanjila invaziju stanica melanoma *in vitro* (Grossmann i ostali, 2013). Za peroksizadin je pokazana povećana ekspresija u invazivnim primarnim stanicama melanoma (Jayachandran i ostali, 2016.). Budući da je u IAC-u stanica RPMI-7951 sa smanjenom ekspresijom α -podjedinice pronađena povećana količina tri proteina ECM-a, moguće je da stanice zbog smanjene količine integrina α kao odgovor na stres izlučuju više proteina ECM-a kako bi si osigurale dodatnu potporu, jaču adheziju i signale proliferacije preko aktivacije drugih integrina ili signalnih puteva.

Prema našim saznanjima, nema podataka o povezanosti ekspresije izotipa α -tubulina 4A s biologijom tumora. Većina istraživanja uloge mikrotubula u biologiji tumora je usmjerena na β -podjedinice tubulina, jer su upravo one cilj protutumorskih lijekova otrova mikrotubula. Tako je pokazano da različiti izotipovi β -tubulinskih podjedinica imaju ulogu u modulaciji osjetljivosti različitih tipova tumora na lijekove i isto se pretpostavlja i za α -podjedinice (Parker i ostali, 2017.).

Keratini pripadaju skupini proteina intermedijarnih filamenata, strukturnih komponenti citoskeleta koje sudjeluju u regulaciji migracije i adhezije stanica (Gruenbaum i Aebi, 2014). U stanicama RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice α v pronašli smo povećanu ekspresiju citoskeletnih keratina 1, 9 i 17. Ekspresija keratina, koji se smatraju markerima epitela, u melanomu nije iznenadila jer su nedavno objavljeni rezultati analize tkiva melanoma pacijenata pokazali da čak 28 ili 40%, ovisno o korištenom protutijelu za analizu, eksprimira keratin (Romano i ostali, 2015). Ben-Izhak i ostali (1994.) su, za razliku od primarnih melanoma, pronašli ekspresiju keratina u uzorcima tkiva metastatskih melanoma. Naši rezultati međutim pokazuju povećanu količinu keratina u manje pokretljivim stanicama.

Ovim smo radom odabrali integrin α v kao potencijalnu metu za povećanje osjetljivosti na otrove mikrotubula i smanjenje pokretljivosti, odnosno migracije i invazije in vitro. Osim toga smo istražili adhesom stanica melanoma čovjeka RPMI-7951 i identificirali veliki broj proteina koji čine adhesom integrina α v. Svi ovi

proteini, posebno oni koji su dio konsenzus-adhesoma, predstavljaju potencijalne ciljne molekule za povećanje osjetljivosti melanoma na protutumorske lijekove ili za smanjenje metastaziranja, što u budućnosti treba istražiti.

5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju rezultata kombiniranog djelovanja utišavanja podjedinica integrina α (α_3 , α_4 ili α_v) i tri protutumorska lijeka (cisplatine, paklitaksela i vinkristina) na preživljenje stanica melanoma čovjeka MDA-MB-435S te pokusa *in vitro* migracije i invazije stanica, odabrana je integrinska podjedinica α_v kao potencijalna meta za kombinacijsku terapiju melanoma čije utišavanje povećava osjetljivost stanica na paklitaksel ili vinkristin i smanjuje pokretljivost, odnosno *in vitro* migraciju i invaziju.
2. Utišavanje ekspresije integrinske podjedinice α_v u stanicama RPMI-7951 povećava, a u stanicama A375 i MeWo smanjuje osjetljivosti na cisplatinu, paklitaksel i vinkristin.
3. Povećana osjetljivost stanica RPMI-7951 i MDA-MB-435S na protutumorske lijekove i smanjena pokretljivost nakon utišavanja ukupnih integrina α_v je posljedica smanjenja ekspresije integrina $\alpha_v\beta_5$.
4. Stanice RPMI-7951 su nakon utišavanja integrinske podjedinice α_v manje raširene po površini, imaju slabo organiziranu aktinsku mrežu i manje fokalnih adhezija po stanici koje su veličinom manje od kontrolnih. Ove karakteristike su u skladu sa smanjenom pokretljivošću, odnosno smanjenom *in vitro* migracijom i invazijom.
5. Utišavanje ekspresije α_v u kombinaciji s paklitakselom povećava broj stanica MDA-MB-435S u apoptozi. Stanice RPMI-7951 s utišanom ekspresijom integrinske podjedinice α_v nakon djelovanja paklitaksela pokazuju relativno malo povećanje apoptoze, ukazujući na druge mehanizme stanične smrti.
6. Iako je u većini staničnih linija melanoma nakon utišavanja integrina α_v ili izlaganja cilengitidu primijećena smanjena fosforilacija FAK-a (Y397), njegova ciljana inhibicija pomoću inhibitora PF-228 smanjuje osjetljivost tri od četiri ispitivane stanične linije na paklitaksel. Prema tome pFAK (Y397) nije pogodna meta u kombinaciji s paklitakselom za terapiju melanoma.

7. Analiza adhesoma je pokazala da stanice RPMI-7951 preferencijalno stvaraju komplekse adhezije integrina preko integrina $\alpha\beta5$.

8. Usporedbom adhesoma stanica RPMI-7951 prolazno transficiranih integrin αv -specifičnom siRNA s adhesomom stanica prolazno transficiranih kontrolnom siRNA utvrdili smo niz promjena u sastavu kompleksa adhezije integrina, ali i u izlučenim proteinima izvanstaničnog matriksa. Promijenjeni proteini kompleksa adhezije integrina su označeni kao „adhesom integrina αv “ i predstavljaju potencijalne ciljne molekule za inhibiciju signalnih puteva integrina αv koje bi se mogle koristiti za poboljšanje terapije melanoma.

6. LITERATURA

- Abercrombie, Heaysman, Pegrum (1971.) „The locomotion of fibroblasts in culture: IV. Electron microscopy of the leading lamella“. *Experimental Cell Research* 67(2):359–67.
- Afratis, Nikitovic, Multhaupt, Theocharis, Couchman, Karamanos (2017.) „Syndecans – key regulators of cell signaling and biological functions“. *FEBS Journal* 284(1):27–41.
- Ahmedah, Patterson, Shnyder, Sheldrake (2017.) „RGD-Binding Integrins in Head and Neck Cancers“. *Cancers* 9(12):56.
- Al-Badr, Alodhaib (2016.) „Dacarbazine“. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* 41:323–77.
- Albrethsen, Angeletti, Horwitz, Yang (2014.) „Proteomics of cancer cell lines resistant to microtubule-stabilizing agents.“ *Molecular Cancer Therapeutics* 13(1):260–69.
- Ambriović-Ristov, Gabrilovac, Čimbora-Zovko, Osmak (2004.) „Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin avb3 and coxsackie adenovirus receptor“. *International Journal of Cancer* 110(5):660–67.
- Ambriović Ristov, Brozović, Bruvo Mađarić, Četković, Herak Bosnar, Hranilović, Katušić Hećimović, Meštrović Radan, Mihaljević, Slade, Vujaklija, ur. (2007.) *Metode u molekularnoj biologiji*. 1. izd. Zagreb: Institut Ruđer Bošković.
- Andarawewa, Moissoglu, Sup Lee, Ando, Yu, Debnath, Shannon, Sirinivasan, Conaway, Weber, Schwartz (2015.) „Integrin adjunct therapy for melanoma“. *Pigment Cell and Melanoma Research* 28(1):114–16.
- Andtbacka, Kaufman, Collichio, Amatruda, Senzer, Chesney, Delman, Spitler, Puzanov, Agarwala, Milhem, Cranmer, Curti, Lewis, Ross, Guthrie, Linette,

- Daniels, Harrington, Middleton, Miller, Zager, Ye, Yao, Li, Doleman, VanderWalde, Gansert, Coffin (2015.) „Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma.“ *Journal of Clinical Oncology* 33(25).
- Aoudjit, Vuori (2001.) „Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells“. *Oncogene* 20(36):4995–5004.
- Aoudjit, Vuori (2012.) „Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance“. *Chemotherapy Research and Practice* 2012:1–16.
- Bakewell, Nestor, Prasad, Tomasson, Dowland, Mehrotra, Scarborough, Kanter, Abe, Phillips, Weilbaecher (2003.) „Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24):14205–10.
- Ballantyne, Garnock-Jones (2013.) „Dabrafenib: First Global Approval“. *Drugs* 73(12):1367–76.
- Bays, DeMali (2017.) „Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions“. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(16):2999–3009.
- Van Belle, Elenitsas, Satyamoorthy, Wolfe, Guerry, Schuchter, Van Belle, Albelda, Tahin, Herlyn, Elder (1999.) „Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi.“ *Human pathology* 30(5):562–67.
- Ben-Izhak, Stark, Levy, Bergman, Lichtig (1994.) „Epithelial markers in malignant melanoma. A study of primary lesions and their metastases.“ *The American Journal of dermatopathology* 16(3):241–46.
- Bhatia, Tykodi, Thompson (2009.) „Treatment of metastatic melanoma: an overview.“ *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 23(6):488–96.
- Brozović, Majhen, Roje, Mikac, Jakopec, Fritz, Osmak, Ambriović-Ristov (2008.) „Alpha v beta 3 integrin-mediated drug resistance in human laryngeal carcinoma

cells is caused by glutathione-dependent elimination of drug induced reactive oxidative species“. *Molecular Pharmacology* 74(1):298–306.

Burridge (2017.) „Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress“. *The FEBS Journal* 284(20):3355–61.

Byron, Humphries, Bass, Knight, Humphries (2011.) „Proteomic analysis of integrin adhesion complexes.“ *Science signaling* 4(167):pt2.

Cao, Cai, Li, Yang, Chen, Xing, Chen (2006.) „Combination of integrin siRNA and irradiation for breast cancer therapy“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351(3):726–32.

Chapman, Hauschild, Robert, Haanen, Ascierto, Larkin, Dummer, Garbe, Testori, Maio, Hogg, Lorigan, Lebbe, Jouary, Schadendorf, Ribas, O’Day, Sosman, Kirkwood, Eggermont, Dreno, Nolop, Li, Nelson, Hou, Lee, Flaherty, McArthur, BRIM-3 Study Group (2011.) „Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation“. *New England Journal of Medicine* 364(26):2507–16.

Chen, Tu, Zhang, Blair, Zhang, Wu (2008.) „PINCH-1 Regulates the ERK-Bim Pathway and Contributes to Apoptosis Resistance in Cancer Cells“. *Journal of Biological Chemistry* 283(5):2508–17.

Chen, Yuan, Xie, Wang, Huang, Chen, Dou, Wu, Nice, Zhou, Huang (2016.) „PDLIM1 Stabilizes the E-Cadherin/ β -Catenin Complex to Prevent Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastatic Potential of Colorectal Cancer Cells“. *Cancer Research* 76(5):1122–34.

Choi, Kim, Fermin, Tsou, Nesvizhskii (2015.) „QPROT: Statistical method for testing differential expression using protein-level intensity data in label-free quantitative proteomics“. *Journal of Proteomics* 129:121–26.

Christmann, Diesler, Majhen, Steigerwald, Berte, Freund, Stojanović, Kaina, Osmak, Ambriović-Ristov, Tomicic (2016.) „Integrin α V β 3 silencing sensitizes malignant

- glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair.“ *Oncotarget* 8(17):27754–71.
- Crone, Glas, Schultheiss, Moehlenbrink, Krieghoff-Henning, Hofmann (2011.) „Zyxin is a critical regulator of the apoptotic HIPK2-p53 signaling axis“. *Cancer Research* 71(6):2350–59.
- Curtin, Stark, Pinkel, Hayward, Bastian (2006.) „PI3-Kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma“. *Journal of Investigative Dermatology* 126(7):1660–63.
- Danen (2013.) „Integrin signaling as a cancer drug target“. *ISRN Cell Biology* 2013:1–14.
- Davies (2012.) „The Role of the PI3K-Akt Pathway in Melanoma“. *The Cancer Journal* 18(2):142–47.
- Davies, Stemke-Hale, Tellez, Calderone, Deng, Prieto, Lazar, Gershenwald, Mills (2008.) „A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines“. *British Journal of Cancer* 99(8):1265–68.
- Dekanić (2012.) „Utjecaj utišavanja integrina $\alpha 3$ i $\alpha 5$ na osjetljivost stanica tumora na cisplatinu“. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu.
- Desgrosellier, Cheresch (2010.) „Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities.“ *Nature Reviews Cancer* 10(1):9–22.
- Dickreuter, Cordes (2017.) „The cancer cell adhesion resistome: Mechanisms, targeting and translational approaches“. *Biological Chemistry* 398(7):721–35.
- van Dijk, Göransson, Strömblad (2013.) „Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer“. *Experimental Cell Research* 319(11):1663–70.
- Einzig, Hochster, Wiernik, Trump, Dutcher, Garowski, Sasloff, Smith (1991.) „A phase II study of taxol in patients with malignant melanoma.“ *Investigational New Drugs* 9(1):59–64.

- Eke, Cordes (2015.) „Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer“. *Seminars in Cancer Biology* 31:65–75.
- Eke, Koch, Hehlhans, Sandfort, Stanchi, Zips, Baumann, Shevchenko, Pilarsky, Haase, Baretton, Calleja, Larijani, Fässler, Cordes (2010.) „PINCH1 regulates Akt1 activation and enhances radioresistance by inhibiting PP1alpha.“ *The Journal of clinical investigation* 120(7):2516–27.
- Elmore (2007.) „Apoptosis: a review of programmed cell death.“ *Toxicologic Pathology* 35(4):495–516.
- Enciu, Radu, Popescu, Hinescu, Ceafalan (2018.) „Targeting CD36 as biomarker for metastasis prognostic: How far from translation into clinical practice?“ *BioMed Research International* 2018:1–12.
- Fedorenko, Abel, Koomen, Fang, Wood, Chen, Fisher, Iyengar, Dahlman, Wargo, Flaherty, Sosman, Sondak, Messina, Gibney, Smalley (2015.) „Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells“. *Oncogene* 35(August 2014):1–11.
- Feng, Wee, Chen, Ong, Qu, Tan, Tan (2017.) „Expression of kindlin-3 in melanoma cells impedes cell migration and metastasis“. *Cell Adhesion & Migration* 11(5–6):419.
- Ferenčak (2013.) „Utjecaj utišavanja integrina alfa-v ili alfa-4 na osjetljivost stanica tumora dojke na vinkristin i paklitaksel“. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu.
- Fire, Xu, Montgomery, Kostas, Driver, Mello (1998.) „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“. *Nature* 391(6669):806–11.
- Frame, Serrels (2015.) „FAK to the rescue: Activated stroma promotes a safe haven for braf-mutant melanoma cells by inducing fak signaling“. *Cancer Cell* 27(4):429–31.

- Fu, Valiathan, Arkwright, Sohail, Mihai, Kumarasiri, Mahasenan, Mobashery, Huang, Agarwal, Fridman (2013.) „Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling.“ *The Journal of Biological Chemistry* 288(11):7430–37.
- Fuente, Casanova, Moyano, Garcia-Gila, Sanz, Garca-Marco, Silva, Garcia-Pardo (2002.) „Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine“. *Journal of Leukocyte Biology* 71(3):495–502.
- van der Gaag, Leccia, Dekker, Jalbert, Amodeo, Randolph Byers (2002.) „Role of zyxin in differential cell spreading and proliferation of melanoma cells and melanocytes“. *Journal of Investigative Dermatology* 118(2):246–54.
- Ganguly, Pal, Moulik, Chatterjee (2013.) „Integrins and metastasis.“ *Cell adhesion & migration* 7(3):251–61.
- Garraway, Widlund, Rubin, Getz, Berger, Ramaswamy, Beroukhi, Milner, Granter, Du, Lee, Wagner, Li, Golub, Rimm, Meyerson, Fisher, Sellers (2005.) „Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma“. *Nature* 436(7047):117–22.
- Gehlsen, Davis, Sriramarao (1992.) „Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties“. *Clinical & Experimental Metastasis* 10(2):111–20.
- Geiger, Yamada (2011.) „Molecular architecture and function of matrix adhesions.“ *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(5):a005033.
- Ghatak, Morgner, Wickström (2013.) „ILK: a pseudokinase with a unique function in the integrin–actin linkage“. *Biochemical Society Transactions* 41(4):995–1001.
- Glover, Ibrahim, Kirkwood, Glick, Karp, Stewart, Ewell, Borden, Eastern Cooperative Oncology Group (2003.) „Phase II randomized trial of cisplatin and WR-2721 versus cisplatin alone for metastatic melanoma: an Eastern Cooperative

Oncology Group Study (E1686).“ *Melanoma research* 13(6):619–26.

Goldstein, Chan, Harland, Gillanders, Hayward, Avril, Azizi, Bianchi-Scarra, Bishop, Bressac-de Paillerets, Bruno, Calista, Cannon Albright, Demenais, Elder, Ghiorzo, Gruis, Hansson, Hogg, Holland, Kanetsky, Kefford, Landi, Lang, Leachman, MacKie, Magnusson, Mann, Niendorf, Newton Bishop, Palmer, Puig, Puig-Butille, de Snoo, Stark, Tsao, Tucker, Whitaker, Yakobson, Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL) (2006.) „High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL“. *Cancer Research* 66(20):9818–28.

Goodman, Grote, Wilm (2012.) „Matched rabbit monoclonal antibodies against av-series integrins reveal a novel avb3-LIBS epitope, and permit routine staining of archival paraffin samples of human tumors“. *Biology Open* 1:329–40.

Guo, Giancotti (2004.) „Integrin signalling during tumour progression.“ *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5(10):816–26.

Halder, Landen, Lutgendorf, Li, Jennings, Fan, Nelkin, Schmandt, Schaller, Sood (2005.) „Focal adhesion kinase silencing augments docetaxel-mediated apoptosis in ovarian cancer cells.“ *Clinical Cancer Research* 11(24 Pt 1):8829–36.

Hamamura, Tsuji, Ohkawa, Nakashima, Miyazaki, Urano, Yamamoto, Ueda, Furukawa, Furukawa (2008.) „Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780(3):513–19.

Hammouda, Riahi-Chebbi, Souid, Othman, Aloui, Srairi-Abid, Karoui, Gasmi, Magnenat, Wells, Clemetson, Rodríguez-López, Essafi-Benkhadir (2018.) „Macrovicepin, a C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits proliferation migration and invasion of SK-MEL-28 human melanoma cells and enhances their sensitivity to cisplatin“. *Biochimica et Biophysica Acta - General*

Subjects 1862(3):600–614.

Han, Liu, Profirovic, Niu, Voyno-Yasenetskaya (2009.) „Zyxin is involved in thrombin signaling *via* interaction with PAR-1 receptor“. *The FASEB Journal* 23(12):4193–4206.

Hauschild, Grob, Demidov, Jouary, Gutzmer, Millward, Rutkowski, Blank, Miller, Kaempgen, Martín-Algarra, Karaszewska, Mauch, Chiarion-Sileni, Martin, Swann, Haney, Mirakhur, Guckert, Goodman, Chapman (2012.) „Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial“. *The Lancet* 380(9839):358–65.

Hieken, Ronan, Farolan, Shilkaitis, Kim, Das Gupta (1995.) „Beta 1 integrin expression in malignant melanoma predicts occult lymph node metastases.“ *Surgery* 118(4):669-73; discussion 673-5.

Hirata, Girotti, Viros, Hooper, Spencer-Dene, Matsuda, Larkin, Marais, Sahai (2015.) „Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin b1/FAK Signaling“. *Cancer Cell* 27(4):574–88.

Hocker, Tsao (2007.) „Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants“. *Human Mutation* 28(6):578–88.

Hodis, Watson, Kryukov, Arold, Imielinski, Theurillat, Nickerson, Auclair, Li, Place, Dicara, Ramos, Lawrence, Cibulskis, Sivachenko, Voet, Saksena, Stransky, Onofrio, Winckler, Ardlie, Wagle, Wargo, Chong, Morton, Stenke-Hale, Chen, Noble, Meyerson, Ladbury, Davies, Gershenwald, Wagner, Hoon, Schadendorf, Lander, Gabriel, Getz, Garraway, Chin (2012.) „A landscape of driver mutations in melanoma.“ *Cell* 150(2):251–63.

Holt, Calle, Sutton, Critchley, Jones, Dunn (2008.) „Quantifying cell-matrix adhesion dynamics in living cells using interference reflection microscopy“. *Journal of Microscopy* 232(1):73–81.

- Hood, Grahovac, Flint, Sun, Charro, Becker, Wells, Conrads (2010.) „Proteomic analysis of laser microdissected melanoma cells from skin organ cultures“. *Journal of Proteome Research* 9(7):3656–63.
- Horton, Byron, Askari, Ng, Millon-Frémillon, Robertson, Koper, Paul, Warwood, Knight, Humphries, Humphries (2015.) „Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly“. *Nature Cell Biology* 17(12):1577–87.
- Horton, Humphries, James, Jones, Askari, Humphries (2016.) „The integrin adhesome network at a glance“. *Journal of Cell Science* 129(22):4159–63.
- Horton, Humphries, Stutchbury, Jacquemet, Ballestrem, Barry, Humphries (2016.) „Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of adhesion complex composition“. *Journal of Cell Biology* 212(3):349–64.
- Hotchin, Hall (1995.) „The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases.“ *The Journal of Cell Biology* 131(6 Pt 2):1857–65.
- Houben, Hesbacher, Schmid, Kauczok, Flohr, Haferkamp, Müller, Schrama, Wischhusen, Becker (2011.) „High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays.“ *PLoS ONE* 6(7):e22096.
- Hsu, Kao (2013.) „Alpha-Actinin 4 and Tumorigenesis of Breast Cancer“. *Vitamins and Hormones* 93:323–51.
- Hu, Lu, Szeto, Sun, Wang, Lasheras, Chien (2015.) „FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells“. *Scientific Reports* 4(1):6024.
- Huang, Hsiao, Wu, Shen, Liu, Wang, Chen, Huang, del Álamo, Chang, Tang, Khoo, Kuo (2014.) „GEF-H1 controls focal adhesion signaling that regulates mesenchymal stem cell lineage commitment.“ *Journal of Cell Science* 127(Pt

19):4186–4200.

Huang, Rofstad (2018.) „Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma“. *Experimental & Clinical Cancer Research* 37(92):1–14.

Huang, Sherman, Lempicki (2009a.) „Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists“. *Nucleic Acids Research* 37(1):1–13.

Huang, Sherman, Lempicki (2009b.) „Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources“. *Nature Protocols* 4(1):44–57.

Humphries, Byron, Bass, Craig, Pinney, Knight, Humphries (2009.) „Proteomic analysis of integrin-associated complexes identifies RCC2 as a dual regulator of Rac1 and Arf6.“ *Science Signaling* 2(87):ra51.

Hynes (2002.) „Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines.“ *Cell* 110(6):673–87.

Hynes, Naba (2012.) „Overview of the matrisome-an inventory of extracellular matrix constituents and functions“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(1):a004903–a004903.

Jayachandran, Prithviraj, Lo, Walkiewicz, Anaka, Woods, Tan, Behren, Cebon, McKeown (2016.) „Identifying and targeting determinants of melanoma cellular invasion“. *Oncotarget*.

Johnson, Tang, Carag, Speicher, Discher (2007.) „Forced unfolding of proteins within cells“. *Science* 317(5838):663–666.

Jones, Humphries, Byron, Millon-, Robertson, Paul, Ng, Askari, Humphries (2015.) „Isolation of integrin-based adhesion complexes“. *Current Protocols in Cell Biology* 44(0):1–21.

Jordan, Kamath (2007.) „How do microtubule-targeted drugs work? An overview“.

Current Cancer Drug Targets 7(8):730–42.

Jung, Lim, Choi, Kim, Kang, Noh, Im (2010.) „Enigma negatively regulates p53 through MDM2 and promotes tumor cell survival in mice.“ *The Journal of clinical investigation* 120(12):4493–4506.

Kang, Hu, Ivan, Dalton, Miyake, Pecot, Zand, Liu, Huang, Jennings, Rupaimoole, Taylor, Pradeep, Wu, Lu, Wen, Huang, Liu, Sood (2013.) „Role of focal adhesion kinase in regulating YB-1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer.“ *Journal of the National Cancer Institute* 105(19):1485–95.

Kato, Liao, Mitsios, Wang, Deryugina, Varner, Quigley, Shattil (2012.) „The primacy of β 1 integrin activation in the metastatic cascade“. *PLoS ONE* 7(10):e46576.

Kim, Cohen (2016.) „The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma“. *Expert Opinion on Drug Discovery* 11(9):907–16.

Kim, Young Min, Renné, Seifert, Schuh, Renné (2011.) „Impaired melanoma growth in VASP deficient mice“. *FEBS Letters* 585(15):2533–36.

Kim, Chungho, Ye, Ginsberg (2011.) „Regulation of integrin activation“. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27(1):321–45.

Koistinen, Ahonen, Kähäri, Heino (2004.) „ α V integrin promotes in vitro and in vivo survival of cells in metastatic melanoma“. *International Journal of Cancer* 112(1):61–70.

Korch, Hall, Dirks, Ewing, Faries, Varella-Garcia, Robinson, Storts, Turner, Wang, Burnett, Healy, Kniss, Neve, Nims, Reid, Robinson, Capes-Davis (2018.) „Authentication of M14 melanoma cell line proves misidentification of MDA-MB-435 breast cancer cell line“. *International Journal of Cancer* 142(3):561–72.

Kramer, Vu, Cheng, Ramos (1991.) „Integrin expression in malignant melanoma.“ *Cancer Metastasis Reviews* 10(1):49–59.

- Krimpenfort, Quon, Mooi, Loonstra, Berns (2001.) „Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice“. *Nature* 413(6851):83–86.
- Kuo, Han, Hsiao, Yates, Waterman, Waterman (2011.) „Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation.“ *Nature Cell Biology* 13(4):383–93.
- Kuo, Han, Yates III, Waterman (2012.) „Isolation of focal adhesion proteins for biochemical and proteomic analysis“. *Methods in Molecular Biology* 757:297–323.
- Kuphal, Bauer, Bosserhoff (2005.) „Integrin signaling in malignant melanoma“. *Cancer and Metastasis Reviews* 24(2):195–222.
- Kuriyama, Yoshida, Yano, Aiba, Kohno, Minamiya, Goto, Tanaka (2016.) „LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination“. *Oncogene* 35(8):952–64.
- Küstters, Westphal, Smits, Ruiter, Wesseling, Keilholz, de Waal (2001.) „The pattern of metastasis of human melanoma to the central nervous system is not influenced by integrin $\alpha(v)\beta(3)$ expression.“ *International Journal of Cancer* 92(2):176–80.
- Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics (2018.) „DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis“. Preuzeto 04. listopad 2018. (<https://david.ncifcrf.gov/>).
- LaFlamme, Mathew-Steiner, Singh, Colello-Borges, Nieves (2018.) „Integrin and microtubule crosstalk in the regulation of cellular processes.“ *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(22):4177.
- LaFlamme, Nieves, Colello, Reverte (2008.) „Integrins as regulators of the mitotic machinery.“ *Current Opinion in Cell Biology* 20(5):576–82.
- Lahlou, Muller (2011.) „ β 1-integrins signaling and mammary tumor progression in

- transgenic mouse models: implications for human breast cancer“. *Breast Cancer Research* 13(6):229.
- Li, Hou, Yang, Liu, Tang, Liu, Jiang (2015.) „Temozolomide for treating malignant melanoma“. *Journal of the College of Physicians and Surgeons - Pakistan* 25(9):680–88.
- Lichtner, Howlett, Lerch, Xuan, Brink, Langton-Webster, Schneider (1998.) „Negative cooperativity between $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins in human mammary carcinoma MDA MB 231 cells“. *Experimental Cell Research* 240(2):368–76.
- Liu, Zhan, Tu, Chen, Liu, Wu (2015.) „PDZ and LIM domain protein 1 (PDLIM1)/CLP36 promotes breast cancer cell migration, invasion and metastasis through interaction with α -actinin“. *Oncogene* 34(10):1300–1311.
- Liu, Zou, Sun, Bao (2017.) „Codonopsis lanceolata polysaccharide CLPS inhibits melanoma metastasis via regulating integrin signaling“. *International Journal of Biological Macromolecules* 103:435–40.
- Lock, Jones, Askari, Gong, Oddone, Olofsson, Göransson, Lakadamyali, Humphries, Strömblad (2018.) „Reticular adhesions are a distinct class of cell-matrix adhesions that mediate attachment during mitosis“. *Nature Cell Biology* 20(11):1290–1302.
- López-Colomé, Lee-Rivera, Benavides-Hidalgo, López (2017.) „Paxillin: A crossroad in pathological cell migration“. *Journal of Hematology and Oncology* 10(1):50.
- Luke, Flaherty, Ribas, Long (2017.) „Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma“. *Nature Reviews Clinical Oncology* 14(8):463–82.
- Ma, Qin, Wu, Plow (2008.) „Kindlin-2 (Mig-2): A co-activator of $\beta 3$ integrins“. *Journal of Cell Biology* 181(3):439–46.
- Mackiewicz, Mackiewicz (2018.) „BRAF and MEK inhibitors in the era of

- immunotherapy in melanoma patients“. *Contemporary Oncology* 22(1A):68–72.
- Mana, Clapero, Panieri, Panero, Böttcher, Tseng, Saltarin, Astanina, Wolanska, Morgan, Humphries, Santoro, Serini, Valdembri (2016.) „PPFIA1 drives active $\alpha 5\beta 1$ integrin recycling and controls fibronectin fibrillogenesis and vascular morphogenesis“. *Nature Communications* 7(1):13546.
- Manninen, Varjosalo (2017.) „A proteomics view on integrin-mediated adhesions“. *Proteomics* 17(3–4):1–42.
- Marshall, Hart (1996.) „The role of αv -integrins in tumour progression and metastasis“. *Seminars in Cancer Biology* 7(3):129–38.
- Marshall, Rutherford, Happerfield, Hanby, McCartney, Newton-Bishop, Hart (1998.) „Comparative analysis of integrins in vitro and in vivo in uveal and cutaneous melanomas.“ *British Journal of Cancer* 77(4):522–29.
- Matthews, Li, Qureshi, Weinstock, Cho (2017.) „Epidemiology of melanoma“. Str. 3–22 u *Cutaneous melanoma: Etiology and therapy*, uredio H. W. William i Jeffrey M. Farma. Brisbane, Australia: Codon Publications.
- Mayer, Swetter, Fu, Geller (2014.) „Screening, early detection, education, and trends for melanoma: Current status (2007-2013) and future directions Part I. Epidemiology, high-risk groups, clinical strategies, and diagnostic technology“. *Journal of the American Academy of Dermatology* 71(4):599.e1-599.e12.
- Melchiori, Mortarini, Carlone, Marchisio, Anichini, Noonan, Albini (1995.) „The $\alpha 3\beta 1$ integrin is involved in melanoma cell migration and invasion“. *Experimental Cell Research* 219(1):233–42.
- Menendez, Vellon, Mehmi, Teng, Griggs, Lupu (2005.) „A novel CYR61-triggered ‘CYR61- $\alpha v\beta 3$ integrin loop’ regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway“. *Oncogene* 24(5):761–79.

- Menzies, Haydu, Visintin, Carlino, Howle, Thompson, Kefford, Scolyer, Long (2012.) „Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma.“ *Clinical Cancer Research* 18(12):3242–49.
- Middleton, Grob, Aaronson, Fierlbeck, Tilgen, Seiter, Gore, Aamdal, Cebon, Coates, Dreno, Henz, Schadendorf, Kapp, Weiss, Fraass, Statkevich, Muller, Thatcher (2000.) „Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma“. *Journal of Clinical Oncology* 18(1):158–158.
- Mirmohammadsadegh, Marini, Nambiar, Hassan, Tannapfel, Ruzicka, Hengge (2006.) „Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma.“ *Cancer Research* 66(13):6546–52.
- Myers, Applegate, Danuser, Fischer, Waterman (2011.) „Distinct ECM mechanosensing pathways regulate microtubule dynamics to control endothelial cell branching morphogenesis“. *Journal of Cell Biology* 192(2):321–34.
- Najm, El-Sibai (2014.) „Palladin regulation of the actin structures needed for cancer invasion.“ *Cell Adhesion & Migration* 8(1):29–35.
- Nakamura, Yano, Uchida, Hashimoto, Schaefer, Sabe (2000.) „Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells.“ *The Journal of Biological Chemistry* 275(35):27155–64.
- Nelson, Folkmann, Henry, DeMali (2012.) „Vinculin activators target integrins from within the cell to increase melanoma sensitivity to chemotherapy“. *Molecular Cancer Research* 9(6):712–23.
- Ng, Humphries, Byron, Millon-Frémillon, Humphries (2014.) „Microtubule-dependent modulation of adhesion complex composition“. *PLoS ONE* 9(12):e115213.
- Nikkola, Vihinen, Vlaykova, Hahka-Kemppinen, Heino, Pyrhönen (2004.) „Integrin

chains beta1 and alpha5 as prognostic factors in human metastatic melanoma.“ *Melanoma Research* 14(1):29–37.

Oakes, Beckham, Stricker, Gardel (2012.) „Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template“. *Journal of Cell Biology* 196(3):363–74.

Palmieri, Ombra, Colombino, Casula, Sini, Manca, Paliogiannis, Ascierto, Cossu (2015.) „Multiple molecular pathways in melanomagenesis: characterization of therapeutic targets“. *Frontiers in Oncology* 5:183.

Pankov, Cukierman, Katz, Matsumoto, Lin, Lin, Hahn, Yamada (2000.) „Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis.“ *The Journal of Cell Biology* 148(5):1075–90.

Paoli, Giannoni, Chiarugi (2013.) „Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression“. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(12):3481–98.

Park, Will, Martin, Gullotti, Friedrichs, Buettner, Schneider, Ludwig, Wixler (2008.) „Deficiency in the LIM-only protein FHL2 impairs assembly of extracellular matrix proteins“. *The FASEB Journal* 22(7):2508–20.

Parker, Teo, McCarroll, Kavallaris (2017.) „An emerging role for tubulin isoforms in modulating cancer biology and chemotherapy resistance.“ *International journal of molecular sciences* 18(7).

Parvani, Galliher-Beckley, Schiemann, Schiemann (2013.) „Targeted inactivation of β 1 integrin induces β 3 integrin switching, which drives breast cancer metastasis by TGF- β .“ *Molecular Biology of the Cell* 24(21):3449–59.

Paulitschke, Berger, Paulitschke, Hofstatter, Knapp, Dingelmaier-Hovorka, Fodinger, Jager, Szekeres, Meshcheryakova, Bileck, Pirker, Pehamberger, Gerner, Kunstfeld (2015.) „Vemurafenib resistance signature by proteome analysis offers new strategies and rational therapeutic concepts“. *Molecular Cancer*

Therapeutics 14(3):757–68.

PDQ Adult Treatment Editorial Board (2018.) *Melanoma treatment (PDQ®): Health professional version*. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US).

Pickarski, Gleason, Bednar, Duong (2015.) „Orally active $\alpha\beta 3$ integrin inhibitor MK-0429 reduces melanoma metastasis.“ *Oncology Reports* 33(6):2737–45.

Pickup, Mouw, Weaver (2014.) „The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer.“ *EMBO Reports* 15(12):1243–53.

Pinon, Wehrle-Haller (2011.) „Integrins: Versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation“. *Pigment Cell and Melanoma Research* 24(2):282–94.

Piva, Jakubzig, Bendas (2017.) „Integrin activation contributes to lower cisplatin sensitivity in MV3 melanoma cells by inducing the Wnt signalling pathway“. *Cancers* 9(125):1–16.

Pollock, Harper, Hansen, Yudt, Stark, Robbins, Moses, Hostetter, Wagner, Kakareka, Salem, Pohida, Heenan, Duray, Kallioniemi, Hayward, Trent, Meltzer (2003.) „High frequency of BRAF mutations in nevi“. *Nature Genetics* 33(1):19–20.

R&D Systems (bez dat.) „Integrin Subunit Interactions“. Preuzeto 20. studeni 2018. (<https://www.rndsystems.com/resources/posters/integrin-subunit-interactions>).

Raab-Westphal, Marshall, Goodman, Raab-Westphal, Marshall, Goodman (2017.) „Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers“. *Cancers* 9(12):110.

Rebhun, Cheng, Gershenwald, Fan, Fidler, Langley (2010.) „Constitutive expression of the $\alpha 4$ integrin correlates with tumorigenicity and lymph node metastasis of the B16 murine melanoma.“ *Neoplasia* 12(2):173–82.

del Rio, Perez-Jimenez, Liu, Roca-Cusachs, Fernandez, Sheetz (2009.) „Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding“. *Science* 323(5914):638–41.

- Ritsma, Dey-Guha, Talele, Sole, Salony, Chowdhury, Ross, Ramaswamy (2017.) „Integrin β 1 activation induces an anti-melanoma host response.“ *PLoS ONE* 12(4):e0175300.
- Robertson, Jacquemet, Byron, Jones, Warwood, Selley, Knight, Humphries, Humphries (2015.) „Defining the phospho-adhesome through the phosphoproteomic analysis of integrin signalling“. *Nature Communications* 6(1):6265.
- Rognoni, Ruppert, Fässler (2016.) „The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease“. *Journal of Cell Science* 129(1):17–27.
- Rönty, Taivainen, Moza, Otey, Carpén (2004.) „Molecular analysis of the interaction between palladin and α -actinin“. *FEBS Letters* 566(1–3):30–34.
- Rossier, Oceau, Sibarita, Leduc, Tessier, Nair, Gatterdam, Destaing, Albigès-Rizo, Tampé, Cognet, Choquet, Lounis, Giannone (2012.) „Integrins β 1 and β 3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions“. *Nature Cell Biology* 14(10):1057–67.
- Ruffini, D’Atri, Lacal (2013.) „Neuropilin-1 expression promotes invasiveness of melanoma cells through vascular endothelial growth factor receptor-2-dependent and -independent mechanisms“. *International Journal of Oncology* 43(1):297–306.
- Sadano, Inoue, Taniguchi (1992.) „Differential expression of vinculin between weakly and highly metastatic B16-melanoma cell lines.“ *Japanese Journal of Cancer Research* 83(6):625–30.
- Sakamoto, McCann, Dhir, Kyprianou (2010.) „Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance“. *Cancer Research* 70(5):1885–95.
- Schaller (2001.) „Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein“. *Oncogene* 20(44):6459–72.

- Schiller, Friedel, Boulegue, Fässler (2011.) „Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins.“ *EMBO Reports* 12(3):259–66.
- Schiller, Hermann, Polleux, Vignaud, Zanivan, Friedel, Sun, Raducanu, Gottschalk, Théry, Mann, Fässler (2013.) „ β 1- and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments“. *Nature Cell Biology* 15(6):625–36.
- Schwartz, McRoberts, Coyner, Andarawewa, Frierson, Sanders, Swenson, Markland, Conaway, Theodorescu (2008.) „Integrin agonists as adjuvants in chemotherapy for melanoma“. *Clinical Cancer Research* 14(19):6193–97.
- Seguin, Desgrosellier, Weis, Cheresh (2015.) „Integrins and cancer: Regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance“. *Trends in Cell Biology* 25(4):234–40.
- Senbanjo, Chellaiah (2017.) „CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells“. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5:18.
- Serra, Chetty (2018.) „p16“. *Journal of clinical pathology* 71(10):853–58.
- Shao, Kirkwood, Wells (2015.) „Tenascin-C signaling in melanoma“. *Cell Adhesion and Migration* 9(1–2):25–30.
- Shao, Li, Watkins, Wells (2014.) „ α -Actinin-4 is required for amoeboid-type invasiveness of melanoma cells“. *Journal of Biological Chemistry* 289(47):32717–28.
- Stojanović, Brozovic, Majhen, Bosnar, Fritz, Osmak, Ambriović-Ristov (2016.) „Integrin $\alpha\beta$ 3 expression in tongue squamous carcinoma cells Cal27 confers anticancer drug resistance through loss of pSrc(Y418)“. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863(8):1969–78.

- Stojanović, Dekanić, Paradžik, Majhen, Ferenčak, Ruščić, Bardak, Supina, Tomicic, Christmann, Osmak, Ambriović-Ristov (2018.) „Differential effects of integrin α knockdown and cilengitide on sensitisation of triple-negative breast cancer and melanoma cells to microtubule poisons.“ *Molecular pharmacology* 94(6):mol.118.113027.
- Stojanovic, Dekanic, Paradzik, Majhen, Ferencak, Ruscic, Bardak, Supina, Tomicic, Christmann, Osmak, Ambriovic-Ristov, Stojanović, Dekanić, Paradžik, Majhen, Ferenčak, Ruščić, Bardak, Supina, Tomicic, Christmann, Osmak, Ambriović-Ristov, Stojanovic, Dekanic, Paradzik, Majhen, Ferencak, Ruscic, Bardak, Supina, Tomicic, Christmann, Osmak, Ambriovic-Ristov, Stojanović, Dekanić, Paradžik, Majhen, Ferenčak, Ruščić (2018.) „Supplement Differential Effect of Integrin α Knockdown and Cilengitide in Sensitisation of Triple-Negative Breast Cancer and Melanoma Cells to Microtubule Poisons“. *Molecular pharmacology* 94(6):mol.118.113027.
- Stordal, Davey (2007.) „Understanding cisplatin resistance using cellular models“. *IUBMB Life* 59(11):696–99.
- STRING Consortium 2018 (2017.) „STRING 10.5“. Preuzeto 07. prosinac 2018. (<https://string-db.org/>).
- Sulzmaier, Jean, Schlaepfer (2014.) „FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications“. *Nature Reviews Cancer* 14(9):598–610.
- Szklarczyk, Morris, Cook, Kuhn, Wyder, Simonovic, Santos, Doncheva, Roth, Bork, Jensen, von Mering (2017.) „The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible.“ *Nucleic Acids Research* 45(D1):D362–68.
- Tai, Chen, Shen (2015.) „Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer“. *BioMed Research International* 2015(690690):1–13.
- Tentori, Dorio, Muzi, Lacal, Ruffini, Navarra, Graziani (2008.) „The integrin

- antagonist cilengitide increases the antitumor activity of temozolomide against malignant melanoma“. *Oncology Reports* 19(4):1039–43.
- The human protein atlas (2018.) „The human protein atlas, verzija 18.1“. Preuzeto 10. siječanj 2018. (<https://www.proteinatlas.org/>).
- Truong, Xiong, Ghotra, Nirmala, Haazen, Le Dévédec, Balcioglu, He, Snaar-Jagalska, Vreugdenhil, Meerman, Van De Water, Danen (2014.) „ β 1 integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGF β -miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer“. *Science Signaling* 7(312):1–12.
- Tu, Huang, Zhang, Hua, Wu (2001.) „A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading.“ *The Journal of cell biology* 153(3):585–98.
- Uhm, Dooley, Kyritsis, Rao, Gladson (1999.) „Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death.“ *Clinical Cancer Research* 5(6):1587–94.
- UniprotKB (2018.) „UniProtKB - Q07817 (B2CL1_HUMAN)“. *BCL2L1*. Preuzeto 15. siječanj 2018. (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q07817#>).
- Velasco-Velázquez, Salinas-Jazmín, Mendoza-Patiño, Mandoki (2008.) „Reduced paxillin expression contributes to the antimetastatic effect of 4-hydroxycoumarin on B16-F10 melanoma cells.“ *Cancer Cell International* 8:8.
- Vogetseder, Thies, Ingold, Roth, Weller, Schraml, Goodman, Moch (2013.) „Alpha v Integrin Isoform Expression in Primary Human Tumors and Brain Metastases“. *International Journal of Cancer* 133(10):2362–71.
- Wagner, Panelos, Massi, Wagner (2008.) „The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation“. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 455(5):839–47.
- Walker, Schalch, King, Dietrich, Eastman, Kwak, Kim, Albertini (2005.) „Phase II

- trial of weekly paclitaxel in patients with advanced melanoma.“ *Melanoma Research* 15(5):453–59.
- Weaver (2014.) „How Taxol/paclitaxel kills cancer cells.“ *Molecular Biology of the Cell* 25(18):2677–81.
- Weber (2003.) „Reflection interference contrast microscopy“. *Methods in Enzymology* 361(1975):34–47.
- Westphal, Mauch, Florin, Czerwitzki, Olligschläger, Wodtke, Schüle, Büttner, Friedrichs (2015.) „Enhanced FHL2 and TGF- β 1 expression is associated with invasive growth and poor survival in malignant melanomas“. *American Journal of Clinical Pathology* 143(2):248–56.
- Whittaker, Bergeron, Whittle, Brandhorst, Burke, Hynes (2006.) „The echinoderm adhesome“. *Developmental Biology* 300(1):252–66.
- Wickström, Lange, Montanez, Fässler (2010.) „The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase!“ *The EMBO Journal* 29(2):281–91.
- Willett, Pollard, Vlasak, Morley (2010.) „Localization of ribosomes and translation initiation factors to talin/ β 3-integrin-enriched adhesion complexes in spreading and migrating mammalian cells“. *Biology of the Cell* 102(5):265–76.
- Winograd-Katz, Fässler, Geiger, Legate (2014.) „The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(4):273–88.
- Wong, Mueller, Barbas, Ruminski, Quaranta, Lin, Smith (1998.) „Alphav integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines.“ *Clinical & Experimental Metastasis* 16(1):50–61.
- Wu, Pagel, Muldoon, Fu, Neuwelt (2017.) „High α v integrin level of cancer cells is associated with development of brain metastasis in athymic rats“. *Anticancer Research* 37(8):4029–40.

- Yang, Flores, Li, Zhou, Xu, Krop, Hemler (2010.) „Disruption of laminin-integrin-CD151-focal adhesion kinase axis sensitizes breast cancer cells to ErbB2 antagonists“. *Cancer Research*.
- Yang, Horwitz, Yang, Horwitz (2017.) „Taxol: The first microtubule stabilizing agent“. *International Journal of Molecular Sciences* 18(8):1733.
- Yoshinaga, Vink, Dekker, Mihm, Byers (1993.) „Role of alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins in melanoma cell migration.“ *Melanoma Research* 3(6):435–41.
- Yue (2014.) „Biology of the extracellular matrix: An overview“. *Journal of Glaucoma*.
- Yue, Xie, Gou, Lee, Schneider, Wu (2014.) „Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4.“ *Developmental Cell* 31(5):572–85.
- Yusuf, Duan, Lamendola, Penson, Seiden (2003.) „Paclitaxel resistance: Molecular mechanisms and pharmacologic manipulation“. *Current Cancer Drug Targets* 3(1):1–19.
- Zaidel-Bar, Geiger (2010.) „The switchable integrin adhesome“. *Cell Science at a Glance* 123.
- Zaidel-Bar, Itzkovitz, Ma'ayan, Iyengar, Geiger (2007.) „Functional atlas of the integrin adhesome“. *Nature Cell Biology* 9(8):858–67.
- Zambruno, Marchisio, Melchiori, Bondanza, Cancedda, De Luca (1993.) „Expression of integrin receptors and their role in adhesion, spreading and migration of normal human melanocytes.“ *Journal of Cell Science* 105(1):179–90.
- Zamir, Katz, Posen, Erez, Yamada, Katz, Lin, Lin, Bershadsky, Kam, Geiger (2000.) „Dynamics and segregation of cell–matrix adhesions in cultured fibroblasts“. *Nature Cell Biology* 2(4):191–96.
- Zhou, Yang, Xing (2011.) „Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis“. *FEBS Journal* 278(3):403–13.

7. SAŽETAK

Metastatski melanom je najsmrtonosniji tumor kože, a prognoze pacijenata korištenjem danas dostupnih terapija su vrlo loše, zbog relativno brze pojave otpornosti na lijekove. Iz tog razloga potrebno je naći nove mete za terapiju ili načine kako postojeće terapije učiniti učinkovitijima, a jedan od načina je kombinirana terapija. Integrini su transmembranski adhezivni proteini, često povećano eksprimirani u tumorima, koji prenose signale preživljenja, proliferacije, migracije i diferencijacije, a mogu modulirati i odgovor tumora na protutumorski lijek. Upravo zato integrini predstavljaju potencijalne ciljne molekule za terapiju ili kombinacijsku terapiju. Integrini nemaju enzimsku funkciju, već signale prenose preko stvaranja višemolekulskog kompleksa signalnih i adaptornih proteina koji nastaju oko citoplazmatskog repa integrina nakon vezanja za izvanstanični matriks koji se zove fokalna adhezija ili kompleks adhezije integrina (IAC). Ukupni proteini IAC-a čine adhesom, skup molekula koje potencijalno mogu biti mete za terapiju tumora, međutim, nisu dovoljno istražene.

Cilj ovog doktorskog rada bio je istražiti potencijal utišavanja integrina α_3 , α_4 ili α_v u modulaciji osjetljivosti stanica melanoma čovjeka (MDA-MB-435S, RPMI-7951, MeWo i A375) na protutumorske lijekove (cisplatinu, paklitaksel i vinkristin). Na integrin $\alpha_v\beta_1$ negativnim stanicama melanoma čovjeka MDA-MB-435S, identificirana je integrinska podjedinica α_v kao potencijalna meta za kombinacijsku terapiju melanoma, jer njeno utišavanje povećava osjetljivost na vinkristin ili paklitaksel i ujedno smanjuje pokretljivost. Upravo je integrin $\alpha_v\beta_5$ odgovoran za povećanje osjetljivosti na ove protutumorske lijekove. Utišavanje ekspresije integrina α_v dovodi i do povećanja osjetljivosti stanica RPMI-7951 na djelovanje cisplatine, paklitaksela i vinkristina te do smanjenja pokretljivosti, migracije i invazije, također posredovane integrinom $\alpha_v\beta_5$. Međutim, u stanicama A375 i MeWo nakon utišavanja integrina α_v zabilježeno je smanjenje osjetljivosti na sva tri protutumorska lijeka, ali i smanjenje migracije u stanicama A375.

Budući da je integrin αv odabran kao moguća meta za terapiju u stanicama RPMI-7951, upravo u tim stanicama smo istražili sastav IAC-a, odnosno adhesom metodom masene spektrometrije nakon prolazne transfekcije integrin αv -specifičnom siRNA. Cilj nam je bio otkriti ključne proteine u odgovoru na terapiju protutumorskim lijekovima, migraciji i invaziji. Dobiveni rezultati pokazuju da stanice RPMI-7951 preferencijalno stvaraju fokalne adhezije preko integrina $\alpha v\beta 5$. Nakon utišavanja integrina αv otkriveno je niz promjena u sastavu IAC-a te proteina izvanstaničnog matriksa, a promijenjeni proteini IAC su označeni kao „adhesom integrina αv “.

Rezultati dobiveni u ovom radu nisu otkrili kombiniranu terapiju koja bi bila učinkovita za sve istraživane stanične linije, ali je zabilježena promjena osjetljivosti na protutumorske lijekove i promjena u *in vitro* migraciji i invaziji. Podatci adhesoma, a posebice integrin αv adhesoma, predstavljaju vrijedan izvor podataka za daljnja istraživanja koja bi mogla dovesti do identifikacije potencijalnih ciljnih molekula za kombiniranu primjenu s protutumorskim lijekovima za liječenje metastatskog melanoma.

8. SUMMARY

Metastatic melanoma is the deadliest skin cancer, and the prognosis for patients, taking into account today's available therapies, is unfavourable due to the relatively rapid emergence of drug resistance. Therefore, it is necessary to find new targets for therapy or new ways to make existing therapies more effective, such as combinational therapy. Integrins are transmembrane adhesion proteins, often overexpressed in tumors, that transmit signals of survival, proliferation, migration and differentiation, and can modulate response to therapy. That is why integrins represent potential targets for mono- or combinational therapy. Integrins don't have enzymatic function, but transmit signals through a multimolecular complex of signaling and adaptive proteins called focal adhesion (i.e. an integrin adhesion complex, IAC). These proteins organize around the cytoplasmic tail of integrins after integrins bind to an extracellular matrix ligand. The total sum of proteins of the IAC termed “the adhesome” represents a set of molecules that can potentially be targeted for tumor therapy, but have been insufficiently investigated.

The goal of this doctoral thesis was to investigate the potential of integrin subunits α (α_3 , α_4 or α_v) knockdown in the modulation of sensitivity of human melanoma cells (MDA-MB-435S, RPMI-7951, MeWo and A375) to antitumour drugs (cisplatin, paclitaxel or vincristine). In the model of integrin $\alpha\beta_1$ negative cells MDA-MB-435S, integrin subunit α_v was identified as a potential target for combinational therapy, since α_v knockdown increases sensitivity to vincristine or paclitaxel and, at the same time, reduces *in vitro* cell motility. Integrin $\alpha\beta_5$ was found to be responsible for the observed increase in sensitivity to antitumour drugs. Integrin subunit α_v knockdown in RPMI-7951 cells increased sensitivity to cisplatin, paclitaxel or vincristin and reduced *in vitro* migration and invasion, again via integrin $\alpha\beta_5$. A different effect was observed in A375 and MeWo cells, where integrin α_v knockdown led to a decrease in sensitivity to cisplatin, paclitaxel or vincristine, but nevertheless to the reduction of *in vitro* migration of A375 cells.

Since integrin αv was selected as a possible target for melanoma treatment, we investigated the composition of the IAC by mass spectrometry in RPMI-7951 cells transfected with control or integrin αv -specific siRNA. Our goal was to discover key proteins involved in the observed increase in sensitivity to antitumour therapy and *in vitro* migration and invasion observed in these cells after integrin αv knockdown. Data suggest that RPMI-7951 preferentially form focal adhesions via integrins $\alpha\beta 5$. Upon αv knockdown, a number of changes have been discovered in the ECM proteins and the IAC composition, and the modulated IAC proteins were classified as „the integrin αv adhesome“.

Results obtained in this doctoral thesis did not reveal a combinational therapy that would be effective for all the investigated melanoma cell lines, but the effect of integrin αv knockdown on sensitivity to antitumour drugs and the change in *in vitro* migration and invasion was observed. Adhesome data obtained from RPMI-7951 cells and in particular the integrin αv adhesome represent a valuable source of data for further studies that could lead to the identification of potential target molecules for combined use with antitumour drugs for the metastatic melanoma treatment.

9. PRILOZI

9.1. Metoda: spektrometrija masa

Analiza proteina fokalnih adhezija provedena je masenom spektrometrijom u laboratoriju dr. Martina J. Humphriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Science, University of Manchester). Uzorci skupljenih kompleksa adhezije integrina (IAC) su naneseni u gel (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm) i nakon elektroforeze 3 minute pri 200V, vrpca proteina uzorka vizualizirana je bojenjem InstantBlue (Sigma-Aldrich), zatim je izrezana, isprana i odbojana (izmjenom amonijevog bikarbonata i acetonitrila). Proteini su reducirani ditionitrom, alkilirani jodoacetamidom i razgrađeni tripsinom. Dobiveni peptidi su nakon izdvajanja iz gela, koncentrirani i analizirani masenim spektrometrom. Spektri su identificirani pomoću programa Mascot Daemon (Matrix science, inačica 2.5.1) pretragom baze podataka čovjeka Swissprot (inačica 2018_01, 161629 unosa). Dopuštena tolerancija mase prekursora i fragmenata iona iznosila je 5 ppm, odnosno 0,50 Da. Identificirani peptidi te broj spektara svakog proteina su analizirani te dodatno potvrđeni računalnim programom Scaffold. Identifikacija spektara vršena je prema algoritmu Scaffold local FDR (prag vjerojatnosti 95%) a proteini su identificirani uz vjerojatnost iznad 99% te minimalno 1 prepoznati karakteristični peptid uz algoritam Protein prophet63.

9.2. Adhesom stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom siRNA ili integrin α -specifičnom podjedinicom siRNA

Tablica 28. Adhesom (sastav IAC-a) stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom siRNA (si(-)) ili siRNA specifičnom za integrinsku podjedinicu α (si(α)) s minimalnim brojem spektara 1. Dva dana nakon prolaznog utišavanja kontrolne stanice RPMI-7951 transficirane siRNA skupljeni su IAC-i i analizirani na masenom spektrometru. Identifikacija je provedena programom Mascot i potvrđena programom Scaffold. Proteini identificirani s minimalnim brojem spektara 1 u barem jednom od uzoraka su navedeni u tablici na engleskom jeziku, poredani po zastupljenosti, a podebljano su označeni proteini pronađeni s minimalnim brojem spektara 4 barem u jednom od 6 analiziranih uzoraka (Horton i ostali, 2015.).

Adhesom (sastav IAC-a) stanica RPMI-7951 si(-) i RPMI-7951 si(α)							
Pristupna oznaka	Ime proteina na engleskom jeziku	RPMI-7951					
		si(-) 1	si(-) 2	si(-) 3	si(α) 1	si(α) 2	si(α) 3
		Broj spektara					
AoA024R88 4	<i>Tenascin c (hexabrachion), isoform cra_a</i>	149	182	108	251	218	171
PLEC	<i>Plectin</i>	253	237	223	130	132	139
VIME	<i>Vimentin</i>	208	312	158	140	242	135
MYH9	<i>Myosin-9</i>	251	282	214	137	145	127
Q6oFE6	<i>Filamin A</i>	147	159	140	84	95	102
TLN1	<i>Talin-1</i>	99	104	101	57	54	83
PXDN	<i>Peroxidasin homolog</i>	33	39	35	47	42	77
BGH3	<i>Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3</i>	57	55	44	78	69	68
FLNB	<i>Filamin-B</i>	148	121	119	54	64	66
AHNK	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i>	143	114	143	50	77	57
FINC	<i>Fibronectin</i>	50	83	32	72	63	53
ACTB	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	234	373	65	155	197	50
EMIL1	<i>Emilin-1</i>	35	42	24	52	43	46
ACTN4	<i>Alpha-actinin-4</i>	82	82	71	49	58	45
H6VRF8	<i>Keratin 1</i>	52	39	28	67	75	41
TSP1	<i>Thrombospondin-1</i>	49	58	24	77	69	39
ACTN1	<i>Alpha-actinin-1</i>	75	96	74	41	53	39
FBN1	<i>Fibrillin-1</i>	11	14	45	21	14	36
IQGA1	<i>Ras gtpase-activating-like protein IQGAP1</i>	79	82	51	49	43	33
HTRA1	<i>Serine protease HTRA1</i>	29	35	20	42	47	32
ANXA2	<i>Annexin A2</i>	30	27	26	20	22	30

K22E	<i>Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal</i>	29	23	17	37	35	29
TIMP3	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>	16	13	21	19	16	29
CYR61	<i>Protein CYR61</i>	27	37	21	45	40	27
Q5SU16	<i>Tubulin beta chain</i>	36	43	33	24	24	27
MOES	<i>Moesin</i>	46	34	29	31	27	26
SRPX	<i>Sushi repeat-containing protein SRPX</i>	10	12	12	25	15	26
K1C10	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>	34	35	15	38	46	25
K1C9	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>	27	23	9	55	45	24
Q8IZ29	<i>Tubulin beta chain</i>	37	42	26	24	26	24
HSP7C	<i>Heat shock cognate 71 kda protein</i>	33	33	30	22	26	22
B3KPS3	<i>Tubulin alpha chain</i>	28	32	34	22	19	21
WNT5A	<i>Protein Wnt-5a</i>	12	15	19	19	14	21
TENS3	<i>Tensin-3</i>	28	17	13	12	10	18
TGM2	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</i>	17	22	8	21	17	16
MYH10	<i>Myosin-10</i>	47	46	31	22	18	16
H15	<i>Histone H1.5</i>	7	8	13	16	9	16
K2C5	<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	17	16	6	18	22	15
THSD4	<i>Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4</i>	21	23	5	24	17	14
VINC	<i>Vinculin</i>	35	35	21	17	18	13
KPYM	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	24	22	13	20	13	13
K1C14	<i>Keratin, type I cytoskeletal 14</i>	15	12	5	19	16	13
EF2	<i>Elongation factor 2</i>	22	28	16	15	18	12
A3RoT8	<i>Histone 1, H1e</i>	8	8	8	12	12	12
Q5MST4	<i>Connective tissue growth factor</i>	4	9	8	6	9	12
EZRI	<i>Ezrin</i>	22	13	13	16	11	12
TFPI2	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>	31	26	10	48	33	11
SPTN1	<i>Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1</i>	46	49	36	15	11	11
ATS4	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4</i>	11	13	10	16	12	11
EF1A1	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	9	11	12	14	11	10
AoA024R4F1	<i>Enolase 1, (Alpha), isoform CRA_a</i>	13	12	8	7	14	10
A6XAA7	<i>Gremlin</i>	5	7	4	8	8	10
TLN2	<i>Talin-2</i>	17	16	12	5	7	10

CSPG2	<i>Versican core protein</i>	12	28	14	25	26	9
WNT5B	<i>Protein Wnt-5b</i>	8	8	9	7	8	9
G3P	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	18	14	12	22	6	8
VTNC	<i>Vitronectin</i>	6	11	8	10	10	8
ANXA1	<i>Annexin A1</i>	7	8	4	15	13	8
B2ZZ89	<i>Spectrin beta chain</i>	66	59	37	26	23	7
PPIA	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	9	11	10	6	6	7
SFRP1	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>	4	6	5	6	10	7
HS71A	<i>Heat shock 70 kda protein 1A</i>	13	11	11	4	11	7
AoAoC4DGB6	<i>Serum albumin</i>	5	4	5	6	5	7
DYHC1	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	14	23	14	5	18	6
LEG1	<i>Galectin-1</i>	8	8	5	11	6	6
IF4A1	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	19	15	7	11	10	5
AoA14oVKo7	<i>Testicular secretory protein Li 7</i>	10	6	6	4	9	5
RS27A	<i>Ubiquitin-4oS ribosomal protein S27a</i>	10	8	10	7	8	5
B3KQQ9	<i>Cdna PSECOO48 fis, clone NT2RP2000028, highly similar to Serine protease 23</i>	6	7	5	8	6	5
PCBP1	<i>Poly(rc)-binding protein 1</i>	6	9	5	7	6	5
Q6NZ52	<i>Ribosomal protein L27a</i>	5	5	4	5	6	5
CLH1	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	16	10	11	7	19	4
CLIC1	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	14	11	12	7	5	4
TKT	<i>Transketolase</i>	5	6	6	6	4	4
SLIT2	<i>Slit homolog 2 protein</i>	2	4	4	17	9	28
EDIL3	<i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i>	3	5	6	8	7	19
RADI	<i>Radixin</i>	24	14	0	15	10	15
K2C6C	<i>Keratin, type II cytoskeletal 6C</i>	18	16	0	19	20	13
Q5JR94	<i>4oS ribosomal protein S8</i>	8	9	3	9	8	8
K1C16	<i>Keratin, type I cytoskeletal 16</i>	13	9	0	15	19	8
AoA14oVKAo	<i>Caldesmon 1, isoform CRA_i</i>	15	9	11	3	6	7
RL23A	<i>6oS ribosomal protein L23a</i>	6	8	0	19	11	7
PAI1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>	11	12	1	6	5	6

RL6	<i>60S ribosomal protein L6</i>	4	6	2	8	9	6
H10	<i>Histone H1.0</i>	5	5	2	10	6	6
B7Z6Z4	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	9	7	10	4	3	6
HBA	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	6	5	0	6	6	6
LRC17	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 17</i>	5	4	0	4	5	6
LAMA5	<i>Laminin subunit alpha-5</i>	11	15	3	26	25	5
SEM3C	<i>Semaphorin-3C</i>	8	9	0	17	11	5
CO4A	<i>Complement C4-A</i>	5	8	3	7	9	5
TGFB1	<i>Transforming growth factor beta-1</i>	5	8	0	8	6	5
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>	9	17	16	0	15	4
GDN	<i>Glia-derived nexin</i>	6	7	3	12	7	4
DDX3X	<i>ATP-dependent RNA helicase DDX3X</i>	3	5	4	6	7	4
B4DDT3	<i>Cdna FLJ54622, highly similar to Prothrombin (EC 3.4.21.5)</i>	5	5	0	10	4	4
D3DTX7	<i>Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a</i>	0	5	5	4	6	4
HS90B	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	15	19	14	4	11	3
H3BQK9	<i>Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5</i>	20	7	8	5	5	3
LMNA	<i>Prelamin-A/C</i>	7	6	6	4	12	3
COR1C	<i>Coronin-1C</i>	14	9	7	5	5	2
D3DPU2	<i>Adenylyl cyclase-associated protein</i>	11	7	6	4	4	2
AoAoAoMT H3	<i>Integrin-linked protein kinase</i>	7	7	5	6	5	2
AoAoS2Z4G 4	<i>Tropomyosin 3 isoform 1 (Fragment)</i>	11	8	7	7	5	1
V9HWJ7	<i>Epididymis secretory protein Li 37</i>	21	16	5	5	10	0
HS90A	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	8	13	6	4	12	0
F5H5D3	<i>Tubulin alpha chain</i>	25	29	32	0	0	20
RL22	<i>60S ribosomal protein L22</i>	4	3	0	10	6	6
CD44	<i>CD44 antigen</i>	4	7	3	5	3	6
H4	<i>Histone H4</i>	3	5	0	7	7	5
RS3	<i>40S ribosomal protein S3</i>	5	3	0	10	4	5
AoA140VKE 5	<i>Sulfhydryl oxidase</i>	5	4	0	5	3	5
SEPT2	<i>Septin-2</i>	13	8	2	8	6	3
SVIL	<i>Supervillin</i>	7	4	11	0	4	3
H2A2A	<i>Histone H2A type 2-A</i>	8	6	3	5	6	3

MYO1B	<i>Unconventional myosin-Ib</i>	20	14	9	6	3	2
AoAo24RDE8	<i>PDZ and LIM domain 5, isoform CRA_c</i>	9	9	9	1	4	2
RS7	<i>40S ribosomal protein S7</i>	9	6	0	9	6	2
VIGLN	<i>Vigilin</i>	5	10	6	0	4	2
ML12A	<i>Myosin regulatory light chain 12A</i>	10	5	4	4	3	2
ZYX	<i>Zyxin</i>	7	8	5	2	4	2
PTX3	<i>Pentraxin-related protein PTX3</i>	8	7	0	12	11	0
TPM4	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	13	8	3	7	8	0
PRDX1	<i>Peroxiredoxin-1</i>	10	8	6	3	6	0
MY18A	<i>Unconventional myosin-xviii</i>	9	7	4	3	7	0
DPYL2	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	10	11	4	3	7	0
LIPB1	<i>Liprin-beta-1</i>	7	5	2	4	4	0
PLST	<i>Plastin-3</i>	11	9	6	3	9	0
DDX21	<i>Nucleolar RNA helicase 2</i>	4	4	0	8	4	0
AP2A1	<i>AP-2 complex subunit alpha-1</i>	6	5	2	4	4	0
MYO1C	<i>Unconventional myosin-Ic</i>	7	6	0	5	4	0
RS15A	<i>40S ribosomal protein S15a</i>	5	4	0	4	6	0
AoAoS2Z4I9	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein isoform 3 (Fragment)</i>	6	5	3	5	6	0
SAHH	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	5	4	0	5	4	0
RS18	<i>40S ribosomal protein S18</i>	4	4	0	9	5	0
Q6ZQN2	<i>Cdna FLJ46846 fis, clone UTERU3004635, moderately similar to Neuroblast differentiation associated protein AHNAK (Fragment)</i>	53	43	0	14	26	0
PCBP2	<i>Poly(rc)-binding protein 2</i>	5	7	5	0	5	0
CoIMJ3	<i>Periostin isoform thy6</i>	2	3	0	4	10	8
H2BFS	<i>Histone H2B type F-S</i>	4	2	0	4	1	7
AoA14oVK8o	<i>Testis secretory sperm-binding protein Li 207a</i>	0	2	3	4	5	5
AoAoAoMRJ7	<i>Coagulation factor V</i>	3	5	0	5	2	4
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	2	3	0	4	4	4
FERM2	<i>Fermitin family homolog 2</i>	17	7	2	4	3	3
ATL1	<i>ADAMTS-like protein 1</i>	0	5	0	8	7	3
AoAo24QZD1	<i>Ribosomal protein L18, isoform CRA_c</i>	3	4	0	4	4	3

CO3	<i>Complement C3</i>	4	3	0	8	8	2
AoA024RAC0	<i>Leucine zipper protein 1, isoform CRA_a</i>	10	11	10	0	0	2
AoA024R2G7	<i>Ribosomal protein L32, isoform CRA_a</i>	7	7	0	2	7	2
A2MG	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	5	3	0	6	9	2
WDR1	<i>WD repeat-containing protein 1</i>	7	8	4	2	2	2
AGRIN	<i>Agrin</i>	3	6	0	8	7	2
PALLD	<i>Palladin</i>	4	4	12	0	0	2
AoA087WUS0	<i>40S ribosomal protein S24</i>	6	3	2	9	5	2
RS2	<i>40S ribosomal protein S2</i>	3	5	1	5	4	2
B4DDF4	<i>Calponin</i>	6	3	5	2	5	2
D3DRX6	<i>Kinesin-like protein</i>	4	6	1	3	4	2
B7Z992	<i>Cdna FLJ53698, highly similar to Gelsolin</i>	3	5	0	5	5	2
NACA	<i>Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha</i>	4	5	0	7	3	2
Q59GY2	<i>Ribosomal protein L4 variant (Fragment)</i>	6	4	0	6	2	2
RL9	<i>60S ribosomal protein L9</i>	11	2	0	11	4	1
YBOX1	<i>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</i>	3	5	0	8	6	1
AoA024R1V4	<i>60S ribosomal protein L27</i>	4	5	0	2	5	1
AoA024R2Q4	<i>Ribosomal protein L15</i>	4	4	1	4	2	1
E1NZA1	<i>Peroxisome proliferator activated receptor interacting complex protein</i>	4	8	2	0	5	1
ITAV	<i>Integrin alpha-V</i>	12	15	9	1	0	0
TB182	<i>182 kda tankyrase-1-binding protein</i>	18	10	1	3	5	0
ITB5	<i>Integrin beta-5</i>	6	9	9	0	0	0
PDLI7	<i>PDZ and LIM domain protein 7</i>	8	4	5	2	3	0
B2R4C0	<i>60S ribosomal protein L18a</i>	9	7	1	3	4	0
MVP	<i>Major vault protein</i>	4	2	5	7	3	0
A2RUM7	<i>Ribosomal protein L5</i>	6	3	0	11	8	0
1433Z	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	7	5	2	3	4	0
AoA024R152	<i>HCG28765, isoform CRA_b</i>	10	6	4	0	3	0
A8K9B9	<i>Cdna FLJ77391, highly similar to Homo sapiens EH-domain containing 4 (EHD4), mrna</i>	3	6	0	4	7	0
Q6ZS99	<i>Cdna FLJ45706 fis, clone FEBRA2028457, highly</i>	3	5	0	9	6	0

	<i>similar to Nucleolin</i>						
SEM3D	<i>Semaphorin-3D</i>	2	5	0	8	5	0
A8K4Wo	<i>40S ribosomal protein S3a</i>	3	4	0	7	6	0
ARC1B	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B</i>	3	5	4	2	5	0
COF1	<i>Cofilin-1</i>	5	4	3	4	3	0
ARPC2	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 2</i>	3	7	0	4	5	0
TAGL2	<i>Transgelin-2</i>	5	6	3	3	4	0
BoZBD0	<i>40S ribosomal protein S19</i>	5	2	0	7	4	0
ACTC	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	91	0	42	0	115	0
J3QSU6	<i>Tenascin</i>	148	180	0	245	0	0
LAMB1	<i>Laminin subunit beta-1</i>	0	4	0	4	6	0
E9KL35	<i>Epididymis tissue sperm binding protein Li 3a</i>	3	4	0	4	7	0
FLII	<i>Protein flightless-1 homolog</i>	4	5	2	0	4	0
SEPT7	<i>Septin-7</i>	7	4	5	3	3	0
PAXI	<i>Paxillin</i>	4	4	5	0	0	0
1433B	<i>14-3-3 protein beta/alpha</i>	4	4	2	2	5	0
GRP78	<i>78 kda glucose-regulated protein</i>	5	0	0	6	5	0
1433E	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	4	4	0	0	7	0
AoA024RAL1	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (Versican), isoform CRA_c</i>	12	28	0	0	26	0
MMP1	<i>Interstitial collagenase</i>	3	0	3	8	3	14
LTBP1	<i>Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1</i>	0	2	2	5	3	10
ITB1	<i>Integrin beta-1</i>	2	3	4	2	2	5
HABP2	<i>Hyaluronan-binding protein 2</i>	0	0	2	4	3	5
MYLK	<i>Myosin light chain kinase, smooth muscle</i>	2	2	11	0	0	4
CBPZ	<i>Carboxypeptidase Z</i>	2	1	1	5	2	4
RL7A	<i>60S ribosomal protein L7a</i>	3	2	0	6	3	4
LIMD1	<i>LIM domain-containing protein 1</i>	2	4	3	0	0	4
C1QT3	<i>Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3</i>	0	8	0	3	11	3
5NTD	<i>5'-nucleotidase</i>	2	5	8	2	0	3
A2RTY6	<i>Inter-alpha (Globulin) inhibitor H2</i>	3	2	0	5	8	3
ATS1	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>	2	2	0	4	4	3

B2R5W2	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2</i>	2	2	0	6	6	3
RL8	<i>60S ribosomal protein L8</i>	4	1	1	5	3	2
AoA024R9D3	<i>Ribosomal protein L30, isoform CRA_b</i>	3	4	2	7	2	2
SYEP	<i>Bifunctional glutamate/proline--trna ligase</i>	3	6	4	0	2	2
AoA024RC87	<i>Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1, isoform CRA_a</i>	4	3	2	2	4	2
Q6IPH7	<i>RPL14 protein</i>	4	2	0	4	3	2
ALDOA	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	7	3	3	2	5	1
D6RER5	<i>Septin-11</i>	8	5	1	2	0	1
B3KX72	<i>Cdna FLJ44920 fis, clone BRAMY3011501, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	2	1	0	4	4	1
RS14	<i>40S ribosomal protein S14</i>	3	3	0	7	4	1
RSMN	<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N</i>	2	1	0	5	4	1
PYR1	<i>CAD protein</i>	3	9	3	3	5	0
COR1B	<i>Coronin-1B</i>	7	7	2	3	3	0
PDL1	<i>PDZ and LIM domain protein 1</i>	6	3	8	3	1	0
EF1G	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	4	5	3	3	3	0
B1AK87	<i>Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_a</i>	7	4	0	1	3	0
ARP3	<i>Actin-related protein 3</i>	7	9	2	1	3	0
PP1A	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</i>	7	4	0	3	3	0
UROK	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>	6	6	0	3	2	0
PDC6I	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>	7	8	0	0	2	0
XPO2	<i>Exportin-2</i>	2	4	0	0	7	0
AoA024R868	<i>Angiopoietin-like 2, isoform CRA_a</i>	0	0	0	7	8	0
LAMC1	<i>Laminin subunit gamma-1</i>	3	2	0	6	5	0
TARA	<i>TRIO and F-actin-binding protein</i>	5	4	1	1	3	0
LPP	<i>Lipoma-preferred partner</i>	4	3	7	0	0	0
AoA140VJW5	<i>Testicular tissue protein Li 192</i>	3	4	0	2	4	0
SMD2	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2</i>	1	0	0	8	6	0
IF2G	<i>Eukaryotic translation</i>	4	4	2	2	2	0

	<i>initiation factor 2 subunit 3</i>						
B5MDF5	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	6	4	0	2	3	0
ADT2	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	5	4	0	3	2	0
AoA024R1A3	<i>Testicular secretory protein Li 63</i>	6	4	2	0	3	0
COCA1	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>	3	3	0	5	5	0
FHL2	<i>Four and a half LIM domains protein 2</i>	8	7	1	0	0	0
RL12	<i>60S ribosomal protein L12</i>	4	2	0	5	3	0
AoA024R814	<i>Ribosomal protein L7, isoform CRA_a</i>	5	0	0	4	2	0
IMDH2	<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2</i>	5	5	0	0	1	0
RUXE	<i>Small nuclear ribonucleoprotein E</i>	1	3	0	4	4	0
SMD1	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1</i>	3	4	0	5	2	0
AoA024R9C1	<i>Polyadenylate-binding protein</i>	2	2	0	6	4	0
AoA024R1X8	<i>Junction plakoglobin, isoform CRA_a</i>	2	0	0	5	5	0
E9PCY7	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	4	4	0	2	2	0
RS17	<i>40S ribosomal protein S17</i>	2	1	0	5	5	0
K2C1B	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1b</i>	0	0	0	5	11	0
AoA024R1Q8	<i>Ribosomal protein L23, isoform CRA_b</i>	4	3	0	7	2	0
RS16	<i>40S ribosomal protein S16</i>	4	3	0	4	1	0
ARF4	<i>ADP-ribosylation factor 4</i>	0	0	0	5	5	0
1433T	<i>14-3-3 protein theta</i>	4	4	2	0	0	0
AoA024RoE5	<i>Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, alpha 1, isoform CRA_a</i>	4	4	0	0	2	0
B3KX11	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	0	3	0	5	4	0
D9YZV5	<i>Tropomyosin 1 (Alpha) isoform 4</i>	3	6	3	0	4	0
LPXN	<i>Leupaxin</i>	4	2	4	0	0	0
TES	<i>Testin</i>	2	5	4	0	0	0
J3KTJ8	<i>60S ribosomal protein L26 (Fragment)</i>	0	2	0	4	4	0
K1C17	<i>Keratin, type I cytoskeletal 17</i>	0	0	0	14	9	0
TBB6	<i>Tubulin beta-6 chain</i>	0	14	0	0	11	0
AoA1W2PNV4	<i>Uncharacterized protein</i>	5	7	0	0	0	0
TBA4A	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	0	0	0	15	18	0

B2R7F8	<i>Plasminogen</i>	0	0	3	0	0	9
SNED1	<i>Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1</i>	0	0	0	0	2	8
Q59F71	<i>Metalloendopeptidase (fragment)</i>	0	0	0	0	2	6
TFPI1	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>	0	3	2	0	2	5
IMB1	<i>Importin subunit beta-1</i>	2	3	3	3	4	3
AoAoF7G8J1	<i>Plasminogen</i>	2	3	3	3	5	3
J3KQN4	<i>60S ribosomal protein L36a</i>	2	1	1	2	5	3
C9JNW5	<i>60S ribosomal protein L24</i>	4	3	0	3	0	3
KANK2	<i>KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2</i>	9	2	3	3	2	2
AoA024R326	<i>60S ribosomal protein L29</i>	2	0	0	6	3	2
Q96QL0	<i>Ribosomal protein L3</i>	4	3	1	3	0	2
RS9	<i>40S ribosomal protein S9</i>	3	2	0	4	3	2
LDHA	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	5	3	1	3	3	2
CTHR1	<i>Collagen triple helix repeat-containing protein 1</i>	2	3	2	2	4	2
A7BI36	<i>P180/ribosome receptor</i>	1	2	1	0	4	2
HSPB1	<i>Heat shock protein beta-1</i>	4	2	0	1	1	2
RL35	<i>60S ribosomal protein L35</i>	1	0	0	2	4	2
LIMA1	<i>LIM domain and actin-binding protein 1</i>	3	1	4	0	0	2
B2R491	<i>40S ribosomal protein S4</i>	3	2	0	5	3	1
AoA024RB14	<i>40S ribosomal protein S26</i>	2	0	1	2	4	1
AoA1W2PNX8	<i>Protein unc-45 homolog A</i>	4	2	2	0	0	1
A8K4C8	<i>60S ribosomal protein L13</i>	0	0	0	5	3	1
RS13	<i>40S ribosomal protein S13</i>	2	2	0	6	3	0
UACA	<i>Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats</i>	10	3	2	0	1	0
RS10	<i>40S ribosomal protein S10</i>	3	2	0	10	3	0
AoA140VK49	<i>Staphylococcal nuclease domain containing 1, isoform CRA_b</i>	2	3	4	0	3	0
RL35A	<i>60S ribosomal protein L35a</i>	1	1	0	6	1	0
CEMIP	<i>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</i>	3	0	0	11	1	0
ANGL4	<i>Angiotensin-converting enzyme 4</i>	3	3	0	3	5	0
AoA024R8V0	<i>Septin 9, isoform CRA_a</i>	7	2	2	2	2	0

SYRC	<i>Arginine--trna ligase, cytoplasmic</i>	3	5	0	2	2	0
Q68DI0	<i>AP complex subunit beta</i>	5	3	1	0	2	0
GDF15	<i>Growth/differentiation factor 15</i>	2	0	0	5	3	0
DYL1	<i>Dynein light chain 1, cytoplasmic</i>	4	3	0	3	3	0
B4DN72	<i>Cdna FLJ55910, highly similar to Keratin, type II cuticular Hb6</i>	9	0	0	0	0	0
AoA024RoE2	<i>Cold shock domain containing E1, RNA-binding, isoform CRA_a</i>	3	2	5	0	1	0
A2A3R6	<i>40S ribosomal protein S6</i>	0	0	0	6	3	0
AoA087XoK9	<i>Tight junction protein ZO-1</i>	4	0	0	0	2	0
UTRO	<i>Utrophin</i>	1	3	4	0	0	0
AoA024RC61	<i>Aminopeptidase</i>	4	1	2	0	0	0
DESP	<i>Desmoplakin</i>	0	0	0	4	3	0
PRDX6	<i>Peroxiredoxin-6</i>	4	1	3	0	3	0
AoA1L1UHR1	<i>Sperm binding protein 1a</i>	6	3	0	2	0	0
HoYKD8	<i>60S ribosomal protein L28</i>	1	3	0	4	3	0
C9JZR2	<i>Catenin delta-1</i>	0	0	4	0	2	0
IPO7	<i>Importin-7</i>	3	4	0	2	2	0
SYAC	<i>Alanine--trna ligase, cytoplasmic</i>	2	7	2	0	3	0
AoA024RB87	<i>RAP1B, member of RAS oncogene family, isoform CRA_a</i>	4	3	0	3	3	0
SMD3	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3</i>	1	2	0	4	2	0
PUR2	<i>Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3</i>	4	3	0	0	3	0
MoR2E9	<i>Urokinase plasminogen activator surface receptor (Fragment)</i>	3	6	0	2	2	0
SRP14	<i>Signal recognition particle 14 kda protein</i>	3	0	0	6	3	0
B4DL46	<i>Cdna FLJ60406, highly similar to Pleckstrin homology-like domain family B member 2 (Fragment)</i>	4	0	2	0	0	0
AoA024R324	<i>Ras homolog gene family, member A, isoform CRA_a</i>	0	2	0	4	3	0
AoA024R4Q8	<i>Ribosomal protein S5, isoform CRA_a</i>	4	3	0	2	1	0
VPS35	<i>Vacuolar protein sorting-</i>	6	3	0	0	2	0

	<i>associated protein 35</i>						
B2RDQ3	<i>Cdna, FLJ96718, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 10 (transformer 2 homolog, Drosophila) (SFRS10), mrna</i>	2	0	0	5	2	0
DBNL	<i>Drebrin-like protein</i>	2	4	1	0	0	0
PARVA	<i>Alpha-parvin</i>	5	2	0	0	2	0
G3V4T5	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Fragment)</i>	3	4	0	2	1	0
FBLI1	<i>Filamin-binding LIM protein 1</i>	0	2	6	0	0	0
ANXA5	<i>Annexin A5</i>	4	2	0	0	0	0
PRKDC	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>	0	4	0	2	2	0
Q7Z759	<i>CCT8 protein</i>	0	0	0	2	5	0
ACTZ	<i>Alpha-centractin</i>	4	0	0	0	2	0
Q53HV2	<i>Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (Eta) variant (Fragment)</i>	2	0	0	2	5	0
RUVB2	<i>Ruvb-like 2</i>	4	3	0	0	2	0
H11	<i>Histone H1.1</i>	0	0	0	11	0	0
URP2	<i>Fermitin family homolog 3</i>	0	0	0	4	2	0
ATS15	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 15</i>	0	0	0	0	4	0
ABCE1	<i>ATP-binding cassette sub-family E member 1</i>	0	4	0	0	0	0
K1H1	<i>Keratin, type I cuticular Ha1</i>	5	0	0	0	0	0
AoA024R1P2	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (Rho family, small GTP binding protein Rac2), isoform CRA_a</i>	0	0	0	0	4	0
AP2A2	<i>AP-2 complex subunit alpha-2</i>	0	4	0	0	0	0
K2C78	<i>Keratin, type II cytoskeletal 78</i>	0	0	0	0	4	0
TBB1	<i>Tubulin beta-1 chain</i>	0	0	0	7	0	0
TSP4	<i>Thrombospondin-4</i>	0	0	0	4	0	0
E9PMV1	<i>Plectin (fragment)</i>	0	0	32	0	0	0
PP1B	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit</i>	8	0	0	0	0	0
B2R6Lo	<i>Tubulin beta chain</i>	0	0	27	0	0	0
AoA024RAQ1	<i>Cold shock domain protein A, isoform CRA_a</i>	0	0	0	6	0	0

COF2	<i>Cofilin-2</i>	5	0	0	0	0	0
HTRA3	<i>Serine protease HTRA3</i>	1	1	2	2	1	3
TETN	<i>Tetranectin</i>	3	2	2	3	3	3
B2R7T2	<i>Cdna, FLJ93591, highly similar to Homo sapiens transforming growth factor, beta 2 (TGFB2), mrna</i>	0	3	0	2	2	3
AoA140VJU3	<i>Testicular tissue protein Li 170</i>	0	0	0	2	0	3
AoA024RDH8	<i>Ribosomal protein L34, isoform CRA_a</i>	0	0	0	0	1	3
E7EVA0	<i>Microtubule-associated protein</i>	0	0	3	0	0	3
TR11B	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B</i>	0	0	0	0	0	3
PGK1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	3	3	3	2	2	2
RS11	<i>40S ribosomal protein S11</i>	3	1	0	3	2	2
H31	<i>Histone H3.1</i>	1	2	1	2	3	2
ARPC4	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 4</i>	3	2	2	3	3	2
AoA024R944	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade C (Antithrombin), member 1, isoform CRA_a</i>	2	0	3	0	0	2
E9PR30	<i>40S ribosomal protein S30</i>	3	2	0	3	2	2
X6RLX0	<i>ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1</i>	2	0	0	2	0	2
CO4A2	<i>Collagen alpha-2(IV) chain</i>	0	1	0	2	2	2
B7Z8Q2	<i>Cdna FLJ55606, highly similar to Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	0	1	0	1	2	2
AoA024RCJ8	<i>HCG1821276, isoform CRA_a</i>	1	0	2	0	0	2
PI42A	<i>Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha</i>	0	0	0	0	0	2
AoA024R5K8	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade H (Heat shock protein 47), member 1, (Collagen binding protein 1), isoform CRA_a</i>	0	0	0	0	0	2
AoA087X0X3	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	0	0	0	2	0	1
AP2M1	<i>AP-2 complex subunit mu</i>	2	2	1	0	1	1
A8K517	<i>Ribosomal protein S23, isoform CRA_a</i>	0	1	0	3	3	1
Q08ES8	<i>Cell growth-inhibiting protein 34</i>	3	0	0	0	0	1
HORN	<i>Hornerin</i>	0	0	0	0	3	1

AoA024R9W7	<i>Transmembrane protein 33, isoform CRA_a</i>	0	0	0	0	2	1
KPRP	<i>Keratinocyte proline-rich protein</i>	0	0	0	0	0	1
B2RU06	<i>Eif4g1 protein</i>	1	3	2	0	1	0
CSRP1	<i>Cysteine and glycine-rich protein 1</i>	3	3	0	3	3	0
H7C2W9	<i>60S ribosomal protein L31 (Fragment)</i>	3	2	0	3	2	0
AoA024R0S6	<i>EH-domain containing 2, isoform CRA_a</i>	3	3	0	3	3	0
RL37	<i>60S ribosomal protein L37</i>	0	0	0	0	2	0
AoA0S2Z5I7	<i>Shwachman-Bodian-Diamond syndrome isoform 1 (Fragment)</i>	0	1	0	3	3	0
A3KC71	<i>Nuclear envelope protein okuribin</i>	2	2	0	2	2	0
E9PLM6	<i>Midkine</i>	2	3	0	2	3	0
NID1	<i>Nidogen-1</i>	3	3	0	3	1	0
B2R8Z8	<i>Cdna, FLJ94136, highly similar to Homo sapiens synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (SYNCRIP), mrna</i>	2	0	0	2	2	0
BTF3	<i>Transcription factor BTF3</i>	0	2	0	1	1	0
AoA024RDQ0	<i>Heat shock 105kda/110kda protein 1, isoform CRA_a</i>	2	3	0	2	1	0
ARHG2	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 2</i>	2	2	1	0	0	0
LIPA1	<i>Liprin-alpha-1</i>	0	3	0	3	0	0
RS20	<i>40S ribosomal protein S20</i>	2	1	0	2	2	0
ROCK2	<i>Rho-associated protein kinase 2</i>	3	0	3	0	0	0
D3DWB6	<i>Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked, isoform CRA_b</i>	2	3	2	0	2	0
DHX9	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>	0	2	0	3	3	0
AoA024R4No	<i>HCG1640809, isoform CRA_b</i>	2	2	2	3	0	0
NIBL1	<i>Niban-like protein 1</i>	2	3	0	2	3	0
AoA090N8Go	<i>Glycyl-trna synthetase</i>	3	1	0	2	2	0
AoA0S2Z491	<i>Nucleophosmin isoform 2 (Fragment)</i>	0	2	0	2	3	0
AoA0A0MSX9	<i>Isoleucine--trna ligase, cytoplasmic</i>	3	3	0	0	0	0
LASP1	<i>LIM and SH3 domain protein 1</i>	2	2	3	2	0	0
B2RAH5	<i>Cdna, FLJ94919, highly similar to Homo sapiens protein phosphatase 1,</i>	3	3	0	0	2	0

	<i>regulatory (inhibitor) subunit 12A (PPP1R12A), mrna</i>						
CNN3	<i>Calponin-3</i>	3	3	0	0	2	0
ARPC3	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 3</i>	2	3	0	0	0	0
AoA087X1X7	<i>Elongation factor 1-delta</i>	2	3	0	0	2	0
AoA0S2Z377	<i>Annexin (fragment)</i>	3	3	0	0	0	0
ARP2	<i>Actin-related protein 2</i>	3	3	0	0	0	0
A8K3C3	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	2	2	0	2	2	0
RS25	<i>40S ribosomal protein S25</i>	2	1	0	3	1	0
B4DF70	<i>Cdna FLJ60461, highly similar to Peroxiredoxin-2 (EC 1.11.1.15)</i>	2	3	0	2	2	0
E7ESA6	<i>Focal adhesion kinase 1</i>	3	3	0	0	0	0
B5BUB1	<i>Ruvb-like helicase (Fragment)</i>	0	3	1	0	2	0
RAB8B	<i>Ras-related protein Rab-8B</i>	1	0	0	2	3	0
B3VLO5	<i>Beta globin (Fragment)</i>	0	1	0	1	0	0
AoA087XoS5	<i>Collagen alpha-1(VI) chain</i>	0	0	0	3	2	0
AoA024R6W2	<i>Nudix (Nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21, isoform CRA_a</i>	3	0	0	3	1	0
AoA024QZN9	<i>Voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a</i>	2	3	2	0	0	0
PFKAP	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type</i>	0	0	0	2	2	0
B3KVV6	<i>Cdna FLJ43948 fis, clone TEST14014924, highly similar to Homo sapiens cytoplasmic FMR1 interacting protein 1 (CYFIP1), transcript variant 1, mrna</i>	1	3	0	0	1	0
PSMD2	<i>26S proteasome non-atpase regulatory subunit 2</i>	2	2	0	0	2	0
D9ZGG3	<i>Protein wnt</i>	0	2	0	3	0	0
B4DN41	<i>Cdna FLJ53366, highly similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (EC 3.6.1.-)</i>	2	3	0	0	0	0
AoA024R930	<i>Proteoglycan 4, isoform CRA_a</i>	2	0	0	2	0	0
H9ZYJ2	<i>Thioredoxin</i>	0	3	0	1	0	0
AoA0J9YWLO	<i>Beta/gamma crystallin domain-containing protein 1</i>	2	2	3	0	0	0
NDKB	<i>Nucleoside diphosphate</i>	2	3	0	1	2	0

	<i>kinase B</i>						
B2R6V9	<i>Cdna, FLJ93141, highly similar to Homo sapiens coagulation factor XIII, A1 polypeptide (F13A1), mrna</i>	2	1	0	2	1	0
D3DVC4	<i>Nestin, isoform CRA_c</i>	0	3	0	0	2	0
AoAoS2Z4Z9	<i>Non-POU domain containing octamer-binding isoform 1 (Fragment)</i>	2	0	0	2	2	0
AoAo24R228	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform CRA_d</i>	0	0	0	3	3	0
B4DLV7	<i>Rab GDP dissociation inhibitor</i>	1	0	0	0	3	0
B2RCM2	<i>Cdna, FLJ96156, highly similar to Homo sapiens leucyl-trna synthetase (LARS), mrna</i>	2	2	0	0	2	0
AoPJ61	<i>RSL1D1 protein (Fragment)</i>	1	0	0	3	3	0
B4DWC4	<i>Chloride intracellular channel protein</i>	3	3	0	0	2	0
AoAo87WY00	<i>Unconventional myosin-Va</i>	2	2	0	0	0	0
I3L397	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A (Fragment)</i>	2	0	2	0	1	0
AoAo24RD93	<i>Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase, isoform CRA_c</i>	0	0	2	0	1	0
B4DLR8	<i>NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1</i>	2	2	0	0	0	0
BoQZ18	<i>Copine-1</i>	2	3	0	0	2	0
B4DKZ9	<i>Cdna FLJ55705, highly similar to Threonyl-trna synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.3)</i>	0	3	0	0	0	0
B4DY09	<i>Interleukin enhancer-binding factor 2</i>	2	2	0	3	0	0
ITCH	<i>E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog</i>	1	3	0	0	0	0
RUXF	<i>Small nuclear ribonucleoprotein F</i>	2	0	0	0	0	0
A8K8D9	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>	0	0	0	0	2	0
FBRL	<i>Rrna 2'-o-methyltransferase fibrillar</i>	0	0	0	3	0	0
H3BQZ7	<i>Hcg2044799</i>	0	1	0	3	2	0
AoAo24RA42	<i>Basic leucine zipper and W2 domains 2, isoform CRA_a</i>	2	2	0	0	2	0
FKB1A	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A</i>	0	0	2	0	2	0

AoA024R732	<i>Syntrophin, beta 2 (Dystrophin-associated protein A1, 59kda, basic component 2), isoform CRA_a</i>	2	0	3	0	0	0
A8K6C9	<i>Cdna FLJ78037, highly similar to Homo sapiens insulin-like growth factor 2 (somatomedin A), mrna</i>	0	3	0	0	3	0
A8K492	<i>Cdna FLJ76789, highly similar to Homo sapiens methionine-trna synthetase (MARS), mrna</i>	2	2	0	0	0	0
AoA087WYX9	<i>Collagen alpha-2(V) chain</i>	0	0	0	2	0	0
Q59GK9	<i>Ribosomal protein L21 variant (Fragment)</i>	3	1	0	0	2	0
AoA024R1T9	<i>ATP-citrate synthase</i>	0	3	2	0	0	0
Q53HE2	<i>Triosephosphate isomerase (Fragment)</i>	3	0	0	0	2	0
AoA024R8P8	<i>Ribosomal protein L38, isoform CRA_a</i>	2	0	0	3	0	0
GFPT1	<i>Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1</i>	0	0	0	0	1	0
AoA024R580	<i>Calpain 1, (Mu/I) large subunit, isoform CRA_a</i>	2	0	0	2	1	0
TRI25	<i>E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25</i>	3	3	0	0	2	0
AoA024R571	<i>EH domain-containing protein 1</i>	0	0	0	3	3	0
AoA024R8E5	<i>Collagen, type V, alpha 1, isoform CRA_a</i>	0	0	2	1	0	0
CO4A1	<i>Collagen alpha-1(IV) chain</i>	0	2	0	0	2	0
B3KPS9	<i>Cdna FLJ32140 fis, clone PLACE5000058, highly similar to Importin-4</i>	2	2	0	0	0	0
B7Z4R3	<i>Cdna FLJ50585, highly similar to T-complex protein 1 subunit beta</i>	0	0	0	1	0	0
AoA024R261	<i>HCG24487, isoform CRA_c</i>	0	0	0	2	3	0
RAI14	<i>Ankyrin</i>	3	3	0	0	0	0
B4DDU6	<i>Cdna FLJ50442, highly similar to T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	1	0	0	0	0	0
AoA0Y0BS51	<i>CUB domain containing protein 1 (Fragment)</i>	0	0	0	1	0	0
B3KTA3	<i>Fascin</i>	0	2	0	0	2	0
LIMS1	<i>LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1</i>	0	2	0	0	0	0
A4D1G5	<i>40S ribosomal protein S27</i>	0	2	2	2	0	0

B5ME97	<i>Septin 10, isoform CRA_c</i>	0	0	0	0	1	0
AoA024QZY1	<i>JTV1 gene, isoform CRA_a</i>	3	2	0	1	0	0
AoA024R882	<i>Stomatin, isoform CRA_a</i>	2	2	0	2	0	0
DX39A	<i>ATP-dependent RNA helicase DDX39A</i>	2	0	0	2	0	0
K7EJ78	<i>40S ribosomal protein S15</i>	1	0	0	1	0	0
AoA140VKF3	<i>Testis tissue sperm-binding protein Li 70n</i>	0	0	0	3	3	0
RSU1	<i>Ras suppressor protein 1</i>	2	0	0	0	0	0
AoA024R7B7	<i>CDC37 cell division cycle 37 homolog (S. Cerevisiae), isoform CRA_a</i>	0	2	0	0	0	0
B9EGI2	<i>Myosin phosphatase Rho interacting protein</i>	3	0	0	0	0	0
CNOT1	<i>CCR4-NOT transcription complex subunit 1</i>	0	2	0	0	1	0
DOCK7	<i>Dedicator of cytokinesis protein 7</i>	2	0	2	0	0	0
J3KPM9	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	1	0	0	0	1	0
OLM2A	<i>Olfactomedin-like protein 2A</i>	0	0	0	0	3	0
ISOC1	<i>Isochorismatase domain-containing protein 1</i>	0	0	0	2	0	0
AoA024R233	<i>Tight junction protein 2 (Zona occludens 2), isoform CRA_a</i>	3	2	0	0	0	0
B7Z4B7	<i>Cdna FLJ52561, highly similar to Four and a half LIM domains protein 1</i>	2	0	0	3	0	0
CoJYY2	<i>Apolipoprotein B (Including Ag(X) antigen)</i>	0	0	0	0	1	0
AoA024R897	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 5</i>	2	2	0	0	0	0
TCPA	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	0	2	0	0	2	0
ITA5	<i>Integrin alpha-5</i>	0	1	0	1	0	0
A1JUI8	<i>Chaperonin subunit 6A (Fragment)</i>	0	0	0	2	0	0
IF6	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i>	0	0	0	3	2	0
AoA024RAE4	<i>Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kda), isoform CRA_a</i>	0	0	0	2	0	0
PERM	<i>Myeloperoxidase</i>	0	0	0	2	0	0
F8W1C3	<i>Matrix metalloproteinase-19</i>	0	0	0	1	0	0
AoA087X2Do	<i>Serine/arginine-rich-splicing factor 3</i>	0	0	0	2	0	0
E41L2	<i>Band 4.1-like protein 2</i>	0	2	0	0	0	0
PROF1	<i>Profilin-1</i>	1	1	0	0	2	0

CSK21	<i>Casein kinase II subunit alpha</i>	0	1	0	1	0	0
HPBP1	<i>Hsp70-binding protein 1</i>	2	2	0	0	0	0
AoA1P7ZIM8	<i>Lmo7b</i>	0	2	3	0	0	0
MoQYS1	<i>60S ribosomal protein L13a (Fragment)</i>	1	2	0	0	0	0
CKAP5	<i>Cytoskeleton-associated protein 5</i>	0	0	0	0	2	0
AoA024RDK3	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (cam kinase) II delta, isoform CRA_a</i>	1	0	0	0	1	0
AoAoKoK1K4	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	2	0	0	0	0	0
B4DRW3	<i>Cdna FLJ57180, highly similar to TAR DNA-binding protein 43</i>	0	0	0	1	0	0
FA10	<i>Coagulation factor X</i>	0	0	0	3	0	0
AFAP1	<i>Actin filament-associated protein 1</i>	2	0	0	0	0	0
A8K2W7	<i>Cdna FLJ78119, highly similar to Homo sapiens G1 to S phase transition 1 (GSPT1), mrna</i>	0	2	0	0	0	0
B2R776	<i>Cdna, FLJ93315, highly similar to Homo sapiens potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2 (KCNA2), transcript variant 2, mrna</i>	0	0	0	2	0	0
AoA024R7A8	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B1 (Aldose reductase), isoform CRA_a</i>	0	0	0	0	2	0
AoA024RC58	<i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 3, isoform CRA_a</i>	0	2	0	2	0	0
AoA024R821	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	0	0	0	0	2	0
TOM34	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM34</i>	0	0	0	0	2	0
AoA024RDD3	<i>SEC31-like 1 (S. Cerevisiae), isoform CRA_d</i>	0	1	0	0	0	0
A8MW50	<i>L-lactate dehydrogenase (Fragment)</i>	2	3	0	0	0	0
B5BU01	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 beta</i>	0	0	0	2	0	0
DREB	<i>Drebrin</i>	2	2	0	0	0	0
AoA024RAM0	<i>Transportin 1, isoform CRA_a</i>	2	1	0	0	1	0
AoA024RA49	<i>Anillin, actin binding protein (Scraps homolog, Drosophila), isoform CRA_e</i>	1	2	0	0	0	0

AoAo87WTA8	<i>Collagen alpha-2(I) chain</i>	0	0	0	2	0	0
E7EX90	<i>Dynactin subunit 1</i>	1	2	0	0	0	0
A8K7D9	<i>Importin subunit alpha</i>	0	1	0	0	0	0
DRG1	<i>Developmentally-regulated GTP-binding protein 1</i>	0	2	0	2	0	0
HUTH	<i>Histidine ammonia-lyase</i>	1	0	0	1	0	0
C9J4Z3	<i>60S ribosomal protein L37a</i>	0	0	0	2	2	0
ABLM3	<i>Actin-binding LIM protein 3</i>	2	0	1	0	0	0
AoAo75B7B1	<i>Desmuslin, isoform CRA_a</i>	0	0	1	0	0	0
A8K9U6	<i>Cdna FLJ76121, highly similar to Homo sapiens zinc finger CCCH-type, antiviral 1 (ZC3HAV1), transcript variant 1, mrna</i>	0	0	2	0	0	0
AoAo24QZE7	<i>Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1, isoform CRA_a</i>	0	0	2	0	0	0
AoAoAoMTS2	<i>Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment)</i>	0	0	0	0	1	0
AoAo24R1U4	<i>RAB5C, member RAS oncogene family, isoform CRA_a</i>	0	0	0	3	2	0
TRIP6	<i>Thyroid receptor-interacting protein 6</i>	0	2	2	0	0	0
EDC4	<i>Enhancer of mrna-decapping protein 4</i>	2	2	0	0	0	0
RLAoL	<i>60S acidic ribosomal protein Po-like</i>	0	0	0	0	3	0
A8K594	<i>Cdna FLJ77256, highly similar to Homo sapiens SH3-domain binding protein 4 (SH3BP4), mrna</i>	0	3	0	0	0	0
AoAo24R5M3	<i>Cortactin, isoform CRA_c</i>	3	0	0	0	0	0
AoAo24QZK7	<i>Hexokinase 1, isoform CRA_c</i>	0	1	0	0	0	0
AoAo24RDJ3	<i>H/ACA ribonucleoprotein complex subunit</i>	0	0	0	2	0	0
AoAo24RDY9	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7, isoform CRA_b</i>	0	1	0	0	0	0
B4DIR5-DECOY	<i>B4dir5-decoy</i>	1	0	0	0	0	0
NUDC	<i>Nuclear migration protein nudc</i>	0	1	0	0	0	0
GNAI2	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2</i>	0	0	0	0	2	0
B4DN60	<i>Cdna FLJ52703, highly similar to Asparaginyl-trna synthetase, cytoplasmic (EC6.1.1.22)</i>	0	2	0	0	0	0
ROA2	<i>Heterogeneous nuclear</i>	0	0	0	0	2	0

	<i>ribonucleoproteins A2/B1</i>						
XPO1	<i>Exportin-1</i>	0	0	0	0	2	0
AoA024R056	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1, isoform CRA_a</i>	1	0	0	0	0	0
AoA286YF22	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	1	0	0	0	1	0
IMA5	<i>Importin subunit alpha-5</i>	2	0	0	0	0	0
QoVGA5	<i>SARS protein</i>	0	0	0	0	1	0
AoA024R2P0	<i>40S ribosomal protein SA</i>	0	0	0	2	0	0
Q53T70	<i>Uncharacterized protein RAB10 (Fragment)</i>	0	0	0	0	3	0
PI15	<i>Peptidase inhibitor 15</i>	0	0	0	2	0	0
A8K3A8	<i>Cdna FLJ75085, highly similar to Homo sapiens glutaminyl-trna synthetase (QARS), mrna</i>	1	0	0	0	0	0
PEAK1	<i>Pseudopodium-enriched atypical kinase 1</i>	3	0	0	0	0	0
B1AKD8-DECOY	<i>B1akd8-decoy</i>	0	2	0	0	0	0
PAI2	<i>Plasminogen activator inhibitor 2</i>	2	0	0	2	0	0
B4DMR0	<i>Cdna FLJ60706, highly similar to Serine/threonine-protein kinase 24 (EC 2.7.11.1)</i>	2	1	0	0	0	0
AoA1U9X609	<i>Abcf1</i>	0	0	0	1	2	0
B2RCM6	<i>Cdna, FLJ96161</i>	0	0	0	1	1	0
PARVB	<i>Beta-parvin</i>	0	0	0	2	0	0
STRAP	<i>Serine-threonine kinase receptor-associated protein</i>	0	2	0	0	0	0
PGAM1	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	0	2	0	0	0	0
RL36	<i>60S ribosomal protein L36</i>	0	0	0	3	0	0
AoA087WW43	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</i>	0	0	0	3	0	0
PURB	<i>Transcriptional activator protein Pur-beta</i>	0	0	0	1	0	0
AoA024R6Q1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5, isoform CRA_b</i>	0	0	0	0	2	0
B7Z9M9	<i>Cdna, FLJ78893, highly similar to Destrin</i>	1	0	0	0	0	0
AoA024R8J2	<i>Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1, isoform CRA_a</i>	1	0	0	0	0	0
Q86VG2	<i>Splicing factor proline/glutamine-rich (Polypyrimidine tract</i>	0	0	0	3	0	0

	<i>binding protein associated)</i>						
B5BTZ6	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	2	0	0	0	0	0
AoA140VK42	<i>Testicular secretory protein Li 42</i>	0	0	0	1	0	0
D6RF35	<i>Vitamin D-binding protein</i>	0	0	0	0	2	0
E9PEP6	<i>Neuropilin</i>	0	2	0	0	0	0
RS29	<i>40S ribosomal protein S29</i>	0	0	0	2	0	0
A8MXL6	<i>Protein SEC13 homolog</i>	0	2	0	0	2	0
A8K4T9	<i>Cdna FLJ77421, highly similar to Homo sapiens autoantigen p542 mrna</i>	0	0	0	2	2	0
AoA024R7L5	<i>UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (Yeast), isoform CRA_b</i>	2	0	0	0	2	0
6PGD	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>	1	0	0	2	0	0
PTN12	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12</i>	0	0	2	0	0	0
AoA024R994	<i>Copine III, isoform CRA_a</i>	0	0	0	2	0	0
A8K6V3	<i>Cdna FLJ78677, highly similar to Homo sapiens splicing factor 3b, subunit 3, 130kda (SF3B3), mrna</i>	0	0	0	0	1	0
AoA024RAK9	<i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1, isoform CRA_a</i>	0	0	0	3	0	0
AoA087WXQ8	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>	1	0	0	0	0	0
B2R7P8	<i>Cdna, FLJ93545, highly similar to Homo sapiens 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ATIC), mrna</i>	0	0	0	1	0	0
AoA024R3Z6	<i>Basic leucine zipper and W2 domains 1, isoform CRA_a</i>	0	3	0	0	0	0
B4EOA4	<i>Cdna FLJ57023, highly similar to Homo sapiens collagen, type VI, alpha 3 (COL6A3), transcript variant 3, mrna</i>	0	0	0	2	0	0
AoA024R486	<i>Armadillo repeat containing 9, isoform CRA_c</i>	0	1	0	0	0	0
B2R6Q4	<i>Tyrosine-protein kinase</i>	2	0	0	0	0	0
B4DZF2	<i>Cdna FLJ59571, highly similar to Eukaryotic translation initiation factor 4gamma 2</i>	0	1	0	0	0	0

B4DTY7	<i>Cdna FLJ57813, weakly similar to p130Cas-associated protein</i>	0	1	0	0	0	0
DYN2	<i>Dynamin-2</i>	1	0	0	0	0	0
AoA140VK70	<i>Testis secretory sperm-binding protein Li 197a</i>	0	0	0	0	3	0
B3KMS0	<i>Condensin complex subunit 1</i>	0	0	1	0	0	0
AoA024RAH8	<i>RNA helicase</i>	0	0	0	1	0	0
Q3B874	<i>STRN protein (Fragment)</i>	1	0	0	0	0	0
AoA024R6R4	<i>Matrix metalloproteinase 2 (Gelatinase A, 72kda gelatinase, 72kda type IV collagenase), isoform CRA_a</i>	0	0	0	2	0	0
AoA024RBB5	<i>Cysteine and glycine-rich protein 2, isoform CRA_a</i>	2	0	0	0	0	0
DNJA1	<i>Dnaj homolog subfamily A member 1</i>	1	0	0	0	0	0
STK10	<i>Serine/threonine-protein kinase 10</i>	0	2	0	0	0	0
AoA0B4J2C3	<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	0	2	0	0	0	0
AoA024R757	<i>Caveolin</i>	0	1	0	0	0	0
S10AB	<i>Protein S100-A11</i>	1	0	0	0	0	0
AoA140VK46	<i>Proteasome subunit beta</i>	2	0	0	0	0	0
AoPJJ5	<i>SRP72 protein (Fragment)</i>	0	0	0	1	0	0
AoA024R845	<i>RAB14, member RAS oncogene family, isoform CRA_a</i>	2	0	0	0	0	0
AoA024R7J0	<i>Protein kinase, camp-dependent, catalytic, alpha, isoform CRA_c</i>	0	1	0	0	0	0
CATK	<i>Cathepsin K</i>	0	0	0	1	0	0
B4E1D3	<i>Cdna FLJ53952, highly similar to Fibrinogen beta chain</i>	0	0	0	1	0	0
AoAoS2Z3Y1	<i>Lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein isoform 1 (Fragment)</i>	0	0	0	0	2	0
AoA096LNY6	<i>Adenylosuccinate lyase (Fragment)</i>	0	2	0	0	0	0
B3KQF4	<i>Cdna FLJ90373 fis, clone NT2RP2004606, highly similar to Metalloproteinase inhibitor 1</i>	0	0	0	1	0	0
TANC1	<i>Protein TANC1</i>	0	0	1	0	0	0
DSG1	<i>Desmoglein-1</i>	0	0	0	0	2	0
G3BP1	<i>Ras gtpase-activating protein-binding protein 1</i>	0	0	0	0	2	0

AoA024RoR1	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1, isoform CRA_e</i>	0	2	0	0	0	0
D6RAX7	<i>COP9 constitutive photomorphogenic-like protein subunit 4 isoform 2</i>	0	0	0	0	1	0
AoA024QYW2	<i>HCG1992932, isoform CRA_a (Fragment)</i>	0	0	0	0	2	0
AoA0C4DGN4	<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>	2	0	0	0	0	0
AoA1W2PQ51	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17</i>	0	0	0	2	0	0
FHL3	<i>Four and a half LIM domains protein 3</i>	2	0	0	0	0	0
F8VS81	<i>Twinfilin-1 (fragment)</i>	0	2	0	0	0	0
B5BU08	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 isoform a</i>	0	0	0	2	0	0
MBB1A	<i>Myb-binding protein 1A</i>	0	0	0	2	0	0
B3KW21	<i>Cdna FLJ41945 fis, clone PLACE6019676, highly similar to Coatomer subunit gamma</i>	2	0	0	0	0	0
AoA075B6E5	<i>Protein enabled homolog (Fragment)</i>	0	1	0	0	0	0
AoA024RCN6	<i>Vars</i>	0	0	1	0	0	0
PSD11	<i>26S proteasome non-atpase regulatory subunit 11</i>	0	0	0	0	1	0
AoAoS2Z3I4	<i>Regulator of chromosome condensation 1 isoform 3 (Fragment)</i>	0	0	0	1	0	0
AoA024R7G6	<i>Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1, isoform CRA_a</i>	0	1	0	0	0	0

9.3. Značenje kratica imena proteina IAC-a povezanih s FA-om i ECM-om prikazanih String programom

Tablica 29. Značenje kratica imena proteina povezanih s FA-om i ECM-om prikazanih programom String na Slici 21, pronađenih u IAC-ima stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom siRNA s minimalnim brojem spektara 4. Dva dana nakon transfekcije kontrolnom siRNA, RPMI-7951 skupljeni su IAC-i i analizirani na masenom spektrometru. Identifikacija je provedena programom Mascot i potvrđena programom Scaffold. Za odabir proteina povezanih s FA-om i ECM-om korišten je alat DAVID Functional Annotation prema GOTERM_CC_DIRECT bazi. Proteini u tablici su napisani na engleskom jeziku i poredani abecednim redom po kraticama.

Proteini adhesoma stanica RPMI-7951 si(-) povezani s FA-om i ECM-om	
Kratika	Ime proteina na engleskom jeziku

1433B	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein beta</i>
1433E	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon</i>
1433T	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta</i>
1433Z	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i>
A2RUM7	<i>ribosomal protein l5</i>
ACTB	<i>actin beta</i>
ACTC	<i>actin, alpha, cardiac muscle 1</i>
ACTN1	<i>actinin alpha 1</i>
ACTN4	<i>actinin alpha 4</i>
ADT2	<i>solute carrier family 25 member 5</i>
AGRIN	<i>agrin</i>
AHNK	<i>ahnak nucleoprotein</i>
ANXA1	<i>annexin a1</i>
ANXA2	<i>annexin a2</i>
ANXA5	<i>annexin a5</i>
ARC1B	<i>actin related protein 2/3 complex subunit 1b</i>
ARP3	<i>arp3 actin related protein 3 homolog</i>
ARPC2	<i>actin related protein 2/3 complex subunit 2</i>
ATS4	<i>adam metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 4</i>
BoZBD0	<i>ribosomal protein s19</i>
B4DDF4	<i>calponin 2</i>
B5MDF5	<i>ran, member ras oncogene family</i>
B7Z6Z4	<i>myosin light chain 6</i>
BGH3	<i>transforming growth factor beta induced</i>
CAP1	<i>adenylate cyclase associated protein 1</i>
CD44	<i>cd44 molecule</i>
CLH1	<i>clathrin heavy chain</i>
COF1	<i>cofilin 1</i>
COL1A1	<i>collagen type i alpha 1 chain</i>
COR1B	<i>coronin 1b</i>
COR1C	<i>coronin 1c</i>
CSPG2	<i>versican</i>
CYR61	<i>cysteine rich angiogenic inducer 61</i>
DYHC1	<i>dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1</i>
E9PFQ4	<i>pleckstrin homology like domain family b member 2</i>
EDIL3	<i>egf like repeats and discoidin domains 3</i>
EF2	<i>eukaryotic translation elongation factor 2</i>
EMIL1	<i>elastin microfibril interfacer 1</i>
EZRI	<i>ezrin</i>
FBLI1	<i>filamin binding lim protein 1</i>

FBN1	<i>fibrillin 1</i>
FERM2	<i>fermitin family member 2</i>
FHL2	<i>four and a half lim domains 2</i>
FINC	<i>fibronectin 1</i>
FLII	<i>flii, actin remodeling protein</i>
FLNA	<i>filamin a</i>
FLNB	<i>filamin b</i>
G3P	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDN	<i>serpin family e member 2</i>
GRP78	<i>heat shock protein family a (hsp70) member 5</i>
H4	<i>histone cluster 4 h4</i>
HS71A	<i>heat shock protein family a (hsp70) member 1a</i>
HS90A	<i>heat shock protein 90 alpha family class a member 1</i>
HSP7C	<i>heat shock protein family a (hsp70) member 8</i>
HSPB1	<i>heat shock protein family b (small member 1) member 1</i>
HTRA1	<i>htra serine peptidase 1</i>
IF4A1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4a1</i>
ILK	<i>integrin linked kinase</i>
IQGA1	<i>iq motif containing gtpase activating protein 1</i>
ITAV	<i>integrin subunit alpha v</i>
ITB1	<i>integrin subunit beta 1</i>
ITB5	<i>integrin subunit beta 5</i>
j3QSU6	<i>tenascin c</i>
KPYM	<i>pyruvate kinase, muscle</i>
KRT1	<i>keratin 1</i>
LAMA5	<i>laminin subunit alpha 5</i>
LAMB1	<i>laminin subunit beta 1</i>
LEG1	<i>galectin 1</i>
LIMA1	<i>lim domain and actin binding 1</i>
LIMD1	<i>lim domains containing 1</i>
LIPB1	<i>ppfia binding protein 1</i>
LMNA	<i>lamin a/c</i>
LPP	<i>lim domain containing preferred translocation partner in lipoma</i>
LPXN	<i>leupaxin</i>
MOES	<i>moesin</i>
MYH9	<i>myosin heavy chain 9</i>
PAI1	<i>serpin family e member 1</i>
PALLD	<i>palladin, cytoskeletal associated protein</i>
PARVA	<i>parvin alpha</i>
PAXI	<i>paxillin</i>

PDC6I	<i>programmed cell death 6 interacting protein</i>
PDLI1	<i>pdz and lim domain 1</i>
PDLI7	<i>pdz and lim domain 7</i>
PLAUR	<i>plasminogen activator, urokinase receptor</i>
PLEC	<i>plectin</i>
PP1B	<i>protein phosphatase 1 catalytic subunit beta</i>
PPIA	<i>peptidylprolyl isomerase a</i>
PRDX1	<i>peroxiredoxin 1</i>
PRKDC	<i>protein kinase, dna-activated, catalytic polypeptide</i>
PXDN	<i>peroxidasin</i>
Q5JR94	<i>ribosomal protein s8</i>
RADI	<i>radixin</i>
RL12	<i>ribosomal protein l12</i>
RL22	<i>ribosomal protein l22</i>
RL4	<i>ribosomal protein l4</i>
RL6	<i>ribosomal protein l6</i>
RL8	<i>ribosomal protein l8</i>
RL9	<i>ribosomal protein l9</i>
RPL18	<i>ribosomal protein l18</i>
RPL23	<i>ribosomal protein l23</i>
rpl27	<i>ribosomal protein l27</i>
RPL3	<i>ribosomal protein l3</i>
rpl30	<i>ribosomal protein l30</i>
RPL7	<i>ribosomal protein l7</i>
rps3a	<i>ribosomal protein s3a</i>
rps5	<i>ribosomal protein s5</i>
RS15A	<i>ribosomal protein s15a</i>
RS16	<i>ribosomal protein s16</i>
RS18	<i>ribosomal protein s18</i>
RS2	<i>ribosomal protein s2</i>
RS3	<i>ribosomal protein s3</i>
RS7	<i>ribosomal protein s7</i>
SFRP1	<i>secreted frizzled related protein 1</i>
SVIL	<i>supervillin</i>
TARA	<i>trio and f-actin binding protein</i>
TBB4B	<i>tubulin beta 4b class ivb</i>
TENS3	<i>tensin 3</i>
TES	<i>testin lim domain protein</i>
TFPI2	<i>tissue factor pathway inhibitor 2</i>
TGFB1	<i>transforming growth factor beta 1</i>

TGM2	<i>transglutaminase 2</i>
THSD4	<i>thrombospondin type 1 domain containing 4</i>
TIMP3	<i>timp metalloproteinase inhibitor 3</i>
TLN1	<i>talin 1</i>
TLN2	<i>talin 2</i>
TPM4	<i>tropomyosin 4</i>
TSP1	<i>thrombospondin 1</i>
TUBB	<i>tubulin beta class i</i>
UROK	<i>plasminogen activator, urokinase</i>
VASP	<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VIME	<i>vimentin</i>
VINC	<i>vinculin</i>
VTNC	<i>vitronectin</i>
ZYX	<i>zyxin</i>

9.4. Popis značajno promijenjenih proteina IAC-a stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice αv

Tablica 30. Popis značajno promijenjenih proteina IAC-a stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice αv u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA, s minimalnim brojem spektara 4. Dva dana nakon prolaznog utišavanja kontrolne stanice RPMI-7951 transficirane sa siRNA skupljeni su IAC-i i analizirani na masenom spektrometru. Identifikacija je provedena programom Mascot i potvrđena programom Scaffold. Proteini identificirani s minimalnim brojem spektara 4 u barem jednom od uzoraka su analizirani u javno dostupnom programu QSpec/QProt (Choi i ostali, 2015). Programom su izračunate vrijednosti pogrešnih pogodaka (engl. *false discovery rate*, FDR) i relativne promjene (engl. *fold change*) na temelju kojih se određivala značajnost promjene u ekspresiji. Promjene s vrijednostima lažnih pogodaka (FDR) manje od 0,05 (tj. negativni log (FDR) veći od 1,3), i s vrijednosti *fold change* većom od 1,5 puta (tj. ln (*fold change*) veći ili manji od 0,405) su smatrane značajnima. Proteini su popisani prema vrijednostima ln (*fold change*) Podebljano su označeni proteini čiji je *fold change* veći od 2 puta (tj. ln (*fold change*) promjene veći ili manji od 0,693). Proteini su obojani ovisno o funkciji prema UniProt podatcima: GO Molecular function ili GO biological process: proteini ECM-a, transmembranski proteini, proteini citoskeleta, proteini koji se vežu na citoskelet ili sudjeluju u njegovoj organizaciji, enzimi ili proteini koji reguliraju enzime, molekularni šaperoni, proteini koji sudjeluju u translaciji proteina, proteini koji se vežu za nukleinske kiseline, proteini uključeni u transport proteina.

Popis značajno promijenjenih proteina IAC-a stanica RPMI-7951 nakon utišavanja integrinske podjedinice αv			
Pristupna oznaka proteina	Ime proteina na engleskom jeziku	ln (<i>fold change</i>)	- log (FDR)
TBA4A	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	2.66	1.61
K1C17	<i>Keratin, type I cytoskeletal 17</i>	2.23	1.93
SLIT2	<i>Slit homolog 2 protein</i>	1.72	4.48
K1C9	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>	0.81	5.52
PXDN	<i>Peroxidasin homolog</i>	0.48	1.93
H6VRF8	<i>Keratin 1</i>	0.48	2.17
AoA024R884	<i>Tenascin C (Hexabrachion), isoform CRA_a</i>	0.43	7.00
Q6oFE6	<i>Filamin A</i>	-0.42	7.00
HS71A	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A</i>	-0.43	3.50
PPIA	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	-0.43	3.48
IF4A1	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	-0.44	4.25
ACTZ	<i>Alpha-centractin</i>	-0.45	1.68
B4DDF4	<i>Calponin</i>	-0.45	2.47

HS90A	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	-0.45	3.35
ACTB	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	-0.47	7.00
PYR1	<i>CAD protein</i>	-0.47	2.55
PRDX6	<i>Peroxiredoxin-6</i>	-0.48	1.88
IQGA1	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>	-0.48	7.00
ALDOA	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	-0.49	2.63
IPO7	<i>Importin-7</i>	-0.49	2.09
DYHC1	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	-0.51	5.30
PUR2	<i>Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3</i>	-0.52	2.11
PLEC	<i>Plectin</i>	-0.52	7.00
PP1A	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</i>	-0.53	2.64
ADT2	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	-0.55	2.59
EF1G	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	-0.55	2.77
1433Z	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	-0.55	3.05
MY18A	<i>Unconventional myosin-XVIIIa</i>	-0.55	3.42
MYH9	<i>Myosin-9</i>	-0.56	7.00
ACTN1	<i>Alpha-actinin-1</i>	-0.57	7.00
TAGL2	<i>Transgelin-2</i>	-0.57	3.12
AoA140VK49	<i>Staphylococcal nuclease domain-containing protein</i>	-0.58	2.44
VINC	<i>Vinculin</i>	-0.59	7.00
SYRC	<i>Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic</i>	-0.59	2.45
HSPB1	<i>Heat shock protein beta-1</i>	-0.60	2.29
B5MDF5	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	-0.63	2.85
E9PCY7	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteinH</i>	-0.63	2.64
FLII	<i>Protein flightless-1 homolog</i>	-0.64	2.89
AoAoS2Z4G4	<i>Tropomyosin 3 isoform 1</i>	-0.65	4.55

D9YZV5	<i>Tropomyosin 1 (Alpha) isoform 4</i>	-0.65	2.95
B7Z6Z4	<i>cDNA FLJ56329, highly similar to Myosin light polypeptide 6</i>	-0.65	4.57
G3V4T5	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1</i>	-0.66	2.55
PLST	<i>Plastin-3</i>	-0.66	4.62
E1NZA1	<i>Peroxisome proliferator activated receptor interacting complex protein</i>	-0.67	3.44
MoR2E9	<i>Urokinase plasminogen activator surface receptor</i>	-0.68	2.79
KANK2	<i>KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2</i>	-0.68	3.27
TLN2	<i>Talin-2</i>	-0.70	7.00
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>	-0.70	7.00
FLNB	<i>Filamin-B</i>	-0.70	7.00
ML12A	<i>Myosin regulatory light chain 12A</i>	-0.70	3.87
IF2G	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3</i>	-0.71	2.84
PARVA	<i>Alpha-parvin</i>	-0.71	2.78
TARA	<i>TRIO and F-actin-binding protein</i>	-0.71	2.93
AP2A2	<i>AP-2 complex subunit alpha-2</i>	-0.71	2.41
LIMA1	<i>LIM domain and actin-binding protein 1</i>	-0.72	2.69
B2R4Co	<i>60S ribosomal protein L18a</i>	-0.73	4.13
AHNK	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i>	-0.73	7.00
ABCE1	<i>ATP-binding cassette sub-family E member 1</i>	-0.74	2.44

UROK	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>	-0.74	3.41
RUVB2	<i>RuvB-like 2</i>	-0.76	2.81
DPYL2	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	-0.76	5.05
MYH10	<i>Myosin-10</i>	-0.76	7.00
AoA14oVKAo	<i>Caldesmon 1, isoform CRA_i</i>	-0.77	7.00
AoA024R4Q8	<i>Ribosomal protein S5, isoform CRA_a</i>	-0.78	3.00
CLIC1	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	-0.79	7.00
SYAC	<i>Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic</i>	-0.81	3.42
Q6ZQN2	<i>cDNA FLJ46846 fis, clone UTERU3004635, moderately similar to Neuroblast differentiation associated protein AHNAK</i>	-0.82	7.00
SEPT7	<i>Septin-7</i>	-0.82	4.07
AoA024R0E5	<i>Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, alpha 1, isoform CRA_a</i>	-0.83	3.05
COR1B	<i>Coronin-1B</i>	-0.83	4.23
AoA024R8V0	<i>Septin 9, isoform CRA_a</i>	-0.83	3.68
PRDX1	<i>Peroxiredoxin-1</i>	-0.85	5.52
Q68DI0	<i>AP complex subunit beta</i>	-0.87	3.23
AoA024RC61	<i>Aminopeptidase</i>	-0.87	2.73
D3DPU2	<i>Adenylyl cyclase-associated protein</i>	-0.87	5.52
K1H1	<i>Keratin, type I cuticular Ha1</i>	-0.87	2.81
ANXA5	<i>Annexin V</i>	-0.89	2.94
AoA024R1A3	<i>Testicular secretory protein Li</i>	-0.90	3.91

	63		
PCBP2	<i>Poly(rC)-binding protein 2</i>	-0.90	4.70
ZYX	<i>Zyxin</i>	-0.90	5.15
COF2	<i>Cofilin-2</i>	-0.90	3.02
DBNL	<i>Drebrin-like protein</i>	-0.92	3.04
COR1C	<i>Coronin-1C</i>	-0.92	7.00
HS90B	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	-0.93	7.00
B1AK87	<i>Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_a</i>	-0.93	3.91
MYLK	<i>Myosin light chain kinase, smooth muscle</i>	-0.93	4.17
A0A1L1UHR1	<i>Sperm binding protein 1a / mitohondrijski kanal</i>	-0.94	3.58
V9HWJ7	<i>Epididymis secretory protein Li 37</i>	-0.94	7.00
B4DL46	<i>cDNA FLJ60406, highly similar to Pleckstrin homology-like domain family B member 2</i>	-0.94	3.05
FERM2		-0.95	6.00
5NTD	<i>5'-nucleotidase</i>	-0.95	4.96
H3BQK9	<i>Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5</i>	-0.98	7.00
VPS35	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 35</i>	-0.99	3.58
SVIL	<i>Supervillin</i>	-1.00	6.00
SYEP	<i>Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase</i>	-1.01	4.41
B2ZZ89	<i>Spectrin beta chain</i>	-1.02	7.00

UTRO	<i>Utrophin</i>	-1.06	3.53
VIGLN	<i>Vigilin</i>	-1.08	5.70
PDLI7	<i>PDZ and LIM domain protein 7</i>	-1.08	5.40
AoA1W2PNX8	<i>Protein unc-45 homolog A</i>	-1.08	3.68
WDR1	<i>WD repeat-containing protein 1</i>	-1.18	5.70
FBLI1	<i>Filamin-binding LIM protein 1</i>	-1.18	4.12
TB182	<i>182 kDa tankyrase-1-binding protein</i>	-1.20	7.00
SPTN1	<i>Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1</i>	-1.21	7.00
AoA024RoE2	<i>Cold shock domain containing E1, RNA-binding, isoform CRA_a</i>	-1.24	4.40
PDLI1	<i>PDZ and LIM domain protein 1</i>	-1.24	6.00
ARP3	<i>Actin-related protein 3</i>	-1.25	6.00
LPXN	<i>Leupaxin</i>	-1.27	4.57
PP1B	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit</i>	-1.29	4.46
D6RER5	<i>Septin-11</i>	-1.30	5.10
1433T	<i>14-3-3 protein theta</i>	-1.30	4.41
F5H5D3	<i>Tubulin alpha chain</i>	-1.33	7.00
B4DN72	<i>cDNA FLJ55910, highly similar to Keratin, type II cuticular Hb6</i>	-1.35	4.85
TES	<i>Testin</i>	-1.36	4.77
MYO1B	<i>Unconventional myosin-Ib</i>	-1.37	7.00
AoA024RDE8	<i>DZ and LIM domain 5, isoform CRA_c</i>	-1.39	7.00
IMDH2	<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2</i>	-1.40	4.70

PDC6I	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>	-1.40	6.00
AoA024R152	<i>HCG28765, isoform CRA_b</i>	-1.44	7.00
AoA1W2PNV4	<i>Uncharacterized protein</i>	-1.54	5.70
PAXI	<i>Paxillin</i>	-1.55	5.52
LPP	<i>Lipoma-preferred partner</i>	-1.58	6.00
PALLD	<i>Palladin</i>	-1.68	7.00
UACA	<i>Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats</i>	-1.70	7.00
FHL2	<i>Four and a half LIM domains protein 2</i>	-1.76	7.00
AoA024RACo	<i>Leucine zipper protein 1, isoform CRA_a</i>	-2.10	7.00
ITB5	<i>Integrin β5</i>	-2.16	7.00
B2R6Lo	<i>Tubulin beta chain</i>	-2.44	7.00
ITAV	<i>Integrin αv</i>	-2.59	7.00
E9PMV1	<i>Plectin</i>	-2.61	7.00

10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

Rođena sam 1988. godine u Vukovaru. Osnovnu školu Zvonka Cara sam s pohvalama završila u Crikvenici, a srednju školu programa opće gimnazije u Vukovaru 2007. Iste godine sam upisala preddiplomski, a 2010. diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) u Zagrebu. Tijekom diplomskog studija sam s kolegicom Martinom Kranjčec, pod mentorstvom doc. dr. sc. Ane Galov i dr. sc. Haidi Arbanasić na Zavodu za animalnu fiziologiju PMF-a izradila znanstveni rad "Raznolikost DRB lokusa glavnog sustava tkivne podudarnosti skupine II u populaciji hrvatskih vukova" za kojeg smo 2011. godine nagrađene Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2012. sam primila pohvalu Znanstvenog vijeća PMF-a za izvanredan uspjeh u studiranju. Tijekom diplomskog studija sudjelovala sam u organizaciji i izvođenju popularizacijske aktivnosti Biološkog odsjeka PMF-a „Noć Biologije“, za kojeg smo 2012. godine nagrađeni posebnom rektorovom nagradom. Diplomski rad „Utjecaj utišavanja integrina $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ na osjetljivost tumorskih stanica na cisplatinu“ izradila sam u Laboratoriju za genotoksične agense Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković (IRB) pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice, a diplomski ispit sam položila u srpnju 2012. čime sam stekla zvanje magistre molekularne biologije.

Nakon fakulteta, dvije godine sam radila kao istraživač na projektu kofinanciranom iz Europskog socijalnog fonda „An experimental study of stem cells in the spinal cord: could they help to repair damage“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mirande Mladinić Pejatović i prof. dr. sc. Andree Nistrija na Odjelu za neuroznanost Visoke međunarodne škole za napredne studije (tal. *Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati*) u Trstu (Italija) i s kraćim posjetima Odjelu za Biotehnologiju u Rijeci. Moj boravak u Trstu rezultirao je trima radovima iz područja neuroznanosti i dvjema nagradama za najbolje predavanje (znanstvenog odbora i po izboru publike) na kongresu NEURI 2015. za predavanje „Research on factors that control the activation of spinal cord endogenous stem cells“. Krajem 2015. godine zaposlena sam kao asistent u Laboratoriju za genotoksične agense (koji je 2016. godine promijenio

ime u Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala), Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, kao doktorand Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) na HRZZ-istraživački projekt „Molekularni mehanizmi povećanja osjetljivosti na protutumorske lijekove stanica karcinoma dojke i melanoma čovjeka utišavanjem integrina“ voditeljice izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice. U sklopu projekta, 2016. godine sam upisala Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu u Osijeku. Tijekom izrade doktorske disertacije pod mojim neposrednim voditeljstvom, uz mentoricu izv. prof. dr. sc. Andreju Ambriović Ristov, izrađena su dva diplomatska rada. Godine 2018. sam dobila COST stipendiju za kraći dvotjedni boravak u Biocentru Sveučilišta u Baselu u laboratoriju prof. dr. sc. Rodericka Lima pod mentorstvom dr. sc. Marije Plodinec u sklopu akcije CA15214 „An integrative action for multidisciplinary studies on cellular structural networks“. Od 2018. uključena sam u projekt bilateralne znanstveno-istraživačke suradnje sa Slovenijom, financiran od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa „Određivanje biokompatibilnosti molidbenovih i volframovih nanočestica: mjerenje citotoksičnosti i upalnog odgovora u *in vitro* kulturi stanica čovjeka“ voditeljice dr. sc. Dragomire Majhen, više znanstvene suradnice Instituta Ruđer Bošković. Od 2015. godine djelujem u Vijeću asistenata kao predstavnica asistenata Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Od 2016. godine sam suvoditeljica „Mladih istraživača“, sekcije Hrvatskog prirodoslovnog društva. Član sam Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (preko društva i član FEBS-a) i Hrvatskog društva za istraživanje raka (preko društva i član EACR-a), a 2016. sam bila član organizacijskog odbora Četvrtog sastanka Hrvatskog društva za istraživanje raka s međunarodnim sudjelovanjem „From bench to clinic“. Koautor sam 14 sažetaka u zbornicima skupova i pet znanstvenih radova, od kojih jednog s dijeljenim prvim autorstvom.

Popis publikacija:

Stojanović, Nikolina*; **Dekanić, Ana***; Paradžik, Mladen; Majhen, Dragomira; Ferenčak, Kresimir; Ruščić, Jelena; Bardak, Irena; Supina, Christine; Tomicic, Maja T; Christmann, Markus; Osmak, Maja; Ambriović-Ristov, Andreja (2018.) “Differential Effects of Integrin Av Knockdown and Cilengitide on Sensitisation of Triple-Negative Breast Cancer and Melanoma Cells to Microtubule Poisons.” *Molecular Pharmacology* 94(6):mol.118.113027.

***dijeljeno prvo autorstvo**

Pinterić, Marija; Podgorski, Iva I; Sobočanec, Sandra; Popović Hadžija, Marijana; Paradžik, Mladen; **Dekanić, Ana**; Marinović, Maja; Halasz, Mirna; Belužić, Robert; Davidović, Grazia; Ambriović Ristov, Andreja; Balog, Tihomir (2018.) “De Novo Expression of Transfected Sirtuin 3 Enhances Susceptibility of Human MCF-7 Breast Cancer Cells to Hyperoxia Treatment.” *Free Radical Research* 52(6):672–84.

Veeraraghavan, Priyadharishini; **Dekanić, Ana**; Nistri, Andrea (2016.) “A Study of Cannabinoid-1 Receptors during the Early Phase of Excitotoxic Damage to Rat Spinal Locomotor Networks in Vitro.” *Neuroscience* 333(October):214–28.

Mladinić, Miranda; Nistri, Andrea; **Dekanić, Ana** (2015.) “How the Discovery of Neuronal Stem Cells Have Changed Neuroscience and Perspective for the Therapy for Central Nervous System Illnesses.” *Periodicum Biologorum* 117(1):185–92.

Mladinić, Miranda; Bianchetti, Elena; **Dekanić, Ana**, Mazzone, Graciela L.; Nistri, Andrea (2014.) “ATF3 is a novel nuclear marker for migrating ependymal stem cells in the rat spinal cord.” *Stem Cell Research* 12(3):815–827.