

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

**Nikolina Stojanović**

**Otpornost na protutumorske lijekove posredovana  
integrinom  $\alpha_v\beta_3$  u stanicama karcinoma pločastog  
epitela jezika čovjeka**

Doktorska disertacija

Osijek, 2014.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni  
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija:

### Otpornost na protutumorske lijekove posredovana integrinom $\alpha_v\beta_3$ u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka

Nikolina Stojanović

Rad je izrađen u Laboratoriju za genotoksične agense Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

Mentor: Dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, viša znanstvena suradnica

#### Kratki sažetak doktorskog rada:

Stabilnom transfekcijom stanica Cal27 plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina  $\beta_3$  izdvojeni su klonovi stanica s *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  i povećanom ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Pokazali smo da je upravo povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  odgovorna za primijećeni fenomen otpornosti stanica na protutumorske lijekove koji djeluju preko DNA i to preko smanjivanja količine pSrc (Y418) u fokalnim adhezijama. Naši rezultati pokazuju kako se lijekovi koji inhibiraju fosforilaciju Src, a koji su prepoznati kao molekule za liječenje mnogih tipova tumora, u nekim slučajevima ne mogu koristiti istovremeno s protutumorskim lijekovima koji djeluju preko molekule DNA, jer mogu imati manji terapijski učinak.

Broj stranica: 170

Broj slika: 32

Broj tablica: 25

Broj literaturnih navoda: 326

Jezik izvornika: hrvatski

**Ključne riječi:** integrin  $\alpha_v\beta_3$ , integrin  $\alpha_v\beta_5$ , otpornost na protutumorske lijekove posredovana integrinima, pSrc (Y418), ILK, migracija

Datum obrane: 24.07.2014.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr.sc. Neda Slade, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, predsjednica
2. Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, mentor i član
3. Prof. dr.sc. Vera Cesar, redovita profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, član
4. Dr. sc. Maja Herak Bosnar, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, zamjena člana

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik  
Ruđer Bošković Institute  
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of  
Molecular biosciences

PhD thesis

**Scientific Area:** Natural sciences

**Scientific Field:** Biology

### Integrin $\alpha_v\beta_3$ mediated drug resistance in human tongue squamous carcinoma cells

Nikolina Stojanović

Thesis performed at Ruđer Bošković Institute, Division of Molecular Biology, Laboratory of Genotoxic agents, Zagreb

**Supervisor:** Andreja Ambriović Ristov, PhD, senior associated researcher

#### Short abstract:

By transfecting human tongue squamous carcinoma cells Cal27 with a plasmid containing the gene for integrin  $\beta_3$  subunit, cell clones with *de novo* expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$  and increased expression of integrin  $\alpha_v\beta_5$  were isolated. We have shown that increased expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$  is responsible for the observed phenomenon of cell resistance to antitumor drugs which target DNA by reducing the amount of pSrc (Y418) in focal adhesions. Our results show that drugs that inhibit the phosphorylation of Src, already used for cancer treatment, cannot, in certain cases be used simultaneously with the antitumor drugs which target DNA, as they may have lower therapeutic effect.

**Number of pages:** 170

**Number of figures:** 32

**Number of tables:** 25

**Number of references:** 326

**Original in:** croatian

**Key words:** integrin  $\alpha_v\beta_3$ , integrin  $\alpha_v\beta_5$ , integrin mediated drug resistance, pSrc (Y418), ILK, migration

**Date of the thesis defense:** 24.07.2014.

#### Reviewers:

1. Neda Slade, PhD, senior associated researcher, Ruđer Bošković Institute, president of commission
2. Andreja Ambriović Ristov, PhD, senior associated researcher, Ruđer Bošković Institute, mentor and member
3. Prof. Vera Cesar, PhD, Full Professor, Department of biology, J.J. Strossmayer University of Osijek, member
4. Maja Herak Bosnar, PhD, senior associated researcher, Ruđer Bošković Institute, substitute member

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

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za genotoksične agense Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH: „Povećanje transdukcije adenovirusnih vektora i otpornost stanica na citostatike“ (098-0982913-2850).

*Najveće Hvala koje mogu dati ide mojoj mentorici dr.sc. Andreji Ambriović Ristov, koja svih ovih godina strpljivo i nesebično prenosi na mene svoje znanje, prijateljstvo i mudrost, a čija su podrška, povjerenje i razumijevanje potpuni i bezrezervni. Veliko hvala što mi je dala slobodu u istraživačkom radu i što je uvijek uz mene, spremna na diskusiju i pomoć. U dobrim i lošim trenucima, ona je moja prijateljica, moj mentor i moja savjest, koja me svojim neumornim entuzijazmom potiče svaki dan da težim napredovati i biti bolja osoba.*

*Hvala dr.sc. Maji Osmak, koja me još kao studenticu velikodušno primila u laboratorij, a svojom mudročću, savjetima i veseljem učinila ga tijekom godina drugim domom.*

*Dragomiri, Anamarii i Ivani veliko hvala na prijateljstvu, nesebičnoj pomoći, savjetima i pozitivnoj atmosferi, u kojoj je bilo pravo zadovoljstvo raditi. Zahvaljujem Ljiljani, Ani, Snježani i Ljiljani na besprijeornoj tehničarskoj pomoći i prijateljskoj ruci kad god mi je trebalo.*

*Hvala dr. sc. Maji Herak Bosnar i dr.sc. Nedi Slade na savjetima i pomoći tijekom istraživačkog rada.*

*Mojim dragim roditeljima hvala na ljubavi, razumijevanju i podršci, posebno mami, koja je oduvijek uz mene, a čiji su savjeti, potpora i bezuvjetna ljubav i vjera u mene nezamjenjivi.*

*Marku, na strpljivom slušanju o propalim pokusima i razumijevanju kada se radilo vikendima i do kasnih sati, neizmjereno hvala.*

*Svim prijateljima, hvala na svakodnevnoj podršci i riječima ohrabrenja.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. TUMORI .....	2
1.1.1. Liječenje tumora .....	3
1.1.2. Karcinomi stanica pločastog epitela glave i vrata .....	6
1.2. MEHANIZMI OTPORNOSTI TUMORA NA PROTUTUMORSKE LIJEKOVE.....	9
1.3. IZVANSTANIČNI MATRIKS .....	11
1.3.1. Proteini izvanstaničnog matriksa .....	11
1.3.2. Receptori na površini stanica za proteine izvanstaničnog matriksa .....	14
1.4. INTEGRINI .....	17
1.4.1. Okidanje signala posredovanih integrinima.....	19
1.4.1.1. FAK .....	22
1.4.1.2. Src .....	23
1.4.1.3. ILK.....	25
1.4.1.4. Utjecaj ekspresije FAK, Src i/ili ILK na otpornost stanica na djelovanje protutumorskih lijekova .....	27
1.4.2. Obitelj $\alpha_v$ integrina .....	28
1.4.2.1. Integrin $\alpha_v\beta_3$ .....	29
1.4.2.2. Integrin $\alpha_v\beta_5$ .....	30
1.5. OTPORNOST TUMORA NA PROTUTUMORSKE LIJEKOVE POSREDOVANA INTEGRINIMA .....	31
1.6. MODULIRANJE INTEGRINA U SVRHU POVEĆANJA UČINKOVITOSTI TERAPIJE TUMORA.....	32
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>36</b>

<b>3.1. MATERIJALI.....</b>	<b>37</b>
3.1.1. Osnovne kemikalije.....	37
3.1.2. Stanične linije .....	38
3.1.3. Protutijela i spojevi korišteni u fluorescencijskoj mikroskopiji, protočnoj citometriji i Western blotu .....	39
3.1.4. Početnice .....	40
3.1.5. Transfekcija siRNA.....	46
3.1.6. Kompleti i standardi .....	46
3.1.7. Priprema pufera i otopina .....	47
3.1.8. Uređaji, ostali materijali i pomagala .....	50
<b>3.2. METODE.....</b>	<b>52</b>
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi .....	52
3.2.2. Određivanje preživljenja i proliferacije stanica .....	52
3.2.2.1. MTT test .....	52
3.2.2.2. Metoda praćenja klonalnog rasta stanica .....	54
3.2.3. Određivanje ekspresije površinskih proteina metodom protočne citometrije .....	54
3.2.4. Analiza DNA i RNA .....	55
3.2.4.1. Izdvajanje genomske DNA iz kulture stanica .....	55
3.2.4.2. Izdvajanje ukupne RNA iz kulture stanica .....	55
3.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja ( <i>real-time</i> RT-PCR).....	56
3.2.4.4. Southern-Western analiza za otkrivanje dimera gvanina .....	58
3.2.5. Analiza proteina .....	58
3.2.5.1. Određivanje koncentracije proteina kolorimetrijskom metodom po Bradford-u .....	58
3.2.5.2. Određivanje koncentracije glutationa.....	59

3.2.5.3. SDS-PAGE .....	60
3.2.5.4. Western blot.....	61
3.2.6. Određivanje adhezivnosti stanica na komponente izvanstaničnog matriksa (ECM) .....	62
3.2.7. Određivanje pokretljivosti stanica .....	63
3.2.8. Utišavanje gena transfekcijom siRNA.....	63
3.2.9. Imunofluorescencija .....	64
3.2.10. Statistička obrada podataka .....	65
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>66</b>
4.1. Stanice Cal27 stabilno transficirane genom za podjedinicu integrina $\beta_3$ ekspimiraju integrin $\alpha_v\beta_3$ , povećanu ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_5$ te povećanu ekspresiju podjedinice integrina $\alpha_v$ .....	67
4.2. Integrin $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju jednaku brzinu proliferacije kao i kontrolni klon Cal27- $\Phi$ i stanice Cal27, te povećanu adheziju na vitronektin i fibronektin .....	71
4.3. Integrin $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju povećanu otpornost na protutumorske lijekove koji djeluju na molekulu DNA u odnosu na stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$ .....	73
4.4. Povećana otpornost integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na protutumorske lijekove nije posljedica njihovog smanjenog nakupljanja u stanici.....	77
4.5. Glutathion nema ulogu u mehanizmu otpornosti stanica modela Cal27 na protutumorske lijekove .....	79
4.6. Integrin $\alpha_v\beta_3$ , a ne integrin $\alpha_v\beta_5$ , u integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 odgovoran je za otpornost na protutumorske lijekove .....	81
4.7. U integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na kontrolne stanice Cal27 i Cal27- $\Phi$ nalazimo smanjenu ekspresiju Src, pSrc (Y418) i pILK (T173), te povećanu ekspresiju ILK.....	86

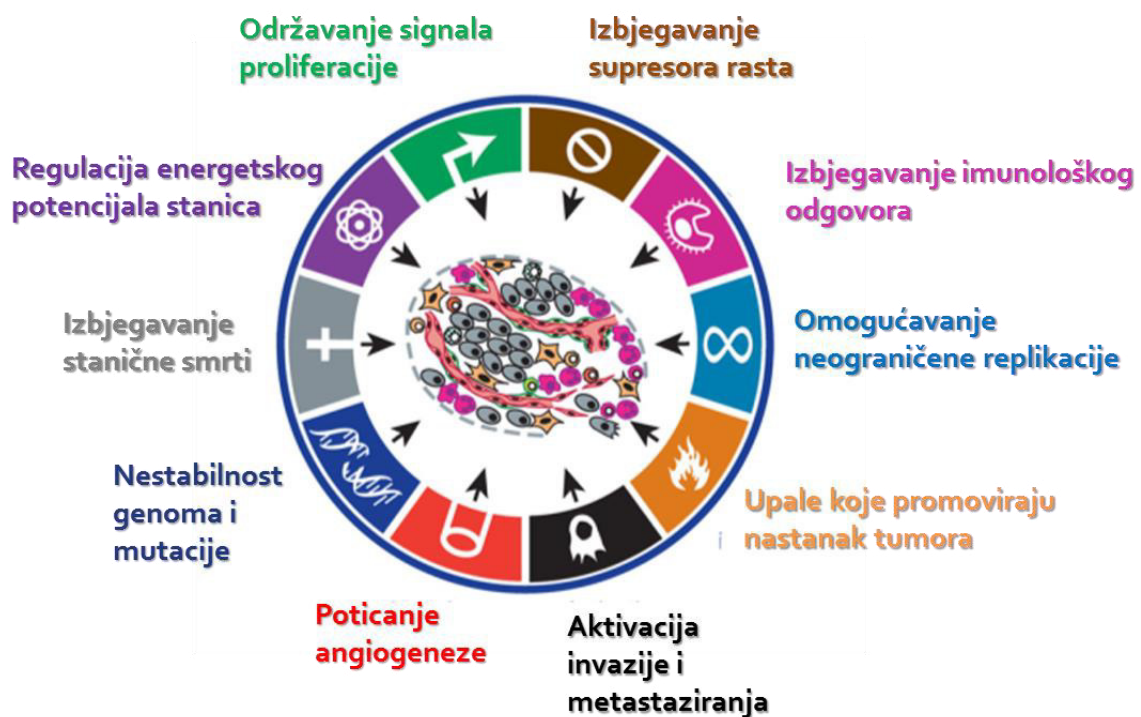


4.8 Smanjenje ekspresije ILK i pILK (T173) u integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 nije odgovorno za otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, mitomicin C i etopozid.....	87
4.9. Smanjenje količine pSrc (Y418) u stanicama Cal27-2B1 odgovorno je za otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, mitomicin C i etopozid .....	90
4.10. Integrini $\alpha_v$ u stanicama Cal27 djeluju preko pSrc (Y418).....	94
4.11. Integrin $\alpha_v\beta_5$ u stanicama Cal27 djeluje preko pSrc, dok u stanicama Cal27-2B1 djeluje preko ILK.....	96
4.12. Lokalizacija Src, pSrc (Y418) i aktina u stanicama modela Cal27 .....	98
4.13. Promjene u ekspresiji gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa, popravak DNA oštećenja, apoptozu, autofagiju i pokretljivost stanica u stanicama modela Cal27.....	101
4.14. Utjecaj utišavanja ILK i Src na diferencijalno eksprimirane gene u stanicama modela Cal27.....	105
4.15. Integrin $\beta_3$ -stabilno transficirane stanične linije Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju smanjenu migratornu sposobnost prema kontrolnim stanicama Cal27 i Cal27- $\Phi$ .....	107
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>109</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>123</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>126</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>154</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>157</b>
<b>10. PRILOZI .....</b>	<b>160</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>164</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. TUMORI

Tumore karakterizira nakupljanje stanica u organizmu u obliku izraslina ili oteklina, a nastaju kao posljedica nekontroliranog rasta stanica. Neki tumori nastaju zbog nasljednih mutacija, no većina ih nastaje zbog utjecaja karcinogena iz okoliša ili grešaka u kopiranju i popravku gena u somatskim stanicama. Stanice se u tumorima nekontrolirano, neograničeno i autonomno dijele i rastu, a izbjegavanjem mehanizama stanične smrti preživljavaju usprkos nakupljanju mutacija. Stanice tumora imaju poremećenu diferencijaciju i potiču angiogenezu. Rastom tumora se razvija populacija stanica koja može prodrijeti u tkiva i metastazirati na udaljena mjesta što ako se ne liječi, može uzrokovati smrt domaćina (Slika 1) (Hanahan i Weinberg 2011).



**Slika 1. Osobine tumora prema Hanahanu i Weinbergu.** Stanice tumora stalno proliferiraju, dijele se neograničeno i neovisno o vanjskim supresorima rasta. Također izbjegavaju staničnu smrt i imunosni odgovor. Reguliraju energetske potencijal stanice, a njihov nastanak potaknut je mutacijama, nestabilnostima genoma i nekim upalama. Potiču angiogenezu novog tumorskog tkiva, koja im omogućava invaziju i metastaziranje. Preuzeto i prilagođeno iz Hanahan i Weinberg (2011).

Do inicijacije maligne transformacije stanice dolazi nakupljanjem mutacija koje uzrokuju aktivaciju onkogenā, a čija povećana ekspresija potiče proliferaciju stanica ili koje uzrokuju gubitak funkcije tumor supresorskih gena, čime se zaustavlja njihova uloga

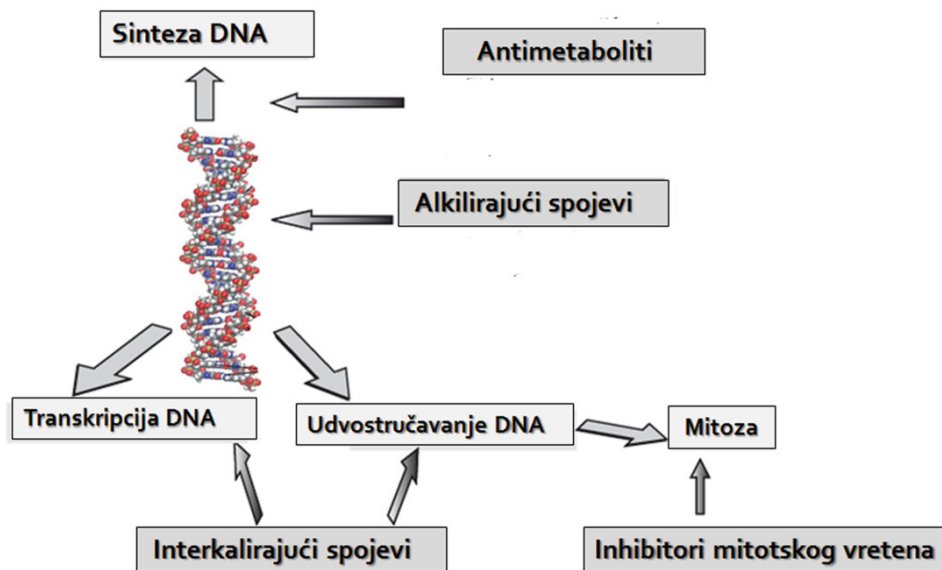
kočenja pretjerane proliferacije stanica. Promocija je faza proliferacije i klonalne ekspanzije transformiranih stanica, dok progresija označava postupni razvoj genotipski i fenotipski promijenjenih stanica (diferencijaciju), koje mogu napustiti primarno tkivo od kojeg su nastale i proširiti se po organizmu kroz postojeće ili novonastale krvne ili limfne žile. Slaba diferencijacija, brži rast i pojava metastaza karakteristika je zloćudnih tumora, koje je teže liječiti od dobroćudnih tumora koji takvu sposobnost nemaju (Alberts i sur. 2008).

### 1.1.1. Liječenje tumora

Standardne metode liječenja tumora podrazumijevaju tri glavna pristupa: kirurški zahvat, radioterapiju (zračenje) i kemoterapiju. Ovisno o tipu tumora, njegovom smještaju u organizmu i razvojnom stadiju, te općenitom zdravstvenom stanju pacijenta primjenjuje se jedna ili kombinacija navedenih vrsta liječenja, istovremeno ili uzastopno (Luqmani 2005), a krajnji cilj je uništiti sve stanice tumora uz minimalno oštećenje zdravog tkiva. Kirurški zahvat i dalje je najčešća metoda liječenja tumora, i često je uspješna za otklanjanje primarnih tumora. Radioterapija ili zračenje metoda je koja se koristi u kombinaciji s kirurškim zahvatom, može se primijeniti lokalno čime se smanjuje oštećenje zdravog tkiva. Kemoterapija je sistemsko liječenje tumora kemijskim spojevima (citostaticima ili protutumorskim lijekovima). Iako se često koristi u liječenju primarnih tumora još se češće koristi u kontroli širenja bolesti. Godinama su najučinkovitiji protutumorski lijekovi bili oni koji uzrokuju oštećenja DNA u stanici i utječu na proliferaciju i diobu stanice (Gurova 2009) (Slika 2), a koji se mogu, bilo da se radi o sintetskim ili prirodnim spojevima, podijeliti prema mjestu i načinu djelovanja na inhibitore sinteze DNA, spojeve koji oštećuju DNA i spojeve koji ometaju diobu stanice (Tablica 1.).

Tablica 1. Podjela protutumorskih lijekova prema mehanizmu djelovanja.

PROTUTUMORSKI LIJEKOVI	MEHANIZAM DJELOVANJA	IZVOR
<b>Inhibitori sinteze DNA</b>		
<b>Antifolati :</b> methotreksat, pemetriksed	inhibiraju potrebne biosintetske procese ili su inkorporirani u makromolekule (strukturni analozi heterocikličkih baza ili spojevi koji ometaju metabolizam folata čime inhibiraju glavne korake stvaranja purinskih i pirimidinskih baza te nukleotida)	(Parker 2009) (Goldman i sur. 2010) (Zhang i sur. 2008)
<b>Antipirimidini :</b> 5-fluorouracil, kapecitabin, eniluracil, hidroksiurea		
<b>Antipurini :</b> 6-merkaptopurin, 6-tiogvanin		
<b>Spojevi koji oštećuju DNA</b>		
<b>Alkilirajući agensi :</b> ciklofosfamid, ifosfamid, melfalan, klorambucil	oštećuju DNA umetanjem metilnih ili alkilnih skupina između nukleotidnih baza, što dovodi do neispravnog sparivanja baza, nakupljanja mutacija, fragmentacije DNA i u konačnici inhibicije replikacije i transkripcije DNA	
<b>Lijekovi na bazi platine :</b> cisplatina, karboplatina		
<b>Antibiotici :</b> antraciklini (doksorubicin, epirubicin);	spriječavaju spajanje DNA lanaca stabilizacijom kompleksa DNA-topoizomeraza II interkalacijom u DNA	(Izbicka i Tolcher 2004)
<b>aktinomycin, bleomicin, adriamicin</b>	oštećuju DNA umetanjem metilnih ili alkilnih skupina između nukleotidnih baza	
<b>mitomicin C</b>	ponaša se kao alkilirajući agens i stvara križne veze s DNA	
<b>Inhibitori topoizomeraze I i II :</b> kamptotecin, irinotekan, topotekan	inhibicija replikacije DNA: vezanjem na kompleks DNA-topoizomeraza I i njegovom stabilizacijom kompleksa	(Payne i Miles 2008)
<b>etopozid, vespid</b>	stabilizacijom kompleksa DNA-topoizomeraza II koji dovodi do dvolančanih lomova u DNA	
<b>Spojevi koji ometaju diobu stanice</b>		
<b>vinblastin, vinkristin</b>	inhibicija polimerizacije tubulina i posljedično inhibicija formiranja diobenog vretena	(Risinger i sur. 2009)
<b>paklitaksel, docetaksel</b>	stabiliziranje mikrotubula	



Slika 2. Mjesta djelovanja protutumorskih lijekova. Preuzeto i prilagođeno iz Luqmani (2005).

Antiproliferativni učinak protutumorskih lijekova posljedica je štetnog djelovanja na DNA ili neku drugu molekulu ili proces u stanici što pokreće programiranu staničnu smrt (apoptozu), međutim, zbog sličnosti tumorskih i normalnih stanica, ne postoji selektivno djelovanje ovih spojeva, već dolazi do štetnog učinka na sve stanice koje se brzo dijele u organizmu. Oštećenje zdravih stanica, kao što su krvne stanice, stanice sluznice probavnog trakta, spolne stanice i folikul kose, uzrokuje popratne neželjene pojave kemoterapije, mijelosupresiju, usporeno zacjeljivanje rana, alopeciju, oštećenja epitela probavnog sustava, mučninu i povraćanje, umor, depresiju i sterilnost (Shapiro i Recht 2001). Većina ovih nuspojava nestaje prekidanjem liječenja, no često dolazi do trajnog oštećenja bubrega, srca, pluća ili reproduktivnog sustava. Osim toga, današnji protutumorski lijekovi imaju još dva velika nedostatka: razvoj otpornosti te nemogućnost kompletnog uništenja tumora korištenjem terapijskih doza. Stoga se intenzivno istražuju i primjenjuju drugi terapijski pristupi kao što su hormonska terapija, imunoterapija, terapija inhibitorima angiogeneze, molekulama koje izazivaju apoptozu ili moduliraju ekspresiju gena.

Osim spomenutih pristupa liječenju tumora zadnjih 10 godina posebice se razvija genska terapija tumora. Njezin je glavni cilj uspješan prijenos genskog materijala pomoću viralnih ili nevirulnih vektora u ciljne stanice (El-Aneed 2004), što rezultira uništenjem tumorske stanice ili sprječavanja njenog rasta. Trenutno je zabilježeno preko 900 kliničkih studija u svijetu sa ciljem genske terapije tumora ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) u kojima se ciljano

utječe na tumorske stanice poticanjem ili pojačavanjem postojećeg imunološkog odgovora na tumorske antigene, nadomještanjem mutacija prisutnih u tumoru, supresijom ekspresije onkogena, unošenjem gena samoubojice u svrhu uništenja tumorske stanice, kočenjem angiogeneze ili ubijanjem tumorske stanice selektivnim umnažanjem virusa (onkolitički virusi) (Majhen i Ambriović-Ristov 2006). Ove metode liječenja imaju potencijal za liječenje tumora za koje standardne metode nisu primjenjive te su zabilježeni brojni uspjesi za različite vrste tumora.

Glavni je problem svih navedenih pristupa u terapiji tumora nedovoljna selektivnost djelovanja na tumorske stanice, odnosno identifikacija prave ciljne molekule ključne za razvoj i rast tumora. Za liječenje tumora protutumorskim lijekovima problem je i pojava otpornosti stanica na djelovanje protutumorskih lijekova.

### 1.1.2. Karcinomi stanica pločastog epitela glave i vrata

Karcinomi stanica pločastog epitela glave i vrata (engl. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSCC) razvijaju se u usnoj šupljini, dušniku, grkljanu ili laringofarinksu, čine 95% svih karcinoma tumora glave i vrata i šesti su najučestaliji karcinom u cijelom svijetu, s vrlo nepovoljnim prognozama za oboljele. Godišnje se zabilježi oko 500.000 slučajeva karcinoma u svijetu, a samo 40-50% pacijenata preživi 5 godina od postavljanja dijagnoze (Kamangar i sur. 2006). Većina karcinoma stanica pločastog epitela glave i vrata su karcinomi pločastog epitela usne šupljine (engl. *Oral Squamous Cell Carcinoma*, OSCC) koji nastaju od keratinocita mutacijama DNA, koje su često spontane ili mogu biti uzrokovane vanjskim čimbenicima, kemijskim ili fizičkim mutagenima, nekim mikroorganizmima ili kao posljedica nasljednih bolesti. Ove karcinome karakterizira sposobnost metastaziranja u limfne čvorove, kosti, mozak, jetru i druga mjesta (Scully i Bagan 2009). Pušenje i konzumacija alkohola, uz slab unos voća i povrća, do sada su najbolje opisani vanjski rizični faktori i imaju sinergistički učinak na nastanak tumora usne šupljine (Petti 2009). Iako je u zadnjih deset godina u zapadnom svijetu pojava tumora usne šupljine uzrokovanih pušenjem u opadanju zbog smanjene konzumacije duhanskih proizvoda, dolazi do povećanja pojave podskupina HNSCC, osobito karcinoma jezika i ždrijela zbog infekcija tipom visokorizičnog papiloma virusa čovjeka (HPV) (D'Souza i sur. 2007; Shillitoe 2009). Bolesti kao što je Fanconi anemija, Li Fraumeni sindrom, xeroderma pigmentosum i

dijabetes (Kutler i sur. 2003), genetska predispozicija (Cloos i sur. 1996; Kutler i sur. 2003; Hopkins i sur. 2008) i neadekvatna oralna higijena pogoduju nastanku OSCC (Guha i sur. 2007; Abnet i sur. 2008). Heterogenost HNSCC identificirana je histološkom klasifikacijom (Woolgar i Triantafyllou 2009), kao i studijama na molekularnoj razini. Glavna podjela HNSCC tumora je prema tome jesu li uzrokovani infekcijom virusom HPV ili ne sadrže HPV, a Chung i suradnici (2004) navode i četiri podskupine HNSCC prema prognozi preživljenja. Kasnije je na temelju genske analize predložena dodatna podjela tumora na temelju ploidnosti stanica (Hermsen i sur. 2001; Jin i sur. 2006). Prognoza preživljenja pacijenata s HNSCC određena je stupnjem razvitka tumora u trenutku dijagnoze. Kliničkim pregledom, snimanjem, biopsijom i citologijom limfnih čvorova određuje se opseg tumora, broj zahvaćenih limfnih čvorova, te pojava, količina i smještaj metastaza u organizmu. U nekim slučajevima karcinoma dušnika najvažni prognostički faktori su konzumacija duhanskih proizvoda i potencijalna izloženost virusu HPV (Ang i sur. 2010). Pacijenti s tumorom usne šupljine otkrivenim u ranoj fazi razvoja podvrgavaju se kirurškom postupku ili radioterapiji i u pravilu imaju povoljnu prognozu, međutim, takvi slučajevi čine samo trećinu svih postavljenih dijagnoza. U pravilu se tumori usne šupljine otkrivaju u već uznapreovalom stadiju u kojoj su već prisutne metastaze u limfnim čvorovima. Glavni način liječenja takvih pacijenata i dalje je kirurški zahvat (Shah i Gil 2009) praćen postoperativnim tretmanom zračenjem (Mazeron i sur. 2009), iako je u zadnjih dvadesetak godina uvođenje preciznijih kirurških i radioloških protokola, kombinacija radijacije i kemoterapije za liječenje uznapreovalih tumora pokazala učinkovitost i povećanje kvalitete života u pacijenata s umjereno uznapreovalim karcinomom grkljana i ždrijela. Nedavno je započela i upotreba lijekova koji ciljano djeluju na molekule ili signalne puteve u organizmu (Tablica 1) u kombinaciji s tradicionalnim metodama liječenja, međutim, preživljenje pacijenata nije se primjetno poboljšalo, većinom zbog toga što i dalje dolazi do razvitka udaljenih metastaza i sekundarnih primarnih tumora u pacijenata (Lippman i Hong 1989). Najveća zapreka razvoju novih strategija u terapiji predstavljaju ograničene informacije o molekularnoj karcinogenezi HNSCC te genetičkoj i biološkoj heterogenosti bolesti (Leemans i sur. 2011).



Tablica 2. Mehanizmi djelovanja lijekova i ciljnih molekule u terapiji karcinoma pločastog epitela glave i vrata. Preuzeto i modificirano iz Scully i Bagan (2009).

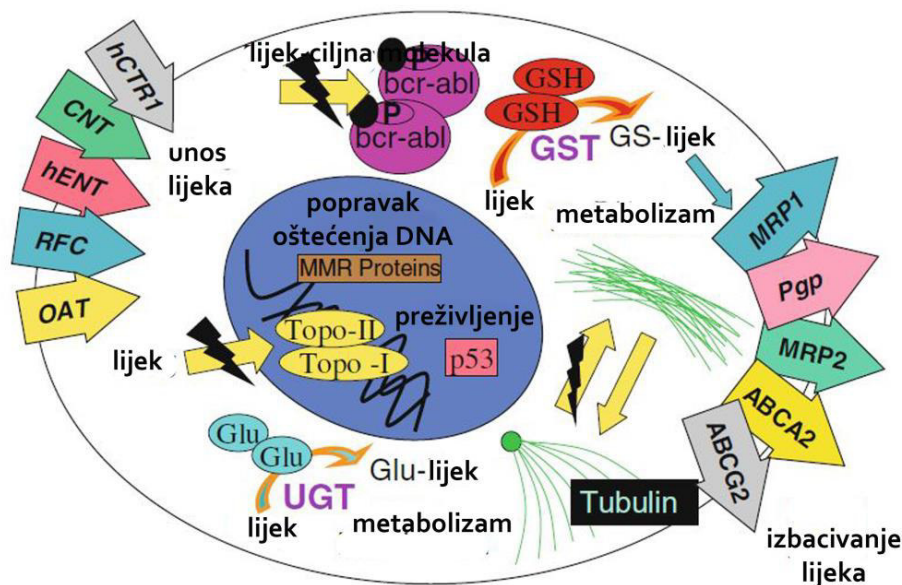
MEHANIZAM DJELOVANJA	CILJNE MOLEKULE	PRIMJERI
Inhibicija receptora faktora rasta	Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR / erbB) - stimulira tirozin kinaze	<i>Monoklonska protutijela:</i> Cetuximab (Erbix) Panitumumab (Vectibix) ABX-EGF, EMD72000 <i>Inhibitor EGF-R i VEGF-R:</i> Vandetanib (Zactima)
	Tirozin kinaze	<i>Inhibitori tirozin kinaza:</i> Gefitinib (Iressa) Erlotinib (Tarceva) Lapatinib (Tykerb)
	Receptor za faktor rasta sličan inzulinu (IGF-R)	<i>Monoklonsko protutijelo:</i> EM164 AMG 479
Blokada okidanja signala za rast	Obitelj proteina Ras	Zarnestra (R115777, Tipifarnib) FTI Ras Inh: ISIS 5132
	Raf (kaskada signala)	Sorafenib (Nexavar)
	Proto-onkogen Met	SU11274
	Farnezil transferaza	Lonafarnib [SCH 66336]
	Protein kinaza MEK1/2	AZD6244 CI-1040 PD184352 PD 0325901
	mTOR (ključni regulator rasta stanica)	Everolimus (RAD001). Temsirolimus (Torisel)
	Protein kinaza C	Bisindolemaleimide (Enzastaurin), PKC412A (Midostaurin)
Degradacija proteina	Inhibitor proteasoma (podjedinica 26S)	Bortezomib
Indukcija apoptoze	TNF vezani aktivator apoptoze (TRAIL)	<i>Monoklonsko protutijelo:</i> AMG655 <i>Rekombinantni citokin:</i> Apo2L/TRAIL (Dulanermin)
	BCL-2	Oblimersen (Genasense)
Blokiranje angiogeneze	Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)	<i>Monoklonsko protutijelo:</i> Bevacizumab (Avastin) VEGF trap (Aflibercept) <i>Inhibitori više kinaza za:</i> signalni put Raf/Mek/Erk, VEGF i KIT: Sorafenib (Nexavar), VEGF-R i receptor faktora rasta trombocita: Sunitinib (Sutent) EGF-R i VEGF-R: Vandetanib (Zactima)

## 1.2. MEHANIZMI OTPORNOSTI TUMORA NA PROTUTUMORSKE LIJEKOVE

Tumorske stanice su genetički nestabilne, potiču iz različitih tkiva, razlikuju se u profilu aktivacije onkogenih i inaktivacije tumor supresorskih gena, pokazuju varijacije u ekspresiji gena i fenotipu. Rezultat svih tih promjena je sposobnost tumorskih stanica da, za razliku od normalnih stanica, brzo moduliraju svoj odgovor na djelovanje lijekova, i razviju otpornost na njih, što predstavlja veliki problem u terapiji tumora protutumorskim lijekovima. Otpornost tumorskih stanica na protutumorske lijekove može biti urođena (primarna) ili stečena (sekundarna). Urođena otpornost na protutumorske lijekove nastaje tijekom procesa tumorigeneze i predstavlja problem već pri prvoj primjeni protutumorskih lijekova. Unutar  $10^9$  tumorskih stanica koje stvaraju tumor, koji se može klinički otkriti, vjerojatno se nalazi između 10 i 1,000 otpornih stanica koje imaju potencijal za ponovno stvaranje tumora neovisno o uništenju osjetljivih stanica, stoga je jedan od bitnih čimbenika izlječenja ili barem ograničavanja progresije bolesti izravno povezan s veličinom tumora pri dijagnozi i početku liječenja (Luqmani 2005).

Stečena otpornost rezultat je prilagodbe tumorskih stanica ili mutacija nastalih kao odgovor na primijenjene protutumorske lijekove (O'Connor i sur. 2007). Molekularnih mehanizama otpornosti je mnogo, često ih je više istovremeno aktivnih u stanici, a ovisni su o vrsti protutumorskog lijeka kojima su tumorske stanice bile izložene. Ove činjenice također vrijede i za mehanizme otpornosti u staničnim linijama tumora. Glavni mehanizmi otpornosti stanica na protutumorske lijekove su (Slika 3): 1. smanjeno nakupljanje protutumorskog lijeka kao posljedica njegovog smanjenog ulaska u stanicu (npr. smanjena ekspresija transportnih molekula u staničnoj membrani za određeni protutumorski lijek), ili pojačanog izbacivanja pomoću membranskih pumpi za izbacivanje (npr. P-glikoprotein), ili kao posljedica oba mehanizma (Gottesman 2002; Mehta i Siddik 2009), 2. smanjeno vezanje protutumorskih lijekova na ciljne molekule unutar stanice zbog: smanjene metaboličke aktivacije protutumorskog lijeka enzimatskom inaktivacijom metilacijom ili vezanjem na zaštitne molekule u citoplazmi (glutation, metalotioneini), povećanom ekspresijom ili mutacijom ciljnih molekula, 3. povećana sposobnost popravka i/ili tolerancije oštećenja ciljne molekule stanice (najčešće DNA), 4. kočenje apoptoze kao konačnog odgovora na oštećenje stanica uslijed promjena u putevima prijenosa signala (p53 i Bcl-2) ili

uslijed prethodno navedenih mehanizama otpornosti (Stavrovskaya 2000; Longley i Johnston 2005), 5. promjene u adhezivnosti stanica (Damiano i sur. 1999; Ambriović-Ristov i Osmak 2006).



**Slika 3. Mehanizmi otpornosti tumorske stanice na djelovanje protutumorskih lijekova:** smanjen unos, pojačano izbacivanje iz stanice, promjene u metabolizmu lijekova, ciljnoj molekuli na koju djeluju protutumorski lijekovi, ubrzan popravak nastalih oštećenja i preživljenje. Preuzeto i prilagođeno iz Mehta i Siddik (2009).

Križna otpornost na više lijekova (engl. *multiple drug resistance*, MDR) jedan je od glavnih uzroka neuspjeha kemoterapije, jer tumorske stanice stvaranjem otpornosti na jedan lijek postaju otporne i na niz drugih koji se od prvotnog lijeka razlikuju po strukturi i po mehanizmu djelovanja (Hall i sur. 2009).

Novije područje istraživanja otpornosti je otpornost na protutumorske lijekove posredovana adhezijom (engl. *cell adhesion mediated drug resistance*, CAM-DR), a unutar tog područja posebno se istražuje otpornost posredovana integrinima (engl. *integrin mediated drug resistance*), koji mogu potaknuti bilo koji od gore navedenih mehanizama otpornosti stanica na protutumorske lijekove (Ambriović-Ristov i Osmak 2006).

### 1.3. IZVANSTANIČNI MATRIKS

Izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) je nestanična komponenta organizma sastavljena od proteina visoke molekularne težine i polisaharida (Timpl 1996), nalazi se u svim tkivima i organima, a osim što je bitna strukturna potpora stanicama služi kao fizička prepreka ili kao selektivni filtar za topljive molekule. Dinamična je struktura koja se stalno preoblikuje (Daley i sur. 2008), a njegove molekularne komponente podvrgavaju se bezbrojnim posttranslacijskim modifikacijama, čime generira biokemijska i mehanička svojstva svakog organa kao što su čvrstoća i elastičnost, te održava izvanstaničnu homeostazu. Izvanstanični matriks vezanjem faktora rasta i interakcijom s receptorima na površini stanica potiče okidanje signala bitnih za morfogenezu tkiva, diferencijaciju, proliferaciju, adheziju i migraciju stanica te staničnu smrt (Hynes 2009; Lu i sur. 2012).

Izvanstanični matriks je iznimno tkivno-specifičan, prilagođava se promjenama koje nastaju tijekom razvoja, starenja i bolesti, a poremećaji njegove dinamike dovode do pojave ožiljaka, urođenih mana, kroničnih rana, malformacija skeleta, tumorigeneze i nastanka fibroznih bolesti (Jarvelainen i sur. 2009; Lu i sur. 2011; Lu i sur. 2012).

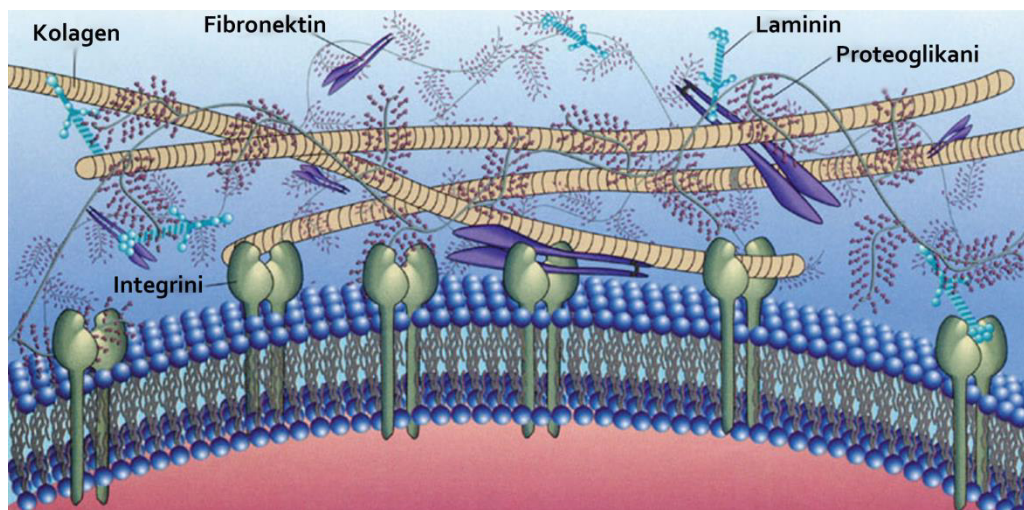
Identifikacijom mehaničkih svojstava i sastava izvanstaničnog matriksa, proteinskih receptora za izvanstanični matriks i signalnih puteva koje može modulirati (Hynes 1990; Schwartz i sur. 1995; Bershadsky i sur. 2003; Aszodi i sur. 2006) otkriveno je puno informacija o organizaciji izvanstaničnog matriksa i njegovoj interakciji sa stanicama.

#### 1.3.1. Proteini izvanstaničnog matriksa

Izvanstanični matriks građen je od dvije glavne vrste makromolekula: proteoglikana i vlaknastih proteina (Slika 4) (Jarvelainen i sur. 2009; Schaefer i Schaefer 2010).

Proteoglikani ispunjavaju većinu izvanstaničnog međuprostora u tkivima u obliku hidratiziranog gela, a sastavljeni su od lanaca glikozaminoglikana koji su kovalentno vezani za glavni protein (Iozzo i Murdoch 1996; Schaefer i Schaefer 2010). Klasifikacija na temelju glavnog proteina, smještaja i sastava glikozaminoglikana dijeli ih na male proteoglikane bogate leucinom, modularne proteoglikane i proteoglikane koji se nalaze na staničnoj površini (Schaefer i Schaefer 2010). Mali proteoglikani bogati leucinom uključeni su u nekoliko signalnih puteva, uključujući i vezanje na, i aktivaciju receptora faktora

epidermalnog rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), receptora faktora rasta sličnog inzulinu (engl. *insulin-like growth factor 1 receptor*, IGFR) i receptoru srodnog lipoproteina niske gustoće 1 (engl. *low-density lipoprotein-receptorrelated protein 1*, LRP1), regulatora odgovora na upalne procese; vezanje na i aktivaciju transformirajućeg faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF $\beta$ ) (Goldoni i Iozzo 2008; Schaefer i Iozzo 2008; Sarrazin i sur. 2011), dok modularni proteoglikani mogu regulirati adheziju, migraciju i proliferaciju stanica (Schaefer i Schaefer 2010), te mogu djelovati kao pro- i anti-angiogenetski faktori (Iozzo i sur. 2009). Proteoglikani koji se nalaze na površini stanica djeluju kao koreceptori i olakšavaju vezanje liganada sa signalnim receptorima (Schaefer and Schaefer 2010). Mutacije u genima koji kodiraju proteoglikane povezane su s mnogim genskim bolestima (Schaefer i Iozzo 2008; Jarvelainen i sur. 2009).



Slika 4. Komponente izvanstaničnog matriksa. Preuzeto i prilagođeno iz Karp (2010).

Kolagen je vlaknasti protein kojeg ima najviše u izvanstaničnom matriksu, i do danas je u kralježnjacima otkriveno 28 tipova kolagena (Gordon i Hahn 2010). Kolageni pružaju strukturnu čvrstoću svim oblicima izvanstaničnog matriksa, uključujući vlakna tetiva, kostima i hrskavici, bazalnoj membrani, intersticijskom izvanstaničnom matriksu dermisa i kapsula koje okružuju organe. Kolageni uglavnom stvaraju trostruke uzvojnice koje se mogu povezati u supramolekularne komplekse, kao što su vlakna ili laminarna struktura bazalne membrane (Ricard-Blum 2011; Yurchenco 2011). Reguliraju adheziju stanica, potiču kemotaksiju i migraciju, te razvijanje tkiva (Rozario i DeSimone 2010). Većinom ih izlučuju fibroblasti koji su ili smješteni u stromi ili ih regrutiraju susjedna tkiva (De Wever i sur. 2008).

Kolageni se vežu na elastin (Wise i Weiss 2009), jedan od vlaknastih proteina izvanstaničnog matriksa, koji omogućava da se tkiva koja se uzastopno rastežu mogu vratiti u prvotno stanje. Građen je od molekula tropoelastina, koje se umrežuju u vlakna pomoću enzima lizil oksidaze (Lucero i Kagan 2006), a zatim se vlakna elastina prekrivaju glikoproteinskim mikrofibrilima, koji su nužni za stabilnost vlakna elastina (Wise i Weiss 2009).

Sljedeći vlaknasti protein izvanstaničnog matriksa je fibronektin koji se izlučuje kao dimer vezan s dvije C-terminalne disulfidne veze i ima nekoliko veznih mjesta za druge dimere fibronektina, kolagen, heparin i receptore na površini stanice, integrine (Pankov i Yamada 2002; Schwarzbauer i DeSimone 2011). Vezanje topljivog fibronektina na površinu stanice neophodno je za njegovo povezivanje u vlakna, a kontrakcije stanica preko aktinskog citoskeleta koje rezultiraju nakupljanjem integrina potiču vezanje fibronektina i otvaranjem veznih mjesta na koja se fibronektin može vezati (Mao i Schwarzbauer 2005; Leiss i sur. 2008). Uključen je u organizaciju međuprostornog izvanstaničnog matriksa, ima ulogu u adheziji, migraciji stanica tijekom razvoja, a povezan je i sa pojavom bolesti srca i krvnih žila te pojavom metastaza u tumorima (Rozario i DeSimone 2010; Tsang i sur. 2010).

Vitronektin, još jedan vlaknasti protein izvanstaničnog matriksa, je glikoprotein, prisutan u krvi i izvanstaničnom matriksu, koji veže glikozaminoglikane, kolagen, plazminogen i receptor urokinaza (engl. *urokinase receptor*, uPAR), te stabilizira inhibitornu konformaciju inhibitora aktivacije plazminogena 1 (Kost i sur. 1992; Schroeck i sur. 2002), čime može regulirati proteolitičku razgradnju izvanstaničnog matriksa. Osim toga, vitronektin se veže na heparin i kompleks trombina i antitrombina III (Kost i sur. 1992; Hess i sur. 1995), čime sudjeluje u imunosnom odgovoru (Preissner 1989) i regulaciji stvaranja ugrušaka (Podor i sur. 2002; Wu i sur. 2004). Pričvršćen je na izvanstanični matriks preko kolagen vezne domene i glikozaminoglikan vezne domene, čime potiče proliferaciju, adheziju i migraciju stanica interakcijom s receptorom urokinaze (uPAR), faktorima rasta i određenim integrinima (Preissner 1991; Preissner i Seiffert 1998; Schwartz i sur. 1999; Hapke i sur. 2003; Heyman i sur. 2008), a povezan je i s pojavom tumora (Hurt i sur. 2010; Kadowaki i sur. 2011; Pirazzoli i sur. 2013). Funkcija vitronektina može se modulirati proteolitičkim enzimima i protein kinazama prisutnim u krvi (Schwartz i sur. 1999).

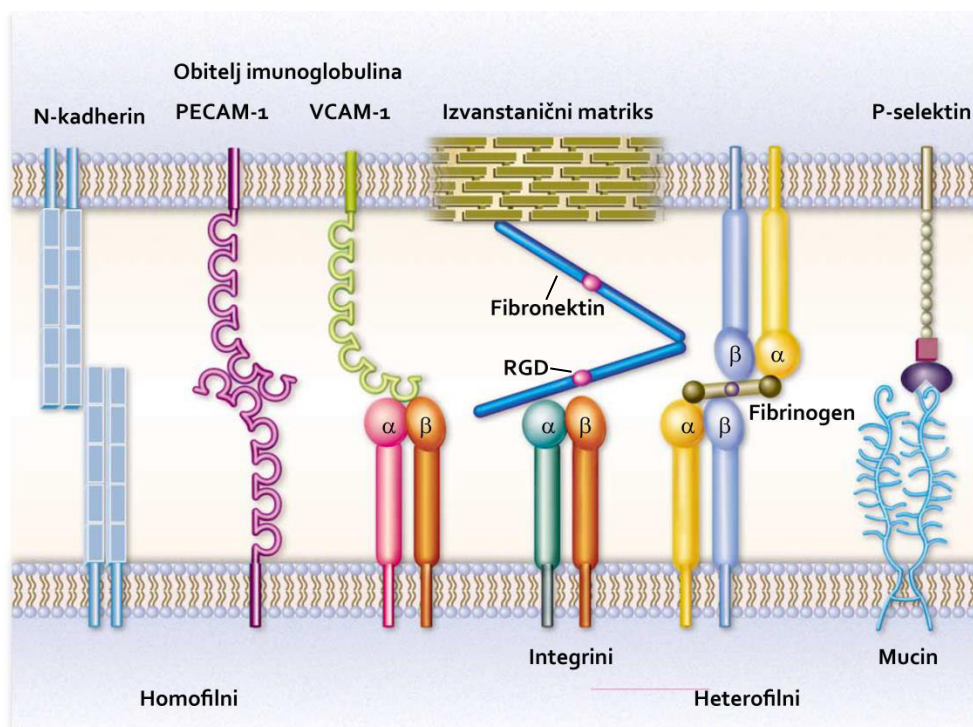
Osim gore navedenih vlaknastih proteina, poznati su još laminin (Aumailley i sur. 2005), trombospondin (Bentley i Adams 2010; Adams i Lawler 2011), tenascini (Chiquet-Ehrismann i Tucker 2011), fibrilini (Ramirez i Dietz 2009) i mnogi drugi.

### 1.3.2. Receptori na površini stanica za proteine izvanstaničnog matriksa

Da bi stanica mogla regulirati svoju okolinu veže se preko receptora na stanicama, odnosno adhezijskih molekula (engl. *cell adhesion molecules*, CAMs) s drugim stanicama i izvanstaničnim matriksom koji zatim utječe na funkciju stanice (Frenette i Wagner 1996). Ovo povezivanje igra ključnu ulogu u procesima kao što su embrionalni razvoj i morfogeneza tkiva, u patološkim procesima, kao što su invazija stanica tumora i metastaziranje, tromboze i upale (Hynes i Lander 1992; Francavilla i sur. 2009). U tijeku su i istraživanja fokusirana na iskorištavanje receptora na stanicama za komponente izvanstaničnog matriksa u ciljanoj terapiji tumora i dijagnostici (Dunehoo i sur. 2006). Interakcije stanica sa susjednim stanicama i izvanstaničnim matriksom posredovane su različitim adhezijskim molekulama na površini stanica, unutar kojih su četiri glavne skupine receptora: kadherini, selektini, imunoglobulini i integrini (Aplin i sur. 1999; van der Flier i Sonnenberg 2001) (Slika 5).

Kadherini su velika obitelj transmembranskih proteina koji imaju zajedničku izvanstaničnu domenu, sastavljenu od ponavljajućih motiva koji sadrže približno 100 kadherin specifičnih aminokiselina (Suzuki 1996; Chothia i Jones 1997; Humphries i Newham 1998). Glavni članovi obitelji kadherina su N-, P-, R-, B- i E-kadherin (Angst i sur. 2001), građeni od 5 takvih motiva i primarno homofilne molekule koje povezuju stanicu s drugim stanicama ovisno o prisutnosti kalcija. Nalaze se u specijaliziranim mjestima povezivanja stanice sa stanicom, koji se nazivaju adherentne veze (engl. *adherence junctions*) gdje uspostavljaju vezu s aktinskim citoskeletom. Kadherini koji se vežu na desmosome drugi su najvažniji članovi obitelji kadherina i formiraju unutarstanične veze s intermedijarnim filamentom (Hynes 1999). Konačno, proto-kadherini članovi su obitelji kadherina važni za razvoj živčanog sustava (Wu i Maniatis 1999). Stabilna adhezija stanice omogućena je formiranjem niza krutih dimera sastavljenih od ponavljajućih motiva kadherina (Humphries i Newham 1998; Vasioukhin i sur. 2000), koji su jednaki dimerima na stanici s kojom se želi spojiti (Sivasankar i sur. 1999). Distalne citoplazmatske domene

kadherina vezane su skupinom unutarstaničnih proteina, katenina, čijom se interakcijom kadherini izravno vežu na aktinski citoskelet (Gumbiner 2000).



Slika 5. Četiri glavne skupine adhezijskih molekula. Preuzeto i prilagođeno iz Frenette i Wagner (1996).

Adhezijske molekule stanica krvožilnog sustava uključene u interakcije leukocita, trombocita i endotela u cirkulaciji krvi nazivaju se selektini (Lasky 1995; Bendas i Borsig 2012). Samo su tri člana ove obitelji: P-, E- i L-selektin. L-selektin je konstitutivno eksprimiran na površini leukocita, P-selektin se nalazi u  $\alpha$ -granulama trombocita i Weibel-Paladeovim tjelešcima endotela pa se nakon aktivacije može brzo prenijeti na površinu stanice, dok ekspresija E-selektina zahtjeva *de novo* transkripciju, pa do ekspresije na površini stanice dolazi nekoliko sati nakon stimulacije aktivacije (Kansas 1996). Pokazano je da selektini posreduju vezanju stanice s drugim stanicama prepoznavanjem i vezanjem različitih struktura glikana neovisno o prisutnosti kalcija (Varki 1997), a imaju funkciju u upalnim procesima, imunosnom odgovoru, zarastanju rana i zaustavljanju krvarenja (Springer 1995; Hartwell i Wagner 1999; Ley i sur. 2007).

Obitelj imunoglobulina vrlo je raznolika grupa adhezijskih receptora, čiji su pripadnici definirani jednom ili više kopija strukture koja se sastoji od dva cisteinska ostatka odvojena dvjema antiparalelnim  $\beta$ -pločama (Vaughn i Bjorkman 1996). Prisutni su u različitim



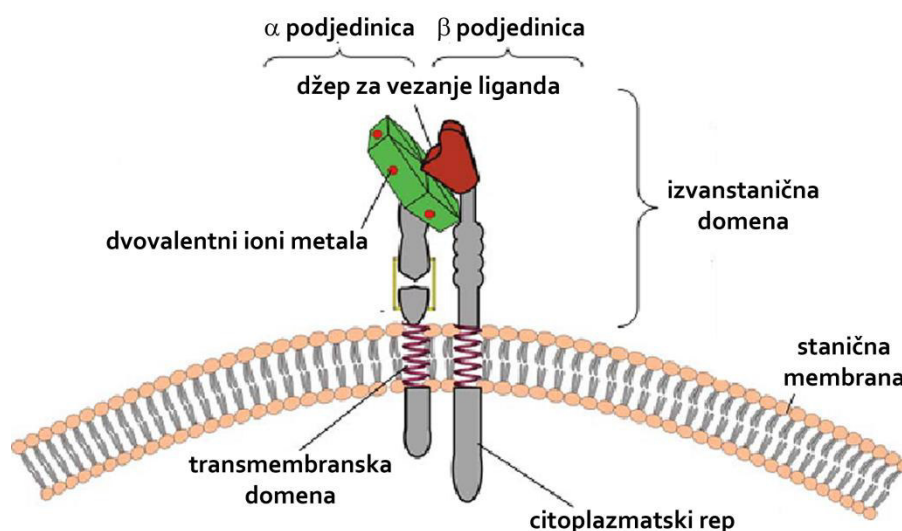
stanicama i sudjeluju u brojnim biološkim procesima, od kojih je najvažniji razvoj živčanog sustava (Murase i Schuman 1999). Postoji nekoliko skupina imunoglobulina uključenih u razvoj živčanog sustava. Adhezijska molekula neuronskih stanica (engl. *neural cell adhesion molecule*, NCAM) homofilna molekula koja povezuje stanicu s drugim stanicama neovisno o prisutnosti kalcija (Crossin i Krushel 2000), L1, TAG1, kontraktilin i *Drosophila fasciklin II* (Tessier-Lavigne i Goodman 1996; Crossin i Krushel 2000) čine jednu od njih. U drugoj su skupini receptori netrina, kao što je DCC (engl. *deleted in colon carcinoma*) koji stupaju u interakciju s izvanstaničnim matriksom kako bi aksonima pružili smjernice u migraciji (Culotti i Merz 1998). Oni, kao i treća skupina imunoglobulina, transmembranske tirozin kinaze koje se vežu na susjedne stanice preko svojih liganada efrina (Bruckner i Klein 1998), povezuju stanicu s drugim stanicama vezanjem na različite adhezijske molekule i receptore.

Integrini, četvrta i glavna skupina adhezijskih molekula na koje se vežu komponente izvanstaničnog matriksa, glavna su tema ove doktorske disertacije, pa će biti obrađeni u sljedećem poglavlju kao zasebna jedinica.

## 1.4. INTEGRINI

Otkako su 1986. godine proteini, koji su sposobni integrirati unutrašnjost stanice s izvanstaničnim matriksom ili s drugom stanicom, dobili ime "integrini" (Hynes 1987), ove adhezijske molekule su intenzivno istraživane. Napredak u razumijevanju njihove strukture postignut je nakon što su riješene kristalne strukture integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Xiong i sur. 2001; Xiong i sur. 2002) i  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Xiao i sur. 2004).

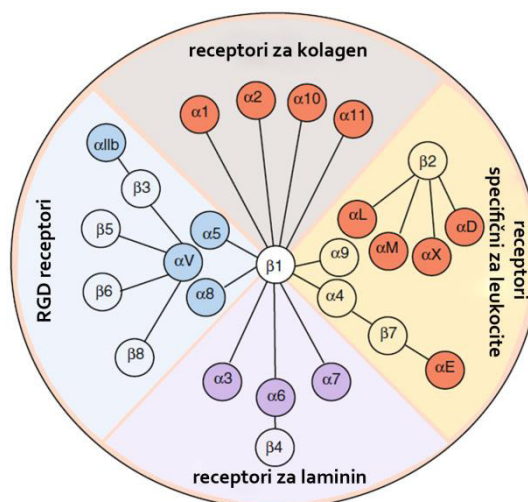
Integrini su transmembranski glikoproteini građeni kao heterodimeri od nekovalentno povezanih  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. Podjedinice integrina  $\alpha$  i  $\beta$  građene su od kratkog citoplazmatskog repa, transmembranske domene i izvanstaničnog dijela (Slika 6), ne pokazuju međusobnu homologiju, ali postoji homologija između različitih  $\alpha$  podjedinica, kao i konzervirane regije između  $\beta$  podjedinica (Barczyk i sur. 2010). Podjedinica  $\alpha$  se sastoji od domene oblika  $\beta$ -propelera, domene zvane *thigh*, te domena *calf-1* i *calf-2* koje zajednički tvore tzv. strukturu *leg* koja drži glavu integrina. Podjedinica  $\beta$  sastoji se od  $\beta I$  domene, hibridne domene, te PSI (engl. *plexin-semaphorin-integrin*) domene (Takada i sur. 2007). Podjedinice  $\alpha$  su zadužene za stvaranje specifičnih veza s izvanstaničnim matriksom, dok  $\beta$  podjedinice ostvaruju veze s citoskeletom i aktiviraju višestruke signalne puteve, uglavnom preko kratkog citoplazmatskog repa (Harburger i Calderwood 2009).



**Slika 6. Shematski prikaz građe integrina.** Podjedinice integrina  $\alpha$  i  $\beta$  sastoje se od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene. Preuzeto i prilagođeno iz Kuphal i sur. (2005).

Do danas je kod sisavaca identificirano 18  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica koje zajedno čine 24 različite kombinacije integrina (Shimaoka i Springer 2003; Takada i sur. 2007; Millard i sur. 2011). Kombinacija podjedinica određuje specifičnost integrina za određeni ligand, pa se mogu podijeliti na 4 skupine (Slika 7): receptori za kolagen ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$  i  $\alpha_{11}\beta_1$ ), receptori za laminin ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$  i  $\alpha_6\beta_4$ ), RGD receptori ( $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$  i  $\alpha_{11b}\beta_3$ ) i receptori specifični za leukocite ( $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$ ,  $\alpha_D\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_E\beta_7$ ,  $\alpha_4\beta_1$  i  $\alpha_9\beta_1$ ) (Plow i sur. 2000; Barczyk i sur. 2010), iako brojni integrini imaju afinitete za iste ligande. Pretpostavlja se da količina određenog integrina na površini stanice ovisi o ekspresiji podjedinice  $\alpha$ , budući da postoji višak podjedinica  $\beta$  u stanici (Santala i Heino 1991). Gubitak ili mutacija bilo koje podjedinice integrina može dovesti do većih ili manjih nedostataka u stanici ili organizmu, ili pojave genskih bolesti, ovisno o tome ima li druga podjedinica sposobnost vezanja na više različitih podjedinica te može li doći do nadoknade gubitka jednog heterodimera integrina drugim koji ima afinitet za iste ligande (van der Flier i Sonnenberg 2001; Takada i sur. 2007).

Integrini su evolucijski sačuvani, od spužvi do čovjeka, iako se njihova složenost i funkcionalna redundancija povećavaju u smislu otkrivanja novih  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica (Hynes i Zhao 2000; Venter i sur. 2001; Huhtala i sur. 2005). Istraživanja provedena na različitim organizmima pokazuju da su geni za  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice integrina nastali duplikacijom (Takada i sur. 2007).



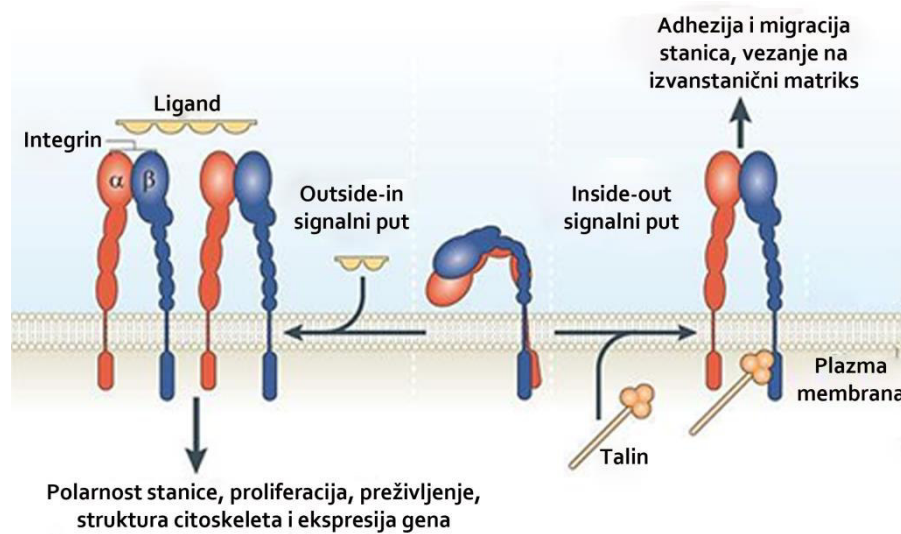
**Slika 7.** Obitelj integrina prikazana prema kombinaciji podjedinica i specifičnosti integrina za određeni ligand. Preuzeto i prilagođeno iz Barczyk i sur. (2010).

Integrini djeluju kao mehanosenzori, adhezijske molekule i mjesta prijenosa signala, a interakcije s izvanstaničnim matriksom posredovane integrinima važne su za prihvaćanje stanica, organizaciju citoskeleta, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica tijekom velikog broja bioloških procesa poput embrionalnog razvitka, imunskog odgovora, resorpcije kosti, agregacije trombocita te patoloških procesa poput upale, angiogeneze i metastaziranja tumora (Hynes 2002; Guo i Giancotti 2004). Osim toga, integrini su receptori za ulazak različitih virusa u stanice (Takada i sur. 1987; Kerr 1999; Ambriović-Ristov i sur. 2004).

#### 1.4.1. Okidanje signala posredovanih integrinima

Integrini sudjeluju u prihvaćanju stanica za izvanstanični matriks i za provođenje signala između stanice i okoline. Obično su prisutni na površini stanice u neaktivnom obliku te ih je moguće aktivirati signalima koji dopijevaju iz oba smjera: (i) iz izvanstaničnog okoliša u citoplazmu (engl. *outside-in signaling*) i (ii) iz unutrašnjosti stanice u izvanstanični okoliš (engl. *inside-out signaling*) (Slika 8) (Hynes 2002). Preko integrina se prenose signali iz okoliša koji obavještavaju stanicu o njenom položaju u okolišu, adhezivnom statusu, te o sastavu izvanstaničnog matriksa vezanjem liganada, promjenom koncentracije dvovalentnih kationa, kemokinima i mehaničkim stresom koji onda kontroliraju ponašanje, proliferaciju, polarnost, rast i migraciju stanica (Legate i sur. 2009; Shattil i sur. 2010; Millard i sur. 2011).

S druge strane, stanica iznutra može promijeniti afinitet integrina za ligand iz pasivnog, slabijeg afiniteta u aktivno, za adheziju povoljno stanje, mijenjanjem konformacije njihove izvanstanične domene (Calderwood 2004). Citoskeletni protein talin ima ulogu u regulaciji afiniteta integrina. Talin se veže za konzervirani NPXY/F motiv citoplazmatskog repa  $\beta$  podjedinice integrina preko PTB domene (Ginsberg i sur. 2005), a također veže i brojne molekule citoskeleta i signalne molekule (Critchley i Gingras 2008). To omogućuje stanici brzu prilagodbu adhezivnog fenotipa bez promjene u broju receptora (Kuphal i sur. 2005).

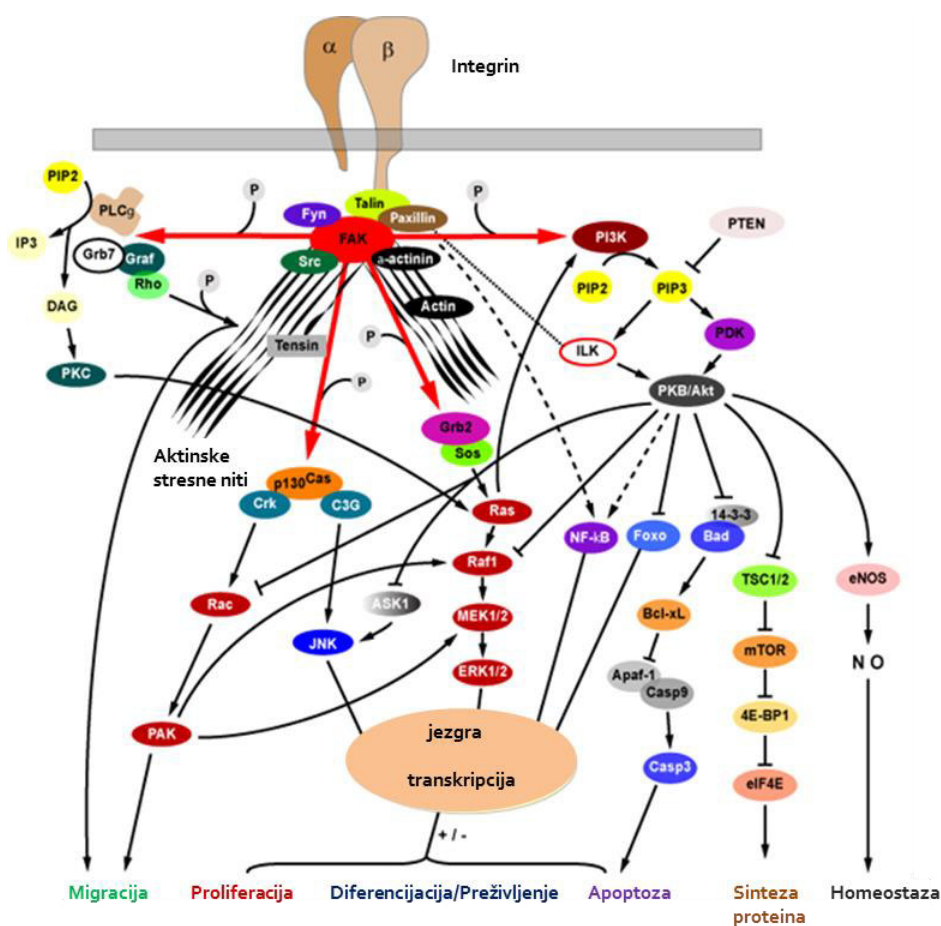


**Slika 8. Shematski prikaz prijenosa signala posredovanog integrinima.** Prijenos signala posredovan integrinima je dvosmjernan, iz stanice u okolinu i obratno. Preuzeto i prilagođeno iz Shattil i sur. (2010).

Integrini nemaju enzimske aktivnosti, vezanje integrina s ligandima dovodi do nakupljanja (engl. *clustering*) integrina i dinamične reorganizacije struktura stanice, što uključuje zakretanje hibridne domene podjedinice  $\beta$ , odvajanje  $\alpha$  i  $\beta$  leg domene i odvajanje transmembranskih domena, što konačno dovodi do vezanja nekoliko proteinskih kompleksa s kratkim citoplazmatskim repom integrina u citoplazmi i formiranjem visokoorganiziranog agregata molekula poznatom pod nazivom fokalne adhezije (Hynes 2002; Takada i sur. 2007; Geiger i Yamada 2011). Do sada je poznato više od 180 molekula koje se nalaze u fokalnim adhezijama, bilo da se radi o adaptornim proteinima ili enzimima (Zaidel-Bar i Geiger 2010). Neki od adaptornih proteina unutar fokalnih adhezija uključeni u vezu integrina i citoskeleta su  $\alpha$ -aktinin, paksilin, vinkulin i talin. Unutar fokalnih adhezija nalaze se i kinaze uključene u signalne puteve, kinaza fokalnih adhezija (engl. *focal adhesion kinase*, FAK), nereceptorska tirozin kinaza Src i kinaza vezana za integrin (engl. *integrin linked kinase*, ILK) (van der Flier i Sonnenberg 2001; Millard i sur. 2011), koji reguliraju migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje putem nizvodnih signalnih kaskada kao što su PI3 kinaza/AKT(PKB), Ras/Raf/MAPK, FAK/JNK ili NF $\kappa$ B (Ginsberg i sur. 2005; Desgrosellier i Cheresh 2010). O glavnim proteinima uključenim u provođenje signala iz okoline u stanicu bit će više govora u sljedećim poglavljima.

Postoji određeni raspored vezanja komponenti fokalnih adhezija nakon vezanja integrina na ligande (Miyamoto i sur. 1995; Yamada i Miyamoto 1995), a prvi proteini koji se

vežu su FAK i adaptorni proteini talin i paksilin, koji zatim uzrokuju vezanje i fosforilaciju članova obitelji Src, i posljedično, regrutiranje i aktivaciju niza nizvodnih signalnih puteva bitnih za regulaciju procesa potrebnih za normalno funkcioniranje stanica (Slika 9) (Schlaepfer i Hunter 1998; Aplin i sur. 1999). Uz to, vezanje talina pospješuje organizaciju citoskeleta, stabilizira adheziju i utječe na rast fokalnih adhezija umrežavanjem s adaptornim proteinom vinkulinom i s aktinom (Legate i sur. 2009). Narušavanje stvaranja fokalnih adhezija može dovesti do sprječavanja pravilne adhezije stanica i smanjene pokretljivosti, a kod stanica koje su ovisne o adheziji i do anoikisa (Desgrosellier i Cheresch 2010).



Slika 9. Signalni putevi koji se aktiviraju vezanjem integrina na izvanstanični matriks. Preuzeto i prilagođeno iz <http://www.unifr.ch/pathology/en/background/tumorangiogenesis>.

#### 1.4.1.1. FAK

Kinaza fokalnih adhezija (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) citoplazmatska je protein tirozin kinaza koju možemo naći u gotovo svim tkivima, a igra veliku ulogu tijekom embrionalnog razvoja i u patogenezi ljudskih bolesti (Golubovskaya i sur. 2009). Slijed aminokiselina u FAK je konzerviran i sastoji se od četiri domene: N-terminalne FERM domene, središnje katalitičke domene tirozin kinaze, C-terminalne FAT domene i regije bogate prolinom između katalitičke i FAT domene (van Nimwegen i van de Water 2007). Nakupljanje integrina dovodi do autofosforilacije tirozina Y397 u N-terminalnoj domeni, kojom se povećava katalitička aktivnost FAK, a motivi koji okružuju Y397 omogućuju vezanje proteina koji sadrže SH2 domenu (engl. *Src homology 2*), od kojih je najbitniji Src. Vezanjem Src na FAK fosforiliraju se tirozini Y576 i Y577, koji se nalaze u katalitičkoj domeni i potrebni su za potpunu aktivaciju katalitičke domene (Calalb i sur. 1995; Owen i sur. 1999). FERM domena može biti i pozitivan i negativan regulator funkcije FAK. FAK se pomoću FERM domene veže na citoplazmatski rep  $\beta$  podjedinice integrina, čime se FAK protein razmotava, autofosforilira i aktivira (Cooper i sur. 2003). Uz autofosforilaciju katalitička domena zajedno s FERM domenom fosforilira i aktivira nekoliko proteina vezanih na fokalne adhezije kao što su paksilin, Grb2, p130CAS (Thomas i sur. 1999; Dunty i sur. 2004). FAT sekvenca na C-terminalnom kraju potrebna je za lokalizaciju FAK u fokalnim adhezijama (Hildebrand i sur. 1993). Međutim, iako je pokazano da se preko FAT domene FAK može direktno vezati na integrine, pokazano je da je puno češći indirektan način vezanja preko adaptornih proteina talina i paksilina (Schaller i Parsons 1995). Uz talin i paksilin, FAK je prva molekula koja se veže na integrine u fokalnim adhezijama i ključna je za procese migracije (Slika 10) (Sieg i sur. 1999).

Ekspresija FAK potrebna je za pravilan razvoj, pa je tako tijekom embrionalnog razvitka FAK potreban za angiogenezu i pravilan razvoj srca (Braren i sur., 2006; Hakim i sur., 2007; Shen i sur., 2005), a u neuronima za rast neurita i vođenje aksona (Li i sur., 2004; Liu i sur., 2004; Ren i sur., 2004). Povećana ekspresija (ne mutacija) FAK pronađena je u velikom broju tumora, u kojima je pokazana njegova uloga u razvitku (Golubovskaya i sur., 2009a). Budući da FAK regulira procese kao što su proliferacija i migracija stanica (Mitra i sur., 2005), promjene u njegovoj ekspresiji ključne su za metastaziranje tumora (Hauck i sur. 2001), proces koji FAK promovira poticanjem faktora rasta i signalnih puteva preko

integrina (Sieg i sur. 1999; Sieg i sur. 2000; Hauck i sur. 2001). FAK može zaštititi stanice od apoptoze ili anoikisa induciranog odvajanjem stanica od podloge (Frisch i sur. 1996; Duxbury i sur. 2004b; Zhang i sur. 2004), a inhibicija FAK u tumorskim stanicama može dovesti do odvajanja stanica od podloge i posljedično apoptoze (Xu i sur. 1998). Očito je da FAK igra veliku ulogu u procesima koji mogu imati direktan utjecaj na maligni fenotip, što je pokazano i radom u kojem je delecija FAK dovela do supresije stvaranja tumora i blokiranja sposobnosti stvaranja metastaza (McLean i sur. 2004). Količina FAK povećana je u velikom broju karcinoma čovjeka (Gabarra-Niecko i sur. 2003; Siesser i Hanks 2006; Hao i sur. 2009), pa je stoga FAK identificiran kao potencijalna ciljna molekula u terapiji (Brunton i Frame 2008). U tu svrhu razvijeno je nekoliko inhibitora (Roberts i sur. 2008), međutim, mnogi smatraju da upotreba inhibitora nije najbolje rješenje, pogotovo jer adaptorna funkcija FAK igra ulogu u mnogim procesima u stanici. FAK je fosforiliran na više mjesta, koja služe kao vezna mjesta za proteine koji sadrže SH<sub>2</sub> domenu, kao što su Src, PI-3 kinaza i p130Cas, a ukoliko su ta mjesta nedostupna i ne može doći do vezanja molekula sa SH<sub>2</sub> domenom, dolazi do smanjene migracije (Cary i sur. 1996) i povećane apoptoze stanica (Sonoda i sur. 2000). Interakcija SH<sub>3</sub>-domene s FAK proteinom također je bitna za migraciju (Sieg i sur. 1999), dok prekid u interakciji proteina FAK i VEGFR uzrokuje odvajanje stanica od podloge i indukciju apoptoze (Garces i sur. 2006). Također je pokazana i sposobnost FAK da preko integrina i faktora rasta regulira stanični ciklus putem transkripcijske aktivacije ciklina D<sub>1</sub> (Zhao i sur. 2001). Svi ovi podaci ukazuju na važnost adaptorne funkcije FAK, koja omogućava da signale dobivene od integrina i faktora rasta prenese u stanicu i time uspješno regulira procese u stanici.

#### 1.4.1.2. Src

Identificiran kao stanični oblik produkta gena virusa Rausovog sarkoma v-Src (Brown i Cooper 1996) koji pokazuje kinaznu aktivnost, protein Src (ili c-Src) uključen je u signalne puteve kojima se regulira morfologija, diferencijacija, dioba, pokretljivost, adhezija i preživljenje stanica. Od otkrića protoonkogena *Src* 1976 godine u ljudskom genomu identificirano je dodatnih devet varijanti proteina Src. Svi oni zajedno čine obitelj kinaza Src (engl. *Src family kinases*, SFKs) (Parsons i Parsons 2004), a mogu se podijeliti u 3 skupine prema ekspresiji: Src, Fyn i Yes nalaze se posvuda u stanici; Blk, Fgr, Hck, Lck, Yrk i Lyn



primarno su eksprimirani na hematopoetskim stanicama, dok se Frk-vezane kinaze može naći na epitelnim tkivima (Yeatman 2004; Wheeler i sur. 2009). Strukturno su članovi Src obitelji kinaza vrlo slični, i dijele neke konzervirane strukturne elemente, kao što su N-terminalna Src homologna domena 4 (SH<sub>4</sub>), Src homolognu domenu 3 (SH<sub>3</sub>), Src homolognu domenu 2 (SH<sub>2</sub>), kinaznu domenu bogatu prolinom i C-terminalni rep (Boggon i Eck 2004; Engen i sur. 2008). Preko SH<sub>4</sub> domene se SFKs vežu na citoplazmatsku membranu (Sato i sur. 2009), a SH<sub>3</sub> i SH<sub>2</sub> domene zajedno reguliraju aktivnost SFKs, vezanje na druge molekule i lokalizaciju unutar stanice (Brown i Cooper 1996; Waksman i Kuriyan 2004). Domena SH<sub>1</sub> katalizira fosforilaciju i sadrži autofosforilacijsko mjesto koje je potrebno za potpunu aktivaciju Src, Y<sub>418</sub>. Vezanjem C-terminalnog repa na SH<sub>2</sub> domenu fosforilacijom Y<sub>530</sub> i interakcijom SH<sub>3</sub> domene s katalitičkom domenom SH<sub>1</sub>, Src zauzima zatvorenu konformaciju i smanjuje interakciju s drugim molekulama (Yeatman 2004; Sen i Johnson 2011). Tek defosforilacijom Y<sub>530</sub> na C-terminalnom repu dolazi do autofosforilacije Y<sub>418</sub> (Yeatman 2004), čime se otvara konformacija te zatim SH<sub>2</sub> i SH<sub>3</sub> domene mogu stupiti u interakciju s faktorima rasta, receptorima adhezije integrinima, hormonskim receptorima, kinazom fokalnih adhezija (FAK), i komponentama citoskeleta (Bromann i sur. 2004; Ishizawar i Parsons 2004; Sen i Johnson 2011).

FAK se veže na SH<sub>2</sub> domenu proteina Src preko veznog mjesta nastalog fosforilacijom Y<sub>397</sub> stimuliranog integrinima, čime dolazi do stvaranja kompleksa FAK-Src (Mitra i Schlaepfer 2006) i prijenosa signala koji kontroliraju procese u stanici kao što su proliferacija, diferencijacija, regulacija staničnog citoskeleta, oblik stanice, adhezija i pokretljivost (Abram i Courtneidge 2000; Playford i Schaller 2004). Istovremeno Src dodatno fosforilira FAK kinaznu domenu na Y<sub>576</sub> i Y<sub>577</sub>, i C-terminalnu domenu na Y<sub>861</sub> i Y<sub>925</sub>, čime stvara dodatna vezna mjesta (Mitra i Schlaepfer 2006) za dvije glavne ciljane molekule ovog kompleksa, adaptorni protein paksilin i p130Cas, koji dalje prenose signale bitne za adheziju i pokretljivost stanice.

S druge strane, pokazano je da integrini mogu aktivirati Src neovisno o FAK direktnim vezanjem podjedinice integrina  $\beta_3$  na SH<sub>3</sub> domenu Src, čime pripremaju Src za maksimalnu aktivaciju tijekom nakupljanja integrina (Arias-Salgado i sur. 2003; Shattil 2005). Kako je pokazano da integrin  $\alpha_v\beta_3$  može regulirati fosforilaciju FAK u normalnim i u tumorskim stanicama (Kuphal i sur. 2005), vezanje podjedinice integrina  $\beta_3$  na Src predstavlja alternativni način stvaranja FAK-Src kompleksa.

Povećana ekspresija proteina Src pokazana je u mnogim tumorima (Summy i Gallick 2003; Wheeler i sur. 2009; Sen i Johnson 2011; Chen i sur. 2014), i korelira s povećanom migracijom i adhezijom te povećanjem malignosti tumora. Na stanicama tumora glave i vrata te malih stanica tumora pluća (Byers i sur. 2009; Sen i sur. 2009), pokazano je da Src potiče preživljenje vezanjem na STAT3. Zhang i suradnici (2009) pokazali su kliničke i eksperimentalne dokaze da Src igra važnu ulogu u nastanku metastaza u kostima kod pacijenata s tumorom dojke. Interakcijom s integrinom  $\alpha_v\beta_3$  Src povećava adheziju stanica tumora gušterače na proteine izvanstaničnog matriksa (Duxbury i sur. 2004a). Također je pokazano da inhibicija Src povećava osjetljivost stanica tumora na djelovanje protutumorskih lijekova (Duxbury i sur. 2004c), a inhibicijom fosforilacije Src smanjuje se sposobnost stanica da adheriraju na podlogu i migriraju (Di Florio i sur. 2007; Shor i sur. 2007; Huveneers i sur. 2008; Meenderink i sur. 2010; Zhu i sur. 2013), što je jedan od preduvjeta tumorskih stanica da prodiru u druga tkiva i organe i tamo stvaraju metastaze. Svi ovi podaci pokazali su da Src ima potencijala kao ciljna molekula u terapiji tumora (Zhang i Yu 2012), pa su neki inhibitori, kao što su ponatinib, bafetinib, dasatinib, bosutinib i sarakatinib već u kliničkim ispitivanjima (Kim i sur. 2009; Sen i Johnson 2011; Zhang i Yu 2012). Dasatinib, mala molekula koja se prvenstveno koristi kao inhibitor fosforilacije nereceptorske tirozin kinaze Src, inhibira migraciju i invaziju tumorskih stanica, smanjuje rast tumora, inducira apoptozu tumorskih stanica i povećava osjetljivost tumorskih stanica na djelovanje zračenja (Shor i sur. 2007; Ceppi i sur. 2009; Nautiyal i sur. 2009; Raju i sur. 2012).

#### 1.4.1.3. ILK

Izvorno opisana kao serin/treonin protein kinaza koja se direktno veže i provodi signale s podjedinice integrina  $\beta_1$  i  $\beta_3$  (Hannigan i sur. 1996), kinaza vezana za integrin (engl. *integrin linked kinase*, ILK) sastoji se od tri visoko evolucijski konzervirane domene: N-terminalne domene koja sadrži četiri ankrin ponavljanja, središnje '*pleckstrin-homology (PH)-like domain*' i C-terminalne katalitičke domene (McDonald i sur. 2008). Istraživanja su pokazala ključnu funkcionalnu vezu ove kinaze s integrinima, čime povezuje integrine i faktore rasta za aktinski citoskelet i aktivira niz signalnih puteva kojima se regulira proliferacija, mitozu, migracija, invazija, angiogeneza, anoikis, apoptoza, embrionalni

razvoj, kontraktilnost srca i glatkih mišića te homeostaza tkiva (Li i sur. 1999; Hannigan i sur. 2005; McDonald i sur. 2008; Hannigan i sur. 2011). Vezanjem za citoplazmatski rep podjedinice integrina  $\beta_1$  i  $\beta_3$  preko parvina (Legate i sur. 2006; Vakaloglou i Zervas 2012), paksilina (Nikolopoulos i Turner 2001) ili PINCH (Stanchi i sur. 2009) ILK zatim regulira dinamiku aktina i mikrotubula (Wickstrom i Fassler 2011; Sayedyahosseini i sur. 2012) smanjivanjem kontraktilnosti aktomiozina inducirane putem RhoA (Montanez i sur. 2009) i stabilizacijom vrhova mikrotubula u fokalnim adhezijama (Wickstrom i Fassler 2011). Posljedično, u fibroblastima koji nemaju ekspresiju ILK dolazi do slabe organizacije aktinskih niti i zaustavljanja širenja stanica. Gubitak ILK dovodi do smanjene organizacije fibronektina (Stanchi i sur. 2009).

ILK je, zajedno s FAK i Src, sastavni dio fokalnih adhezija, nalazi se i u miofilamentima, a otkriveno je i da može stupiti u interakciju s tubulinom i tubulin pridruženim proteinima (Dobrev i sur. 2008), kako bi regulirao premještanje kalveola (Wickstrom i sur. 2010a) i smjestio se u centrosome gdje može regulirati sastavljanje diobenog vretena interakcijom s chTOG, TACC3 i kinazom Aurora-A (Fielding i sur. 2008).

Tijekom posljednjih nekoliko godina vodila se rasprava o pravoj prirodi ILK-a, tj. radi li se o pravoj protein kinazi ili o pseudokinazi (Hannigan i sur. 2005; Boudeau i sur. 2006; Wickstrom i sur. 2010b). Naime, analiza slijeda katalitičke domene ILK-a pokazala je da nedostaju dva konzervirana motiva bitna za kinaznu aktivnost (Balendran i sur. 1999; Lynch i sur. 1999). Međutim, brojne studije pokazale su da ILK može direktno fosforilirati više različitih peptida i proteina *in vitro* (Hannigan i sur. 2005; McDonald i sur. 2008), primjerice podjedinicu integrina  $\beta_1$  (Hannigan i sur. 1996),  $\beta$ -parvin (Yamaji i sur. 2001); kinazu glikogen sintaze  $3\beta$  (engl. *glycogen synthase kinase-3 $\beta$* , GSK-3 $\beta$ ) (Delcommenne i sur. 1998); Akt (Persad i Dedhar 2003), paksilin (Nikolopoulos i Turner 2001) i mnoge druge. S druge strane, postoje i genetičke studije koje su pokazale da za aktivaciju ILK-u nije potrebna kinazna aktivnost, već da može imati ulogu kao adaptorni protein (Mackinnon i sur. 2002; Lange i sur. 2009). Hannigan i suradnici (2011) detaljnom su analizom postojećih informacija pokazali da protein ILK nije pseudokinaza, već da se radi o proteinu koji je istodobno i adaptorni protein i kinaza, a može se fosforilirati na 3 mjesta, gdje je mjesto S343 odgovorno za autofosforilaciju ILK-a, dok za druga dva mjesta S146 i T173, koja se također fosforiliraju, nije pokazano da ta fosforilacija ima utjecaj na aktivnost ILK proteina. Međutim, Suh i Han (2011) su povezali fosforilaciju na mjestu T173 s povećanom

signalizacijom ILK-a . U različitim vrstama tumora pokazana je povećana ekspresija i kinazna aktivnost ovog proteina (McDonald i sur. 2008; Cabodi i sur. 2010), koja korelira s progresijom tumora u pacijentima (Persad i Dedhar 2003). Tako je katalitička aktivnost ILK, koja promovira stvaranje tumora fosforilacijom GSK-3 $\beta$ , Akt i ERK, pokazana u tumoru dojke (White i sur. 2001). Osim toga, ILK posreduje u fosforilaciji proteina Akt i preživljenju stanica tumora dojke, ali ne i normalnih stanica (Troussard i sur. 2006). U endotelnim stanicama VEGF stimulira aktivnost ILK-a, koji regulira angiogenezu, a inhibicija ILK-a u ksenograftima tumora prostate inhibira angiogenezu i rast tumora *in vivo* (Tan i sur. 2004). Uloga ILK u poticanju rasta tumora dodatno je istražena korištenjem inhibitora kinazne aktivnosti ILK kinaze, koja je dovela do supresije rasta tumora gušterače (Yau i sur. 2005), pluća (Liu i sur. 2006) i tiroidne žlijezde (Younes i sur. 2005), a pokazano je i da može regulirati proces angiogeneze u melanomu aktivacijom signalnog puta koji ide preko NF- $\kappa$ B i interleukina 6 (Wani i sur. 2011). Svi ovi podaci pokazuju da bi ILK mogao biti potencijalna ciljna molekula u terapiji tumora (Hannigan i sur. 2005; Cabodi i sur. 2010).

#### 1.4.1.4. Utjecaj ekspresije FAK, Src i/ili ILK na otpornost stanica na djelovanje protutumorskih lijekova

S obzirom da se preko FAK, Src i/ili ILK provode signali koji reguliraju adheziju, migraciju, proliferaciju i preživljenje tumorskih stanica, njihovom modulacijom moguće je utjecati na otpornost stanica na djelovanje protutumorskih lijekova. Tako je u stanicama melanoma pokazano da smanjena ekspresija FAK u kombinaciji s djelovanjem 5-fluorouracila dovodi do smanjene adhezije stanica i povećane apoptoze (Smith i sur. 2005), a Chen i suradnici (2009) pokazali su povećanu citotoksičnost 5-fluorouracila na stanice tumora debelog crijeva MCS preko smanjene ekspresije FAK, koja djelomično smanjuje otpornost stanica supresijom aktivnost Akt/NF- $\kappa$ B puta. Inhibicija aktivnosti FAK povećava osjetljivost stanica tumora dojke na djelovanje topotekana (Satoh i sur. 2003). Na stanicama tumora gušterače pokazano je da aktivacija FAK/PI3K/AKT signalnog puta posredovana povećanom ekspresijom transglutaminaze TG2 pridonosi nastanku otpornosti na gemcitabine (Verma i sur. 2006). Također je pokazana veza između povećane ekspresije integrina  $\alpha_5\beta_1$  i povećane fosforilacije FAK u stanicama tumora glave i vrata HSC-2 otpornim na cisplatinu (Nakahara i sur. 2003). Stanice otporne na trastuzumab, lapatinib ili

kombinaciju ova dva lijeka, u kojima je došlo do inhibicije fosforilacije EGFR/HER1, HER2 i HER3, pokazuju povećanu ekspresiju FAK i Src posredovanu ekspresijom integrina  $\beta_1$  (Huang i sur. 2011). Inhibicijom FAK djelovanjem inhibitora VS-6063 u stanicama SKOV3 smanjuje se otpornost na paklitaksel posredovana aktivacijom AKT signalnog puta preko transkripcijsko/translacijskog faktora Yb-1 (Kang i sur. 2013).

Pokusi na stanicama tumora gušterače PANC1, MiaPaCa2, Capan2, BxPC3 i PANC1 (GemRes), klonu koji pokazuje otpornost na gemcitabin, pokazali su da inhibicija fosforilacije Src potiče citotoksični efekt gemcitabina (Duxbury i sur. 2004c). Src povećava preživljenje tj, otpornost na paklitaksel i cisplatinu u mišjim stanicama tumora jajnika ID8 (Pengetnze i sur. 2003), a aktivacija Src u stanicama tumora mjehura čovjeka HAG-1 potiče otpornost na cisplatinu preko Ras, PI3K ili PKC signalnog puta (Masumoto i sur. 1999). George i suradnici (2005) pokazali su da inhibicijom Src dolazi do ponovne osjetljivosti na paklitaksel u stanicama tumora jajnika čovjeka CaOV3TaxR i mišjim stanicama tumora jajnika ID8TaxR otpornim na djelovanje paklitaksela mehanizmom neovisnim o MDR1.

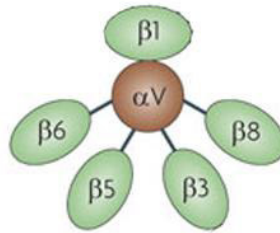
Za ILK je u literaturi pokazano da smanjena ekspresija ILK vodi do povećane osjetljivosti na cisplatinu stanica tumora želuca čovjeka SGC7901 preko blokiranja PI3K/Akt i MAPK/ERK signalnih puteva (Song i sur. 2012), i do povećane osjetljivosti stanica tumora gušterače na djelovanje gemcitabina preko apoptoze posredovane povećanjem ekspresije kaspaze 3 (Duxbury i sur. 2005). U ksenograftima tumora gušterače čovjeka inhibicija ILK inhibitorom QLT0254 inhibira PI3K/PKB/mTOR, Stat3 i FKHR signalne puteve, rast tumora i povećava apoptozu induciranu djelovanjem gemcitabina (Yau i sur. 2005).

Svi ovi podaci pokazuju da FAK, Src i ILK mogu biti potencijalne ciljne molekule za terapiju tumora, te su razvijeni mnogobrojni inhibitori na ove molekule, čija korist u terapiji tumora treba tek biti u potpunosti otkrivena (Kalra i sur. 2009; Lara i sur. 2009; Lee i sur. 2011; Golubovskaya i sur. 2012; Raju i sur. 2012).

#### 1.4.2. Obitelj $\alpha_v$ integrina

Podjedinica integrina  $\alpha_v$  stvara heterodimere s podjedinicama  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  i  $\beta_8$  (Slika 10), koji se vežu na proteine izvanstaničnog matriksa (fibrinogen, fibronektin, vitronektin, osteopontin, trombospondin, fibrilin i dr.) koji sadrže domenu RGD (arginin-glicin-aspartat), često zvanu integrin vezujući motiv (Takada i sur. 2007). Svaki od nastalih heterodimera ima

bitno različite funkcije. To su sposobnost vezanja liganda, internalizacija i razgradnja liganda, sudjelovanje u migraciji stanica (Wong i sur. 1998), a pokazano je da su bitni u procesu zacjelivanja rana, angiogenezi i nastanku tumora (Cox i sur. 2010; Weis i Cheresch 2011). Ova doktorska disertacija bavi se funkcijom dva pripadnika obitelji  $\alpha_v$  integrina, integrinima  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , koji će biti opisani u sljedećim poglavljima.



Slika 10. Obitelj  $\alpha_v$  integrina. Preuzeto i prilagođeno iz Cox i sur. (2010)

#### 1.4.2.1. Integrin $\alpha_v\beta_3$

Integrin  $\alpha_v\beta_3$  važan je receptor za molekule izvanstaničnog matriksa kojeg je moguće pronaći na fibroblastima, stanicama glatkog mišića, endotelnim stanicama u angiogenezi, te u vrlo malim količinama na normalnim epitelnim stanicama. Također ga nalazimo i na nekim B-stanicama, trombocitima i monocitima (Brooks i sur. 1995). Kao i ostali članovi obitelji  $\alpha_v$  integrina prepoznaje i veže se za proteine izvanstaničnog matriksa (vitronektin, fibrinogen, laminin, kolagen, von Willebrand faktor, osteopontin i dr.) koji sadrže RGD domenu (Janssen i sur. 2002; Takada i sur. 2007). Ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  povećana je u različitim tumorima, kao što su tumori dojke, prostate, grlića maternice i jajnika (Weis i Cheresch 2011), i u melanomu i glioblastomu čovjeka (Mitjans i sur. 2000). Zanimljivo je da integrin  $\alpha_v\beta_3$  eksprimiran na tumorskim stanicama potiče rast primarnog tumora i daje tumoru sposobnost invazije, metastaziranja i preživljavanja u nepovoljnom okolišu neovisno o usidrenju (Haubner i sur. 2001; Weis i Cheresch 2011). U melanomu inicira prijelaz stanica iz benigne radijalne faze rasta u malignu vertikalnu fazu rasta (Albelda i sur. 1990). Kod tumora dojke (Felding-Habermann i sur. 2001) i prostate (McCabe i sur. 2007) integrin  $\alpha_v\beta_3$  posreduje metastaziranje putem pojačane adhezije stanica tumora. Pokazano je da

povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  na stanicama tumora dojke potiče metastaziranje u kosti (Sloan i sur. 2006).

Integrin  $\alpha_v\beta_3$  u svim navedenim tumorima ima i prognostičku vrijednost, naime preživljenje pacijenata negativno je korelirano s njegovom povećanom ekspresijom (Sheldrake i Patterson 2009). Desgrosellier i suradnici (2009) pokazali su na mišjem modelu da se povećanjem ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  povećava rast i širenje, odnosno da se utišavanjem ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  smanjuje rast i širenje tumora gušterače. Zbog svih ovih karakteristika integrin  $\alpha_v\beta_3$  je, bilo da se radi o onom eksprimiranom na endotelnim stanicama u angiogenezi ili na tumorskim stanicama, jedna od najzanimljivijih meta za terapiju tumora (Weis i Cheresh 2011).

#### 1.4.2.2. Integrin $\alpha_v\beta_5$

Integrin  $\alpha_v\beta_5$ , veže se za osteopontin, protein CCN3 i BSP i vitronektin (Takada i sur. 2007). Za razliku od integrina  $\alpha_v\beta_3$  eksprimiran je na velikom broju normalnih stanica, ali kao i integrin  $\alpha_v\beta_3$  ima važnu ulogu u širenju tumora te je pojačano eksprimiran na stanicama endotela tijekom angiogeneze i stanicama tumora (Pasqualini i sur. 1993b; Pasqualini i sur. 1993a). Za razliku od integrina  $\alpha_v\beta_3$ , koji potiče rast primarnog tumora i ima mogućnost spontanog metastaziranja, provođenje signala preko integrina  $\alpha_v\beta_5$  tijekom invazije i metastaziranja ide preko suradnje (engl. *cross-talk*) s tirozin kinaznim receptorima, poput receptora za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) ili faktora rasta sličnog inzulinu (engl. *insulin-like growth factor*, IGF). Pokazano je da stimulacija stanica tumora gušterače EGFR-om vodi do povećane invazije i metastaziranja u specifičnom integrin  $\alpha_v\beta_5$  ovisnom putu. EGFR stimulira stanice tumora preko Src ovisne fosforilacije p130CAS, što vodi do aktivacije Rap1, male GTP-aze koja aktivira integrin  $\alpha_v\beta_5$  (Ricono i sur. 2009).

Kritičnu ulogu integrina  $\beta_5$  u potencijalu nastanka tumora dojke nedavno su u svojim rezultatima pokazali Bianchi-Smiraglia i suradnici (2013) i predložili kako bi ciljanje ovog integrina bilo posebno važno za trostruko negativne tumore dojke koji su otporni na većinu trenutačno dostupnih terapija.

## 1.5. OTPORNOST TUMORA NA PROTUTUMORSKE LIJEKOVE POSREDOVANA INTEGRINIMA

Vežanjem integrina na izvanstanični matriks potiču se signalni putevi koji mogu osigurati preživljenje različitim tipovima tumorskih stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima. Npr. u stanicama mijeloma čovjeka 8226 povećana ekspresija integrina  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) osigurava otpornost na doksorubicin i melfalan (Damiano i sur. 1999). Adhezija tumora malih stanica pluća na fibronektin, kolagen IV i laminin osigurava otpornost na etopozid, cisplatinu i daunorubicin, ali i na zračenje. Ovaj učinak je posredovan podjedinicom integrina  $\beta_1$  uključenom u integrine  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  i  $\alpha_v\beta_1$ , koji su na ovim stanicama eksprimirani (Sethi i sur. 1999). U staničnim linijama tumora dojke MDA-MB-231 i MDA-MB-435 vezanje  $\beta_1$  integrina inhibira apoptozu potaknutu protutumorskim lijekovima koji djeluju na mikrotubule, paklitakselom i vinkristinom (Aoudjit i Vuori 2001). U stanicama glioma, integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  koji vežu vitronektin, okidaju signale koji štite stanice od izlaganja topotekanu (Uhm i sur. 1999). Povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  pokazana je u glioblastomima i vrlo vjerojatno ima ulogu u invaziji (Desgrosellier i Cheresh 2010). Fibronektin inhibira ceramid i docetaksel induciranu apoptozu u stanicama tumora prostate DU145 vezanjem  $\beta_1$  integrina s kompleksom faktora rasta sličnog inzulinu i protein receptora za kinazu RACK-1 i povećanjem ekspresije MAPK fosfataze 1 (Thomas i sur. 2010). Vežanje kolagena na integrin  $\alpha_2\beta_1$  povećava sposobnost metastaziranja adenokarcinoma gušterače i štiti ga od 5-fluorouracilom inducirane apoptoze povećanom regulacijom protuapoptotskog proteina Mcl-1, člana Bcl-2 obitelji (Armstrong i sur. 2004).

Međutim, u literaturi postoje oskudni podaci o tome da integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  direktno posreduju u otpornosti na protutumorske lijekove. Uhm i suradnici (1999) pokazali su da stanice glioma čovjeka otporne na topotekan imaju povećanu ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  te da je mehanizam otpornosti povezan s povećanjem Bcl-2 i Bcl-XL. U stanicama tumora dojke MCF-7 i MDA-MB-231 faktor rasta veznog tkiva (CTFR) koji se veže na integrin  $\alpha_v\beta_3$  osigurava otpornost na doksorubicin i taksol povećanom ekspresijom Bcl-xL i cIAP1 (Wang i sur. 2009). U stanicama tumora dojke MCF-7 otkriveno je da zaštita od oštećenja nastalih izlaganjem paklitakselu, doksorubicinu, i  $\beta$ -lapachonu posredovana povećanjem ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$ , potaknuta ekspresijom induktora CYR61, može biti dokinuta upotrebom blokirajućih monoklonskih protutijela na  $\alpha_v\beta_3$  (Menendez i sur. 2005). Interakcija



CCN1 i integrina  $\alpha_v\beta_3$  potiče otpornost stanica tumora bubrega na vinblastin aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta čime je povećana aktivnost P-glikoproteina (Long i sur. 2013). Ambriović i suradnici (2004) pronašli su povećanu ekspresiju  $\alpha_v\beta_3$  integrina na stanicama karcinoma grkljana čovjeka (HEp2) otpornima na cisplatinu i pretpostavili ulogu povećane ekspresije ovog integrina u otpornosti, što je i dokazano radom Brozović i suradnika (2008) u kojem su HEp2 stanice transficirane plazmidom koji eksprimira  $\beta_3$  podjedinicu integrina i izdvojeni su stabilni transfektanti koji pokazuju otpornost na tri protutumorska lijeka: cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C (Brozovic i sur. 2008). Zajednički mehanizam djelovanja ovih lijekova je stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta. Pronađen je i mehanizam otpornosti; povećanjem ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  u HEp<sub>2</sub> stanicama došlo je do povećane ukupne količine glutationa koja je omogućila bolje preživljenje stanica djelotvornijim uklanjanjem nastalih reaktivnih kisikovih vrsta u stanici.

S obzirom na ove opisane karakteristike integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  su potencijalne ciljne molekule za terapiju tumora (Millard i sur. 2011; Weis i Cheresch 2011).

## 1.6. MODULIRANJE INTEGRINA U SVRHU POVEĆANJA UČINKOVITOSTI TERAPIJE TUMORA

Aktivnost integrina ovisi o njihovoj aktivaciji, vezanju liganda, stvaranju fokalnih adhezija i kontakta s citoskeletom, stoga bi inhibicija bilo kojeg od ovih događaja dovela do prekida funkcija u stanici reguliranih integrinima, pa svaki predstavlja važnu metu za djelovanje lijekova.

Najčešći terapijski pristup su antagonisti integrina, bilo da se radi o protutijelima, cikličkim peptidima, dezintegrinima (engl. *disintegrins*) i oponašajućim (engl. *mimetic*) peptidima (Desgrosellier i Cheresch 2010), koji se vežu na ciljni integrin na sličan način na koji se veže ligand integrina i time sprječavaju okidanje signala (Millard i sur. 2011). Neki od njih su već u predkliničkim i kliničkim ispitivanjima (Kapp i sur. 2013).

Monoklonsko protutijelo CNTO 95 razvijeno je na podjedinicu integrina  $\alpha_v$ , čime se ciljaju integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , i u prvoj fazi kliničkih ispitivanja pokazano je njegovo protutumorsko djelovanje na uznapredovalim tumorima otpornim na uobičajenu terapiju, ili za koje terapija ne postoji (tumori jajnika i debelog crijeva). Drugo monoklonsko protutijelo

koje se nalazi u kliničkim ispitivanjima, a veže se na integrin  $\alpha_v\beta_3$  je etaracizumab (MEDI-522). Inhibira angiogenezu i smanjuje rast tumora, a pretpostavljena je njegova učinkovitost u smanjenju metastaza u kostima jer direktno utječe na stanice tumora i smanjuje njihovu resorpciju u kosti. Cilengitid je ciklički pentapeptid koji sadrži RGD slijed i koristi se kao specifični inhibitor integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , a trenutno je u drugoj i trećoj fazi kliničkih ispitivanja (Desgrosellier i Cheresch 2010).

Integrine je moguće upotrijebiti, posebice one koji su povećano eksprimirani na stanicama tumora ili stanicama endotela u angiogenezi, kao adresu za isporuku terapije razvijanjem nanočestica ili virusa koji koriste slijed RGD. Te bi nanočestice mogle ciljano prenositi protutumorski lijek (kemoterapeutike, peptide koji potiču programiranu smrt stanica, radionuklide, kemokine) do krvnih žila tumora koje povećano eksprimiraju integrine  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  (Desgrosellier i Cheresch 2010). Virusi koji koriste slijed RGD mogu ciljano prenositi terapijske gene u tumorske stanice (Majhen i sur. 2009).

Jedan od načina kako se još može kočiti prijenos signala potaknut integrinima je RNA interferencija, tj. unos malih interferirajućih molekula RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA), čime se postiže ciljano utišavanje ekspresije određenih gena. Na taj se način unosom molekule siRNA specifične za podjedinicu integrina razgrađuje ciljna molekula mRNA te se kao posljedica smanjuje ekspresija podjedinice integrina na površini stanice (Cai i Chen 2006), što može doprinijeti povećanju učinka protutumorskih lijekova te utjecati na migraciju stanica koja je preduvjet za metastaziranje.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Glavni je razlog neuspjeha terapije tumora razvoj otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove. Nastaje često kao rezultat istovremenog djelovanja više mehanizama, od kojih je jedan interakcija stanica putem transmembranskih heterodimernih proteina integrina s izvanstaničnim matriksom ili s drugim stanicama. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  prepoznat je kao jedna od meta za terapiju tumora, nakon što je u mnogim tumorima pronađena njegova povećana ekspresija. Pokazano je da ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  utječe na rast tumora, njegovu invazivnost i metastatski potencijal, a postoje i podaci o direktnom utjecaju integrina  $\alpha_v\beta_3$  na otpornost tumorskih stanica na djelovanje protutumorskih lijekova.

Osnovna je hipoteza ovog istraživanja da integrin  $\alpha_v\beta_3$  u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka Cal27 modulira citotoksično djelovanje protutumorskih lijekova, mijenja adheziju i pokretljivost stanica. Prethodno je pokazano da stanice Cal27 s *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  pokazuju povećanu otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C. Cilj ove doktorske disertacije je utvrditi utječe li *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  na osjetljivost stanica Cal27 i na druge protutumorske lijekove te otkriti signalne puteve koji su uključeni u ovaj fenomen. Interakcija stanica s izvanstaničnim matriksom preko integrina dovodi do stvaranja fokalnih adhezija, proteinskih kompleksa preko kojih se provode signalni putevi u stanicu. Ovim se radom žele istražiti promjene u proteinima fokalnih adhezija i proteinima uključenim u signalne puteve odgovorne za preživljenje stanica nastalih *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$ . S obzirom da integrini imaju i ulogu u regulaciji adhezije i migracije, dva preduvjeta za uspješnu invaziju tumorskih stanica u druga tkiva, u okviru ove doktorske disertacije utvrdit će se utjecaj *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  na sposobnost stanica da adheriraju na podlogu i migriraju.

Dobiveni rezultati pružit će dodatne informacije o signalnim putevima potaknutim integrinom  $\alpha_v\beta_3$  i time doprinijeti istraživanjima terapijskih pristupa povećanja osjetljivosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove ciljanjem integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Osnovne kemikalije.

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ	KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
cisplatina	Sigma-Aldrich, Njemačka	etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA)	Kemika, Hrvatska
doksorubicin	Sigma-Aldrich, Njemačka	agaroz	Serva, Njemačka
mitomicin C	Sigma-Aldrich, Njemačka	akrilamid	Serva, Njemačka
etopozid	Sigma-Aldrich, Njemačka	bisakrilamid	Serva, Njemačka
5-fluorouracil	PLIVA, Hrvatska	amonijev persulfat (APS)	Serva, Njemačka
kamptotecin	Sigma, SAD	2-merkaptioetanol	Serva, Njemačka
vinkristin	Sigma, SAD	Ponceau S	Sigma, Njemačka
paklitaksel	Sigma, SAD	natrij-dodecilsulfat (SDS)	Serva, Njemačka
Dulbeccova modifikacija Eagleove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , DMEM)	Invitrogen, SAD Lonza, Švicarska	N,N,N,N-tetrametiletildiamin (TEMED)	Serva, Njemačka
serum fetusa goveda (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Invitrogen, SAD	Tween-20	Sigma, SAD
tripsin	Invitrogen, SAD	nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT)	Chemicon International Inc., SAD	Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer Life Science, SAD
dimetilsulfoksid (DMSO)	Kemika, Hrvatska	razvijač	Fotokemika, Hrvatska
deionizirana voda (diH <sub>2</sub> O)		fiksir	Fotokemika, Hrvatska
etanol	Kemika, Hrvatska	etidijev bromid (EtBr)	Serva, Njemačka

metanol	Kemika, Hrvatska	paraformaldehid (PFA)	Merck Millipore, Njemačka
Lipofectamine™ RNAiMAX	Invitrogen, SAD	podloga za uklapanje (engl. <i>mounting medium</i> )	Dako, Danska
Opti MEM (engl. <i>minimum essential media</i> )	Invitrogen, SAD	albumin seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumin, BSA</i> )	Sigma-Aldrich, Njemačka
Orange G	Merck, Njemačka	boja Kristal ljubičasto (engl. <i>Crystal violet</i> )	Sigma-Aldrich, Njemačka
glutation reduktaza	Roche, SAD	Triton X-100	Sigma-Aldrich, Njemačka
reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat ( $\beta$ -NADPH)	Sigma, Njemačka	Tris-klorovodična kiselina (Tris HCl)	Serva, Njemačka
Glutation	Boehringer Ingelheim, Njemačka	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (Ellmanov reagens)	Boehringer Ingelheim, Njemačka
Taq DNA Polimerazase	Thermo scientific, SAD	klorovodična kiselina (HCL)	Kemika, Hrvatska
butionin sulfoksimin (BSO)	Sigma-Aldrich, Njemačka	Sensimix Sybr HI-RO	Bioline, UK
Metilensko modriilo (engl. <i>Methylene blue</i> )	Sigma-Aldrich, Njemačka	RNAza A	Sigma-Aldrich, Njemačka
dasatinib	Sigma-Aldrich, Njemačka	Giemsa otopina	Kemika, Hrvatska
amonijev acetat (engl. <i>ammonium acetate</i> )	Sigma-Aldrich, Njemačka	N-acetil cistein (NAC)	Sigma-Aldrich, Njemačka

### 3.1.2. Stanične linije

U ovom radu korištene su stanice karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka (engl. *human tongue squamous carcinoma*, Cal27, ATCC, CRL-2095), čije je porijeklo potvrđeno analizom u Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH u Njemačkoj. Ove stanice korištene su za transfekciju i izdvajanje stabilno transficiranih klonova stanica: kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  dobivenog transfekcijom plazmida pcDNA<sub>3</sub> te klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3, dobivenih transfekcijom plazmida pcDNA $\beta_3$  koji sadrži gen za  $\beta_3$  podjedinicu integrina (Stojanović 2009.). Sve stanice rastu kao adherentna kultura.

### 3.1.3. Protutijela i spojevi korišteni u fluorescencijskoj mikroskopiji, protočnoj citometriji i Western blotu

Za određivanje ekspresije proteina metodom protočne citometrije korištena su protutijela prikazana u Tablici 4.

Tablica 4. Protutijela korištena za određivanje ekspresije integrina.

	SPECIFIČNOST*	PROIZVEDENO U ORGANIZMU	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
<b>PRIMARNA PROTUTIJELA</b>	Integrin $\alpha_v\beta_3$ (23C6, LM609)	Miš	Chemicon International, SAD	92590, LM 609
	Integrin $\alpha_v\beta_5$ (P1F6, MAB1961)		Millipore, SAD	MAB1961
	Podjedinica integrina $\alpha_v$ (272-17E6)		Calbiochem, SAD	407286
	Izotipska kontrola IgG1		Sigma-Aldrich, Njemačka	088K4753
<b>SEKUNDARNO PROTUTIJELO</b>	Mišji imunoglobulini**	Zec	Dako, Danska	Ro439

\* Protutijela specifična za proteine na stanicama čovjeka

\*\* Poliklonsko protutijelo, obilježeno fikoeritriinom (engl. *Phycoerythrin*, PE)

Za određivanje ekspresije proteina Western blotom i imunofluorescencijom korištena su protutijela i spojevi prikazani u Tablici 5 i Tablici 6.

Tablica 5. Protutijela korištena za određivanje ekspresije proteina.

	SPECIFIČNOST*	PROIZVEDENO U ORGANIZMU	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
<b>PRIMARNA PROTUTIJELA</b>	ILK1	Zec	Cell signaling, SAD	#3862
	pILK (T173)		Santa Cruz Biotechnology, SAD	Sc-130196
	FAK		Abcam, UK	ab24738
	pFAK (Y397)		Abcam, UK	ab4803
	Src		Abcam, UK	ab32102
	pSrc (Y418)		Abcam, UK	ab4816
	ERK 1		Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-94



	pERK		Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7383
	Pt-(GpG)	Miš	Essen, Njemačka	
SEKUNDARNA PROTUTIJELA	Ovčja protutijela usmjerena protiv mišjih imunoglobulina **		GE Healthcare, UK	NA931
	Goveđa protutijela usmjerena protiv zečjih imunoglobulina **		Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2370
	Magareća protutijela usmjerena protiv zečjih imunoglobulina obilježena Alexa-Fluor-om 555		Molecular Probes, SAD	A31572

\* Protutijela specifična za proteine na stanicama čovjeka

\*\* Protutijelo obilježeno peroksidazom iz hrena

Tablica 6. Spojevi korišteni za imunofluorescenciju.

SPECIFIČNOST	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
Phalloidin-FITC (F-aktin)	Sigma-Aldrich, SAD	P5282
TO-PRO®-3 iodide (kromatin)	Invitrogen, SAD	T3605

### 3.1.4. Početnice

Metodom lančane reakcije polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (engl. *Reverse Transcription-Polymerase chain reaction*, RT-PCR) određivana je ekspresija mRNA gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$  i jednoliko eksprimirani tzv. engl. *housekeeping* gen  $\beta$ -aktin, koji je služio kao kontrola. Sljedovi nukleotida korištenih početnica za PCR prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Početnice korištene u reakciji PCR.

GEN	POČETNICE	SLIJED NUKLEOTIDA U SMJERU 5'-3'
Podjedinica integrina $\beta_3$	$\beta_3^f$	GAGGATGACTGTGTCGTCAG
	$\beta_3^r$	CTGGCGGTTCTTCCTCAA
$\beta$ -aktin	Akt 1	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA
	Akt 2	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG

Sljedovi nukleotida početnica korišteni u tehnici lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (engl. *real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR*) prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Početnice korištene u reakciji *real-time* PCR.

GEN	POČETNICE	SLIJED NUKLEOTIDA U SMJERU 5'-3'
Podjedinica integrina $\alpha_v$ (ITGAV)	F	AATCTTCCAATTGAGGATATCAC
	R	AAAACAGCCAGTAGCAACAAT
Podjedinica integrina $\beta_1$ (ITGB1)	F	TGCCAAATGGGACACGGTAAG
	R	AATCAGCCTGACAGCTAATAC
Podjedinica integrina $\beta_3$ (ITGB3)	F	CCGTGACGAGATTGAGTCA
	R	AGGATGGACTTTCCACTAGAA
Podjedinica integrina $\beta_5$ (ITGB5)	F	AAGATTGGGGACACGGCATC
	R	CACGTGCAGTTGTAGGTGACC
Podjedinica integrina $\beta_6$ (ITGB6)	F	GAATGATCACGTACAAGGTGG
	R	GCACACTGAGGTCCAATAAGC
<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> (HPRT1)*	F	AGAATGTCTTGATTGTGGAAGA
	R	ACCTTGACCATCTTTGGATTA
<i>8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), nuclear gene encoding mitochondrial protein*</i>	F	AAGAGGTGGCTCAGAAAT
	R	GATGTTGTTGTTGGAGGAA
Actin, beta (ACTB)*	F	TGGCATCCACGAAACTACC
	R	GTGTTGGCGTACAGGTCTT
<i>APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 (APEX1)*</i>	F	AGGATTAGATTGGGTAAAGGA
	R	GCTGGTAGTTTGTCTCTG
<i>Ataxia telangiectasia mutated (ATM)*</i>	F	CAAGATGTTCATAGAGTT
	R	TGAGGAAGATAGTAAGAG
<i>ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae) (ATG3)*</i>	F	AGGACAATATAAGGCTTCAA
	R	TTCCAACAATCCACTCTC
<i>ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae) (ATG7)*</i>	F	GAACCTCAGTGAATGTATG
	R	AACCTTGTCCAAGTCTAA
<i>Baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3)*</i>	F	TGGTAATGAGATGTGATG
	R	GTAAGAGGTTCTGAGTC
<i>B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), nuclear gene encoding mitochondrial protein*</i>	F	CGACTCCTGATTCATTGG
	R	TCTACTTCCTCTGTGATGT
<i>BCL2-associated X protein (BAX)*</i>	F	ATCAGATGTGGTCTATAATG
	R	CAGAAGGCACTAATCAAG
<i>Beclin 1, autophagy related (BECN1)*</i>	F	GGATGGAAGGGTCTAAGA
	R	CTGTGGTAAGTAATGGAG
<i>BH3 interacting domain death agonist (BID)*</i>	F	GAAGACAGGCTGGAAGATA
	R	GTGTGGATGATATGAAGGC
<i>Breast cancer 1, early onset (BRCA1)*</i>	F	AAGACTTCTACAGAGTGAA
	R	CAGTTCCAAGGTTAGAGA

<i>Breast cancer 2, early onset (BRCA2)*</i>	F	AACAACAATTACGAACCAA
	R	AACATTCCTTCCTAAGTCTA
<i>Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP2)*</i>	F	GAGAGAAAGAACTGGAATT
	R	TCTGGTCACATAGAACAT
<i>CD44 molecule (Indian blood group) (CD44)*</i>	F	GGACCAATTACCATAACTATT
	R	AGGATTCGTTCTGTATTCT
<i>Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) (CDC25A)*</i>	F	GTGAAGAACAACAGTAATC
	R	TGAGGTAGGGAATGTATT
<i>Cell division cycle 25 homolog B (S. pombe) (CDC25B)*</i>	F	CGTGACCTTGATTGAGTT
	R	TCCCGGAAGTTTGCTAAA
<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)*</i>	F	GCCTTACTACATTGGGAT
	R	ACAGTGTTCTCAAACCTCA
<i>CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) (CHEK1)*</i>	F	CCACCTCTTCATAACAACAA
	R	TAAATCACAATCGCCACTC
<i>CHK2 checkpoint homolog (S. pombe) (CHEK2)*</i>	F	GCACTGTCTACTAAGCAGAAAT
	R	AGGCACCACTTCCAAGAG
<i>Cyclin A1 (CCNA1)*</i>	F	ATTTCAACACAGTTTCCC
	R	CAGCATATTCAGTCACATT
<i>Cyclin B1 (CCNB1)*</i>	F	CCTTCGGAGAGCATCTAA
	R	CATAGTTAGTTCCATCAGGTATT
<i>Cyclin E1 (CCNE1)*</i>	F	GCAAATAGAGAGGAAGTC
	R	ATTAACCAATCCAGAAGAAT
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A)*</i>	F	TACATCTTCTGCCTTAGT
	R	TCTTAGGAACCTCTCATT
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) (CDKN1B)*</i>	F	ACAGCTCGAATTAAGAATA
	R	CTTATACAGGATGTCCATT
<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1)*</i>	F	CTGCTTAGCCTAGTCAAC
	R	GGTAGGTAGCGAAGAATAG
<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1)*</i>	F	TCCGTCCCCATCCCAATC
	R	CCTCACTGGAAGCTTTAACT
<i>Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa (DDB2)*</i>	F	TTAACCCTCTCAATACCA
	R	CTACTAGCAGACACATCC
<i>DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3)*</i>	F	ACTGAGCGTATCATGTAA
	R	CAGGTGTGGTGATGTATG
<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (ERCC1)*</i>	F	AGGAAGAAATTTGTGATAC
	R	TGTGTAGATCGGAATAAG
<i>Fanconi anemia, complementation group C (FANCC)*</i>	F	AGATGTATGAAGCCTTGAA
	R	AGACAACATAAGCACCAT
<i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6) (FAS)*</i>	F	TTATCTGATGTTGACTTGAGTAA
	R	GGCTTCATTGACACCATT
<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6) (FASLG)*</i>	F	CAATCTTACCAGTGCTGAT
	R	AATCCCAAAGTGCTTCTC
<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)*</i>	F	TCAGTGGAACCTGTCAAGA
	R	TGGATGATGCTGGGAACA

<i>Flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1)*</i>	F	CGGGAGAATGACATCAAG
	R	AACAGCAATCAGGAACTG
<i>Glutathione peroxidase 1 (GPX1)*</i>	F	GCCAAGAACGAAGAGATT
	R	TCGAAGAGCATGAAGTTG
<i>Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1)*</i>	F	ACTATCCTTCGTGAACATC
	R	AGACACAACCACTAACAG
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*</i>	F	CATGAGAAGTATGACAACAG
	R	ATGAGTCCTTCCACGATA
<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)*</i>	F	ATCCACATTCATCTCAAT
	R	GTA ACTACAAAGGTATTTCA
<i>Heat shock 70kDa protein 1B (HSPA1B)*</i>	F	GGACTTTGACAACAGGCT
	R	GCTTGTTCTGGCTGATGT
<i>Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1)*</i>	F	AGTTATCCTACACCTGAA
	R	CATCATCGCTTACTTCTT
<i>Heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1)*</i>	F	CAACAAAGTGCAAGATTC
	R	AGAAAGCTGAGTGTAAGG
<i>HUS1 checkpoint homolog (S. pombe) (HUS1)*</i>	F	TGTTATCTATGTCAAGCAGTA
	R	CGGTTCTTGTAAGTCCTT
<i>Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A)*</i>	F	TATTTGCGTGTGAGGAAA
	R	CATCTGTGAGAACCATAAC
<i>Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1)*</i>	F	GAGGATTA CTTCGGACTTCA
	R	GCTGGTGTTGTGCTAATG
<i>Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)*</i>	F	AAGAAGATAGCCAACCAATGT
	R	TACACGGTGAGGAAGGTT
<i>Interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6)*</i>	F	CCAATCTGGATTCAATGA
	R	GTTCCCTCACTACTCTCAA
<i>Jun oncogene (JUN)*</i>	F	ATGGAAACGACCTTCTATG
	R	TCTTGGGGTACTGTAGC
<i>Ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)*</i>	F	GAAGTGGAACAGAGAAG
	R	CTTTGGAGGTCTTTAGGG
<i>Ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3), nuclear gene encoding mitochondrial protein*</i>	F	GCTATATGTCTTTGGCTTTC
	R	GGAATAGGCACAGTTCTT
<i>Ligase IV, DNA, ATP-dependent (LIG4)*</i>	F	TGAGCACATTGAGAAGGA
	R	CAGTAGGAGAAGCACCAA
<i>Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)*</i>	F	GCTCCAAAGAAATCAAGACTGT
	R	GGTGCCACTAACACATCTG
<i>Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) (MMP13)*</i>	F	GGCTCTTAATGGTTATGAC
	R	GCACTTATCTTCTTA ACTTCT
<i>Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3)*</i>	F	GAAGTTACTAGCAAGGACCTC
	R	TCCAGCTCGTACCTCATT
<i>Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) (MMP7)*</i>	F	TTGATAAGCACTGTTCTT
	R	GCAAGTATAGATGAATAAGACA
<i>Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)</i>	F	ATCTTGATGCTGGTGTA

(MDM2)*	R	AGGCTATAATCTTCTGAGTC
<i>MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae) (MRE11A)*</i>	F	GCCTGTCCAGTTTGAAT
	R	GGTTGCCATCTTGATAGTT
<i>MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli) (MSH2)*</i>	F	CTTCTTCTGGTTTCGTCAGTATAGA
	R	ATCATTCTCCTTGGATGCCTTAT
<i>NADPH oxidase 1 (NOX1), transcript variant NOH-1L*</i>	F	CTCTCCAGCCTATCTCAT
	R	AATGTCACATACTCCACTG
<i>Nitric oxide synthase 2, inducible (NOS2)*</i>	F	AATCCAGATAAGTGACATAAG
	R	CTCCACATTGTTGTTGAT
<i>Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) (NOS3)*</i>	F	CAAGGAGACGAAGAGAAC
	R	TGGAGTCTTGTGTAGGATA
<i>N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG)*</i>	F	CAACCGAGGCATGTTTAT
	R	TGGAGATGTTTATGCAGAAG
<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)*</i>	F	CTCTTACCATCCCGTTT
	R	AATCACTTCTCCGAATTTTAC
<i>Phosphatase and tensin homolog (PTEN)*</i>	F	ATCATCAAAGAGATCGTTA
	R	ACCTTACTACATCATCAATA
<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)*</i>	F	GAACGACCTGATCTGGAA
	R	CACTTGCTGCTTGTGAA
<i>Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa (POLD1)*</i>	F	TCTGGGATGATGATGATGC
	R	GTGTTCTGCCTCCATCTC
<i>Polymerase (DNA directed), epsilon (POLE)*</i>	F	TTTGGCATTGACATTGAG
	R	AATCATCATAATCTGGTCTGT
<i>Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*</i>	F	TTACCATAGAGATGAATGAACCA
	R	AGTGTACCGTTGAAGAG
<i>RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae) (RAD51)*</i>	F	AATTAGTTCCAATGGGTTT
	R	TGAAGTAGTTTGTCAAGC
<i>Ras homolog gene family, member A (RHOA)*</i>	F	CCGATGTTATACTGATGTG
	R	ACAGAAATGCTTGACTTC
<i>Ras homolog gene family, member B (RHOB)*</i>	F	TGATCGTGTTTCAAGGAC
	R	CAATGTCGGCCACATAGTT
<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1) (RAC1)*</i>	F	ATCAGTTACACAACCAAT
	R	CGTAATCTGTCATAATCTTC
<i>REV1 homolog (S. cerevisiae) (REV1)*</i>	F	AACACATATTATTGCCACAA
	R	GAATGTAGGAGAGGAGTC
<i>REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast) (REV3L)*</i>	F	AGTGTATTAGTATCAGGAA
	R	TGTAGGAGGTAGGGAATA
<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha (ARHGDI)*</i>	F	TCGTTTGTGCTGAAGGAG
	R	TCATGCCGGACACTATCT
<i>Selectin E (SELE)*</i>	F	GCTATGACTTATGATGAG
	R	ATTCCAATCCAGTAATAAC
<i>Superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)*</i>	F	TCTGTTTCAATGACCTGTATT
	R	GCCTCATAATAAGTGCCATA
<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>	F	TAATGCTCTGAATCCTAGTC

(TIAM1)*	R	GAAACAGAAGAGGCTTTG
<i>Thioredoxin reductase 1</i> (TXNRD1)*	F	CGAAATTATGGATGGAAAGTC
	R	GAGCCAATGTGATTCTGTA
<i>Three prime repair exonuclease 1</i> (TREX1)*	F	TCATGTGAAGAGGGGAGAC
	R	GAAGTTGGAGAGGGTGAG
<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i> (TIMP2)*	F	AAGGAAGTGGACTCTGGAA
	R	CTTTGAACATCTTTATCTGCTTGA
<i>Topoisomerase (DNA) II alpha 170kda</i> (TOP2A)*	F	ACGGTGTGGATATTCTAAG
	R	AAGCGAGCCTGATTATTC
<i>Topoisomerase (DNA) II beta 180kda</i> (TOP2B)*	F	ATAACATTCCAACCAGAT
	R	GGCAATTTCTTTCCATTA
<i>Tumor protein p53</i> (TP53)*	F	AGCACTAAGCGAGCACTG
	R	ACGGATCTGAAGGGTGAAA
<i>Tumor protein p63</i> (TP63)*	F	ATTGTTCTCCGTTGTTGATA
	R	GTAAGGGTCAGGGCAGTA
<i>Tumor protein p73</i> (TP73)*	F	CACTTTGAGGTCACCTTC
	R	ATCTGGCAGTAGAGTTTC
<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> (AKT1)*	F	ATTGTGAAGGAGGGTTGG
	R	TGAAGGTGCCATCATTCT
<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (VCAM1)*	F	TGTCATTGAGGATATTGGAA
	R	ATAACTGTATTCTGGGTGAT
<i>WEE1 homolog (S. pombe)</i> (WEE1)*	F	TTCCAGAGATTAAGACAA
	R	ATATTCACCTTGAGGAGTC
<i>Werner helicase interacting protein 1</i> (WRNIP1)*	F	CTGGAGACCAACGAAATC
	R	TAATGTCACAAACCTTATGC
<i>Werner syndrome, RecQ helicase-like</i> (WRN)*	F	AAGATGTGCTGTAGAAGAA
	R	TCGTAACCTATACACAATGGA
<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group</i> <i>A</i> (XPA)*	F	AAGGAAGTCCGACAGGAA
	R	ACACGCTGCTTCTTACTG
<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group</i> <i>C</i> (XPC)*	F	ACACCTACTACCTCTCAA
	R	TAAATAGCAAATCTCCTTTCC
<i>X-ray repair complementing defective repair in</i> <i>Chinese hamster cells 1</i> (XRCC1)*	F	GAGGAAGTTGGATTTGAA
	R	ATTTAGGTCTCTTGGGAA
<i>X-ray repair complementing defective repair in</i> <i>Chinese hamster cells 3</i> (XRCC3)*	F	CATTGTTCTGTCTTTCCT
	R	CTCCTTTACCGATTTTCTCAG
<i>X-ray repair complementing defective repair in</i> <i>Chinese hamster cells 4</i> (XRCC4)*	F	GTGTGAGTGCTAAGGAAG
	R	CTCATCATAGACTGGATCTC

\* Tablica gena korištenih u reakciji *real-time* PCR dobivena ljubaznošću prof.dr.sc.Gerharda Fritza, Institut für Toxikologie, Düsseldorf, Njemačka.

### 3.1.5. Transfekcija siRNA

Za transfekciju male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) u stanice korišten je komercijalno dostupan Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, SAD). Podaci o specifičnim Silencer® Select Pre-designed & Validated siRNA i nespecifičnoj siRNA Silencer® Select Negative Control proizvođača Ambion® prikazani su Tablici 9.

**Tablica 9. Korištene siRNA molekule.** Dopremljene su od proizvođača u liofiliziranom obliku, otopljene u diH<sub>2</sub>O do koncentracije 100 μM (matična otopina). Razrjeđivanjem u diH<sub>2</sub>O od matične otopine pripravljene su radne otopine koncentracije 10 μM. Radne otopine su korištene za pripremu potrebnih koncentracija za utišavanje navedenih u tablici.

SPECIFIČNOST	siRNA ID	LOCUS ID
Podjedinica integrina β <sub>5</sub>	s7591	3693
Podjedinica integrina α <sub>v</sub>	s7568	3685
Nereceptorska tirozin kinaza (Src)	s13414	6714
Kinaza vezana za integrin (engl. <i>integrin linked kinase</i> , ILK)	s7404	3611
Nespecifična (engl. <i>scrambled</i> )	-	

### 3.1.6. Kompleti i standardi

U Tablicama 10 i 11 prikazani su korišteni kompleti i standardi.

**Tablica 10. Korišteni kompleti.**

KOMPLET	UPOTREBA
DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Njemačka)	izdvajanje i pročišćavanje ukupne DNA iz stanica u kulturi
Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, SAD).	transfekcija siRNA u stanice
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Njemačka)	izdvajanje i pročišćavanje odsječaka DNA iz gela agaroze
High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Njemačka)	izdvajanje ukupne RNA iz stanica u kulturi
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litva)	reverzna transkripcija ukupne RNA

**Tablica 11. Korišteni standardi.**

STANDARD	UPOTREBA
Standard dužine odsječaka DNA 1 kb (Invitrogen, SAD)	elektroforeza DNA
Standard za određivanje molekularne mase proteina (engl. <i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i> ) (Fermentas, Litva)	Western analiza

## 3.1.7. Priprema pufera i otopina

Sastav i priprema korištenih pufera i otopina navedeni su u Tablici 12.

Tablica 12. Priprema otopina.

OTOPINA	PRIPREMA
cisplatina (500 µg/mL)	otapa se u vodi, čuva se pri -20°C
doksorubicin (2 mg/mL)	otapa se u vodi, čuva se pri -20°C
mitomicin C (10 mg/mL)	otapa se u vodi, čuva se pri -20°C
etopozid (10 mg/mL)	otapa se u vodi, čuva se pri -20°C
5-fluorouracil (2,5 mg/mL)	otapa se u fosfatnom puferu (PBS), čuva se pri -20°C
kamptotecin (1390 µg/mL)	otapa se u dimetilsulfoksidu (DMSO), čuva se pri 4°C
vinkristin (100 µg/mL)	otapa se u fosfatnom puferu (PBS), čuva se pri -20°C
paklitaksel (6 mg/mL)	otapa se u dimetilsulfoksidu (DMSO), čuva se pri -20°C
butionin sulfoksimin (100 mM)	otapa se u vodi, čuva se pri -20°C
N-acetil cistein (613 mM)	otapa se u vodi, čuva se pri -20°C
dasatinib (10 mM)	otapa se u dimetilsulfoksidu (DMSO), čuva se pri -20°C
10% seruma fetusa goveda (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS) u DMEM (DMEM-FCS)	50mL FCS u 500mL DMEM, čuva se pri 4°C
podloga za zamrzavanje stanica	450 µL DMEM-FCS + 450 µL FCS +100 µL DMSO, radi se neposredno prije upotrebe
matična otopina MTT (12,1 mM)	5 mg MTT-a se otapa u 1 mL fosfatnog pufera (PBS), filtrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci pri 4°C
tripsin (0,25%)	2,5 g tripsina + 0,01 g streptomocina + 0,006 g penicilina + 0,02 g fenol crvenog se otopi u otopini T, nadopuni se do 1L i podesi pH na 7 do 7,2 te se sterilizira filtriranjem kroz filter veličine pora 0,22 µm, čuva se pri -20°C



fosfatni pufer bez $Mg^{2+}$ i $Ca^{2+}$ , (PBS $\Delta$ )	1,37 mM natrijev klorid + 2,7 mM kalijev klorid + 4,3 mM natrijev hidrogenfosfat heptahidrat + 1,4 mM kalijev hidrogenfosfat, čuva se pri 4°C
albumin iz seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumine</i> , BSA) u PBS $\Delta$ (PBS $\Delta$ -BSA)	0,01, 0,1, 0,3 ili 0,5 mg BSA se otapa u 10 mL PBS $\Delta$ , kako bi se dobilo 0,1, 1, 3 ili 5 % BSA u PBS, čuva se pri 4°C
albumin iz seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumine</i> , BSA) u DMEM (DMEM-BSA)	0,1 mg BSA se otapa u 10 mL DMEM kako bi se dobilo 1% BSA u DMEM, čuva se pri 4°C
10x TBS	500 mL Tris-HCl (pH 7,5) + 300 mL 5M NaCl + 200 mL diH <sub>2</sub> O, čuva se pri 4°C
EDTA (1mM)	60 $\mu$ L 0,5M EDTA (pH 8) + 60 mL PBS $\Delta$ , čuva se pri 4°C
boja kristal ljubičasto 0,1%	0,2% boje kristal ljubičasto u 2% EtOH, čuva se pri sobnoj temperaturi
boja metilensko modri (1mg/mL)	otapa se u vodi, čuva se pri 4°C
pufer TBST	50 mL pufera 10x TBS + 450 mL diH <sub>2</sub> O + 500 $\mu$ L Tween-20 (1x TBS sa 0,1% Tween-20), čuva se pri 4°C
pufer TBE 5X	54 g Tris-baze, 27,5 g borne kiseline, 20 mL 0,5M EDTA otopiti u 1L diH <sub>2</sub> O (pH 8,0), čuva se pri 4°C
pufer za nanošenje uzoraka DNA na agarozni gel (6x)	50% glicerol + 20 mM EDTA + 0,25% Orange G boja, čuva se pri -20°C
towbin pufer za prijenos (pH 8,1 do 8,4)	3,03 g Trisa i 14,4 g glicina se otopi u diH <sub>2</sub> O, dodaje 200 mL metanola i nadopuni do 1 L s diH <sub>2</sub> O (25 mM TrisHCl, 192 mM glicin, 20% metanol). pH varira između 8,1 i 8,4, ovisno o kvaliteti sastojaka i ne podešava se naknadno. Pufer se čuva pri 4°C
tris-glicinski pufer za elektroforezu	3,2 g Tris-baze, 14,42 g glicina, 1 g SDS-a, nadopuni se do 100 mL sa diH <sub>2</sub> O. (25 M Tris, 192 mM glicin; 0,1% SDS; pH 8,3), čuva se pri 4°C
tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	18.2 g Tris-a otapa se u 100 mL diH <sub>2</sub> O. pH se potom podesi dodatkom 6 M HCl-a, čuva se pri 4°C
tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	6 g Tris-a otapa se u 80 mL diH <sub>2</sub> O. pH se podesi dodatkom 6 M HCl-a. Nadopuni se diH <sub>2</sub> O do 100 mL. Čuva se pri 4°C

akrilamid/bisakrilamid (30%)	29.2 g akrilamida i 0.8 g bisakrilamida otapa se u 100 mL diH <sub>2</sub> O, čuva se pri 4°C
10% amonijev persulfat (APS)	500 mg APS-a otapa se u 5 mL diH <sub>2</sub> O. Čuva se pri -20°C u alikvotima po 500 µL
10% natrij-dodecilsulfat (SDS)	u 100 mL diH <sub>2</sub> O otapa se 10 g SDS-a, čuva se pri sobnoj temperaturi
6X SB pufer (engl. <i>sample buffer za SDS-PAGE</i> )	1,2 g SDS-a otapa se u 2 mL diH <sub>2</sub> O, dodaje 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) i 30 mg Bromfenol plavila, nakon što se otopi dodaje se 3 mL glicerola i 1,2 mL β-metkaptoetanol. Dopuni se do 10 mL diH <sub>2</sub> O i čuva pri -20°C. u alikvotima po 500 µL.
Bradford reagens	100 mg Coomassie briljant plavo G-250 + 50 mL 95% etanola + 100 mL 85% fosforne kiseline u 1 L diH <sub>2</sub> O, čuva se pri 4°C
100 mM glicin za uklanjanje vezanih protutijela s membrane	7,51 g glicina se otapa u 1000 mL diH <sub>2</sub> O (pH 2,8), čuva se pri 4°C
lizirajući pufer	0,156 g NaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O + 1 mL 0,5M EDTA u 100 mL diH <sub>2</sub> O, čuva se pri 4°C
pufer za razrjeđivanje	1,56 g NaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O + 1 mL 0,5M EDTA u 100 mL diH <sub>2</sub> O, čuva se pri 4°C
Ellmanov reagens (3 mM)	15 mg Ellman reagens u 12,6 mL pufera za razrjeđivanje, čuva se pri 4°C
NADPH (2 mM)	5 mg NADPH u 6 mL pufera za razrjeđivanje, čuva se pri -20°C
pufer TE	1 mL 1 M Tris-HCl (pH 7,4), + 0,2 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) u 100 mL diH <sub>2</sub> O, sterilizira se autoklaviranjem, čuva se pri 4°C
20xSSC pufer	3,0 M NaCl, 0,3 M natrijev citrat (pH 7,0) čuva se pri sobnoj temperaturi
paraformaldehid (4%)	40 g paraformaldehida i 100 µL NaOH otapa se u 1000 mL PBS-a, čuva se pri -20°C u alikvotima po 500 µL.

## 3.1.8. Uređaji, ostali materijali i pomagala

Korišteni uređaji navedeni su u Tablici 13.

Tablica 13. Korišteni uređaji.

UREĐAJ	PROIZVOĐAČ	UREĐAJ	PROIZVOĐAČ
automatski brojač stanica Coulter Counter	Beckman Coulter, UK	spektrofotometar za mikrotitarske pločice StatFax 2100	Awareness Technology INC, SAD
centrifuga za stanice	Heraeus, Njemačka	svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
drmalica	Tehnica, Slovenija	termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
centrifuga za mikroeprevete koja postiže do 14000 x g	Eppendorf, Njemačka	transiluminator	Vilber Lourmat, Njemačka
inkubator za uzgoj stanica	Heraeus, Njemačka	tresilica	Vibromix 301EVT, Tehnica, Slovenija
izvor napona stuje	Amersham Biosciences, Švedska	uređaj za elektroforezu u gelu agaroze (kalup za izlijevanje gela, češalj, kadica za elektroforezu)	Hofer Scientific Instruments, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska	sustav za vertikalnu elektroforezu Mighty Small II SE 250/SE 260	Hofer Scientific Instruments, SAD
magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija	uređaj za PCR	Eppendorf, Njemačka
Mighty Small Transpher	Amersham Pharmacia Biotech, Švedska	uređaj za <i>real-time</i> PCR	Bio-RAD, SAD
nanodrop NanoVue	GE Healthcare, Life sciences, UK	vaga	Tehnica, Slovenija
protočni citometar	FACSCalibur, Becton- Dickinson, SAD	vibracijska miješalica Vibromix 301EVT	Tehnica, Slovenija
spektrofotometar Ultrospec 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Švedska	vodena kupelj	Tehnica, Slovenija
konfokalni mikroskop LeicaTSC SP2.	Leica Microsystems, Njemačka	ultrazvuk	Cole Palmer, SAD
Whatman Protran nitrocelulozna membrana	Sigma-Aldrich, Njemačka		

Osnovni pribor za rad s kulturom stanica, mjerenje ekspresije protočnom citometrijom i Western blotom, te za provođenje reakcije PCR navedeni su u Tablici 14.

Tablica 14. Ostali materijali i pomagala.

MATERIJAL	PROIZVOĐAČ	MATERIJAL	PROIZVOĐAČ
ampule za smrzavanje stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD	plastične mikroeprovete od 1,5 ili 2mL	Eppendorf, Njemačka
bočice za uzgoj kultura stanica, T-25 i T-75	Falcon Becton Dickinson, SAD	plastične epruvete od 15 mL	Falcon Becton Dickinson, SAD
Petrijeve zdjelice za uzgoj kultura stanica promjera 100 mm/60mm/35mm	Falcon Becton Dickinson, SAD	plastične epruvete od 50 mL	Falcon Becton Dickinson, SAD
pločice za uzgoj kulture stanica s 96/24/6 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD Sarsted	staklene pipete	Superior, Njemačka
mikroeprovete za PCR	Eppendorf, Njemačka	mikropipete	Eppendorf, Njemačka; Rainin
Boyden komorice za migraciju	Falcon Becton Dickinson, SAD	nastavci za mikropipete s filtrom i bez filtra	Eppendorf, Njemačka Rainin
gel dokumentacijski sustav	Syngene, UK	propipeta	Brand, Njemačka
sustav za dokumentaciju i analizu slika ImageQuant TL	GE Healthcare, Life sciences, UK	spremnik ispunjen tekućim dušikom	
sustav za dokumentaciju i analizu slika Image J		pokrovna i predmetna stakalca	Marienfeld, Njemačka
kvarcne kivete volumena 100 µL		sustav za dokumentaciju i analizu podataka FlowJo	Flow Cytometry Analysis Software, SAD
filtrar papir veličina pora 0,22 µm		vateni štapići	DM
gumena strugalica (engl. <i>policeman</i> )	Falcon Becton Dickinson, SAD		

## 3.2. METODE

Korištene su standardne metode molekularne biologije detaljno opisane u priručniku "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriović Ristov i sur. 2007).

### 3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanice Cal27 su adherentne, rastu prihvaćene za podlogu dok u potpunosti ne popune površinu na kojoj rastu ili dok ne iscrpe hranjivu podlogu te ih je stoga potrebno presaditi. Stanice pohranjene u ampulama za smrzavanje, smještenim u spremnicima s tekućim dušikom, odmrzavane su u vodenoj kupelji pri 37°C i zatim prenesene u Petrijevu zdjelicu sa zagrijanom (37°C) hranjivom podlogom DMEM-FCS. Nakon uspješnog prihvaćanja za podlogu stanice su uzgajane u Petrijevim zdjelicama promjera 3,5; 6 i 10 cm te bočicama za uzgoj stanica T-25 (površina 25 cm<sup>2</sup>) i T-75 (površina 75 cm<sup>2</sup>) u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Kao hranjiva podloga koristio se DMEM-FCS.

Prilikom presađivanja, za odvajanje stanica od podloge korišten je tripsin ili po potrebi 1 mM EDTA u kojima su stanice ostavljane tijekom nekoliko minuta. Odvajanje stanica od podloge je praćeno svjetlosnim mikroskopom. Djelovanje tripsina zaustavljano je dodatkom DMEM-FCS, stanice su u potpunosti resuspendirane višekratnim propuštanjem kroz pipetu, po potrebi razrijeđene dodatkom DMEM-FCS i nasađene u nove posude za uzgoj stanica. Ukoliko se stanice smrzavaju, suspenzija stanica se centrifugira 10 minuta pri 1000 x g, supernatant koji sadržava tripsin uklanja, a stanice se resuspendiraju u prethodno pripremljenoj i ohlađenoj otopini za smrzavanje te prenose u ampulu za smrzavanje. Ampule se pohranjuju u hladnjak pri -80°C na najmanje dva sata, a zatim u cilju dužeg čuvanja u spremnik s tekućim dušikom.

### 3.2.2. Određivanje preživljenja i proliferacije stanica

#### 3.2.2.1. MTT test

MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se određuje preživljenje (vijabilnost) stanica. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju žutu topljivu tetrazolijevu sol (MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u ljubičaste kristale formazana. Ova

se reakcija dešava u mitohondrijima djelovanjem enzima sukcinat dehidrogenaze. Kristali formazana se otapaju u dimetil-sulfoksidu (DMSO) te se mjeri apsorbancija pri 600 nm. Preživljenje stanica je proporcionalno izmjerenoj apsorbanciji.

Za određivanje proliferacije stanica nakon tretmana s protutumorskim lijekovima s/bez prethodnog izlaganja inhibitoru sinteze glutaciona (butionin sulfoksimin, BSO), prekursoru sinteze glutaciona (N-acetilcisteine, NAC) ili inhibitoru fosforilacije Src (dasatinib, DAS) stanice su nasađene u pločicu s 96 bunarića ( $5 \times 10^3$  stanica po bunariću u volumenu 180  $\mu\text{L}$ ) i nakon 24 sata dodane su različite koncentracije inhibitora/prekursora u ukupnom volumenu od 200  $\mu\text{L}$  po bunariću, te su nakon perioda predobrade (16 sati za BSO i NAC) dodane različite koncentracije protutumorskih lijekova u ukupnom volumenu od 20  $\mu\text{L}$  po bunariću (Tablica 15). Za svaku koncentraciju istovremeno su rađena 4 paralelna uzorka (kvadriplikat). Nakon inkubacije pri 37°C tijekom 72 sata sa stanica je uklonjena hranjiva podloga i u svaki bunarić je dodano 40  $\mu\text{L}$  matične otopine MTT-a + DMEM-FCS u omjeru 1:10. Stanice su inkubirane 3 sata nakon čega su pod mikroskopom vidljivi kristali formazana. Kristali su zatim otopljeni dodatkom DMSO-a (170  $\mu\text{L}$  po bunariću). Pločica je mehanički protresena na tresilici kako bi se kristali u potpunosti otopili. Apsorbancija je mjerena pri 600 nm pomoću spektrofotometra za mikrotitarske pločice StatFax 2100.

Tablica 15. Raspon konačnih koncentracija ispitivanih spojeva.

SPOJ	MATIČNA OTOPINA	KONAČNE KONCENTRACIJE
cisplatina (cDDP)	500 $\mu\text{g/mL}$	0,125; 0,25; 0,5 $\mu\text{g/mL}$
doksorubicin (DOX)	$2 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$	0,0125; 0,025; 0,5 $\mu\text{g/mL}$
mitomicin (MMC)	500 $\mu\text{g/mL}$	0,02; 0,04; 0,08 $\mu\text{g/mL}$
etopozid (ETO)	$10^4$ $\mu\text{g/mL}$	0,25; 0,5; 1 $\mu\text{g/mL}$
5-fluorouracil (5-FU)	$25 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$	0,0488; 0,0976; 0,195 $\mu\text{g/mL}$
kamptotecin (CTP)	1390 $\mu\text{g/mL}$	0,01; 0,025; 0,05 $\mu\text{g/mL}$
vinkristin (VCR)	100 $\mu\text{g/mL}$	0,00125; 0,0025; 0,005 $\mu\text{g/mL}$
paklitaksel (TAX)	$6 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$	0,00125; 0,0025; 0,005 $\mu\text{g/mL}$
butionin sulfoksimin (BSO)	100 mM	0,005 mM
N-acetilcistein (NAC)	613 mM	2,5; 10 mM
dasatinib (DAS)	10 mM	1000 nM

Preživljenje je izračunato prema formuli:

$$\text{preživljenje (\%)} = \frac{\text{apsorbancija stanica izloženih djelovanju ispitivanog spoja}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica}} \times 100$$

### 3.2.2.2. Metoda praćenja klonalnog rasta stanica

Metoda bojenja kolonija stanica bojom Giemsa koristi se za ispitivanje učinka citotoksičnih spojeva na preživljenje odnosno na stvaranje kolonija adherentnih stanica. Broj nasadenih stanica varira u ovisnosti o tipu stanica koje se koriste i utvrđuje se iskustveno. Za model Cal27 utvrđeno je da se u pločice s 6 bunarića stanice nasadi 1200 stanica u 2 mL DMEM-FCS. Nakon 24 sata stanice su izložene ispitivanom spoju razrijeđenom u DMEM-FCS tijekom jednog sata (Tablica 16), zatim je hranjiva podloga DMEM-FCS zamijenjena svježom i pločice su inkubirane 10-14 dana dok ne izrastu golim okom vidljive kolonije stanica.

Tablica 16. Raspon konačnih koncentracija ispitivanih spojeva.

SPOJ	MATIČNA OTOPINA	KONAČNE KONCENTRACIJE
cisplatina (cDDP)	500 µg/mL	3,5; 7 µg/mL
doksorubicin (DOX)	$2 \times 10^3$ µg/mL	0,0437; 0,0875 µg/mL
mitomicin (MMC)	500 µg/mL	0,091; 0,28 µg/mL
etopozid (ETO)	$10^4$ µg/mL	1,3125; 2,625 µg/mL
5-fluorouracil (5-FU)	$25 \times 10^3$ µg/mL	0,6; 2,4 µg/mL
kamptotecin (CTP)	1390 µg/mL	0,035; 0,07 µg/mL

Kolonije stanica su isprane s PBSΔ, fiksirane 10 minuta u 100% metanolu, sušene tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi i bojane dodatkom boje Giemsa (10%) tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije uklonjena je boja, a pločice su isprane vodovodnom vodom i sušene. Kolonije su izbrojane i izračunato je preživljenje stanica u odnosu na kontrolni uzorak u kojem stanice nisu bile izložene djelovanju ispitivanog spoja.

### 3.2.3. Određivanje ekspresije površinskih proteina metodom protočne citometrije

Metoda neizravne protočne citometrije korištena je za određivanje ekspresije podjedinice integrina  $\alpha_v$  te heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  na površini stanica Cal27. Stanice su uzgajane do 80% popunjenosti površine Petrijeve zdjelice, dva puta isprane s PBSΔ i odvojene od podloge pomoću tripsina ili 1mM EDTA. Za postupak obilježavanja korišteno je  $5 \times 10^5$  stanica po uzorku u 50 µL PBSΔ. U pripremljene uzorke dodana su mišja primarna protutijela (Tablica 17) u ukupnom volumenu 5 µL, inkubirana 60 minuta u ledu, nakon čega su uzorci isprani dva puta hladnim PBSΔ. Ispiranje podrazumijeva dodatak 350

$\mu\text{L}$  PBS $\Delta$ , centrifugiranje stanica 4 minute pri 1000 x g i uklanjanje 350  $\mu\text{L}$  supernatanta, tako da na stanicama i dalje ostane 50  $\mu\text{L}$  PBS $\Delta$ . Stanice su zatim inkubirane sa zečjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina obilježenim s fikoeritriinom (PE) tijekom 30 min u ledu, u mraku (zbog osjetljivosti PE na svjetlo). Nakon inkubacije stanice su ponovno isprane tri puta hladnim PBS $\Delta$ . Nakon zadnjeg ispiranja stanice su resuspendirane u 350  $\mu\text{L}$  0,1% PBS $\Delta$ -BSA kako bi se spriječilo nakupljanje stanica i stavljene u led do analize protočnim citometrom.

**Tablica 17. Koncentracije primarnih i sekundarnih protutijela korištenih u određivanju ekspresije proteina protočnom citometrijom.**

PROTUTIJELO	KONAČNA KONCENTRACIJA
Izotipska kontrola (IgG)(0,5 mg/mL)	50 $\mu\text{g/mL}$
Podjedinica integrina $\alpha_v$ (1 mg/mL)	10 ng/mL
Integrin $\alpha_v\beta_3$ (0,1 mg/mL; 1 mg/mL)	10 ng/mL
Integrin $\alpha_v\beta_5$ (1 mg/mL)	10 ng/mL
Sekundarno protutijelo (0,5 mg/mL)	28 ng/mL

Stanice u protočnom citometru prolaze kroz lasersku zraku pri čemu dolazi do emisije fotona određene valne duljine, a signal se bilježi detektorom. Ekscitacijska valna duljina za PE iznosi 488 nm, a emisijska valna duljina 578 nm.

### 3.2.4. Analiza DNA i RNA

#### 3.2.4.1. Izdvajanje genomske DNA iz kulture stanica

Za izdvajanje ukupne DNA iz  $3 \times 10^6$  stanica korišten je komplet "DNeasy Blood & Tissue Kit" (Qiagen, Njemačka), te je postupak proveden prema uputama proizvođača. Koncentracija DNA je mjerena pomoću nanodropa NanoVue (GE Healthcare, UK). Dobivena DNA korištena je za utvrđivanje porijekla stanica Cal27 u Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH i u Southern-Western analizi za otkrivanje dimera gvanina, opisanoj u poglavlju 3.2.4.4.

#### 3.2.4.2. Izdvajanje ukupne RNA iz kulture stanica

Za izdvajanje ukupne RNA iz  $1 \times 10^6$  stanica korišten je komplet "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche, Njemačka) prema uputama proizvođača. Koncentracija RNA mjerena



je spektrofotometrijski i računata prema formuli  $[RNA]\mu\text{g/mL} = A_{260} \times 44,19 \times R$  ( $A_{260}$ =apsorbancija pri valnoj duljini 260 nm, 44,19=ekstincijski koeficijent RNA, R=razrijeđenje uzorka u  $\text{diH}_2\text{O}$ ).

### 3.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (*real-time* RT-PCR)

Za analizu ekspresije gena korištena je semikvantitativna metoda lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) i lančana reakcije polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (*real-time* RT-PCR). U oba slučaja kao početni uzorak korištena je komplementarna DNA (cDNA) dobivena obrnutim prepisivanjem (engl. *reverse transcription*, RT) izdvojene ukupne RNA.

Za obrnuto prepisivanje ukupne RNA iz kulture stanica korišten je komplet "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas, Litva), te je postupak proveden prema uputama proizvođača. Sastav reakcijske smjese u semikvantitativnoj reakciji PCR prikazan je u tablici 18., a uvjeti reakcije PCR, ovisno o tipu početnica i duljini traženog odsječka, odnosno ispitivane mRNA, u tablici 19. Nakon reakcije PCR uzorci su analizirani elektroforezom u agaroznom gelu (1%) koji sadrži etidij bromid, vizualizirani i slikani izlaganjem UV svjetlu.

Tablica 18. Koncentracije komponenata reakcijske smjese PCR.

REAGENSI – RADNA OTOPINA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )
$\text{diH}_2\text{O}$		3,44
Taq pufer sa dodatkom $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10x)	1x	1,6
dNTP (100 mM)	1 mM	0,16
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	3 mM	1,92
Početnica 1 (x)	100-500 nM	0,4
Početnica 2 (x)	100-500 nM	0,4
Kalup DNA (25 ng/ $\mu\text{L}$ )	x	8
Taq DNA-polimeraza (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,025 U/ $\mu\text{L}$	0,08
Ukupni volumen:		16

Tablica 19. Uvjeti reakcije PCR i duljine umnoženih odsječaka DNA u reakciji PCR.

UVJETI REAKCIJE PCR					
mRNA	DENATURACIJA	SPARIVANJE POČETNICA	PRODULJIVANJE LANCA DNA	BROJ CIKLUSA	DULJINA ODSJEČKA (pb)
Podjedinica integrina $\beta_3$	95°C, 30 s	59°C, 30 s	72°C, 45 s	32	232
$\beta$ -aktin	95°C, 45 s	55°C, 30 s	72°C, 45 s	22	661

\*Početna denaturacija DNA za sve uzorke provedena je pri 95°C, 2,5 min, a završno produljivanje lanca pri 72°C, 7 min.

Količine produkata reakcije RT-PCR određene su analizom digitalnih slika pomoću programa ImageQuant TL, nakon čega su rezultati normalizirani prema ekspresiji nekoliko jednoliko eksprimiranih (engl. *housekeeping*) gena.

Vežanje fluorescencijske boje (SYBR Green I) na produkte i analiza njihovog nastajanja metoda je umnažanja cDNA ili DNA tehnikom *real-time* PCR, pri čemu se očitava broj ciklusa (CT, engl. *threshold cycle*) u kojem emisija fluorescencije (količina umnoženog produkta) prijeđe postavljeni prag (iznad nespecifičnog signala). Sastav reakcijske smjese *real-time* PCR prikazan je u tablici 20, a uvjeti reakcije u tablici 21., a za svaki set početnica istovremeno su rađena 3 paralelna uzorka. Analiza produkta *real-time* PCR može biti relativna (mjere se relativne promjene u količini transkripta) i apsolutna (određuje se broj kopija RNA u nekom uzorku uspoređujući fluorescenciju sa standardnom krivuljom).

Tablica 20. Koncentracije komponenata reakcijske smjese *real-time* PCR.

REAGENSI – RADNA OTOPINA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN ( $\mu$ L)
diH <sub>2</sub> O		5,68
Sensimix Sybr HI-RO (2x)	1x	10
Početnica 1 (x)	0,5 nM	1,66
Početnica 2 (x)	0,5 nM	1,66
cDNA (20 ng/ $\mu$ L)	2 ng/ $\mu$ L	1,0
Ukupni volumen:		20

Tablica 21. Uvjeti reakcije *real-time* PCR

DENATURACIJA	SPARIVANJE POČETNICA	PRODULJIVANJE LANCA DNA	BROJ CIKLUSA
95°C, 15 s	55 ili 57°C, 15 s	72°C, 17 s	44

#### 3.2.4.4. Southern-Western analiza za otkrivanje dimera gvanina

Po 1 µg izdvojene DNA iz svake stanične linije modela Cal27 razrijeđeno je u 200 µL TE pufera, zagrijano pri 95°C tijekom 10 minuta i zatim odmah stavljeno u led. Na uzorke je zatim dodano 200 µL 2 M amonijevog acetate prethodno ohlađenog na -20°C. Aparatura za kapljičnu analizu složena je prema uputama proizvođača, s tim da je membrana prethodno namočena u 2 M amonijev acetat. U jažice je dodano 200 µL pripremljenih uzoraka i pomoću vakuuma spuštено na membranu, koja je zatim ispirana redom u 2 M amonijevom acetatu, vodi i 5x SSC-u. Tako pripremljena membrana je zatim sušena 2 sata pri 80 °C, blokirana s 5% mlijekom u 1x SSC-u tijekom noći i inkubirana Pt-(GpG) protutijelom (Liedert i sur. 2006) pri sobnoj temperaturi tijekom 1,5-2 sata. Nakon ispiranja (5 puta po 5 minuta) membrana je inkubirana s odgovarajućim sekundarnim protutijelom obilježenim peroksidazom u trajanju od 1,5-2 sata. Nakon temeljitog ispiranja, vezanje protutijela obilježenih peroksidazom, odnosno prisutnost DNA adukata, utvrđena je kemiluminiscencijom. Uspješnost nanošenja uzoraka na membranu potvrđena je bojanjem membrane bojom metilensko modriilo.

#### 3.2.5. Analiza proteina

##### 3.2.5.1. Određivanje koncentracije proteina kolorimetrijskom metodom po Bradford-u

Mjerenje koncentracije proteina po Bradford metodi određuje se spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije vezane boje Coomasie briljant plavo (engl. *Coomasie Brilliant Blue*) na proteine u kiseloj otopini. Koncentracija proteina u uzorku određuje se iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama albumina iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA).

Lizati stanica su razrijeđeni u diH<sub>2</sub>O (10x, 5x i 2,5x), nanaseni u triplicatu po 10 µL u mikrotitarsku pločicu, a zatim je dodano 200 µL Bradford reagensa. Nakon kratkog miješanja na tresilici mjerena je apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 595 nm (StatFax 2100).

### 3.2.5.2. Određivanje koncentracije glutationa

Za određivanje koncentracije glutationa stanice su odvojene od podloge tripsinom i isprane s PBSΔ. Nakon ispiranja  $5 \times 10^6$  stanica resuspendirano je u 250  $\mu\text{L}$  lizirajućeg pufera i ostavljeno 30 minuta u ledu. Stanice su dodatno razorene ultrazvukom (Cole Palmer, SAD amplitude 40% tijekom 30 sekundi, i zatim centrifugirane pri  $1000 \times g$  15 minuta pri  $4^\circ\text{C}$ . Odvojen je supernatant i određena mu je koncentracija proteina kako je opisano u poglavlju 3.2.5.1.

U postupku određivanja koncentracije glutationa u uzorku, oksidirani oblik glutationa (GSSG) reducira se pomoću  $\beta$ -NADPH i glutation reduktaze u reducirani oblik (GSH). Glutation reducira Ellmanov reagens, a produkti reakcije apsorbiraju pri 412 nm.

Standardna krivulja pripremljena je razrjeđivanjem matične otopine glutationa s 0,01 M HCl : 20  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ . U mikroeprovete je stavljeno 0,7 mL svake od pripremljenih koncentracija glutationa, a kao slijepa proba umjesto glutationa stavljena je 0,7 mL 0,01 M HCl. Istovremeno su lizati stanica razrijeđeni u 0,01 M HCl (140, 70 i 46,7 puta) u mikroeprevetama u konačnom volumenu 0,7 mL. U mikroeprovete s uzorcima, standardnom krivuljom i slijepom probom dodano je 200  $\mu\text{L}$  3 mM Ellmanovog reagensa i promiješano na vibracijskoj miješalici, i konačno dodano je 2  $\mu\text{L}$  glutation reduktaze koncentracije 5 mg/mL i ponovno promiješano na vibracijskoj miješalici. Ukupan sadržaj mikroeprovete prenesen je u kivetu, dodano je 100  $\mu\text{L}$  2 mM  $\beta$ -NADPH, i dobro promiješano pipetiranjem odmah je stavljeno u spektrofotometar te se počinje mjeriti vrijeme reakcije. Apsorbancija je mjerena pri 412 nm nakon 15, 30, 45 i 60 sekundi. Prvo je mjerena apsorbancija slijepe probe, standardne krivulje i na kraju uzoraka u kojima određujemo količinu glutationa.

Iz linearnog dijela standardne krivulje očitana je vrijednost GSH za svaki određeni vremenski interval uzorka, i izračunata je prosječna vrijednost GSH za taj uzorak. Vrijednosti su normalizirane u odnosu na ukupne stanične proteine izmjerene metodom po Bradfordu i izražene u nmol GSH/mg proteina.

## 3.2.5.3. SDS-PAGE

Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pomoću natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dedecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) omogućuje razdvajanje proteina samo na temelju razlike u molekulskoj masi. Dodatkom anionskog detergenta SDS-a proteini se odmataju, postaju negativno nabijeni i putuju u električnom polju samo na temelju molekulske mase. Za usporedbu ekspresije proteina u stanicama modela Cal27 korištene su metode SDS-PAGE i Western blot. Uzorak za razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE dobiven je ispiranjem stanica prihvaćenih za podlogu s PBSΔ i direktnim dodatkom vrućeg (zagrijanog na 96°C) pufera za nanošenje uzoraka 1x SB (engl. *sample buffer*). Strugalicom su lizirane stanice odvojene od podloge i prenesene u mikroepuvete. Ovako pripremljeni uzorci su viskozni zbog prisutne DNA što se rješava izlaganjem ultrazvuku amplitude 40% tijekom 30 sekundi, te se potpuna denaturacija proteina postiže zagrijavanjem pri 96°C tijekom 5 min.

Tablica 22. Komponente korištenog diskontinuiranog gel sustava.

REAGENS (POČETNA KONCENTRACIJA)	5%-TNI GEL ZA SABIJANJE	10%-TNI GEL ZA RAZDVAJANJE	15%-TNI GEL ZA RAZDVAJANJE
	VOLUMEN (mL)		
deH <sub>2</sub> O	3,65	6,8	4,3
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	0,5	/	/
Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	/	3,0	3,0
SDS (10%)	0,05	0,15	0,15
APS (10%)	0,0175	0,050	0,05
akrilamid/bisakrilamid (30%)	0,8	5,05	7,5
TEMED (konc.)	0,005	0,0075	0,0075
Ukupni volumen:*	5,0225	15,0575	15,0075

\* volumen dovoljan za za izlivanje gela veličine 10 x 8 cm

Gelovi su pripremljeni u plastičnim epruvetama od 50 mL i izljevani u kalup za izlivanje gela. Prvo se polimerizira gel za razdvajanje, u kojem proteini putuju samo na temelju razlike u molekulskoj masi, a zatim se na njega nadslojava gel za sabijanje, koji omogućava koncentriranje uzorka (Tablica 22). Nakon izrade poliakrilamidnog gela proteini su razdvojeni u Tris-glicinskom puferu za elektroforezu (pH 8,3) pomoću sustava za vertikalnu elektroforezu Mighty Small II SE 250/SE 260 (Hoefer Scientific Instruments, SAD) pri konstantnom naponu od 80 V. Kao standard za određivanje molekulskih masa

razdvojenih proteina korišten je Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, Litva).

#### 3.2.5.4. Western blot

Razdvojeni proteini prenijeti su na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska) u Towbin puferu pomoću aparata za prijenos proteina u električnom polju Mighty Small Transphor (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska) pri konstantnoj struji od 400 mA u tijekom jednog sata. Kako bi potvrdili da je prijenos proteina bio uspješan i da je količina ukupnih proteina u svim uzorcima bila ujednačena, membrana je nakon prijenosa bojana otopinom Ponceau S, i zatim odbojana ispiranjem s puferom TBST. Slijedi blokiranje u 5% nemasnom mlijeku u TBST puferu tijekom jednog sata pri sobnoj temperaturi, čime su popunjena sva vezna mjesta na membrani na koje se nisu vezali proteini iz uzorka. Membrana je zatim isprana u TBST-u i inkubirana s primarnim protutijelom (Tablica 23) pri sobnoj temperaturi tijekom 1,5-2 sata. Nakon ispiranja (5 puta po 5 minuta) membrana je inkubirana s odgovarajućim sekundarnim protutijelom (Tablica 23) u trajanju od 1,5-2 sata. Nakon temeljitog ispiranja, vezanje protutijela obilježenih peroksidazom, odnosno prisutnost ispitivanog proteina, utvrđena je kemiluminiscencijom, inkubacijom membrane s "Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus" tijekom 1-2 minute i izlaganjem membrane fotografskom filmu.

Tablica 23. Razrjeđenja primarnih i sekundarnih protutijela korištenih u određivanju ekspresije proteina metodom Western blot.

PROTUTIJELO	RAZRJEĐENJE	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )*	MOLEKULARNA MASA (kDa)
pFAK (Y397)	1:1000	5	125
FAK	1:1000	5	125
pSrc (Y418)	1:1000	5	60
Src	1:1000	5	60
pILK (Thr-173)	1:1000	5	59
ILK1	1:1000	5	51
pERK	1:1000	5	42/44
ERK	1:1000	5	42/44
<b>Sekundarno protutijelo</b>	1:10000	0,5	

\*Protutijela su razrjeđivana u 5 mL 5% nemasnog mlijeka u TBST

Na istoj membrani moguće je napraviti imunodetekciju više različitih proteina. Kako bi se uklonila protutijela vezana u prvoj reakciji imunodetekcije, membrana je isprana i inkubirana 30 min u 100 mM glicinu (postupak poznat pod imenom engl. *stripping*). Membrana je zatim ponovo blokirana u 10% nemasnom mlijeku u TBST tijekom jednog sata pri sobnoj temperaturi, nakon čega se nastavlja postupak inkubacije s odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima (Tablica 23) i imunodetekcija kako je već prethodno opisano. Fotografski film je skeniran i analiziran pomoću programa ImageQuant TL, nakon čega su rezultati normalizirani prema ekspresiji jednoliko eksprimiranih (engl. *housekeeping*) proteina.

### 3.2.6. Određivanje adhezivnosti stanica na komponente izvanstaničnog matriksa (ECM)

Ova kolorimetrijska metoda u pločicama za uzgoj stanica s 96 bunarića obloženih komponentama ECM-a koristi se za ispitivanje promjena u adhezijskim svojstvima stanica, koje bi mogle upućivati na promjenu u ekspresiji integrina u stanicama. Kao supstrat korištene su komponente izvanstaničnog matriksa, vitronektin i fibronektin. Bunarići koji služe kao negativna kontrola ispunjeni su s 100  $\mu$ L otopine 1% PBS $\Delta$ -BSA, dok je u bunariće pločice s 96 bunarića u kojima se mjeri adhezivnost dodano 100  $\mu$ L otopine proteina izvanstaničnog matriksa (vitronektin, fibronektin) u koncentraciji 40  $\mu$ g/mL. Tako pripremljena pločica inkubirana je preko noći pri 4°C ili 2 sata u inkubatoru pri 37°C kako bi se proteini vezali za pločicu. Nakon inkubacije dodano je 200  $\mu$ L otopine 1% PBS $\Delta$ -BSA da bi se blokirale sve površine u bunariću na koje se nisu vezale komponente ECM-a. Nakon jednog sata, bunarići su isprani dva puta PBS-om i dodana je suspenzija stanica ( $4 \times 10^4$ ) u DMEM-u i ostavljena u inkubatoru 90 minuta. Nakon uklanjanja DMEM i ispiranja PBS $\Delta$  (2-3 puta), stanice prihvaćene za podlogu fiksirane su pomoću 4% paraformaldehida tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi, isprane 2 puta pomoću PBS $\Delta$  i bojane dodatkom 100  $\mu$ L 1% vodene otopine boje kristal ljubičastog tijekom jednog sata. Pločica je zatim isprana vodovodnom vodom i ostavljena 30 minuta u digestoru da se osuši, zatim je dodano 100  $\mu$ L 0,5%-tne otopine PBS $\Delta$ -Triton X-100, te je pločica stavljena na tresilicu kako bi se boja vezana na proteine u stanicama resuspendirala. Očitana je apsorbancija pri 600 nm spektrofotometrom za mikrotitarske pločice StatFax 2100. Razlika apsorbancija u bunariću

obloženom komponentom ECM-a i onom obloženom BSA predstavlja mjeru prihvatanja stanica na podlogu.

### 3.2.7. Određivanje pokretljivosti stanica

Za analizu pokretljivosti (migracije) stanica upotrebljen je sustav Boydenovih komorica, koji se sastoji od dva odjeljka razdvojena poroznom membranom. Za stanice Cal27 korištene su membrane čija je veličina pora 8  $\mu\text{m}$ .

U pločice s 6 bunarića nasađeno je  $7 \times 10^5$  stanica u 2 mL DMEM-FCS. Nakon 24 sata stanicama je uklonjena hranjiva podloga i zamjenjena hranjivom podlogom bez FCS, DMEM, te su stanice ostavljene u inkubatoru sljedećih 24 sata. Sutradan su stanice odvojene od podloge pomoću 1 mM EDTA, i u gornji odjeljak Boydenove komorice je dodano 500  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica ( $4 \times 10^5$ ) u 1% DMEM-BSA. U pločicu s 24 bunarića u koju se stavljaju Boydenove komorice dodan je DMEM-FCS, koji služi kao kemoatraktant. Nakon 24 sata, membrane komorica su isprane s PBS $\Delta$ , vatenim štapićem su uklonjene stanice koje nisu migrirale (gornja strana membrane). Stanice koje su migrirale, a nalaze se prihvaćene s donje strane membrane su fiksirane u 4% paraformaldehidu tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi, isprane 2 puta s PBS $\Delta$  i bojane uranjanjem u 1% vodenu otopinu boje kristal ljubičastog tijekom jednog sata. Višak boje je uklonjen ispiranjem vodovodnom vodom, skalpelom su izrezane membrane komorica i stavljene na predmetna stakalca u kapljicu podloge za uklapanje i slikane pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 20 puta. Za svaki uzorak snimljeno je 5 vidnih polja, a slike su analizirane programom ImageJ, koji mjeri površinu obojanu bojom kristal ljubičasto.

### 3.2.8. Utišavanje gena transfekcijom siRNA

Kako bismo utišali ekspresiju gena za podjedinice integrina, Src i ILK, stanice smo transficirali malim interferirajućim molekulama RNA (engl. *small interfering RNA*, *siRNA*) specifičnim za svaki pojedini gen. Transfekciju smo izvršili pomoću komercijalno dostupnih liposoma (Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX, Invitrogen, SAD).

Dan nakon što su stanice nasađene u Petrijeve zdjelice promjera 3,5 cm tako da popunjenost površine bude oko 50%, transficirane su gen specifičnom siRNA i kontrolnom siRNA pomoću Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX reagensa prema uputama proizvođača. Za



pokuse u Petrijevoj zdjelici promjera 3,5 cm utvrđena optimalna količina lipofektamina iznosi 3  $\mu\text{L}$ , dok su se koncentracije siRNA razlikovale. Tako je za utišavanje podjedinice integrina  $\alpha_v$  i  $\beta_5$  te Src korištena specifična siRNA koncentracije 50 nM, dok je za utišavanje ILK korištena specifična siRNA koncentracije 40 nM. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanice su odvojene od podloge tripsinom i upotrebljene u daljnjim eksperimentima.

### 3.2.9. Imunofluorescencija

Za određivanje smještaja proteina u stanici korištena je metoda imunofluorescencije u kojoj se primarno protutijelo specifično veže na neki protein u stanicama uzorka. Prema tome radi li se o proteinu eksprimiranom na površini stanice ili proteinima koji se nalaze unutar stanice, stanice u uzorku su fiksirane i dodatno permeabilizirane prije dodatka primarnog protutijela. Vežanje primarnog protutijela otkriva se sekundarnim protutijelom obilježenim fluorescentnom bojom. U ovom su istraživanju korištene fluorescentne boje Alexa fluor 555 i Alexa fluor 488, koje imaju ekscitacijsku valnu duljinu 555 i 495 nm, a emisijsku valnu duljinu 565 i 519 nm.

U bunariće pločice za uzgoj stanica s 24 bunarića stavljeno je po jedno pokrovno stakalce koje je prethodno sterilizirano kratkotrajnim uranjanjem u 96% etanol i izlaganjem UV svjetlu u kabinetu za sterilni rad tijekom 30 minuta. Na svako stakalce nasađeno je  $5 \times 10^4$  stanica u volumenu od 500  $\mu\text{L}$  DMEM-FCS i ostavljeno da raste 24 sata. Potom su stakalca s izraslim stanicama izvađena iz bunarića i isprana dva puta s 100  $\mu\text{L}$  PBS $\Delta$ . Ovo ispiranje i svi daljni postupci izvedeni su pri sobnoj temperaturi. Stanice su fiksirane dodatkom 80  $\mu\text{L}$  2% paraformaldehida u PBS $\Delta$  na stakalca tijekom 12 minuta ili 80  $\mu\text{L}$  metanola prethodno ohlađenog na  $-20^\circ\text{C}$  tijekom 3 minute. Nakon uklanjanja fiksativa stanice su isprane dva puta s PBS $\Delta$  i permeabilizirane dodavanjem 80  $\mu\text{L}$  PBS $\Delta$ -0,1% Triton X-100 tijekom 2 minute, nakon čega su stanice ponovo isprane 2 puta s PBS $\Delta$ . Kako bi se smanjilo nespecifično vežanje protutijela u stanicama, stanice su blokirane tijekom 30 minuta dodatkom 80  $\mu\text{L}$  PBS $\Delta$ -3% BSA po stakalcu. Potom je na stanice dodano 80  $\mu\text{L}$  primarnog protutijela i inkubirano 60 minuta, isprano dva puta s PBS $\Delta$ , zatim je dodano 80  $\mu\text{L}$  sekundarnog protutijela i inkubirano 60 minuta u mraku, te su stanice na kraju isprane s PBS $\Delta$  dva puta. Primarna i sekundarna protutijela s razrjeđenjima navedena su u tablici 24.

Prema potrebi, stanice su dodatno obrađene u cilju bojanja jezgre (dodaje se 80  $\mu$ L otopine TO-PRO-3) ili aktina (80  $\mu$ L otopine faloidina) tijekom 20 minuta. Nakon još jednog ispiranja, stanice su uklopljene u podlogu za uklapanje na predmetno stakalce. Uzorci su analizirani i fotografirani pomoću konfokalnog mikroskopa LeicaTSCSP2.

Tablica 24. Primarna i sekundarna protutijela i spojevi korišteni u fluorescencijskoj mikroskopiji.

	PROTUTIJELO/SPOJ	RAZRJEĐENJE U 5% PBSΔ-BSA
PRIMARNA PROTUTIJELO	pSrc (Y418)	1:100
	Src	1:200
SEKUNDARNO PROTUTIJELO	Alexa-Fluor 555 (anti zec)	1:1000
	Phalloidin-FITC	1:200
	TO-PRO®-3 iodide	1:1000

### 3.2.10. Statistička obrada podataka

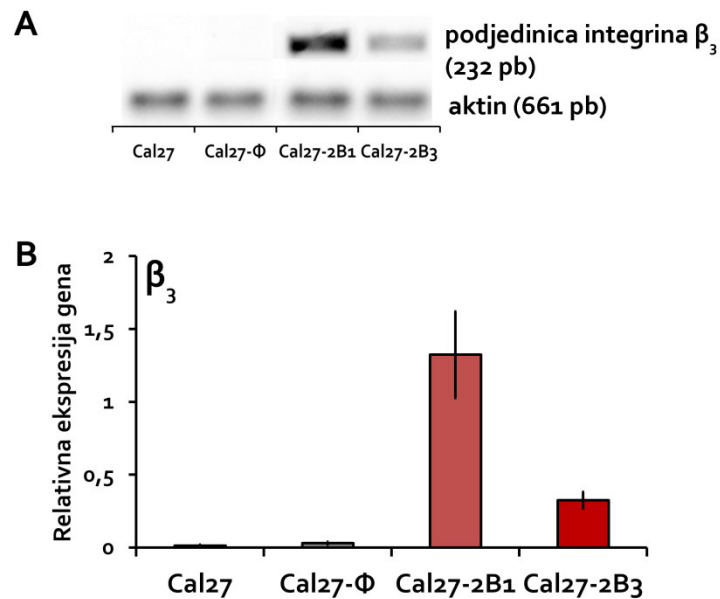
Svi dobiveni rezultati analizirani su Student t-testom i prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 4. REZULTATI

#### 4.1. Stanice Cal27 stabilno transficirane genom za podjedinicu integrina $\beta_3$ ekspimiraju integrin $\alpha_v\beta_3$ , povećanu ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_5$ te povećanu ekspresiju podjedinice integrina $\alpha_v$

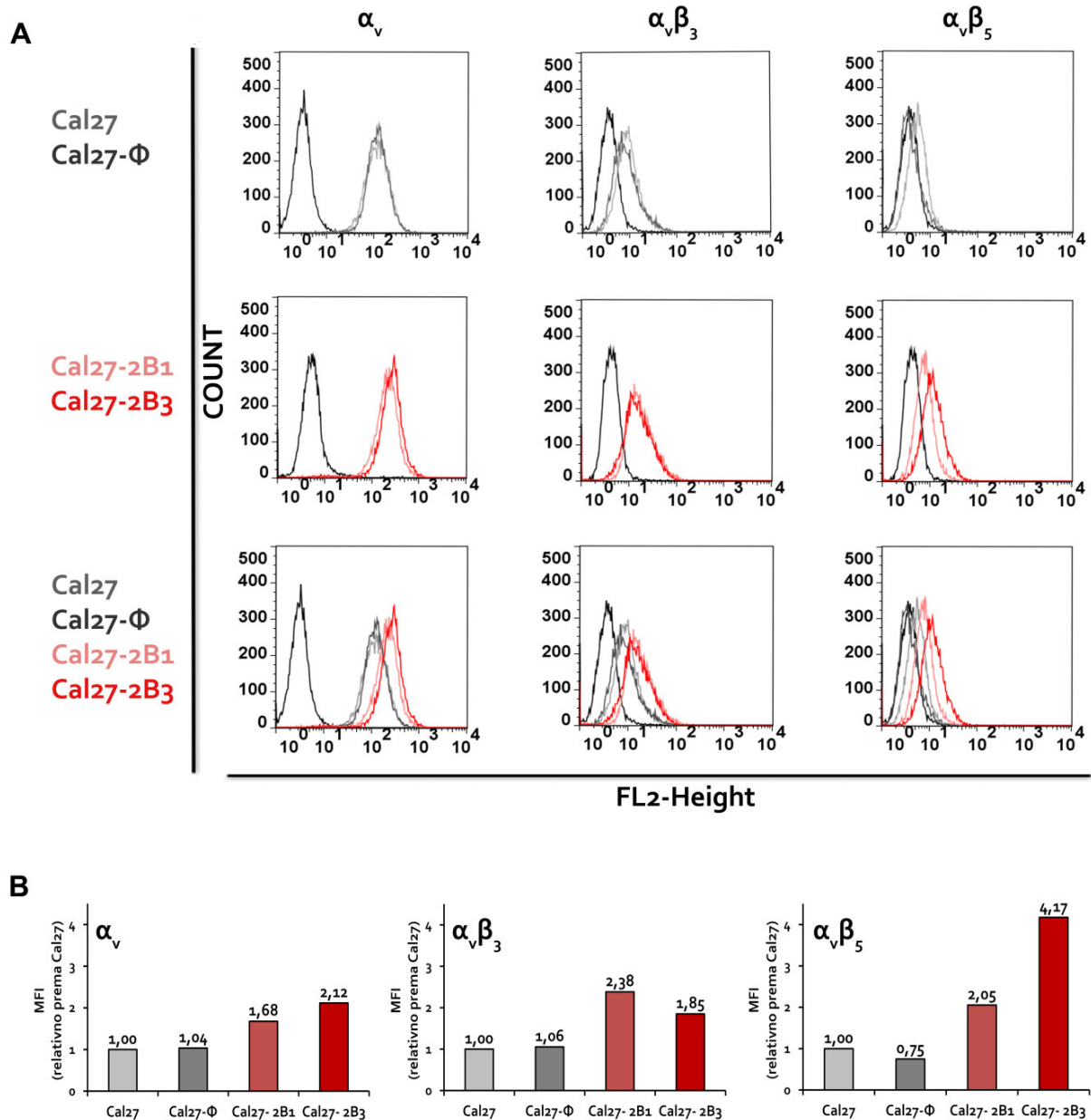
Rezultati laboratorija u kojem je izrađen ovaj doktorski rad, opisani u radu Brozović i suradnici (2008) pokazali su da ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  u stanicama karcinoma grkljana čovjeka HEP2 osigurava otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C mehanizmom ovisnim o glutationu, koji omogućava povećano otklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) nakon izlaganja protutumorskom lijeku. Kako bi istražili utječe li ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  na otpornost stanica karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka Cal27 (koje ne ekspimiraju integrin  $\alpha_v\beta_3$ , ovaj rad) na različite protutumorske lijekove, u diplomskom su radu Stojanović (2009) ove stanice transficirane plazmidom koji sadrži gen za  $\beta_3$  podjedinicu integrina pod promotorom CMV (engl. *human cytomegalovirus immediate-early enhancer and promoter*), te su izdvojena dva stabilno transficirana klonova, Cal27-2B1 i Cal27-2B3, koji ekspimiraju integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Podjedinica integrina  $\beta_3$  može se vezati na podjedinice  $\alpha_{IIb}$  ili  $\alpha_v$ , no kako je integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ekspimiran samo na trombocitima, pretpostavljamo da transfekcijom gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$  i vezanjem ekspimirane podjedinice integrina  $\beta_3$  na slobodnu količinu podjedinice  $\alpha_v$  u stanici, može doći do *de novo* ekspresije samo integrina  $\alpha_v\beta_3$ . U svim dalje opisanim eksperimentima, bit će uspoređene karakteristike stanica Cal27, kontrolnog klonova Cal27- $\Phi$  (stanice Cal27 transficirane plazmidom koji ne sadrži gen za integrin  $\beta_3$ ) s karakteristikama integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 (zajedno čine „model Cal27“).

Ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  u stanicama modela Cal27 određena je metodom RT-PCR i *real-time* RT-PCR s početnicama specifičnim za podjedinicu integrina  $\beta_3$ , te metodom protočne citometrije uz pomoć protutijela specifičnog za integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Na slici 11 prikazani su rezultati mjerenja razine ekspresije mRNA specifične za podjedinicu integrina  $\beta_3$  u stanicama modela Cal27 metodom RT-PCR (Slika 11.A) i *real-time* RT-PCR (Slika 11.B), koji jasno pokazuju da u stanicama Cal27 i kontrolnom klonu Cal27- $\Phi$  nema ekspresije podjedinice integrina  $\beta_3$ , dok je ekspresija u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 prisutna, pri čemu je veća u klonu Cal27-2B1.



**Slika 11. (A) Razina ekspresije gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$  u stanicama modela Cal27 dobivena reakcijom RT-PCR.** Reakcija RT je provedena sa jednakim količinama izdvojene ukupne RNA iz stanica, te je dobivena cDNA poslužila kao kalup u reakciji PCR. Produkt reakcije PCR vizualiziran je na agaroznom gelu s EtBr. **(B) Razina ekspresije gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$  u stanicama modela Cal27 dobivena reakcijom *real-time* RT-PCR.** Reakcija RT je provedena sa jednakim količinama izdvojene ukupne RNA iz stanica, te je dobivena cDNA poslužila kao kalup u reakciji *real-time* PCR. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (GAPDH, ACTB i HPRT<sub>1</sub>). Prikazan je jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Na slici 12.A. prikazani su histogrami ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  i izotipske kontrole u stanicama modela Cal27. Relativne vrijednosti MFI (engl. *mean fluorescence intensity*) (Slika 12.B) pokazuju da je u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 došlo do povećanja ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Stanice Cal27 prikazane su s vrijednošću 1, iako iz rezultata dobivenog mjerenjem ekspresije  $\beta_3$ -specifičnih transkripata RT-PCR i *real-time* RT-PCR-om (Slika 11.A i B) znamo da stanice Cal27 na svojoj površini ne eksprimiraju integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Izmjerena vrijednost signala prikazana vrijednošću 1 rezultat je reakcije nespecifičnog vezanja primarnog i sekundarnog protutijela, te specifičnog vezanja sekundarnog protutijela na nespecifično vezanje primarnog (pozadinski signal reakcije).

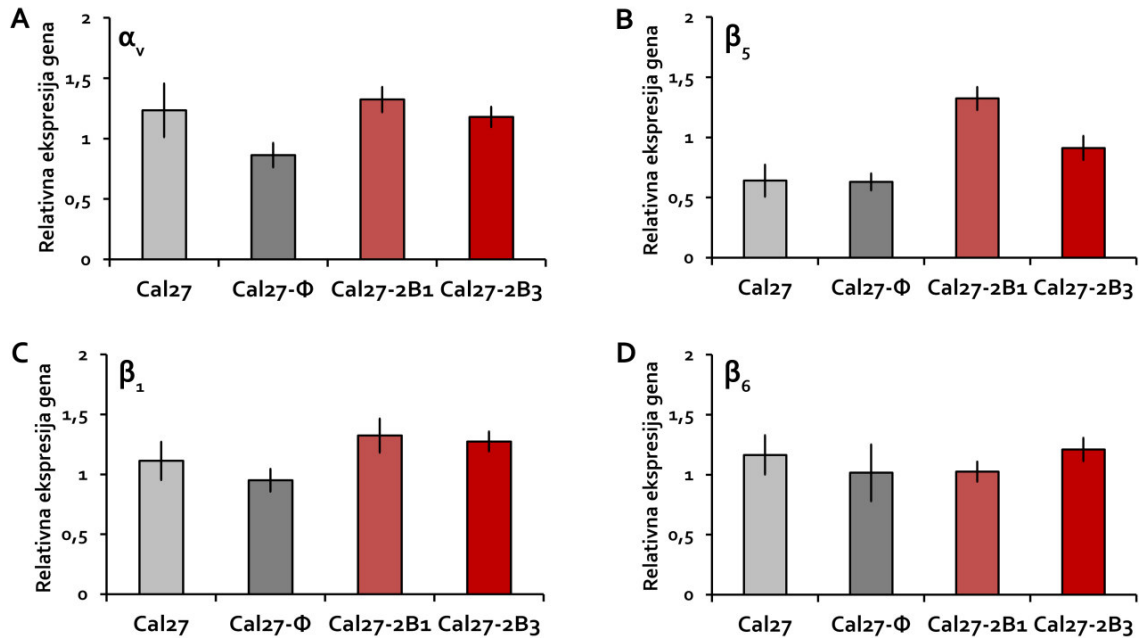


**Slika 12. Ekspresija podjedinice integrina  $\alpha_v$  i heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  u stanicama modela Cal27.** Stanice su obilježene protutijelima specifičnim za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  i heterodimere integrina  $\alpha_v\beta_3$  ili  $\alpha_v\beta_5$  te sekundarnim, fluorescentno obilježenim zečjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina, a ekspresija je određena mjerenjem fluorescencije protočnim citometrom. (A) Histogrami izmjerene fluorescencije za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  i heterodimere integrina  $\alpha_v\beta_3$  ili  $\alpha_v\beta_5$  uz histograme dobivene mjerenjem fluorescencije izotipske kontrole. Crne krivulje (lijevo) prikazuju fluorescenciju izotipske kontrole, sive krivulje (desno) prikazuju fluorescenciju specifičnu za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  i heterodimere integrina  $\alpha_v\beta_3$  ili  $\alpha_v\beta_5$  u stanicama Cal27 (svijetlo siva krivulja) i kontrolnim Cal27 stanicama transficiranim praznim plazmidom Cal27- $\Phi$  (tamno siva krivulja). Crvene krivulje (desno) prikazuju fluorescenciju specifičnu za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  i heterodimere integrina  $\alpha_v\beta_3$  ili  $\alpha_v\beta_5$  u stanicama transficiranim plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina  $\beta_3$ . Cal27-2B1 (svijetlo crvena krivulja) i Cal27-2B3 (tamno crvena krivulja). Zbog istog položaja histograma izotipskih kontrola svih stanica modela Cal27, kod prikazivanja koristi se samo jedan. (B) Relativne MFI vrijednosti prema stanicama Cal27 za ekspresiju podjedinice integrina  $\alpha_v$  i heterodimere integrina  $\alpha_v\beta_3$  ili  $\alpha_v\beta_5$ . Prikazan je jedan od pet pokusa sa sličnim rezultatima.

Ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 posljedica je ekspresije podjedinice integrina  $\beta_3$  unesene stabilnom transfekcijom, koja se veže sa slobodnom podjedinicom  $\alpha_v$  u stanicama. Zanimalo nas je u kojoj je mjeri transfekcija podjedinicom  $\beta_3$  utjecala na ekspresiju heterodimera integrina koji također sadrže podjedinicu  $\alpha_v$  na površini stanice; a to su prvenstveno integrini  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  i  $\alpha_v\beta_6$ . Nismo uzimali u obzir integrin  $\alpha_v\beta_8$  budući da je ekspresija podjedinice integrina  $\beta_8$ , koja se veže samo na podjedinicu integrina  $\alpha_v$  kako bi tvorili integrin  $\alpha_v\beta_8$ , pronađena u stanicama mozga, jajnika, maternice, bubrega, placente, pluća, očnog kapka i slezene (Cambier i sur. 2000; Zhang i sur. 2010). Također nismo mogli mjeriti ekspresiju heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_1$  budući da protutijela usmjerena protiv heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_1$  još uvijek ne postoje. Mjerali smo ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_5$  protutijelom koje prepoznaje heterodimer integrina  $\alpha_v\beta_5$ , te ukupnu ekspresiju podjedinice integrina  $\alpha_v$  specifičnim protutijelom koje prepoznaje podjedinicu integrina  $\alpha_v$  (Slika 12.A). Usporedba MFI vrijednosti pokazuje da je u stanicama transficiranim genom za podjedinicu integrina  $\beta_3$  došlo do povećanja ekspresije ukupne podjedinice integrina  $\alpha_v$ , 1,68 puta u Cal27-2B1, odnosno 2,12 puta u Cal27-2B3, u odnosu na stanice Cal27 (Slika 12.B). Također, relativne vrijednosti MFI pokazuju da je ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  u stabilnim transfektantima s *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  povećana u odnosu na stanice Cal27, 2,05 puta za Cal27-2B1 i 4,17 puta za Cal27-2B3 (Slika 12.B).

Na temelju dobivenih rezultata pretpostavili smo da je u oba integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirana klona došlo do poticanja ekspresije podjedinica integrina  $\alpha_v$  i/ili  $\beta_5$  što je dovelo do ukupnog povećanja ekspresije heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Kako bi provjerili ovu hipotezu mjerili smo ekspresiju mRNA specifičnih za podjedinice integrina  $\alpha_v$  i  $\beta_5$  metodom *real-time* RT-PCR koristeći specifične početnice. Rezultati prikazani na slici 13. pokazuju da je ekspresija podjedinice integrina  $\beta_5$  povećana u oba integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirana klona Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u usporedbi s stanicama Cal27 i kontrolnim klonom Cal27- $\Phi$  (Slika 13.B), dok promjene u ekspresiji podjedinice integrina  $\alpha_v$  nisu bile statistički značajne između stanica modela Cal27 (Slika 13.A). Metodom *real-time* RT-PCR koristeći specifične početnice za podjedinice integrina  $\beta_1$  i  $\beta_6$  izmjerili smo razinu ekspresije odgovarajućih mRNA, te pokazali da transfekcija  $\beta_3$  podjedinice nije dovela do promjene u ekspresiji mRNA podjedinica integrina  $\beta_1$  i  $\beta_6$  (Slika 13.C i D). Iako se na temelju mjerenja razine mRNA ne može zaključiti o razini ekspresije heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_1$  i  $\alpha_v\beta_6$  na površini stanice, u daljnjim pokusima bit će pokazano da ako je i došlo do promjene ekspresije ovih

heterodimera njihov utjecaj na osjetljivost stanica na protutumorske lijekove je vrlo slab ili nepostojeći, budući da integrin  $\alpha_v\beta_3$  u tom fenomenu ima presudnu ulogu (ovaj rad).



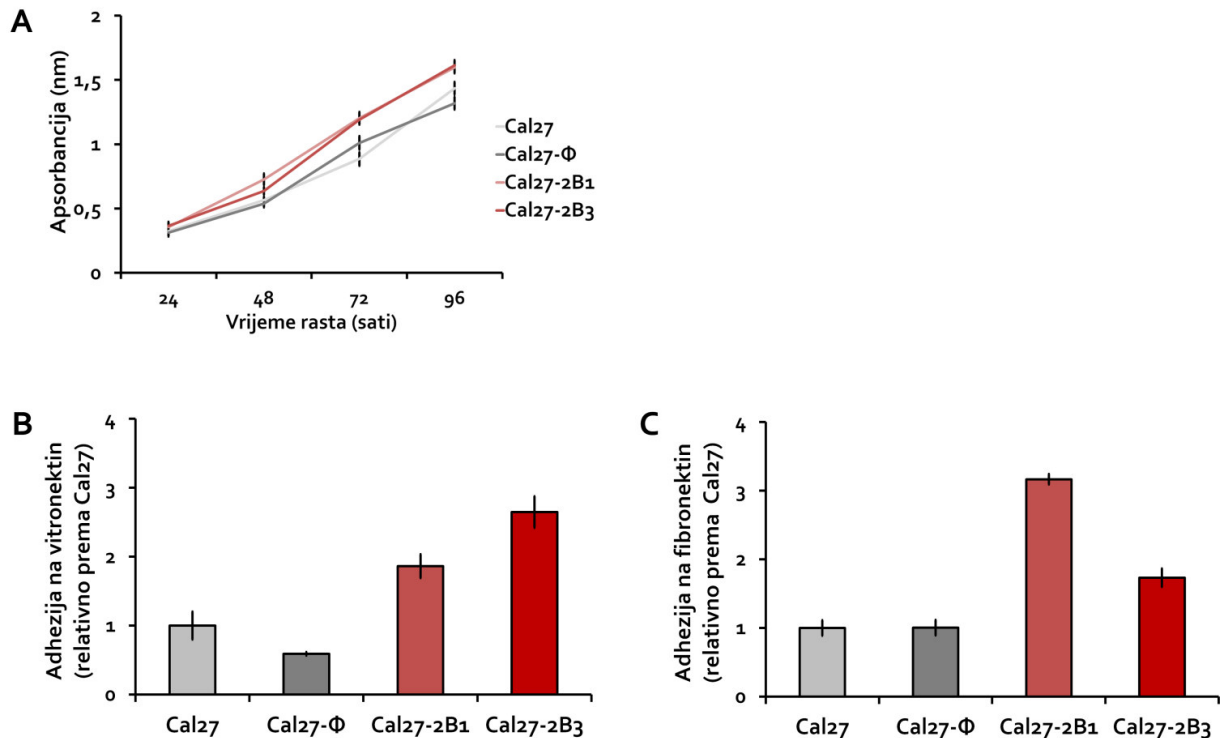
**Slika 13.** Razina ekspresije gena za podjedinice integrina (A)  $\alpha_v$ , (B)  $\beta_5$ , (C)  $\beta_1$  i (D)  $\beta_6$  u stanicama modela Cal27 dobivena reakcijom *real-time* RT-PCR. Reakcija RT je provedena s jednakim količinama izdvojene ukupne RNA iz stanica, te je dobivena cDNA poslužila kao kalup u reakciji *real-time* PCR. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (GAPDH, ACTB i HPRT1). Prikazan je jedan od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

#### 4.2. Integrin $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju jednaku brzinu proliferacije kao i kontrolni klon Cal27- $\Phi$ i stanice Cal27, te povećanu adheziju na vitronektin i fibronektin

U literaturi je pokazano da promjena ekspresije heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  može mijenjati brzinu proliferacije (Maubant i sur. 2002; Zhou i sur. 2004; Desgrosellier i Cheresh 2010). Kako bi pokazali je li integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju razliku u brzini proliferacije u odnosu na stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$ , mjeren je broj stanica MTT testom tijekom 96 sati. Rezultati pokazuju da ne postoji razlika u vremenu duplikacije između stanica modela Cal27. Iz krivulje rasta prikazane na slici 14.A. vidi se da su sve krivulje paralelne, što ukazuje na jednako vrijeme duplikacije svih stanica modela Cal27. Međutim, krivulje rasta stanica Cal27 i kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  grupiraju se



i niže su u odnosu na krivulje rasta klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3. Razlog za ovaj učinak mogla bi biti promjena u sposobnosti stanica da se vežu za podlogu zbog promijenjenog repertoara adhezijskih molekula (u ovom slučaju integrina) na površini stanica.



**Slika 14. (A) Krivulja rasta stanica modela Cal27.** Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića i svakih 24 sata broj stanica je određen MTT testom. Sivim nijansama prikazane su krivulje rasta stanica Cal27 i kontrolnog klona Cal27-Φ, dok su crvenim nijansama prikazane krivulje rasta integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima. **(B, C) Adhezija stanica modela Cal27.** Kvantifikacija relativne adhezije integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3, kontrolnog klona Cal27-Φ prema stanicama Cal27 na (B) vitronektin i (C) fibronektin. Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, prethodno obloženu vitronektinom ili fibronektinom. Nakon 90 minuta stanice koje su adherirale su isprane, fiksirane i obojane bojom kristal ljubičasto. ApSORBANCija se očitava spektrofotometrom StatFax 2100, a rezultati statistički obrade. Prikazani su reprezentativni pokusi od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  na površini stanice nužno vodi prema povećanoj sposobnosti stanica da se vežu na komponente izvanstaničnog matriksa (Hynes 1992; Majhen i sur. 2011). Kako bi pokazali da je to uistinu tako mjerili smo adheziju stanica na podlogu prethodno obloženu vitronektinom ili fibronektinom, komponentama izvanstaničnog matriksa za koje je poznato da vežu integrin  $\alpha_v\beta_5$  (vitronektin) (Memmo i McKeown-Longo 1998) i  $\alpha_v\beta_3$  (vitronektin i fibronektin) (Plow i sur. 2000; Takada i sur. 2007).

Na slici 14.B prikazani su rezultati adhezije na vitronektin koji pokazuju da povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  u oba integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirana klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 povećava adheziju, i to za 1,86 puta (Cal27-2B1) odnosno 2,65 puta (Cal27-2B3) u odnosu na stanice Cal27. S obzirom da se oba integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  vežu na vitronektin, rezultat adhezije korelira s povećanjem integrina  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  te ukupnom količinom podjedinice integrina  $\alpha_v$  mjerenom protočnom citometrijom (Slika 12.B). Adhezija na vitronektin kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  nešto je niža, ali ne značajno od adhezije stanica Cal27.

Fibronektin je komponenta izvanstaničnog matriksa na koju se veže integrin  $\alpha_v\beta_3$ , ali ne i na integrin  $\alpha_v\beta_5$  (Hynes 1992), pa je za očekivati da je adhezija u korelaciji s ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  na površini stanica (Slika 12.B). To je i vidljivo iz dobivenih rezultata (Slika 14.C) koji pokazuju 3,17 puta povećanu adheziju klona Cal27-2B1 te 1,73 puta povećanu adheziju klona Cal27-2B3, u odnosu na stanice Cal27. Adhezija na fibronektin kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  ne razlikuje se od adhezije stanica Cal27.

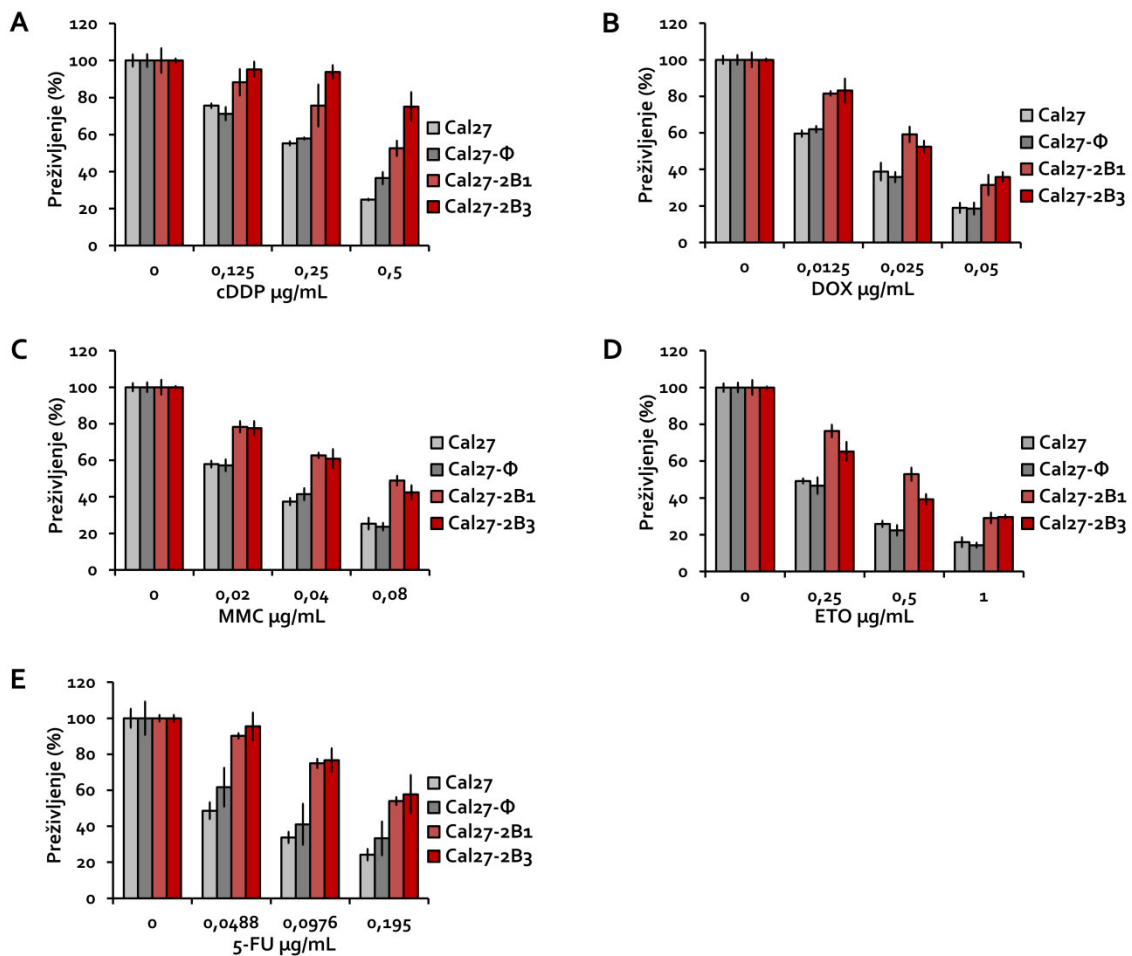
### 4.3. Integrin $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju povećanu otpornost na protutumorske lijekove koji djeluju na molekulu DNA u odnosu na stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$

U diplomskom radu Stojanović (2009) pokazano je da integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C u usporedbi s stanicama Cal27. U daljnjim pokusima opisanim u ovom doktorskom radu kao dodatna kontrola uveden je kontrolni klon Cal27- $\Phi$  transficiran kontrolnim plazmidom bez gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$  i ponovljeni su pokusi pokazali da osjetljivost na protutumorske lijekove cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C tog klona odgovara stanicama Cal27 (Slika 15.A; B; C).

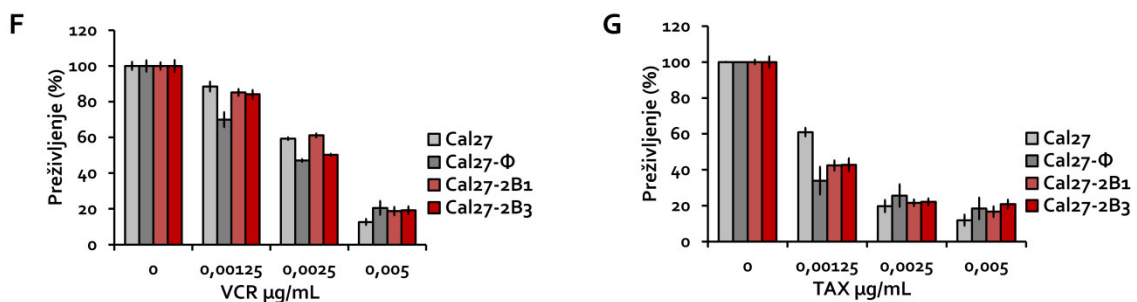
Kako bi istražili utjecaj transfekcije stanica Cal27 podjedinicom integrina  $\beta_3$  na osjetljivost na druge protutumorske lijekove, stanice modela Cal27 podvrgnute su djelovanju različitih protutumorskih lijekova, a učinak je praćen MTT testom. Istražena je osjetljivost na protutumorske lijekova različitog mehanizma djelovanja koji imaju široku primjenu u liječenju različitih vrsta tumora. Rezultati prikazani na slici 15. pokazuju da su

integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 otporniji u usporedbi s stanicama Cal27 i kontrolnim klonom Cal27- $\Phi$  na djelovanje cisplatine (Slika 15.A), doksorubicina (Slika 15.B), mitomicina C (Slika 15.C), etopozida (Slika 15.D) i 5-fluorouracila (Slika 15.E), protutumorskih lijekova koji svojim mehanizmima na izravan ili neizravan način utječu na DNA stanice. Na grafovima se jasno vidi grupiranje rezultata osjetljivosti stanica Cal27 i kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  u odnosu na integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirane klonove Cal27-2B1 i Cal27-2B3. Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 otporniji su na djelovanje navedenih protutumorskih lijekova između 1,5 do 2 puta, pri čemu je najveća razlika od 2 puta vidljiva kod izlaganja stanica etopozidu i 5-fluorouracilu. Osim toga istražena je i osjetljivost stanica na protutumorske lijekove čiji je mehanizam djelovanja vezan uz organizaciju mikrotubula vinkristin (Slika 15.G) i paklitaksel (Slika 15.H). Rezultati dobiveni MTT testom pokazuju nepromijenjenu osjetljivost stanica modela Cal27 ove protutumorske lijekove.

### Protutumorski lijekovi za koje je zabilježena pojava otpornosti



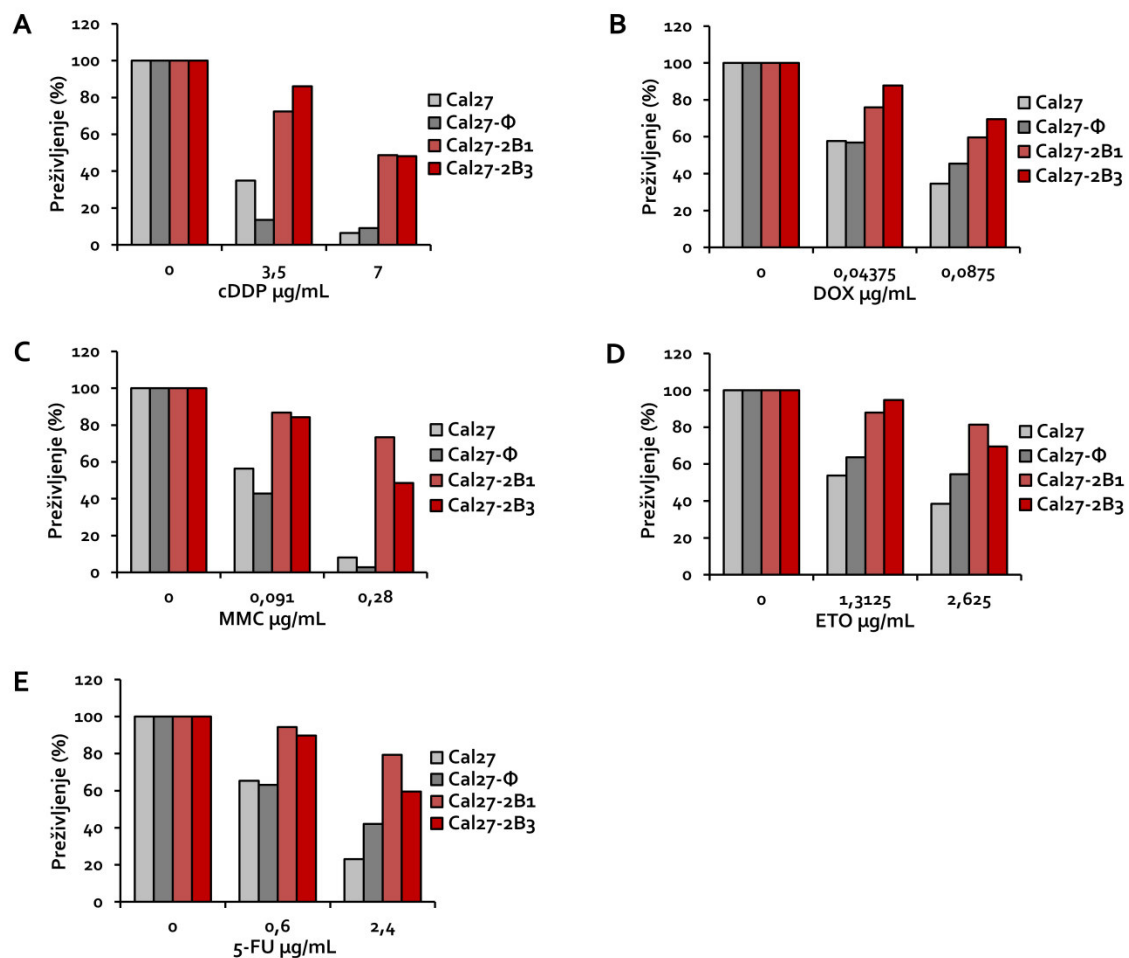
### Protutumorski lijekovi za koje nije zabilježena pojava otpornosti



Slika 15. Osjetljivost stanica modela Cal27 na: (A) cisplatinu (cDDP), (B) doksorubicin (DOX), (C) mitomicin C (MMC), (D) etopozid (ETO), (E) fluorouracil (5-FU), (F) vinkristin (VCR) i (G) paklitaksel (TAX). Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3, stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$  nasadeni su u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, 24 sata nakon nasađivanja dodavane su različite koncentracije protutumorskih lijekova. Sedamdeset i dva sata nakon, preživljenje stanica je mjereno MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jednog od pet pokusa sa sličnim rezultatima.

S obzirom da je MTT test metoda koja ima nedostataka kao što je npr. nelinearni odnos broja stanica i apsorbancije za adherentne stanice (Kasugai i sur. 1990), dobivene

rezultate mjerenja osjetljivosti stanica na protutumorske lijekove željeli smo provjeriti još jednom metodom. Stoga je osjetljivost stanica modela Cal27 određivana i pomoću metode praćenja klonalnog rasta, tj. sposobnosti stanica da stvaraju kolonije nakon izlaganja stanica djelovanju protutumorskih lijekova tijekom 1 sata. Rezultati analize postotka izraslih kolonija prikazani na slici 16. potvrdili su da su integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u usporedbi s stanicama Cal27 i kontrolnim klonom Cal27- $\Phi$  otporniji na cisplatinu (Slika 16.A), doksorubicin (Slika 16.B), mitomicin C (Slika 16.C), etopozid (Slika 16.D) i 5-fluorouracil (Slika 16.E). Otpornost integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 najveća je kod izlaganja stanica cisplatinu, mitomicinu C i 5-fluorouracilu.



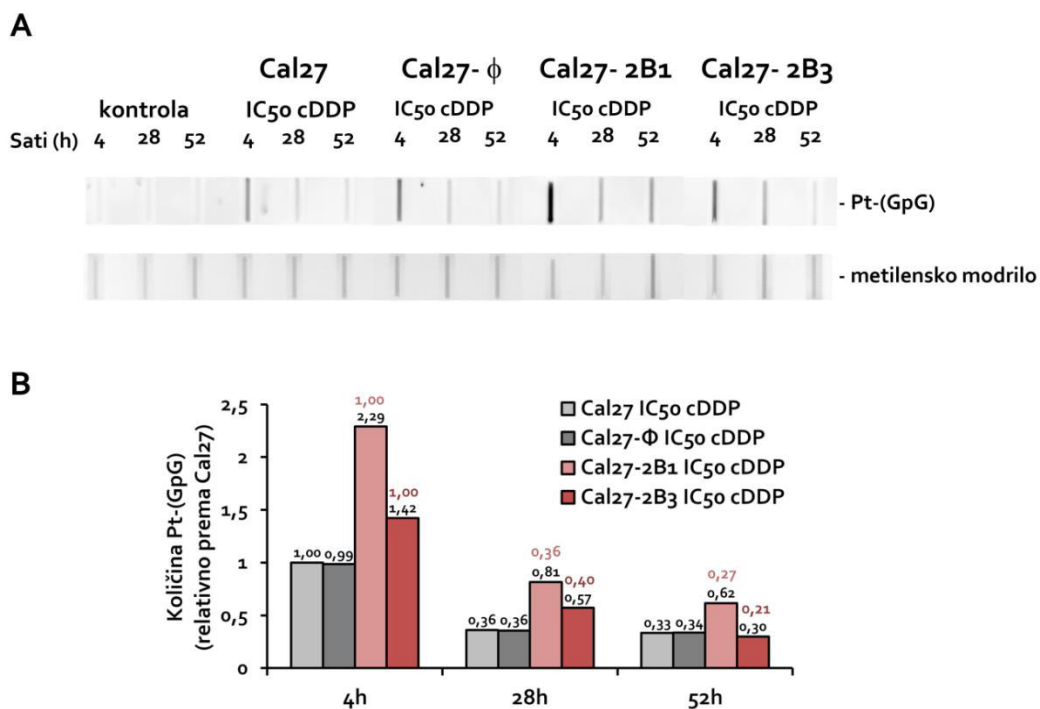
Slika 16. Osjetljivost stanica modela Cal27 na: (A) cisplatinu (cDDP), (B) doksorubicin (DOX), (C) mitomicin (MMC), (D) etopozid (ETO) i (E) 5-fluorouracil (5-FU). Citotoksičnost je mjerena metodom praćenja klonalnog rasta, tj. sposobnosti stanica da stvaraju kolonije, nakon izlaganja protutumorskom lijeku. Stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića, a 24 sata nakon nasađivanja izlagane su različitim koncentracijama protutumorskih lijekova tijekom 1 sata. Nakon perioda inkubacije od 12 do 14 dana, narasle kolonije su bojane bojom Giemsa i brojane.

#### 4.4. Povećana otpornost integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na protutumorske lijekove nije posljedica njihovog smanjenog nakupljanja u stanici

Jedan od mehanizama otpornosti kojim se tumorska stanica prilagođava djelovanju protutumorskih lijekova i stječe otpornost je smanjeno nakupljanje protutumorskog lijeka, kao posljedica njegovog smanjenog ulaska u stanicu (npr. smanjena ekspresija transportnih molekula u staničnoj membrani za određeni protutumorski lijek), ili pojačanog izbacivanja pomoću membranskih pumpi za izbacivanje (npr. P-glikoprotein), ili kao posljedica oba mehanizma (Gottesman 2002). Kako bismo odredili je li ovaj mehanizam odgovoran za otpornost integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na protutumorske lijekove, izložili smo ih djelovanju cisplatine i mjerili količinu DNA adukata.

Cisplatina stvara različite unutarlančane i međulančane veze s molekulom DNA, čime je oštećuje i dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze (Todd i Lippard 2009). Stupanj tolerancije za trajna (nepopravljena) oštećenja DNA određuje sudbinu određene stanice, koja može biti preživljenje ili apoptoza. Najveći dio DNA adukata čine dimeri gvanina (Liedert i sur. 2006), stoga smo stanice izložili djelovanju ekvivalentne koncentracije cisplatine, pri kojoj je preživljenje stanica 50%, tijekom 4 sata, te pratili količinu dimera gvanina u stanicama odmah nakon djelovanja cisplatine (4 sata), te tijekom 24 (ukupno 28 sati) i 48 sati perioda oporavka (ukupno 52 sata) (Slika 17.A). Rezultati (Slika 17.A i B) pokazuju da u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 dolazi do nakupljanja više dimera gvanina neposredno nakon djelovanja cisplatine, točnije 2,29 puta (za Cal27-2B1) i 1,43 puta (za Cal27-2B3) više nego u kontrolnim Cal27 stanicama, dok je količina dimera gvanina u kontrolnom klonu Cal27- $\Phi$  jednaka količini dimera gvanina u kontrolnim stanicama Cal27. To je posljedica veće doze cisplatine kojoj se izlažu integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3, za koje je koncentracija cisplatine pri kojoj je preživljenje stanica 50% ( $IC_{50}$  vrijednost) 1  $\mu\text{g/mL}$  cDDP, dok je za Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$  ta koncentracija 0,375  $\mu\text{g/mL}$  cDDP, što je razlika od gotovo 3 puta. U periodu oporavka od 24 sata (ukupno vrijeme nakon početka tretmana 28 sati) kontrolne stanice Cal27 i Cal27- $\Phi$  uspješne su u uklanjanju dimera gvanina, jer se količina dimera ne mijenja tijekom sljedećih 24 sata oporavka, tj. 52 sata nakon izlaganja, međutim, trećina dimera gvanina nastalih izlaganjem stanica cisplatini i dalje ostaje neuklonjena (Slika 17.B). Kod

integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3, dolazi do uklanjanja gotovo trećine količine dimera gvanina unutar prvih 24 sata oporavka, ali u ovim stanicama i dalje ostaje veća količina dimera gvanina nego u kontrolnim stanicama Cal27 i Cal27- $\Phi$  kao posljedica veće doze cisplatinine. Tijekom sljedećih 24 sata oporavka, tj. do 52 sata nakon izlaganja djelovanju cisplatinine, u stanicama Cal27-2B1 i Cal27-2B3 i dalje se nastavlja uklanjanje dimera gvanina pa se njihova količina približava količini u kontrolnim stanicama (Cal27-2B1) ili postaje njima jednaka (Cal27-2B3) (Slika 17.B). Iz ovih rezultata zaključujemo da količina adukata odgovara dozi cisplatinine tj. nije došlo do promjena u nakupljanju cisplatinine u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, što upućuje na druge mehanizme otpornosti na protutumorske lijekove.

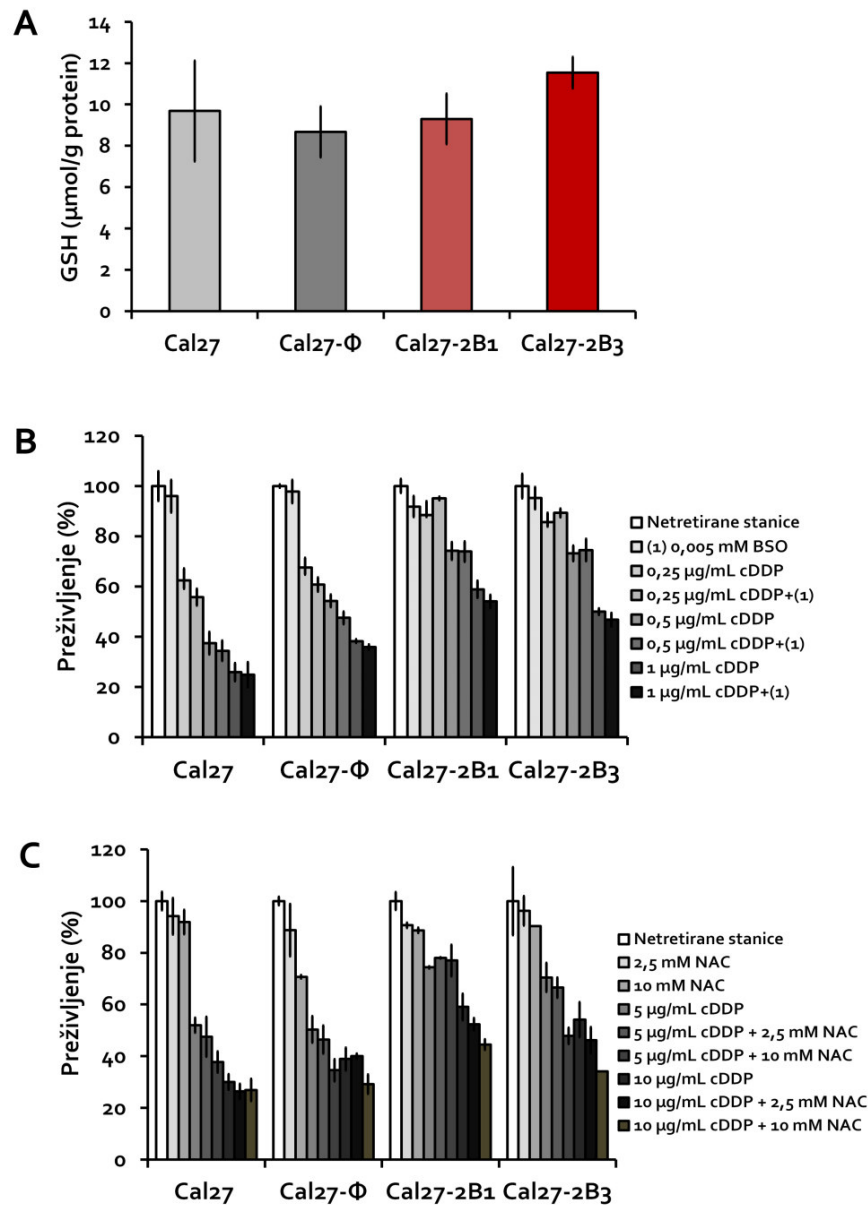


**Slika 17. Mjerenje dimera gvanina nastalih djelovanjem ekvivalentne (IC<sub>50</sub>) doze cisplatinine i praćenje njihovog uklanjanja tijekom 51 sat od izlaganja cisplatinini u stanicama modela Cal27.** (A) Količina dimera gvanina utvrđena je inkubacijom ukupne DNA izdvojene iz stanica, protutijelima specifičnim za Pt-(GpG) prema uputama proizvođača, nakon što su stanice izložene djelovanju ekvivalentne koncentracije cisplatinine (cDDP) tijekom 4 sata i perioda oporavka od 24 i 48 sati. Ujednačenost nanošenja uzoraka određena je bojanjem membrane bojom metilensko modriilo. Koncentracija cisplatinine pri kojoj je preživljenje stanica Cal27 i Cal27- $\Phi$  50% (IC<sub>50</sub> vrijednost) je 0,375  $\mu$ g/ml cDDP, dok za stanice Cal27-2B1 i 2B3-Cal27 IC<sub>50</sub> iznosi 1  $\mu$ g/ml cDDP. (B) Kvantifikacija količine dimera gvanina nakon izlaganja ekvivalentnoj koncentraciji cisplatinine (cDDP) u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, kontrolnom klonu Cal27- $\Phi$  prema stanicama Cal27. Crnim brojevima su označene vrijednosti relativno prema stanicama Cal27. Crvenim brojevima su označene vrijednosti smanjenja količine dimera gvanina za svaki od integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klon Cal27-2B1 i Cal27-2B3. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

#### 4.5. Glutacion nema ulogu u mehanizmu otpornosti stanica modela Cal27 na protutumorske lijekove

Brozović i suradnici (2008) opisali su mehanizam otpornosti u stanicama HEp2 posredovan integrinom  $\alpha_v\beta_3$ , kojim povećana ukupna količina glutaciona omogućava bolje preživljenje stanica djelotvornijim uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta u stanici nastalih djelovanjem tri protutumorska lijeka: cisplatina, doksorubicin i mitomicin C. Kako bi utvrdili radi li se o istom mehanizmu u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, mjerili smo ukupnu količinu glutaciona u stanicama modela Cal27. Rezultati prikazani na slici 18.A pokazuju da je količina ukupnog glutaciona u stanicama Cal27, Cal27- $\Phi$ , Cal27-2B1 i Cal27-2B3 jednaka. Kako bi istražili ima li postojeća količina glutaciona u stanicama ulogu u otpornosti stanica na protutumorske lijekove, stanice smo izložili prvo djelovanju 0,005 mM butionin sulfoksimina (BSO) koji inhibira sintezu glutaciona, a zatim djelovanju različitih koncentracija cisplatine (cDDP). Na slici 18.B se može primijetiti da sam tretman stanica BSO-om nije utjecao na proliferaciju stanica, niti je imao utjecaj na osjetljivost stanica na cisplatinu. Nadalje, vidi se da je otpornost integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 i dalje prisutna u usporedbi s stanicama Cal27 i kontrolnim klonom Cal27- $\Phi$ . Kako bi dodatno utvrdili može li povećanje količine glutaciona u stanicama Cal27 utjecati na osjetljivost na protutumorske lijekove stanice smo izložili N-acetil cisteinu (NAC), koji kao prekursor sinteze glutaciona povećava njegovu ukupnu količinu u stanici, i različitim koncentracijama cisplatine (cDDP). Slika 18.C pokazuje da NAC ne mijenja osjetljivost stanica na cisplatinu. Zajedno, ovi rezultati pokazuju da glutacion nema ulogu u mehanizmu otpornosti stanica modela Cal27 na protutumorske lijekove.





Slika 18. Određivanje ukupne količine glutationa i utjecaja modulacije količine glutationa na osjetljivost stanica modela Cal27 na cisplatinu: (A) Određivanje ukupne količine glutationa u stanicama modela Cal27; (B) Osjetljivost stanica modela Cal27 na cisplatinu (cDDP) nakon prethodnog izlaganja stanica 0,005 mM butionin sulfoksiminu (BSO) tijekom 16 sati; (C) Osjetljivost stanica modela Cal27 na cisplatinu (cDDP) nakon prethodnog izlaganja stanica različitim koncentracijama N-acetil cisteina (NAC) tijekom 16 sati. Preživljenje stanica je mjereno MTT testom 72 sata nakon izlaganja cisplatinu. Na slici je prikazan rezultat jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

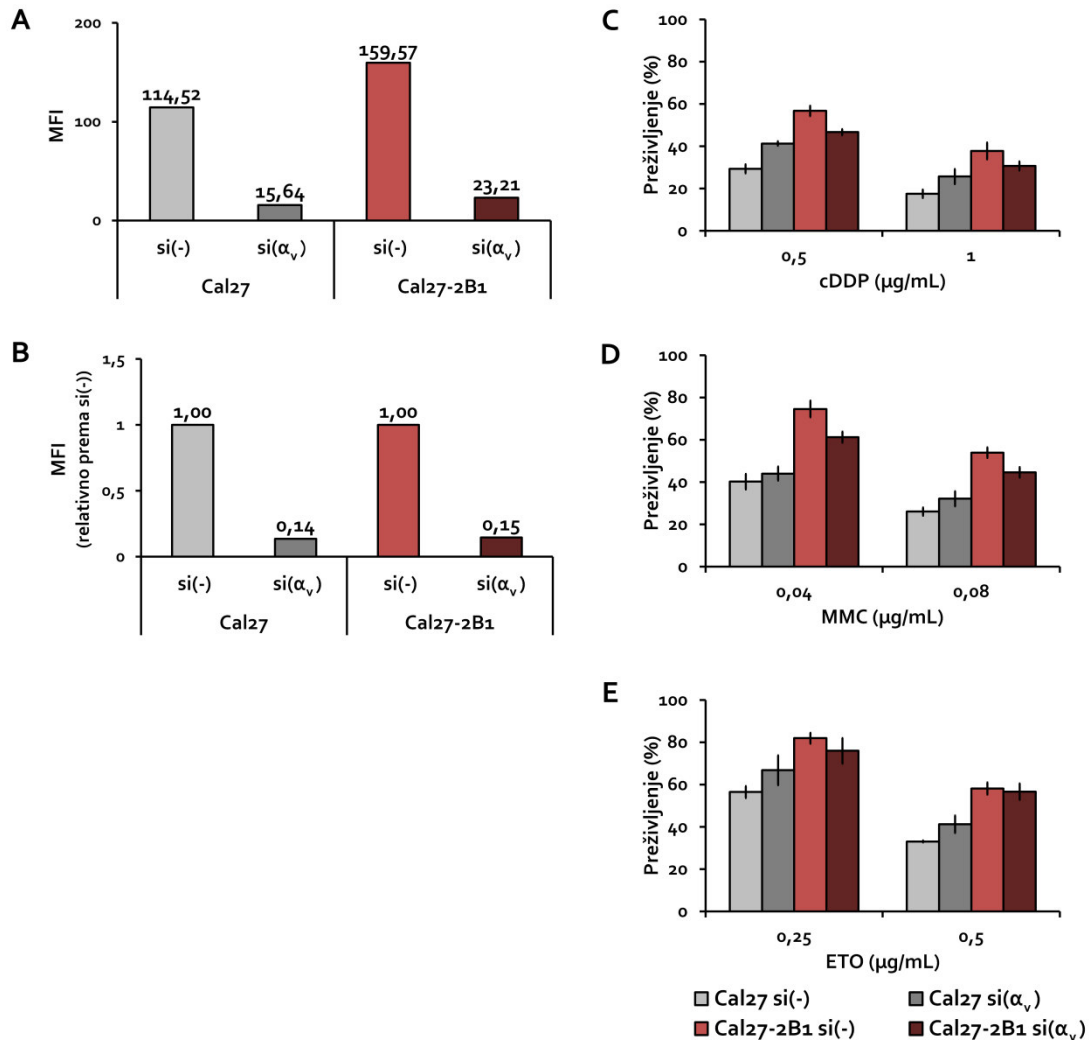
#### 4.6. Integrin $\alpha_v\beta_3$ , a ne integrin $\alpha_v\beta_5$ , u integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 odgovoran je za otpornost na protutumorske lijekove

Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 koji ekspimiraju integrin  $\alpha_v\beta_3$  i imaju povećanu ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_5$  u odnosu na stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$ , pokazuju povećanu otpornost na različite protutumorske lijekove. Kako bi utvrdili da je otpornost zaista posljedica ovih promjena, izveden je pokus utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$ . Utišavanjem ove podjedinice očekuje se smanjenje ekspresije svih heterodimera integrina  $\alpha_v$ . Transficirali smo stanice sa siRNA( $\alpha_v$ ) i kontrolnom siRNA(-), a uspješnost utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  transfekcijom  $\alpha_v$ -specifičnom siRNA potvrdili smo metodom mjerenja ekspresije podjedinice integrina  $\alpha_v$  specifičnim protutijelima i protočnom citometrijom.

Na slici 19. prikazane su vrijednosti MFI (Slika 19.A) i relativne vrijednosti MFI (Slika 19.B) izmjerene za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  i izotipsku kontrolu na stanicama Cal27 i integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1. U pokus smo uključili i netransficirane stanice kako bi provjerili da transfekcija ne utječe značajno na ekspresiju integrina na površini stanice (rezultati nisu prikazani), ali se u eksperimentu uspoređuju vrijednosti dobivene transfekcijom stanica kontrolnom siRNA(-) i siRNA( $\alpha_v$ ). Ekspresija podjedinice integrina  $\alpha_v$  mjerena je 48 sati nakon transfekcije stanica sa siRNA( $\alpha_v$ ) i siRNA(-) tj. u trenutku izlaganja stanica protutumorskim lijekovima. Transfekcija siRNA( $\alpha_v$ ) smanjila je ekspresiju podjedinice integrina  $\alpha_v$  za 86% u stanicama Cal27 i za 85% u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-) (Slika 19.B). Rezultati pokazuju da je utišavanje podjedinice integrina  $\alpha_v$  bilo uspješno, ali da je u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 nakon transfekcije  $\alpha_v$ -specifičnom siRNA i dalje veća količina podjedinice integrina  $\alpha_v$  u usporedbi s stanicama Cal27 transficiranim  $\alpha_v$ -specifičnom siRNA (Slika 19.A).

Kako bi utvrdili postoji li utjecaj utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  na osjetljivost stanica na protutumorske lijekove, stanice Cal27 i integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klon Cal27-2B1 transficirali smo siRNA molekulama specifičnim za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  te izložili djelovanju tri protutumorska lijeka tijekom 72 sata, nakon čega smo učinak pratili MTT testom. U svakom od eksperimenta određivali smo i osjetljivost netransficiranih

stanica (rezultati nisu prikazani). Sam proces transfekcije utječe na proliferaciju svih stanica, no za usporedbu prikazali smo samo rezultate prave kontrole tj. stanica transficiranih nespecifičnom siRNA (si(-)) i stanica transficiranih  $\alpha_v$ -specifičnom siRNA (si( $\alpha_v$ )).



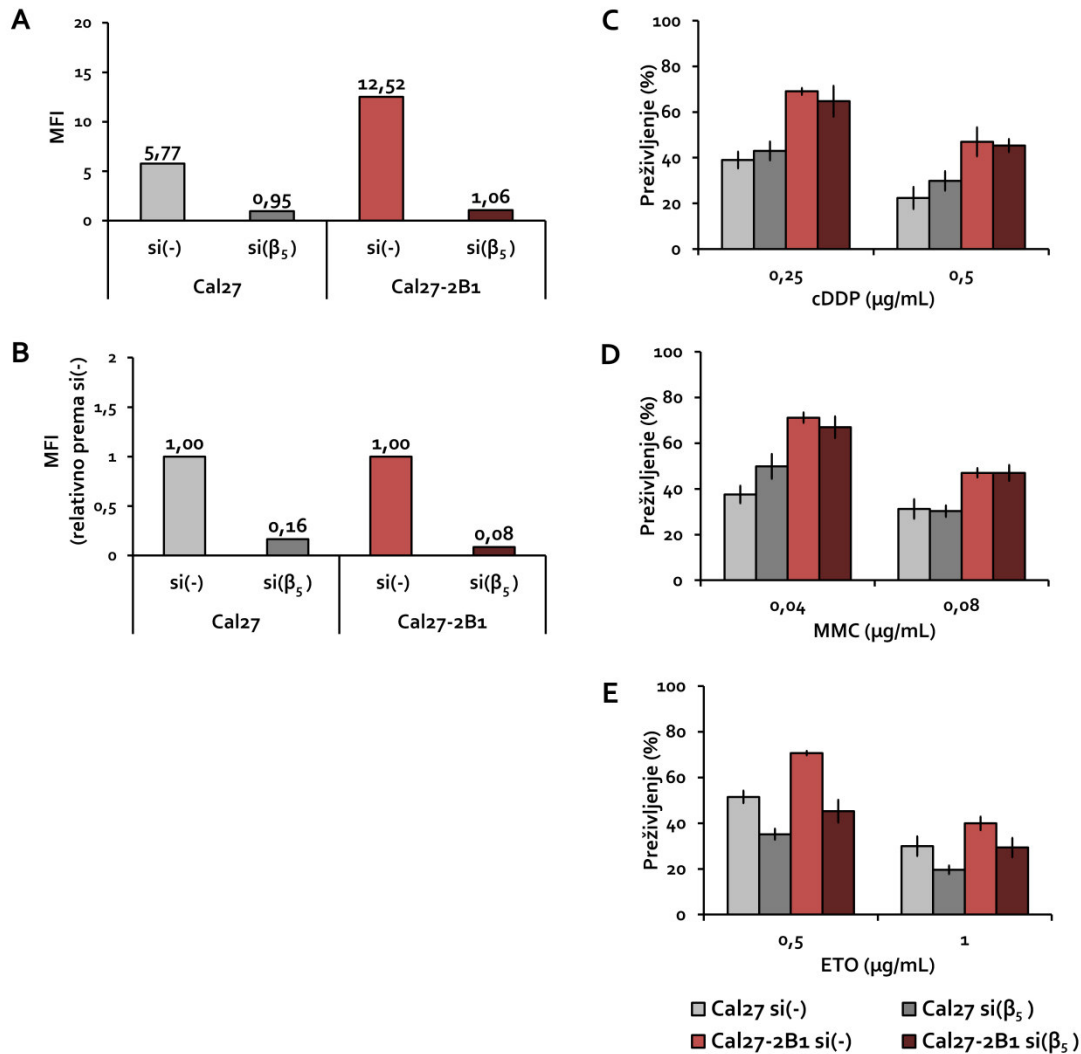
**Slika 19. Utjecaj utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  na osjetljivost stanica Cal27 i Cal27-2B1 na cisplatinu, mitomicin C i etopozid.** Ekspresija podjedinice integrina  $\alpha_v$  (A) i relativan odnos ekspresije podjedinice integrina  $\alpha_v$  u odnosu na stanice transficirane sa siRNA(-) (B) na stanicama Cal27 i Cal27-2B1 transficiranim sa siRNA( $\alpha_v$ ) i siRNA(-). Stanice su obilježene protutijelima specifičnim za  $\alpha_v$  te sekundarnim, fluorescentno obilježenim zečjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina, a ekspresija je određena mjerenjem fluorescencije protočnim citometrom. Svjetlo sivi stupići prikazuju stanice Cal27 transficirane sa siRNA(-), a tamno sivi stupići prikazuju stanice Cal27 transficirane sa siRNA( $\alpha_v$ ). Svijetlo crveni stupići prikazuju stanice Cal27-2B1 transficirane sa siRNA(-), a tamno crveni stupići prikazuju stanice Cal27-2B1 transficirane sa siRNA( $\alpha_v$ ). **Utjecaj utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  na preživljenje stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima (C, D, E).** Stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane siRNA molekulama specifičnim za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  siRNA (si( $\alpha_v$ )) i nespecifičnom siRNA (si(-)). Dvadeset četiri sata kasnije stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, u koje je 48 sati nakon transfekcije dodana (C) cisplatinu (cDDP), (D) mitomicin C (MMC) ili (E) etopozid (ETO). 72 sata nakon izlaganja stanica protutumorskim lijekovima određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jednog od pet pokusa sa sličnim rezultatima.

Mjerali smo preživljenje stanica Cal27 i Cal27-2B1 nakon izlaganja cisplatinu, mitomicinu C i etopozidu, od kojih svaki ima drugačiji mehanizam djelovanja. Utišavanjem podjedinice integrina  $\alpha_v$  dolazi do povećanja preživljenja stanica Cal27 nakon izlaganja djelovanju sva tri ispitana protutumorska lijeka, te se ono približava preživljenju stanica Cal27-2B1 (Slika 19.C, D, E). Stanice Cal27 na svojoj površini ne ekspimiraju integrin  $\alpha_v\beta_3$ , ali ekspimiraju integrin  $\alpha_v\beta_5$ , vrlo vjerojatno  $\alpha_v\beta_1$  i neku količinu  $\alpha_v\beta_6$ . Prema tome, ovim eksperimentom pokazali smo ukupni utjecaj svih  $\alpha_v$  integrina koji se ekspimiraju na površini stanica Cal27, a među kojima nema integrina  $\alpha_v\beta_3$ ; smanjivanjem njihove ekspresije dolazi do smanjene osjetljivost, odnosno otpornosti, na sva tri protutumorska lijeka. S druge strane, utišavanjem podjedinice integrina  $\alpha_v$  u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1, koje se od stanica Cal27 razlikuju po *de novo* ekspresiji integrina  $\alpha_v\beta_3$  i povećanoj ekspresiji integrina  $\alpha_v\beta_5$ , ili dolazi do smanjenja preživljenja (Slika 19.C i D) ili ono nema nikakvog utjecaja na preživljenje ovih stanica (Slika 19.E). Treba naglasiti da nepostojanje promjene u osjetljivosti stanica Cal27-2B1 na etopozid ne znači da utišavanje integrina  $\alpha_v$  ne utječe na osjetljivost ovih stanica na etopozid, već znači da je u stanicama Cal27-2B1 učinak utišavanja heterodimera integrina  $\alpha_v$  (a koji su jednako ekspimirani kao i u stanicama Cal27, osim  $\alpha_v\beta_3$ ) poništen ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  ili razlikom ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  između Cal27 i Cal27-2B1, a ono što mi vidimo u eksperimentu je samo njihov kumulativni učinak. Za cisplatinu i mitomicin C je kumulativni učinak doveo do snažnijeg približavanja vrijednosti ukupnog preživljenja stanica Cal27 i Cal27-2B1, no zaključak je u potpunosti jednak: ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  i/ili povećana ekspresija  $\alpha_v\beta_5$  odgovorna je za opaženu otpornost na protutumorske lijekove.

Kako bi razlučili koji je od ova dva heterodimera integrina,  $\alpha_v\beta_3$  ili  $\alpha_v\beta_5$ , odgovoran za otpornost na protutumorske lijekove, stanice smo transficirali sa siRNA( $\beta_5$ ) i kontrolnom siRNA(-), uspješnost utišavanja potvrdili metodom mjerenja ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  za njih specifičnim protutijelima i protočnom citometrijom, a otpornost na protutumorske lijekove mjerili MTT testom. Kako podjedinica integrina  $\beta_5$  tvori heterodimer samo s podjedinicom integrina  $\alpha_v$ , utišavanjem podjedinice integrina  $\beta_5$  pomoću  $\beta_5$  specifične siRNA, smanjuje se ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  na površini stanica. Na slici 20. prikazane su vrijednosti MFI (Slika 20.A) i relativne vrijednosti MFI (Slika 20.B) izmjerene za ekspresiju heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_5$  i izotipsku kontrolu na stanicama Cal27 i integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1. U eksperimentu se kao dokaz uspješnosti uspoređuju vrijednosti dobivene

transfekcijom stanica kontrolnom siRNA(-) i siRNA( $\beta_5$ ) izmjerena 48 sati nakon transfekcije. Transfekcija siRNA( $\beta_5$ ) smanjila je ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_5$  za 84% u stanicama Cal27 i za 92% u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-) (Slika 20.B). Transfekcija siRNA( $\beta_5$ ) uspješna je u stanicama Cal27 i Cal27-2B1 te je dovela do snažnog smanjenja ekspresije  $\alpha_v\beta_5$  i izjednačavanja ekspresije  $\alpha_v\beta_5$  u Cal27 i Cal27-2B1 (Slika 20.A).

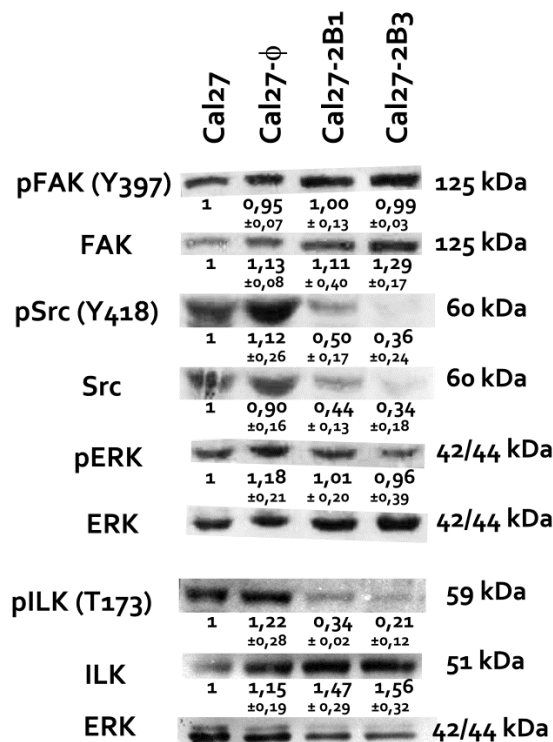
Rezultati MTT testa pokazuju da ne dolazi do značajnih promjena u preživljenju stanica Cal27 i integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranog klona Cal27-2B1 transficiranih s siRNA( $\beta_5$ ) u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-) nakon izlaganja djelovanju različitim koncentracijama cisplatine i mitomicina C (Slika 20.C i D), te je i dalje vidljivo bolje preživljenje integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranog klona Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 stanice. Iz toga zaključujemo da povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  u stanicama Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 nije odgovorna za povećanje otpornosti na cisplatinu i mitomicin C. Ovaj zaključak potvrđuje i rezultat izlaganja stanica djelovanju etopozida nakon utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\beta_5$  u kojem dobivamo u potpunosti različiti obrazac osjetljivosti nego za prethodna dva protutumorska lijeka; dolazi do smanjenog preživljenja u oba tipa stanica, Cal27 i Cal27-2B1, u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-) ali stanice Cal27-2B1 i dalje pokazuju bolje preživljenje u odnosu na Cal27 (Slika 20.E). Na temelju ovih pokusa zaključujemo da smanjenje ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  u određenoj mjeri utječe na osjetljivost stanica Cal27 i Cal27-2B1 na protutumorske lijekove, ali taj utjecaj ne prati isti obrazac za sva tri protutumorska lijeka i stoga nije povezan s mehanizmom otpornosti stanica Cal27-2B1 potaknut transfekcijom gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$ . Prema tome, ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  u stanicama Cal27-2B1 odgovorna je za opaženu otpornost na protutumorske lijekove u odnosu na stanice Cal27.



Slika 20. Utjecaj utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\beta_5$  na otpornost stanica Cal27 i Cal27-2B1 na cisplatinu, mitomicin C i etopozid. Ekspresija integrina  $\alpha_5\beta_5$  (A) i relativan odnos ekspresije integrina  $\alpha_5\beta_5$  u odnosu na stanice transficirane sa siRNA(-) (B) na stanicama Cal27 i Cal27-2B1 transficiranim sa siRNA( $\beta_5$ ) i siRNA(-). Stanice su obilježene protutijelima specifičnim za integrin  $\alpha_5\beta_5$  te sekundarnim zečjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina, a ekspresija je određena mjerenjem fluorescencije protočnim citometrom. Prikazane su relativne MFI vrijednosti prema siRNA(-). Svjetlo sivi stupići prikazuju stanice Cal27 transficirane sa siRNA(-), a tamno sivi stupići prikazuju stanice Cal27 transficirane sa siRNA( $\beta_5$ ). Svijetlo crveni stupići prikazuju stanice Cal27-2B1 transficirane sa siRNA(-), a tamno crveni stupići prikazuju stanice Cal27-2B1 transficirane sa siRNA( $\beta_5$ ). **Utjecaj utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\beta_5$  na preživljenje stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima (C, D, E)** Stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane siRNA molekulama specifičnim za podjedinicu integrina  $\alpha_5\beta_5$  i nespecifičnom siRNA(si(-)). Dvadeset četiri sata kasnije stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, u koje je 48 sati nakon transfekcije dodana (C) cisplatin (cDDP), (C), (D) mitomicin C (MMC) ili (E) etopozid (ETO). 72 sata nakon dodatka protutumorskih lijekova određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jednog od pet pokusa sa sličnim rezultatima.

#### 4.7. U integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na kontrolne stanice Cal27 i Cal27- $\Phi$ nalazimo smanjenu ekspresiju Src, pSrc (Y418) i pILK (T173), te povećanu ekspresiju ILK

Nekoliko je proteina uključenih u signalne puteve koje okidaju integrini: kinaza vezana za fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK), nerekceptorska tirozin kinaza Src (Src) i kinaza vezana za integrine (engl. *integrin linked kinase*, ILK) (van der Flier i Sonnenberg 2001; Millard i sur. 2011). Pri vezanju integrina na proteine izvanstaničnog matriksa dolazi do stvaranja fokalnih adhezija, u kojima ovi proteini imaju vrlo važnu ulogu u prijenosu signala (Hynes 2002). Stoga smo željeli utvrditi postoji li razlika u njihovoj ekspresiji u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na kontrolne stanice Cal27- $\Phi$  i Cal27.



**Slika 21. Ekspresija FAK, Src i ILK te njihovih fosforiliranih formi u stanicama modela Cal27.** Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata uzorci za Western analizu su skupljeni kako je navedeno u poglavlju Materijali i metode i ekspresija je utvrđena inkubacijom protutijelima specifičnim za pFAK (Y397), FAK, pILK (T173), ILK pSrc (Y418), Src, pERK i ERK te odgovarajućim sekundarnim protutijelima prema uputama proizvođača. Na slici su prikazani rezultati jednog od tri pokusa koji su pokazali sličan rezultat. Brojevi predstavljaju srednju vrijednost relativne ekspresije prema kontrolnim stanicama Cal27  $\pm$  SD dobivenu iz tri neovisno izvršena pokusa.

Western blot analiza pokazala je statistički značajnu promjenu u razini ekspresije ukupnog proteina Src i fosforiliranog oblika (Y418), koji su značajno smanjeni u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim staničnim klonovima Cal27-2B1 (0,44 Src i 0,50 pSrc (Y418) u odnosu na stanice Cal27) i Cal27-2B3 (0,34 Src i 0,36 pSrc (Y418) u odnosu na stanice Cal27) (Slika 21), dok je ukupna količina proteina ILK nešto veća u Cal27-2B1 (1,47 puta u odnosu na stanice Cal27) i Cal27-2B3 (1,56 puta u odnosu na stanice Cal27), a njegova fosforilirana forma pILK (T173) značajno smanjena (Cal27-2B1 na 0,34 i Cal27-2B3 na 0,21) u odnosu na stanice Cal27 i Cal27- $\Phi$  (Slika 21), što bi moglo upućivati na ulogu Src i ILK u otpornosti stanica na protutumorske lijekove. Kako promjena u razini ekspresije ukupnog proteina FAK i fosforiliranog oblika (Y397) nije bila statistički značajna (Slika 21), u daljnjim smo se istraživanjima fokusirali na Src i ILK.

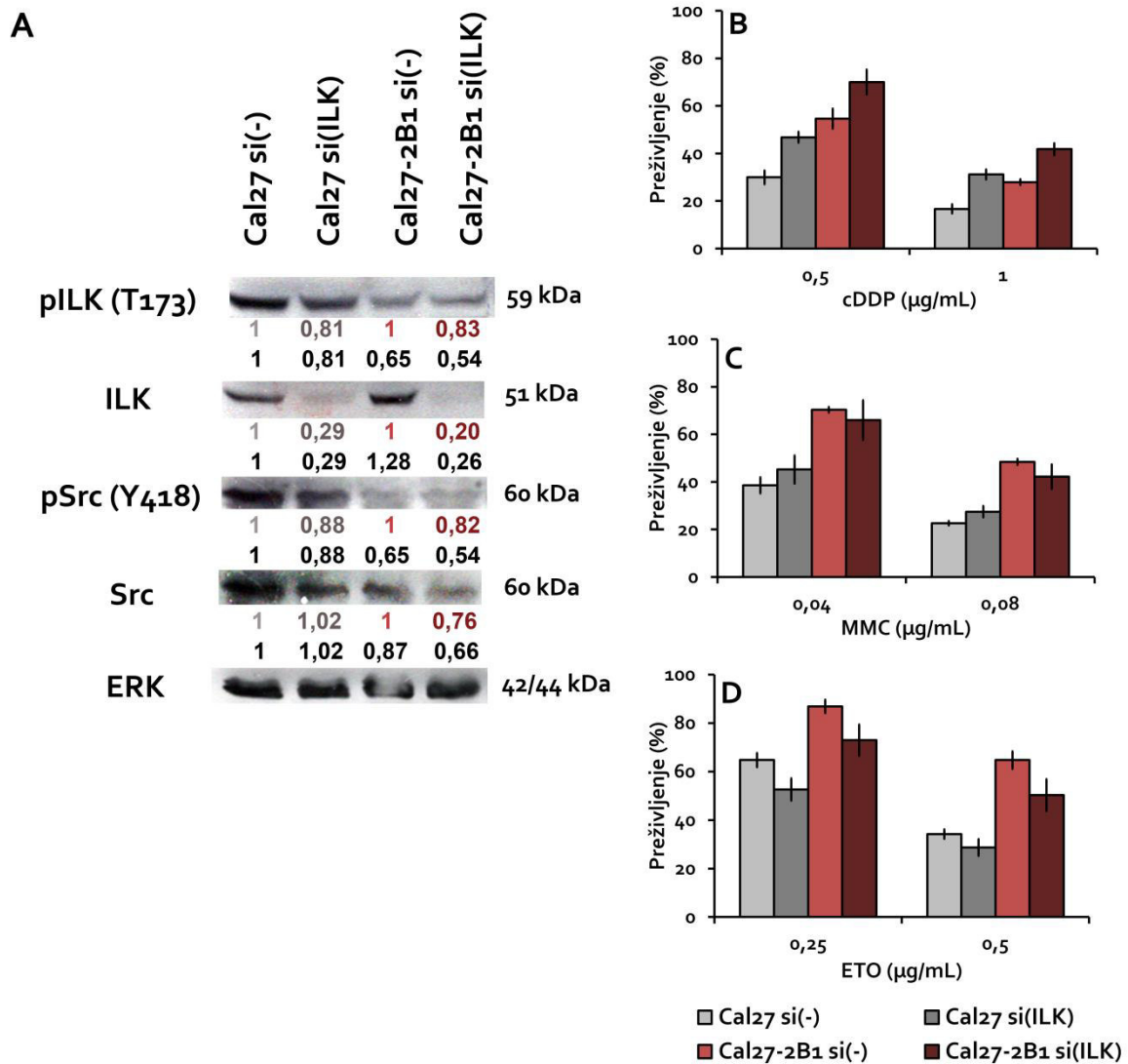
#### 4.8 Smanjenje ekspresije ILK i pILK (T173) u integrin $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 nije odgovorno za otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, mitomicin C i etopozid

Protein ILK je istodobno adaptorni protein i kinaza, sastavni je dio fokalnih adhezija, povezuje integrine i faktore rasta za aktinski citoskelet i niz signalnih puteva kojima se regulira proliferacija, mitozu, migraciju, invaziju, angiogenezu, anoikis, apoptozu, embrionalni razvoj, kontraktilnost srca i glatkih mišića te homeostaza tkiva (Li i sur. 1999; Hannigan i sur. 2005; Hannigan i sur. 2011). Pokazana je povećana ekspresija ovog proteina u različitim vrstama tumora koja korelira s progresijom tumora u pacijentima (Persad i Dedhar 2003). ILK se može fosforilirati na 3 mjesta, gdje je mjesto S343 odgovorno za autofosforilaciju ILK-a, dok za druga dva mjesta S146 i T173 nije pokazan učinak na aktivnost proteina (Hannigan i sur. 2011), iako su Suh i sur. 2011. godine povezali fosforilaciju na mjestu T173 sa povećanim prijenosom signala preko ILK-a (Suh i Han 2011). S obzirom da je Western analiza pokazala povećanu ekspresiju ukupnog proteina ILK u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$  proveli smo utišavanje ekspresije ILK pomoću specifične siRNA za ILK (si(ILK)) u stanicama Cal27 i integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 kako bi utvrdili njegovu ulogu u osjetljivosti stanica na protutumorske lijekove. Uspješnost utišavanja potvrdili smo Western blot analizom (Slika 22).



Utišavanje ILK u stanicama Cal27 dovelo je do smanjenja ekspresije ukupnog proteina ILK, i to za 71% u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-), ali i do vrlo malog (19%) smanjenja količine njegove fosforilirane forme pILK (T173) (Slika 22.A). U integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1, u kojem je prisutna veća količina ILK nego u stanicama Cal27, utišavanje je uspješno smanjilo ekspresiju ILK za 80% u odnosu na stanice Cal27-2B1 transficirane kontrolnom siRNA(-), dok se ekspresija pILK, kojeg u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom staničnom klonu Cal27-2B1 ima manje nego u stanicama Cal27, malo smanjila (17%) (Slika 22.A). Daljnja analiza pokazala je da utišavanje ILK nije značajnije utjecalo na ekspresiju proteina Src i pSrc (Y418) u stanicama Cal27 i Cal27-2B1 (Slika 22.A). Kada bi primijećeno povećanje ILK u stanicama Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 bilo povezano s promjenama Src i pSrc (Y418) (koji su značajno manje eksprimirani u Cal27-2B1 u odnosu na Cal27) očekivali bismo da utišavanje ILK u Cal27-2B1 povećava ekspresiju Src i pSrc (Y418). Kako se to nije dogodilo zaključujemo da promjena ekspresije ILK nije uzvodno od primijećene promjene Src i pSrc (Y418).

Rezultati MTT testa nakon utišavanja ILK pokazuju različite obrasce s obzirom na istraživani protutumorski lijek. Nakon utišavanja ILK dolazi do povećanog preživljenja stanica Cal27 i Cal27-2B1 na djelovanje cisplatine (Slika 22.B), ali razlika u preživljenju među njima ostaje ista. Utišavanje ILK ne utječe na osjetljivost stanica Cal27 i Cal27-2B1 na mitomicin C (Slika 22.C), dok izlaganjem stanica djelovanju etopozida dolazi do smanjenog preživljenja oba tipa stanica, ali Cal27-2B1 i dalje pokazuje bolje preživljenje u odnosu na Cal27 (Slika 22.D). Iako smanjenje ekspresije ILK nakon utišavanja u određenoj mjeri utječe na osjetljivost stanica Cal27 i Cal27-2B1 na protutumorske lijekove, taj utjecaj ne prati isti obrazac za sva tri protutumorska lijeka i stoga zaključujemo da nije povezan s mehanizmom otpornosti stanica Cal27-2B1 potaknut transfekcijom gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$ .



**Slika 22. Utjecaj utišavanja gena za ILK na preživljenje stanica Cal27 i Cal27-2B1 nakon izlaganja cisplatinu, mitomicinu C i etopozidu. (A) Ekspresija Src, pSrc (Y418), ILK i pILK (T173) na stanicama Cal27 i Cal27-2B1 transficiranim sa siRNA(ILK) i siRNA(-). Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane siRNA molekulama specifičnim za ILK siRNA (si(ILK)) i nespecifičnom siRNA(si(-)). Četrdeset osam sati kasnije uzorci za Western analizu su skupljeni i ekspresija proteina je utvrđena inkubacijom protutijelima za pSrc (Y418), Src, pILK (T173), ILK i ERK te odgovarajućim sekundarnim protutijelima. Na slici je prikazan jedan od dva pokusa koji su pokazali sličan rezultat. Brojevima (sivo, crveno) označena je relativna ekspresija prema stanicama transficiranim s kontrolnom siRNA(si(-)) za stanice Cal27 i Cal27-2B1, dok je crnim brojevima označena relativna ekspresija prema stanicama Cal27 transficiranim s kontrolnom siRNA(si(-)). **Utjecaj utišavanja gena za ILK na preživljenje stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima (B, C, D).** Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane siRNA molekulama specifičnim za ILK (si(ILK)) i nespecifičnom siRNA (si(-)). Dvadeset četiri sata kasnije stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, u koje je 48 sati nakon transfekcije dodana (B) cisplatinu (cDDP), (C) mitomicin C (MMC), ili (D) etopozid (ETO). 72 sata nakon izlaganja stanica protutumorskim lijekovima određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jednog od pet pokusa koji su pokazali slični rezultat.**

#### 4.9. Smanjenje količine pSrc (Y418) u stanicama Cal27-2B1 odgovorno je za otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, mitomicin C i etopozid

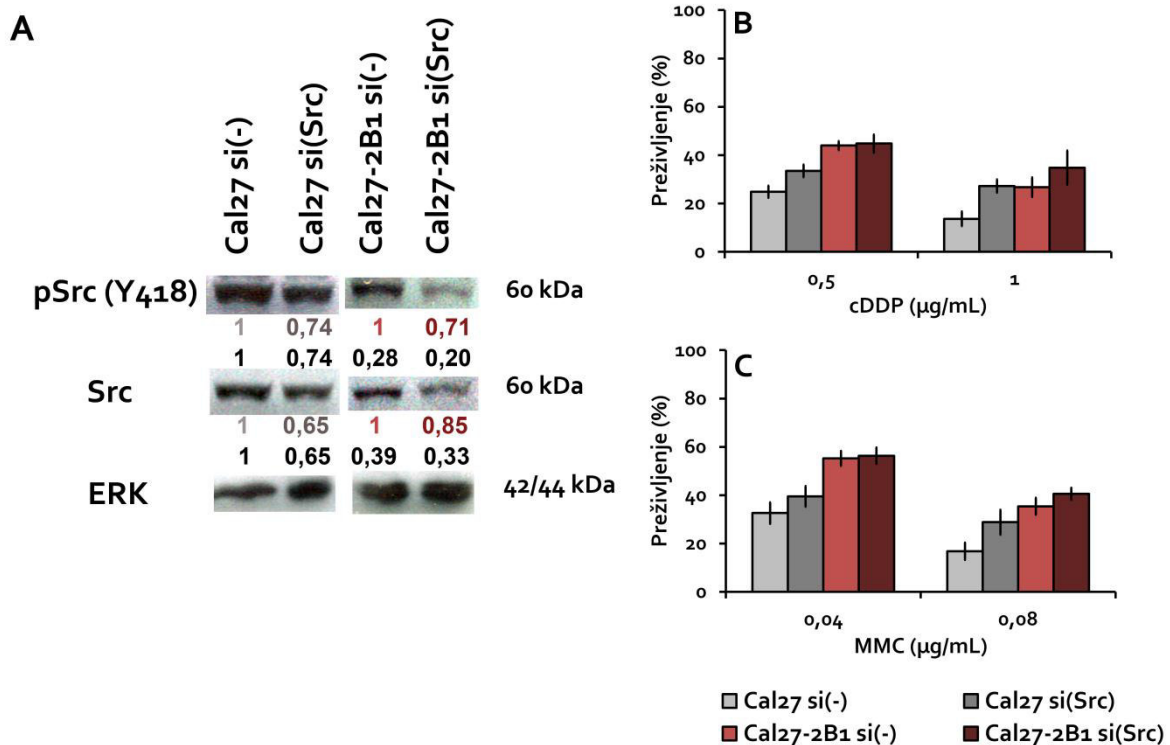
Protein Src je glavni član obitelji Src kinaza koji se veže na integrine i prenosi signale koji kontroliraju procese u stanici kao što su proliferacija, diferencijacija, regulacija staničnog citoskeleta, oblik stanice, adhezija i pokretljivost (Abram i Courtneidge 2000; Playford i Schaller 2004). U većini tumora njegova je ekspresija ili aktivnost promijenjena (Summy i Gallick 2003; Sen i Johnson 2011). Western blot analiza je pokazala da je razina ekspresije ukupnog proteina Src i njegovog fosforiliranog oblika pSrc (Y418) značajno smanjena u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na kontrolne stanice Cal27- $\Phi$  i Cal27 (Slika 21). Da bi utvrdili ulogu ovih promjena u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u otpornosti na različite protutumorske lijekove, proveli smo utišavanje ekspresije Src pomoću specifične siRNA za Src (si(Src)), a uspješnost utišavanja potvrdili Western blot analizom (Slika 23). Cilj je ovog pokusa u stanicama Cal27 postići smanjenu količinu Src i eventualno pSrc (Y418), kakva je primijećena u klonu Cal27-2B1.

Utišavanje Src dovelo je do smanjenja ekspresije ukupnog Src u Cal27 stanicama, i to za 35% u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-), i do smanjenja njegove fosforilirane forme pSrc (Y418) za 26% (Slika 23.A). Budući da je u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom staničnom klonu Cal27-2B1 prisutna manja količina Src, pretpostavljamo da je to razlog što nismo mogli vidjeti značajniji utjecaj utišavanja; primijećeno je utišavanje kinaze Src za samo 15%, dok je promjena njegove fosforilirane forme pSrc (Y418) bila nešto veća i iznosila je 29% u odnosu na stanice Cal27-2B1 transficirane kontrolnom siRNA(-) (Slika 23.A). Bitno je primijetiti da i nakon utišavanja Src u stanicama Cal27, ekspresija Src i pSrc (Y418) nije dosegla smanjenju ekspresiju Src i pSrc (Y418) u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom staničnom klonu Cal27-2B1.

Izlaganjem djelovanju protutumorskim lijekovima cisplatinu i mitomicinu C nakon utišavanja Src dolazi do povećanja preživljenja stanica Cal27 (Slika 23.B i C), koje se pri nižim koncentracijama protutumorskih lijekova izjednačava s preživljenjem u stanicama Cal27-2B1 transficiranim kontrolnom siRNA, dok u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 ne dolazi do promjene u preživljenju (Slika 23.B i C). Prema tome upravo bi smanjenje

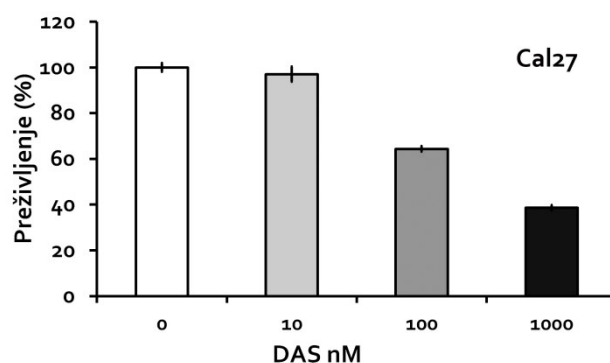
ekspresije Src i/ili pSrc moglo biti odgovorno za otpornost Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 na cisplatinu i mitomicin C.

Pokus mjerenja osjetljivosti stanica Cal27 i Cal27-2B1 na etopozid nakon utišavanja Src ponovili smo pet puta. Međutim, rezultati su bili neuvjerljivi i nisu međusobno pokazivali isti obrazac. S obzirom da je iz literature poznato da se Src aktivira fosforilacijom Y418, odlučili smo u daljnjim pokusima koristiti dasatinib koji djeluje ciljano na inhibiciju fosforilacije pSrc (Y418).



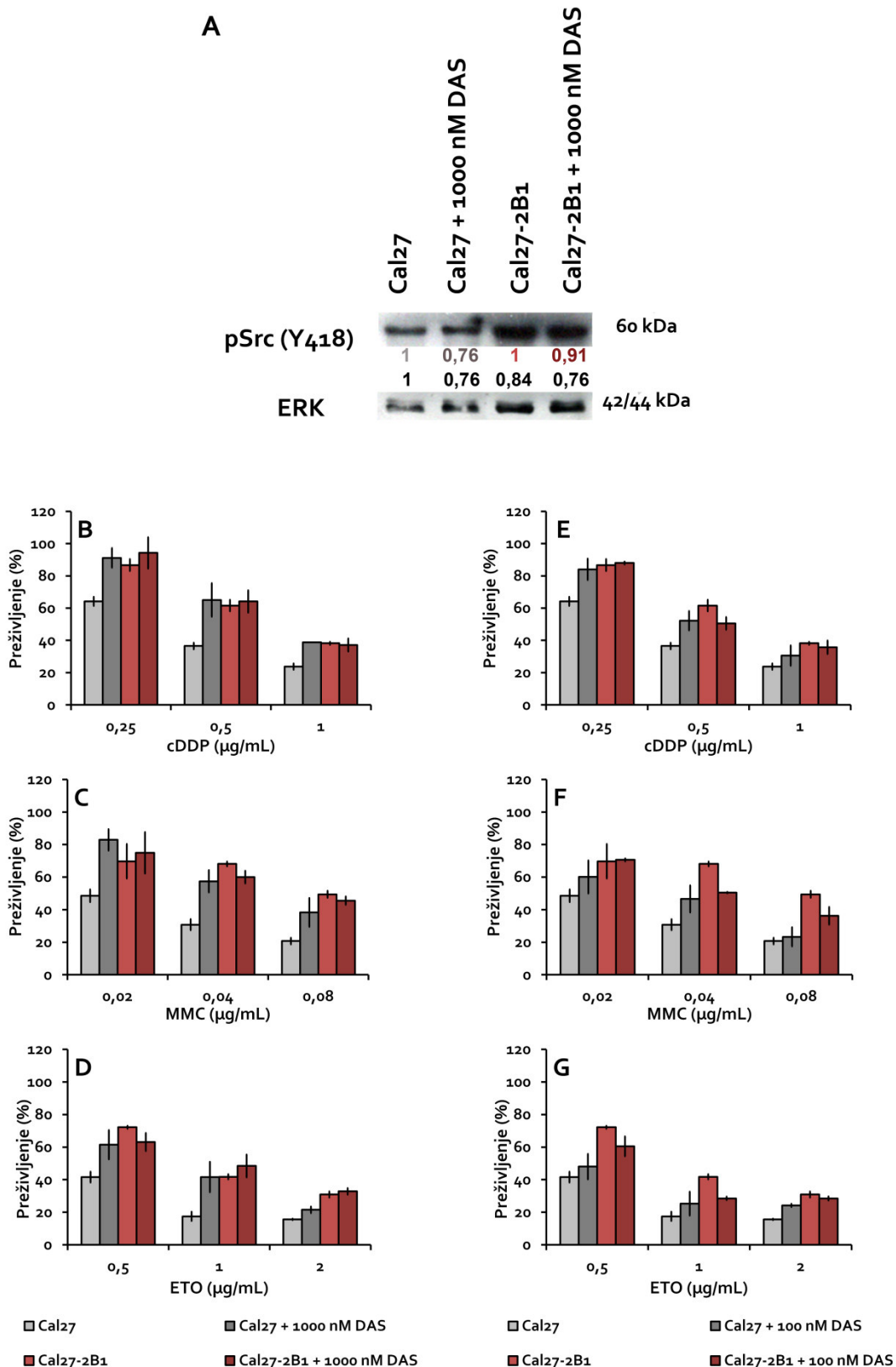
**Slika 23. Utjecaj utišavanja gena za protein Src na preživljenje stanica Cal27 i Cal27-2B1 nakon izlaganja cisplatinu, mitomicinu C i etopozidu. (A) Ekspresija Src i pSrc (Y<sub>418</sub>) na stanicama Cal27 i Cal27-2B1 transficiranim sa siRNA(Src) i siRNA(-). Stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane siRNA molekulama specifičnim za Src (si(Src)) i nespecifičnom siRNA (si(-)). Četrdeset osam sati kasnije uzorci za Western analizu su skupljeni i ekspresija proteina utvrđena je inkubacijom protutijelima za pSrc (Y<sub>418</sub>), Src, i ERK te odgovarajućim sekundarnim protutijelima. Na slici je prikazan jedan od dva pokusa koji su pokazali sličan rezultat. Brojevima (sivo, crveno) označena je relativna ekspresija prema stanicama transficiranim s kontrolnom siRNA (si(-)) za stanice Cal27 i Cal27-2B1, dok je crnim brojevima označena relativna ekspresija prema stanicama Cal27 transficiranim s kontrolnom siRNA (si(-)). Utjecaj utišavanja gena za protein Src na preživljenje stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima (B, C, D). Stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane sa siRNA molekulama specifičnim za Src (si(Src)) i nespecifičnom siRNA (si(-)). Dvadeset četiri sata kasnije stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, u koje je 48 sati nakon transfekcije dodana (B) cisplatinu (cDDP) ili (C) mitomicin C (MMC). 72 sata nakon dodatka protutumorskih lijekova određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jednog od pet pokusa sa sličnim rezultatima.**

Kako bi utvrdili da li je smanjena fosforilacija samo pSrc (Y418) odgovorna za povećanu otpornost integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova stanica Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na protutumorske lijekove, stanice Cal27 i Cal27-2B1 smo izložili djelovanju dasatiniba, male molekule koja je inhibitor fosforilacije tirozina nekoliko različitih molekula kao što su članovi obitelji SRC kinaza, nekih receptora tirozin kinaza, faktora rasta PDGFR, DDR1 i receptora za epinefrin (Montero i sur. 2011), a koja se uglavnom koristi kao inhibitor kinazne aktivnosti nerekceptorske tirozin kinaze Src (Shor i sur. 2007; Ceppi i sur. 2009). S obzirom da je u literaturi pokazano da djelovanjem dasatiniba dolazi do smanjenog preživljenja stanica (Ceppi i sur. 2009; Nautiyal i sur. 2009; Raju i sur. 2012), prvo smo stanice Cal27 izložili djelovanju različitih koncentracijama dasatiniba, kako bi odredili optimalan raspon koncentracija (Slika 24), te su za daljnje pokuse izabrane koncentracije 100 i 1000 nM.



**Slika 24. Utjecaj dasatiniba na preživljenje stanica Cal27.** Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, u koje su nakon 24 sata dodane različite koncentracije dasatiniba, i 72 sata nakon toga određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan jedan od dva pokusa koji su pokazali sličan rezultat.

Iz literature je poznato da dasatinib smanjuje fosforiliranu formu pSrc (Y418), što smo i potvrdili metodom Western analize. Izlaganje stanica djelovanju dasatiniba već nakon 1 sata dovelo je do smanjenja količine fosforilirane forme pSrc (Y418) za 24% u odnosu na stanice Cal27 (Slika 25.A). U integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu stanica Cal27-2B1 prisutna je manja količina pSrc (Y418), što je možda i razlog da je primijećeno smanjenje količine za samo 9% u odnosu na stanice Cal27-2B1 (Slika25.A).



Slika 25. Utjecaj smanjenja količine fosforilirane forme pSrc (Y<sub>418</sub>) dasatinibom na preživljenje stanica Cal27 i Cal27-2B1 nakon izlaganja cisplatini, mitomicinu C i etopozidu. (A) Ekspresija pSrc (Y<sub>418</sub>) u stanicama Cal27 i Cal27-2B1 nakon izlaganja dasatinibu. Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su izložene djelovanju 1000 nM dasatiniba. Jedan sat kasnije uzorci za Western analizu su skupljeni i ekspresija pSrc (Y<sub>418</sub>) utvrđena je inkubacijom protutijelima za pSrc (Y<sub>418</sub>) i ERK te odgovarajućim sekundarnim protutijelima. Na slici je prikazan jedan od dva pokusa koji su pokazali

sličan rezultat. Brojevima (sivo, crveno) označena je relativna ekspresija prema kontrolnim stanicama, dok je crnim brojevima označena relativna ekspresija prema stanicama Cal27. **Utjecaj dasatiniba na preživljenje stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima (B, C, D, E, F, G).** Stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, 24 sata nakon nasađivanja izložene su istovremeno djelovanju dasatiniba (DAS) (E, F, G) 100 nM ili (B, C, D) 1000 nM dasatinibom i različitim koncentracijama protutumorskih lijekova: cisplatin (B, E), mitomicina C (C, F) i etopozida (D, G). Sedamdeset i dva sata nakon, preživljenje stanica je mjereno MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

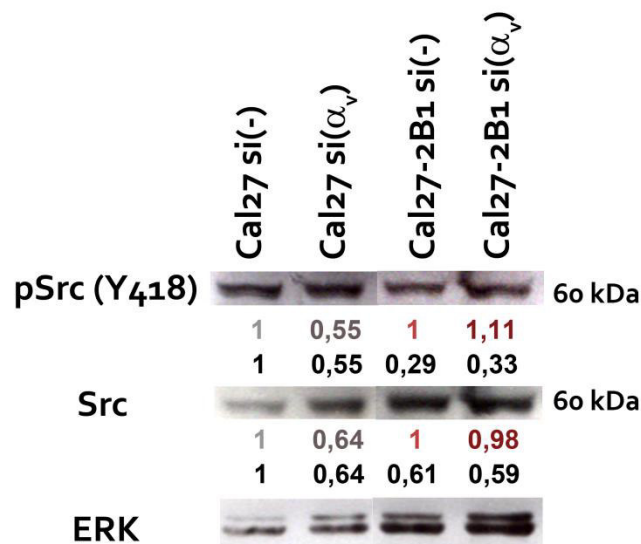
Rezultati MTT testa, u kojem su stanice izložene djelovanju 1000 nM dasatiniba i različitim koncentracijama protutumorskih lijekova cisplatin, mitomicina C i etopozida, pokazali su da u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 ne dolazi do promjene u preživljenju, dok se preživljenje stanica Cal27 povećalo i doseglo razinu preživljenja integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranog klona Cal27-2B1 za sva tri protutumorska lijeka (Slika 25.B, C i D). Isti se trend povećanja preživljenja stanica Cal27 može vidjeti i u pokusima u kojima su stanice izložene djelovanju 100 nM dasatiniba (Slika 15.E; F; G), iako je ta razlika nešto manja, vjerojatno kao posljedica nedovoljne inhibicije fosforilacije pSrc (Y418) u stanicama Cal27.

Na temelju svih ovih rezultata zaključujemo da je u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  potaknula signalni put koji je doveo do smanjenja ekspresije Src i pSrc (Y418), od kojih je upravo smanjenje ekspresije pSrc (Y418) odgovorno za otpornost na protutumorske lijekove. Ovaj zaključak ipak je utemeljen na indirektnom dokazu povećanja preživljenja stanica Cal27 nakon inhibicije fosforilacije pSrc (Y418), čime se imitira primijećeno smanjenje ekspresije pSrc (Y418) u stanicama Cal27-2B1 u odnosu na Cal27.

#### 4.10. Integrini $\alpha_v$ u stanicama Cal27 djeluju preko pSrc (Y418)

Kako smo prethodno pokazali, utišavanjem podjedinice integrina  $\alpha_v$  u stanicama Cal27 dolazi do smanjenja osjetljivosti na djelovanje protutumorskih lijekova cisplatin, mitomicina C i etopozida i istodobnog povećanja osjetljivosti na djelovanje istih lijekova u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 nakon utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  (Slika 19.C; D; E). S obzirom da isti učinak smanjene osjetljivosti Cal27 stanica na protutumorske lijekove vidimo u pokusima utišavanja Src (Slika 23.B i C), kao i u pokusima u kojima izlažemo stanice djelovanju dasatiniba (Slika 25.B; C; D), čime dolazi do smanjenja količine pSrc (Y418) (Slike 23.A i 25.A), htjeli smo provjeriti hipotezu da pri utišavanju podjedinice integrina  $\alpha_v$  dolazi do promjene u količini pSrc (Y418).

Western analiza je pokazala da nakon utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  uistinu dolazi do smanjenja ekspresije ukupnog Src u Cal27 stanicama, i to za 36% u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-) i do smanjenja njegove fosforilirane forme pSrc (Y418) za 45% (Slika 26), te se njihove količine gotovo izjednačavaju sa količinom u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1. Prema tome možemo zaključiti da u stanicama Cal27 signal s integrina  $\alpha_v$  uključuje pSrc (Y418). Međutim, nakon utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 ne dolazi do značajne promjene količine Src i pSrc (Y418) proteina (Slika 26). Rezultati MTT-a dobiveni nakon utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  i izlaganja stanica protutumorskim lijekovima cisplatinu, mitomicinu C i etopozidu u potpunosti su sukladni rezultatima dobivenim dasatinibom, a protein koji je očito u tome ključan je pSrc (Y418).



**Slika 26. Utjecaj utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  na ekspresiju Src i pSrc (Y418) u stanicama Cal27 i Cal27-2B1.** Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane siRNA molekulama specifičnim za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  (si( $\alpha_v$ )) i nespecifičnom siRNA (si(-)). Četrdeset osam sati kasnije uzorci za Western analizu su skupljeni i ekspresija Src i pSrc (Y418) utvrđena je inkubacijom protutijelima za pSrc (Y418), Src i ERK te odgovarajućim sekundarnim protutijelima. Na slici je prikazan jedan od dva pokusa koji su pokazali sličan rezultat. Brojevima (sivo, crveno) označena je relativna ekspresija prema stanicama transficiranim s kontrolnom siRNA (si(-)) za stanice Cal27 i Cal27-2B1, dok je crnim brojevima označena relativna ekspresija prema stanicama Cal27 transficiranim s kontrolnom siRNA (si(-)).

Na temelju svih iznesenih rezultata možemo postaviti hipotezu da je povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 dovela do smanjenja ukupne količine proteina Src i pSrc (Y418), koji su time prestali biti uključeni u signalni put potaknut



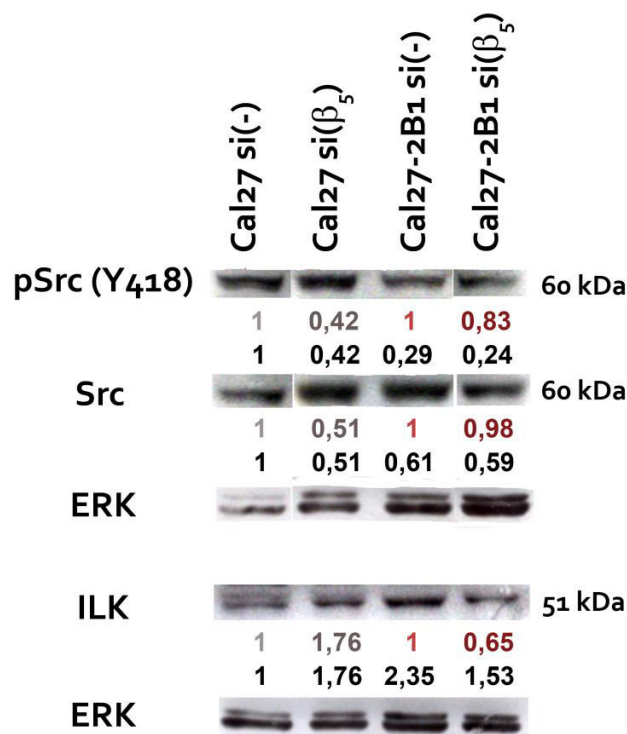
$\alpha_v$  integrinima. Taj događaj doveo je do povećane otpornosti ovih stanica na cisplatinu, mitomicin C i etopozid. Na temelju svih dosadašnjih rezultata možemo pretpostaviti da je pSrc (Y418) u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 zamijenjen s ILK.

#### 4.11. Integrin $\alpha_v\beta_5$ u stanicama Cal27 djeluje preko pSrc, dok u stanicama Cal27-2B1 djeluje preko ILK

Utišavanjem podjedinice integrina  $\alpha_v$  u stanicama Cal27 dolazi do smanjenja osjetljivosti na djelovanje protutumorskih lijekova cisplatine, mitomicina C i etopozida (Slika 19.C; D; E), kao posljedice smanjenja količine pSrc (Y418) (Slika 25.A). Rezultati MTT-a dobiveni nakon utišavanja podjedinice integrina  $\beta_5$  i utišavanja ILK te izlaganja stanica protutumorskim lijekovima cisplatinu, mitomicinu C i etopozidu pokazali su da ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  u Cal27, ali ni povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  u Cal27-2B1 nemaju ulogu u otpornosti. Također je pokazano da promjene u ekspresiji ILK u stanicama Cal27-2B1, nastale kao posljedica integrin  $\beta_3$ -transfekcije stanica Cal27, nisu uzrok promjene otpornosti na protutumorske lijekove. Kako je u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim staničnim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 sa smanjenom ekspresijom Src i pSrc (Y418) došlo do povećane ekspresije ukupnog ILK, moguće je pretpostaviti da je pSrc (Y418) u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 zamijenjen s ILK.

Western analiza je pokazala da u stanicama Cal27 nakon utišavanja podjedinice integrina  $\beta_5$  dolazi do smanjenja ekspresije ukupnog Src, i to za 49% u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-), i do smanjenja njegove fosforilirane forme pSrc (Y418) za 58% (Slika 27), gdje se količina Src u stanicama Cal27 gotovo izjednačava sa količinom Src u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom staničnom klonu Cal27-2B1, dok količina pSrc (Y418) i dalje ostaje veća u stanicama Cal27. Prema tome možemo zaključiti da u stanicama Cal27 signal s integrina  $\alpha_v\beta_5$  uključuje pSrc (Y418). Međutim, nakon utišavanja podjedinice integrina  $\beta_5$  u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom staničnom klonu Cal27-2B1 (koji *de novo* eksprimira integrin  $\alpha_v\beta_3$  i eksprimira povećanu količinu integrina  $\alpha_v\beta_5$  u odnosu na Cal27) ne dolazi do značajne promjene količine proteina Src ni pSrc (Y418) u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA si(-) (Slika 27). Ovi rezultati pokazuju da u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 integrin  $\alpha_v\beta_5$  nije vezan na Src/pSrc (Y418).

Utišavanjem podjedinice integrina  $\beta_5$  u Cal27 stanicama ukupna ekspresija ILK se povećava za 1,76 puta u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA(-) što pokazuje da bi upravo smanjenje ekspresije Src/pSrc (Y418) moglo biti odgovorno za povećanje ekspresije ILK primijećeno u stanicama Cal27-2B1 u odnosu na Cal27. U integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 utišavanjem podjedinice integrina  $\beta_5$  ekspresija ILK se smanjuje za 35% u odnosu na stanice transficirane kontrolnom siRNA si(-) te se gotovo izjednačava s ekspresijom u stanicama Cal27 (Slika 27) ukazujući na povezanost ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  s ILK.



**Slika 27. Utjecaj utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\beta_5$  na ekspresiju Src, pSrc (Y418) i ILK u stanicama Cal27 i Cal27-2B1.** Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane siRNA molekulama specifičnim za podjedinicu integrina  $\beta_5$  (si( $\beta_5$ )) i nespecifičnom siRNA (si(-)). Četrdeset osam sati kasnije uzorci za Western analizu su skupljeni i ekspresija Src, pSrc (Y418) i ILK utvrđena je inkubacijom protutijelima za pSrc (Y418), Src, ILK i ERK. Na slici je prikazan jedan od dva pokusa koji su pokazali sličan rezultat. Brojevima (sivo, crveno) označena je relativna ekspresija prema stanicama transficiranim s kontrolnom siRNA (si(-)) za stanice Cal27 i Cal27-2B1, dok je crnim brojevima označena relativna ekspresija prema stanicama Cal27 transficiranim s kontrolnom siRNA (si (-)).

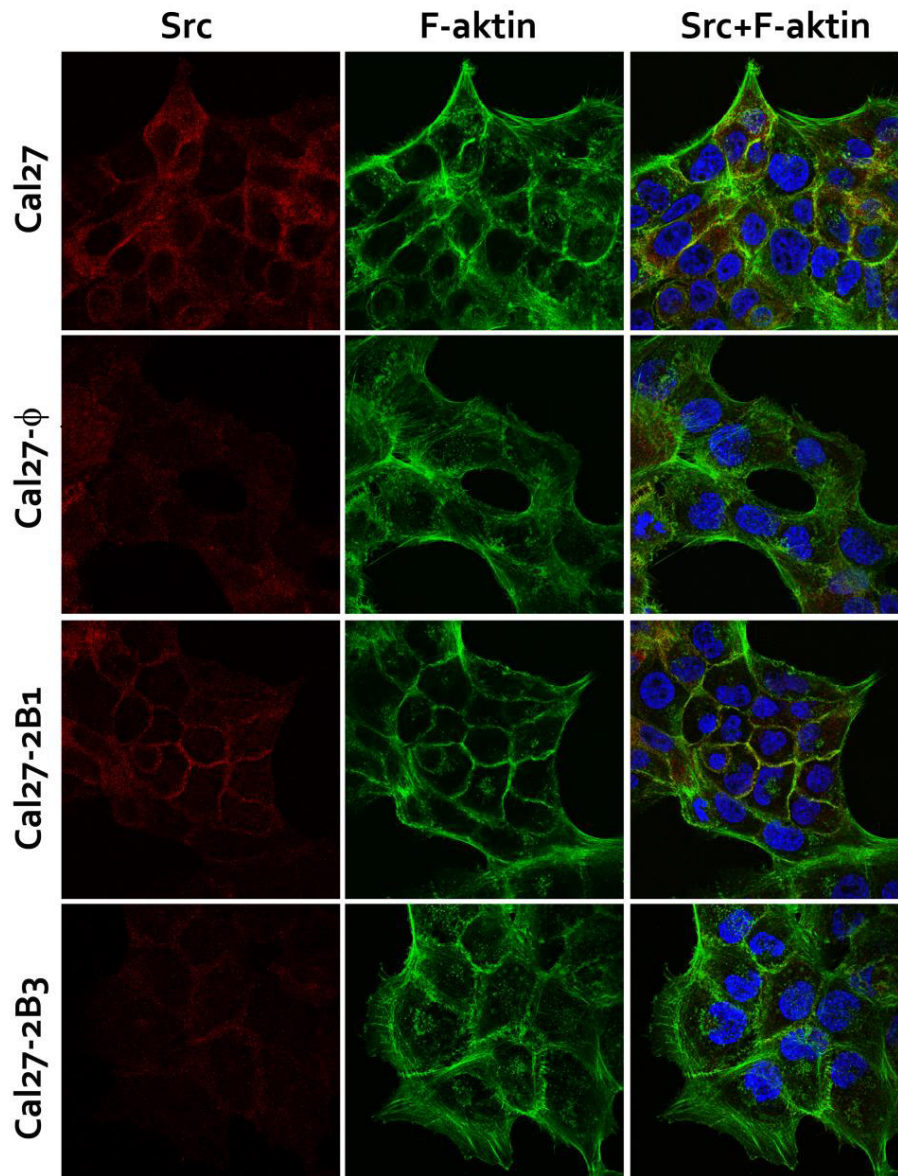
Na temelju svih ovih rezultata zaključujemo da je integrin  $\alpha_v\beta_5$  u stanicama Cal27 vezan na Src, dok se u stanicama Cal27-2B1, u kojima je došlo do *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  i povećane ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$ , taj integrin  $\alpha_v\beta_5$  veže na ILK. Osim toga zaključujemo da postoji veza između ekspresije Src/pSrc (Y418) i ILK jer u stanicama Cal27 smanjenje Src/pSrc (Y418) dovodi do značajnog povećanja ekspresije ILK.

Ostaje otvoreno pitanje preko koje kinaze djeluje integrin  $\alpha_v\beta_3$  u stanicama Cal27-2B1. Iako za direktan odgovor na ovo pitanje treba napraviti imunoprecipitaciju integrina  $\alpha_v\beta_3$  iz stanica Cal27-2B1 i analizu količine ILK Western blotom, iz naših rezultata ipak možemo pretpostaviti odgovor. Utišavanje integrina  $\alpha_v$  smanjilo je ekspresiju Src/pSrc (Y418) u stanicama Cal27, ali nije promijenilo ekspresiju pSrc u stanicama Cal27-2B1 (Slika 26). Prema tome možemo postaviti hipotezu da u stanicama Cal27-2B1 integrin  $\alpha_v\beta_3$  nije vezan za pSrc (Y418), a vrlo je vjerojatno da je vezan za ILK.

#### 4.12. Lokalizacija Src, pSrc (Y418) i aktina u stanicama modela Cal27

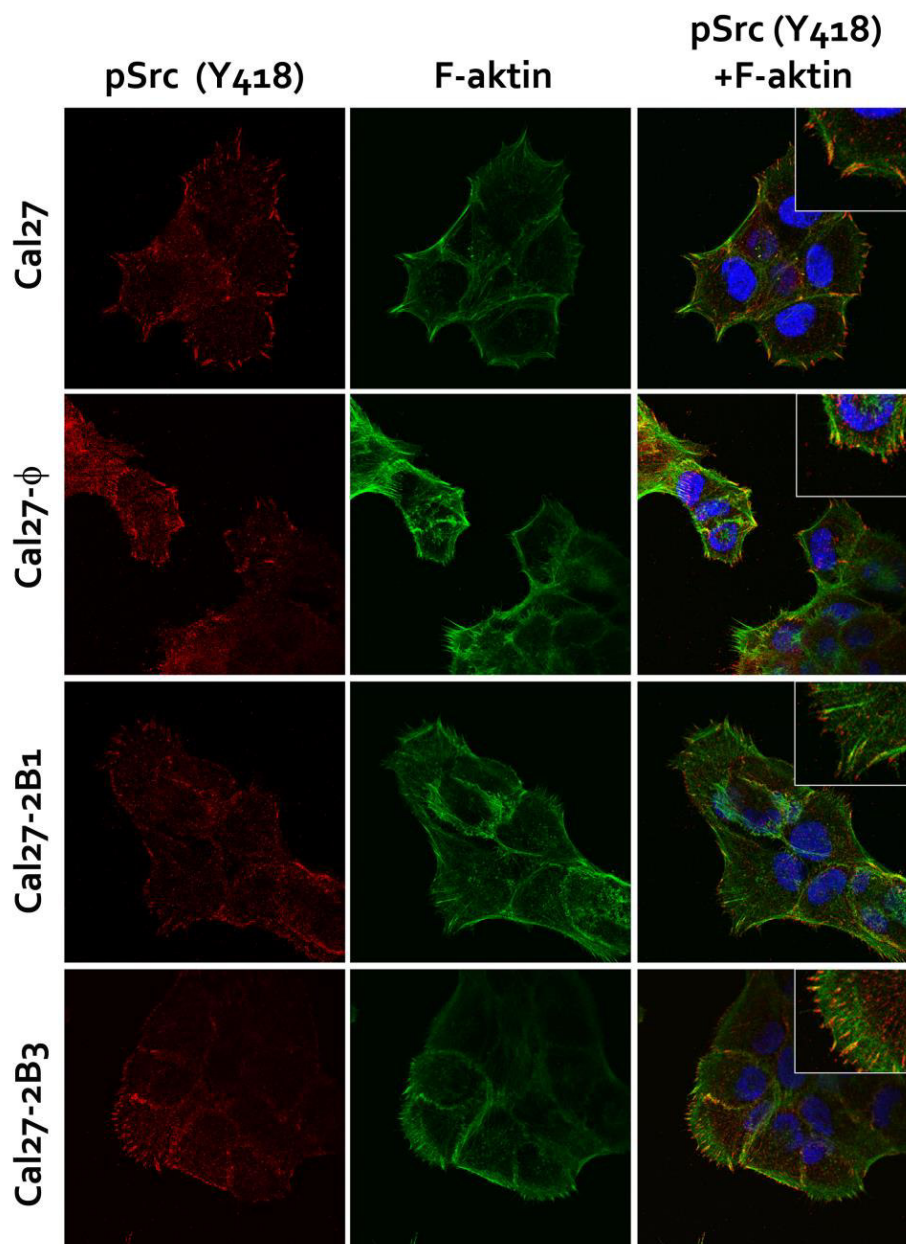
Vežanje integrina s proteinima izvanstaničnog matriksa potiče nakupljanje integrina, reorganizaciju aktina te stvaranje i reorganizaciju stresnih niti i kompleksa fokalnih adhezija, čime integrini osiguravaju dinamičku fizičku vezu između proteina izvanstaničnog matriksa (ECM) i aktinskog citoskeleta (Takada i sur. 2007; Geiger i Yamada 2011).

Prethodnim eksperimentima utvrdili smo ključnu ulogu pSrc (Y418) u osjetljivosti stanica Cal27 na protutumorske lijekove cisplatinu, mitomicin C i etopozid. Kako bi pokazali lokalizaciju Src i pSrc (Y418) u odnosu na aktinski citoskelet u stanicama modela Cal27, koristili smo metodu imunofluorescencije u kojoj smo protutijelima specifičnim za Src i pSrc (Y418) te faloidinom obilježenim fluorescentnom bojom FITC koji se veže na aktin odredili njihov smještaj u stanici. Rezultati prikazani na slikama 28. i 29. pokazuju raspodjelu Src i pSrc (Y418) u stanicama istovremeno s izgledom aktinskog citoskeleta u stanicama modela Cal27.



**Slika 28.** Lokalizacija Src i aktinskog citoskeleta u stanicama modela Cal27. Stanice su nasađene na prethodno sterilizirana pokrovna stakalca. Nakon 48 sati stanice se fiksiraju, permeabiliziraju i inkubiraju primarnim zečjim protutijelom specifičnim za Src i sekundarnim protutijelom protiv zečjih imunoglobulina obilježenim Alexa fluor 555 fluorescentnom bojom te faloidinom obilježenim FITC-om koji se veže na aktin i snimljene konfokalni mikroskopom LeicaTSC SP2. Crvena boja označava Src a zelena boja aktin. Jezgre su bojane bojom TO-PRO-3.

Protein Src nalazimo raspršen unutar stanica modela Cal27 (Slika 28), dok se pSrc (Y418) nalazi na vrhovima aktinskih niti (Slika 29, narančasto obojenje) u fokalnim adhezijama stanica modela Cal27.



**Slika 29. Lokalizacija pSrc (Y418) i aktinskog citoskeleta u stanicama modela Cal27.** Stanice su nasadene na prethodno sterilizirana pokrovna stakalca. Nakon 48 sati stanice se fiksiraju, permeabiliziraju i inkubiraju primarnim zečjim protutijelom specifičnim za pSrc (Y418) i sekundarnim protutijelom protiv zečjih imunoglobulina obilježenim Alexa fluor 555 fluorescentnom bojom te faloidinom obilježenim FITC-om koji se veže na aktin i snimljene konfokalni mikroskopom LeicaTSC SP2. Crvena boja označava pSrc (Y418) a zelena boja aktin. Jezgre su bojane bojom TO-PRO-3.

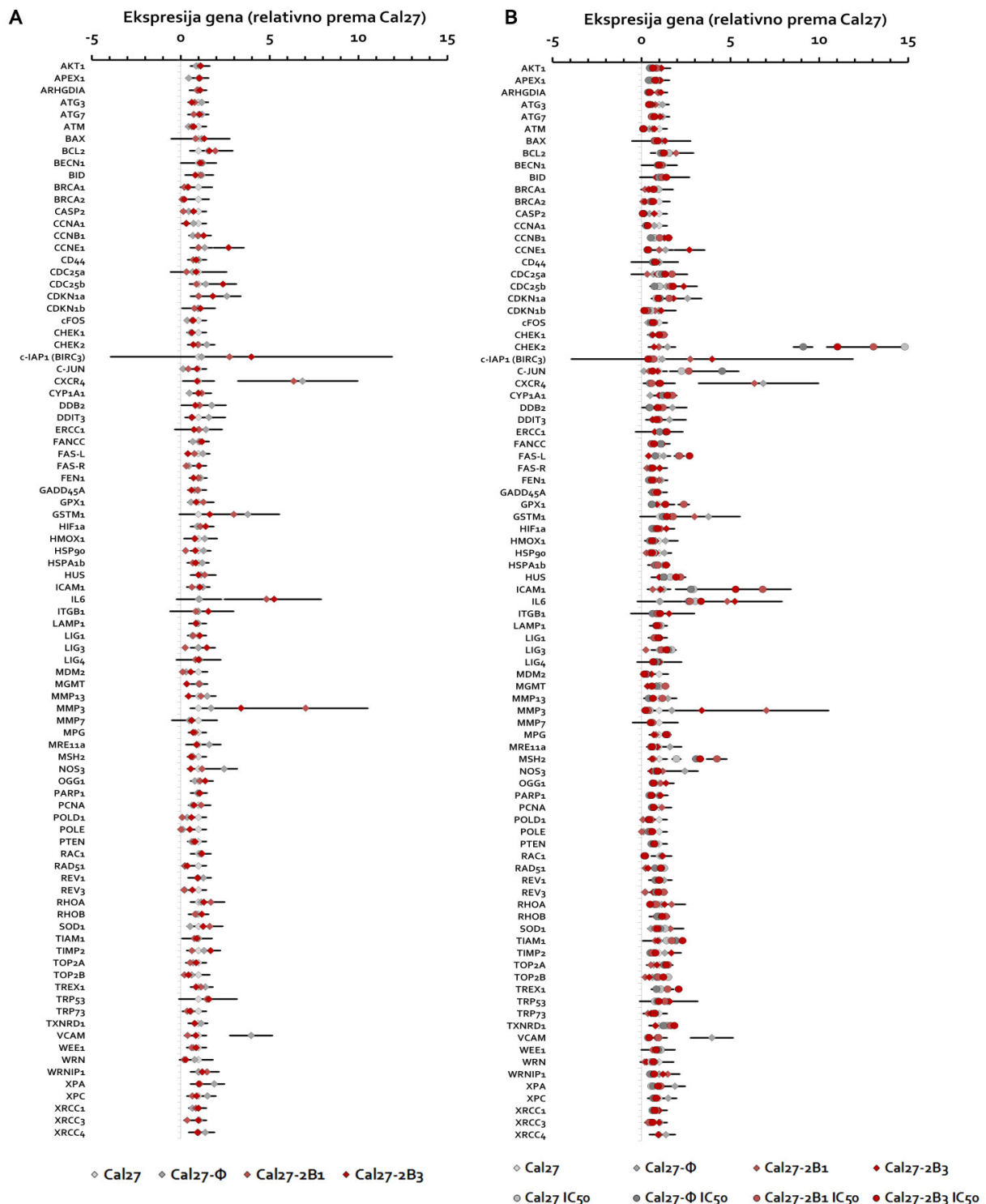
Iako smo Western analizom vidjeli razlike u količini Src i pSrc (Y418) između stanica Cal27, kontrolnog klona Cal27-Φ i integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih staničnih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3, imunofluorescencijom, koja nema obilježje kvantitativne metode, ovaj rezultat nismo mogli potvrditi. Međutim, ovi rezultati potvrđuju ispravan smještaj pSrc

(Y418) u fokalnim adhezijama, gdje dolazi do njegove interakcije s integrinima koji su na površini stanice.

#### **4.13. Promjene u ekspresiji gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa, popravak DNA oštećenja, apoptozu, autofagiju i pokretljivost stanica u stanicama modela Cal27**

Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (*real-time* RT-PCR) analizirali smo ekspresiju gena uključenih u signalne puteve koji reguliraju pokretljivost stanica, popravak oštećenja DNA, stanični ciklus, apoptozu i autofagiju, kako bismo identificirali gene eventualno uključene u mehanizam otpornosti na protutumorske lijekove. Na slici 30. prikazana je relativna ekspresija gena u stanicama modela Cal27 (Slika 30.A), te ekspresija gena nakon djelovanja ekvitoksične koncentracije cisplatine, pri kojoj je preživljenje stanica modela Cal27 50% (Slika 30.B), u odnosu na stanice Cal27.

Analizom svih gena (Prilog 1) izdvojili smo one za koje je u stanicama modela Cal27 nađena statistički značajna promjena u ekspresiji (Tablica 25), bilo da se radi o promjeni u konstitutivnoj ekspresiji ili promjeni u ekspresiji gena nakon izlaganja stanica djelovanju ekvitoksične koncentracije cisplatine (IC<sub>50</sub>, vrijednost pri kojoj je preživljenje stanica 50%), koja za stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27-Φ iznosi 0,375 µg/mL, dok je za integrin β<sub>3</sub>-stabilno transficirane klonove Cal27-2B1 i Cal27-2B3 veća i iznosi 1 µg/mL.



Slika 30. Ekspresija gena u stanicama modela Cal27 dobivena pomoću metode *real-time* RT-PCR: konstitutivna ekspresija i ekspresija nakon izlaganja stanica koncentraciji cisplatinе pri kojoj je preživljenje stanica 50 %. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć dva kontrolna gena (GAPDH, ACTB), Prikazan je jedan od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

Tablica 25. Promjene u ekspresiji gena u stanicama modela Cal27, konstitutivno i nakon izlaganja stanica koncentraciji cisplatinu pri kojoj je preživljenje stanica 50%.

	KONSTITUTIVNA EKSPRESIJA GENA	EKSPRESIJA GENA NAKON IZLAGANJA IC <sub>50</sub> KONCENTRACIJI CISPLATINE	GENI
1	konstitutivno jednaka	značajno snižena, smanjuje se u svim stanicama jednako	<i>ARHGDI1</i> <i>ATG3</i> <i>Bax</i> <i>CCNB1</i> <i>CD44</i> <i>MGMT</i> <i>MMP7</i>
2	konstitutivno povećano ekspimirana u otpornim stanicama	smanjuje se u svim stanicama	<i>MMP3</i>
3	konstitutivno smanjeno ekspimirana u otpornim stanicama	povećava se u svim stanicama i izjednačava se s ekspresijom u kontrolnim stanicama	<i>WRN</i> <i>TOP2B</i>
4	konstitutivno smanjeno ekspimirana u otpornim stanicama	izjednačava se i pada u svim stanicama na vrijednost nižu od konstitutivne u otpornim stanicama	<i>CCNA1</i>
5	konstitutivno povećano ekspimirana u otpornim stanicama	znatno se povećava te nema razlike između kontrolnih i otpornih stanica	<i>c-IAP1 (BIRC3)</i>
6	konstitutivno povećano ekspimirana u otpornim stanicama	raste u svim stanicama tako da se zadržava povećana ekspresija u otpornim s obzirom na kontrolne stanice	<i>IL6</i>
7	konstitutivno jednaka	raste u svim stanicama jednako	<i>ITGB1</i> <i>NOS3</i> <i>TIMP2</i>

Geni čija je ekspresija konstitutivno jednaka u stanicama modela Cal27, a čija se ekspresija u svim stanicama nakon izlaganja djelovanju cisplatinu, pri kojoj je preživljenje stanica 50%, smanjuje na jednaku razinu su *ARHGDI1*, *ATG3*, *Bax*, *CCNB1*, *CD44*, *MGMT* i *MMP7*. Da su ovi geni uključeni u mehanizam otpornosti na djelovanje cisplatinu očekivali bi razlike u ekspresiji između stanica Cal27 i kontrolnog klona Cal27-Φ prema integrin β<sub>3</sub>-stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, bilo da se radi o promjeni na konstitutivnoj razini ili promjeni u ekspresiji gena nakon djelovanja IC<sub>50</sub> koncentracije cisplatinu.



Isto vrijedi i za gene *ITGB1*, *NOS3* i *TIMP2*, koji su konstitutivno jednako eksprimirani u stanicama modela Cal27, a djelovanjem cisplatine njihova ekspresija raste jednako u svim stanicama, stoga zaključujemo da su promjene u ove dvije skupine gena posljedica samog djelovanja cisplatine ali nemaju ulogu u otpornosti.

Konstitutivno smanjeno eksprimirani geni u otpornim stanicama su geni *CCNA1*, *TOP2B* i *WRN*. Međutim, dok se ekspresija *WRN* i *TOP2B* nakon djelovanja cisplatine povećava u svim stanicama i izjednačava s ekspresijom u kontrolnim stanicama, ekspresija *CCNA1* nakon djelovanja cisplatine se izjednačava, ali i pada u svim stanicama na vrijednost nižu od konstitutivne u otpornim stanicama. Kako su studije pokazale da je smanjena ekspresija *WRN* povezana s povećanom osjetljivošću na djelovanje različitih protutumorskih lijekova (Futami i sur. 2007; Masuda i sur. 2012; Wang i sur. 2013), a u našem je sustavu došlo upravo do suprotnog učinka, zaključujemo da ove promjene nisu vezane za otpornost. DNA topoizomeraza 2-beta, koju kodira *TOP2B* gen, ciljna je molekula protutumorskih lijekova, kao što su etopozid, doksorubicin i mitoksantron, koji se nazivaju TOP2 otrovi (Nitiss 2009), ali ne i cisplatine, pa stoga ovaj gen vrlo vjerojatno nije uključen u mehanizam otpornosti. U literaturi postoje kontradiktorni podaci o ulozi ekspresije proteina ciklin A1, kojeg kodira *CCNA1* gen u otpornosti stanica na djelovanje protutumorskih lijekova (Volm i sur. 2002; Wegiel i sur. 2008), a niti jedan od njih ne uključuje otpornost na djelovanje cisplatine, pa ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je promjena koju vidimo zaslužna za otpornost integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3.

U literaturi postoje podaci koji povezuju ekspresiju *MMP3* s otpornosti stanica na cisplatinu (Blons i sur. 2004; Varma i sur. 2005; Januchowski i sur. 2014). Ekspresija gena koji kodira matriks metaloproteinazu 3 (*MMP-3*), konstitutivno je povećana u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, a nakon izlaganja cisplatinu smanjuje se u svim stanicama, međutim, u Cal27-2B1 i dalje ostaje dvostruko veća ekspresija ovog gena nego što je u ostalim stanicama, pa stoga zaključujemo da ove promjene nisu vezane za otpornost integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova na djelovanje cisplatine.

Za razliku od ekspresije gena za *MMP3*, geni koji su konstitutivno povećani u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima, a kod kojih dolazi do povećanja ekspresije nakon djelovanja cisplatine su *c-IAP1* (*BIRC3*) i *IL6*. Ekspresija gena *c-IAP1* (*BIRC3*) znatno se povećava i dolazi na razinu na kojoj nema razlike između kontrolnih i otpornih stanica, dok

ekspresija gena *IL6* nakon djelovanja cisplatine raste u svim stanicama tako da se zadržava povećana ekspresija u otpornim stanicama s obzirom na kontrolne stanice. Pokazano je da povećana ekspresija *c-IAP1 (BIRC3)* gena, koji kodira dva člana obitelji inhibitora apoptoze, *cIAP1/BIRC2* i *cIAP2/Birc3*, korelira sa povećanom otpornosti na djelovanje protutumorskih lijekova (Tamm i sur. 2000; Imoto i sur. 2001; Amantana i sur. 2004; Notarbartolo i sur. 2004), a povećana ekspresija *IL6* gena, koji kodira interleukin 6 (IL-6), povezana je s povećanom otpornosti na protutumorske lijekove u različitim vrstama tumora (Borsellino i sur. 1995; Mizutani i sur. 1995; Conze i sur. 2001; Wang i sur. 2010). Prema tome ovi geni su potencijalno uključeni u mehanizam otpornosti na djelovanje cisplatine u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3.

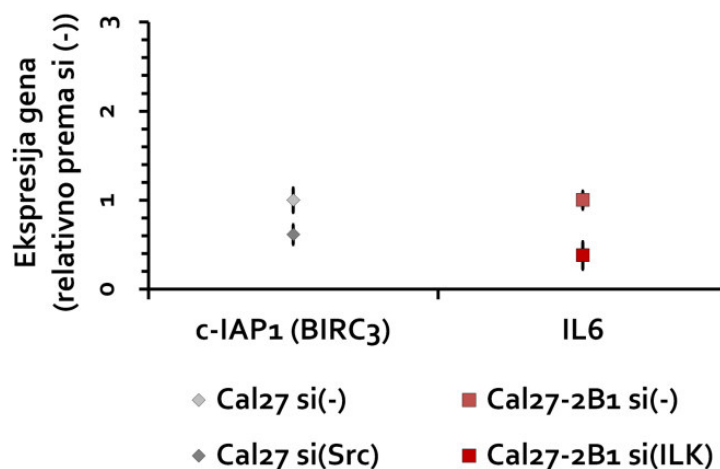
#### 4.14. Utjecaj utišavanja ILK i Src na diferencijalno eksprimirane gene u stanicama modela Cal27

U dosadašnjem istraživanju pokazana je značajno smanjena razina ekspresije ukupnog proteina Src i pSrc (Y418) u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$ . Osim toga pokazana je nešto veća ukupna količina proteina ILK u stanicama Cal27-2B1 i Cal27-2B3, i značajno smanjena njegova fosforilirana forma pILK (T173) u odnosu na stanice Cal27 i Cal27- $\Phi$  (Slika 21).

Utišavanje gena Src specifičnom siRNA u stanicama Cal27 smanjuje se količina proteina Src, ali i pSrc (Y418), te ima za posljedicu približavanje razine osjetljivost Cal27 stanica na cisplatinu i mitomicin C integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 (Slika 23). Konačno, smanjivanjem količine pSrc (Y418) dasatinibom identificirana je molekula pSrc (Y418) kao ključna molekula za otpornost budući da ima za posljedicu dovođenje osjetljivost Cal27 stanica na cisplatinu, mitomicin C i etopozid, na razinu zabilježenu za integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klon Cal27-2B1 (Slika 25).

Analizom ekspresije gena uključenih u signalne puteve koji reguliraju pokretljivost stanica, popravak oštećenja DNA, stanični ciklus, apoptozu i autofagiju (Slika 30, tablica 25) pretpostavili smo moguću ulogu inhibitora apoptoze, *cIAP1/BIRC2* i *cIAP2/BIRC3* i/ili interleukina 6 u otpornosti klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na djelovanje cisplatine. Kako bismo odredili da li su primijećene promjene u *cIAP1/BIRC2* i *cIAP2/BIRC3* i/ili interleukinu 6

vezane za ekspresiju Src i/ili ILK, proveli smo utišavanje Src i ILK u stanicama Cal27 i Cal27-2B1 i metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu nakon obrnutog prepisivanja (*real-time* RT-PCR) odredili ekspresiju gena *cIAP1* (*BIRC3*) i *IL6*. Slika 31 pokazuje relativnu ekspresiju gena *cIAP1* (*BIRC3*) u stanicama Cal27 nakon utišavanja Src u odnosu na stanice Cal27 transficirane kontrolnom siRNA, i relativnu ekspresiju gena *IL6* u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 nakon utišavanja ILK u odnosu na stanice Cal27-2B1 transficirane kontrolnom siRNA.



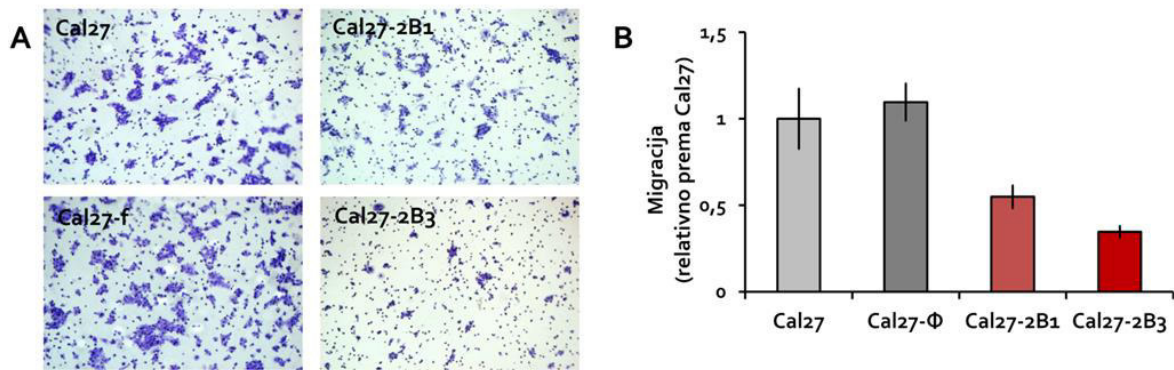
Slika 31. Ekspresija diferencijalno ekspimiranih gena u stanicama Cal27 nakon utišavanja Src i u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 nakon utišavanja ILK dobivena uz pomoć metode *real-time* RT-PCR. Ekspresija gena normalizirana je uz pomoć dva kontrolna gena (GAPDH i ACTB). Prikazan je jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

Utišavanjem Src specifičnom siRNA (si(Src)) u stanicama Cal27 došlo je do nešto manje ekspresije gena *cIAP1* (*BIRC3*) u odnosu na stanice Cal27 transficirane kontrolnom siRNA (Slika 31). Gen koji kodira inhibitore apoptoze, *cIAP1* (*BIRC3*) konstitutivno je pojačano ekspimiran u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, a djelovanjem cisplatine povećava se i izjednačava u svim stanicama modela Cal27, stoga je bilo za očekivati da će utišavanje Src, koje vodi k približavanju razine osjetljivost Cal27 stanica na cisplatinu i mitomicin C u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1, dovesti do povećanja ekspresije *cIAP1* (*BIRC3*) gena. Kako je promjena ekspresije krenula u suprotnom smjeru, zaključujemo da se ne radi o molekuli povezanoj s mehanizmom otpornosti stanica Cal27-2B1 potaknutim transfekcijom gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$ .

Utišavanje ILK u stanicama Cal27-2B1 dovelo je do statistički značajno smanjene ekspresije gena *IL6* u odnosu na stanice Cal27-2B1 transficirane kontrolnom siRNA (Slika 31). Konstitutivna ekspresija gena *IL6* povećana je u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, a djelovanjem cisplatine raste u svim stanicama tako da se zadržava povećana ekspresija u otpornim stanicama s obzirom na kontrolne stanice. Kako je iz literature poznato da ILK pozitivno utječe na ekspresiju interleukina 6 (Wani i sur. 2011), bilo je za očekivati da će utišavanje ILK u stanicama Cal27-2B1 dovesti do smanjene ekspresije *IL6* gena, što su rezultati prikazani na slici 31 potvrdili. Stoga se može zaključiti da je ekspresija interleukina 6 vezana na ekspresiju ILK u stanicama modela Cal27 i nije povezana s mehanizmom otpornosti stanica Cal27-2B1 potaknutim transfekcijom gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$ .

#### 4.15. Integrin $\beta_3$ -stabilno transficirane stanične linije Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju smanjenu migratornu sposobnost prema kontrolnim stanicama Cal27 i Cal27- $\Phi$

Vežanje integrina za proteine izvanstaničnog matriksa vodi do aktivacije signalnih putova koji utječu na sposobnost migracije stanica, koja je neophodna za normalan razvoj tkiva, održavanje homeostaze i popravak, ali ima i važnu ulogu u patološkim stanjima organizma te predstavlja preduvjet za invaziju i metastaziranje tumora (Wong i sur. 1998; Hood i Cheresch 2002). Kako bi izmjerili sposobnosti migracije stanica modela Cal27 određen je broj prethodno izglednijih stanica koje su migrirale kroz pore Boyden komorica (Slika 32.A) prema serumu kao kemoatraktantu. Slika 32.B prikazuje kvantifikaciju relativne migracije integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3, te kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  prema stanicama Cal27. Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju značajno smanjenu sposobnost migracije, i to za 45%, odnosno 65% u odnosu na stanice Cal27, dok se migracija kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  ne razlikuje značajno od one izmjerene za stanice Cal27. S obzirom da je u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 zabilježena smanjena količina pSrc (Y418) ovaj rezultat je u skladu s našim očekivanjima, jer je pokazano da povećana fosforilacija Src korelira sa povećanom sposobnošću migracije stanica (Shor i sur. 2007; Meenderink i sur. 2010; Zhu i sur. 2013).



**Slika 32. Migracija stanica modela Cal27.** (A) Test migracije stanica modela Cal27. Dvadeset i četiri sata nakon izgladnjivanja stanica inkubacijom u hranjivoj podlozi DMEM, stanice se nasade u Boyden komorice za migraciju te se ostave migrirati prema hranjivoj podlozi DMEM-FCS koja se nalazi s druge strane membrane s rupama promjera 8  $\mu\text{m}$ . Nakon 24 sata stanice koje su prošle kroz rupe na drugu stranu membrane Boyden komorica se fiksiraju i slikaju pod mikroskopom te izbroje, a rezultati statistički obrade. (B) Kvantifikacija relativne migracije integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3, kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  prema stanicama Cal27. Prikazan je reprezentativni pokus od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

## **5. RASPRAVA**

Otpornost posredovana integrinima, jedan od mehanizama otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove, posljedica je interakcije stanica s izvanstaničnim matriksom preko integrina. Integrini djeluju kao mehanosenzori, adhezijske molekule i mjesta prijenosa signala, a integrinima posredovane interakcije s izvanstaničnim matriksom važne su za prihvaćanje stanica, organizaciju citoskeleta, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica tijekom velikog broja bioloških procesa poput embrionalnog razvitka, imunskog odgovora, resorpcije kosti, agregacije trombocita te patoloških procesa poput upale, angiogeneze i metastaziranja tumora (Hynes 2002; Guo i Giancotti 2004). Integrini  $\alpha_v\beta_3$  i/ili  $\alpha_v\beta_5$  aktiviraju signalne puteve kojima se smanjuje osjetljivost različitih tipova stanica na protutumorske lijekove, kao što je inhibicija apoptoze, smanjena proliferacija stanica ili promjena u molekuli na koju protutumorski lijek ciljano djeluje (Uhm i sur. 1999; Maubant i sur. 2002; Kozlova i sur. 2004; Menendez i sur. 2005; Vellon i sur. 2007; Brozovic i sur. 2008; Wang i sur. 2009; Jinushi i sur. 2012; Tumbarello i sur. 2012; Long i sur. 2013). Osim što se nalaze na samim tumorskim stanicama, gdje reguliraju migraciju i invaziju (Desgrosellier i Cheresh 2010), integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  nalaze se i na endotelnim stanicama u angiogenezi u tumoru, gdje imaju ključnu ulogu u stvaranju krvnih žila tumora i na taj način omogućavaju njegov rast (Weis i Cheresh 2011). Prema tome, integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  predstavljaju ciljne molekule za terapiju tumora s idejom inhibicije angiogeneze, ali s obzirom da imaju i ulogu u osjetljivosti stanica tumora na protutumorske lijekove, predstavljaju i ciljne molekule na stanicama tumora s idejom povećanja osjetljivosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove. Primjerice, u stanicama glioma, integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  koji vežu vitronektin, okidaju signale koji štite stanice od djelovanja inhibitora topoizomeraze I, topotekana (Uhm i sur. 1999). Povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  pokazana je u stanicama tumora dojke otpornim na cisplatinu dobivenih višekratnim izlaganjima stanica cisplatinu (Maubant i sur. 2002), dok je povećana količina integrina  $\alpha_v\beta_3$  pokazana u stanicama karcinoma grkljana čovjeka (HEp2) otpornim na cisplatinu dobivenim na sličan način (Ambriović-Ristov i sur. 2004). Izravan dokaz da povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  na stanicama HEp2 osigurava otpornost na cisplatinu, ali istovremeno i na doksorubicin i mitomicin C, dobiven je istraživanjem integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih stanica HEp2 koje ekspimiraju na svojoj površini integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *De novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  u HEp2 stanicama povećala je ukupnu količinu glutationa, koja je omogućila bolje preživljenje stanica djelotvornijim uklanjanjem nastalih reaktivnih kisikovih vrsta u stanici

koje nastaju kao posljedica djelovanja spomenutih protutumorskih lijekova (Brozovic i sur. 2008). Svi ovi rezultati potakli su nas da bolje istražimo mogućnost *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  i njegovu ulogu u otpornosti tumorskih stanica na djelovanje protutumorskih lijekova i to u modelu stanica karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka (Cal27). Rezultati opisani u ovoj disertaciji pokazuju da *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  povećava otpornost stanica Cal27 na protutumorske lijekove smanjivanjem količine pSrc (Y418).

Stanice Cal27 ne ekspimiraju mRNA specifičnu za podjedinicu integrina  $\beta_3$  (Slika 11), kao ni integrin  $\alpha_v\beta_3$  na svojoj površini (Slika 12), ali je zato u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 potvrđena ekspresija mRNA specifične za podjedinicu integrina  $\beta_3$ , čija je količina veća u klonu Cal27-2B1 od one u klonu Cal27-2B3 (Slika 11), što je u skladu s količinom integrina  $\alpha_v\beta_3$  ekspimiranog na površini stanice (Slika 12). Kako se podjedinica integrina  $\beta_3$  može vezati samo na podjedinice  $\alpha_{IIb}$  i  $\alpha_v$ , a integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nalazimo samo na trombocitima, u ovim klonovima je bez sumnje došlo do *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  vezanjem podjedinice integrina  $\beta_3$  na slobodnu količinu podjedinice integrina  $\alpha_v$  u stanici. Transfekcija podjedinice integrina  $\beta_3$  u stanicama Cal27-2B1 i Cal27-2B3 dovela je i do povećane ekspresije heterodimera  $\alpha_v\beta_5$  na površini stanica (Slika 12) i to preko poticanja ekspresije mRNA specifične za podjedinicu integrina  $\beta_5$  (Slika 13). Ekspresija heterodimera  $\alpha_v\beta_5$  veća je u klonu Cal27-2B3 nego u klonu Cal27-2B1 iako je količina mRNA manja u Cal27-2B3 nego u klonu Cal27-2B1. U stanicama Cal27-2B1 i Cal27-2B3, u odnosu na stanice Cal27 i kontrolni klon Cal27- $\Phi$ , nisu pronađene razlike u ekspresiji mRNA za ostale  $\beta$  podjedinice koje se mogu vezati na podjedinicu  $\alpha_v$ , niti za ekspresiju mRNA podjedinice  $\alpha_v$  (Slika 13). Povećanje ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  na površini stanica odražava se u povećanoj količini ukupne podjedinice integrina  $\alpha_v$  (Slika 12).

Santala i Heino (1991) pretpostavili su da je količina određenog heterodimera integrina na površini stanice ovisna o ekspresiji podjedinice integrina  $\alpha_v$ , zbog toga što uvijek postoji višak podjedinica  $\beta$  u stanici. U stanicama Cal27-2B1 transfekcijom integrina  $\beta_3$  došlo je do pratećeg povećanja ekspresije podjedinice integrina  $\beta_5$  (Slika 13). Kako se količina podjedinice integrina  $\alpha_v$  nije transkripcijski povećala (Slika 13), vrlo je vjerojatno da je ona ograničavajući faktor vezanja podjedinica  $\beta$ . Stoga je povećana količina integrina  $\alpha_v\beta_3$  u klonu Cal27-2B1, veća od one u klonu Cal27-2B3, dovela do manje količine integrina  $\alpha_v\beta_5$  na površini klona Cal27-2B1 jer nema dovoljno slobodne podjedinice integrina  $\alpha_v$  na koju bi se ostatak podjedinice integrina  $\beta_5$  vezao. Obrnuto, manja količina transficiranog gena za



podjedinicu integrina  $\beta_3$  u klonu Cal27-2B3 dovela je do manjeg povećanja ekspresije podjedinice integrina  $\beta_5$ , iako je ekspresija mRNA specifične za podjedinicu integrina  $\beta_5$  veća u klonu Cal27-2B1 nego u klonu Cal27-2B3 (Slika 13). Međutim, kako je nakon vezanja podjedinice integrina  $\beta_3$  u heterodimer  $\alpha_v\beta_3$  ostalo više slobodne podjedinice integrina  $\alpha_v$ , na nju se moglo vezati više podjedinice integrina  $\beta_5$  i zbog toga je došlo do veće ekspresije heterodimera  $\alpha_v\beta_5$  u klonu Cal27-2B3 (Slika 12).

Ovakva regulacija ekspresije integrina drugačija je od one opisane na modelu HEP2, u kojem su Ambriović-Ristov i suradnici (2004) transfekcijom gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$  izdvojili 6 klonova u kojima je došlo do *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$ , tako da je svaki sljedeći klon imao veću ekspresiju od prethodnog. Mjerenje ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  u ovim klonovima pokazalo je da u prva tri klona, u kojima je eksprimirana relativno mala količina integrina  $\alpha_v\beta_3$ , dolazi do vrlo malog smanjenja ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  i to vrlo vjerojatno zbog kompeticije podjedinica integrina  $\beta_3$  i  $\beta_5$  za raspoloživu podjedinicu integrina  $\alpha_v$ , dok ekspresija ukupne količine podjedinice integrina  $\alpha_v$  nije promijenjena. U druga tri klona, u kojima je eksprimirana veća količina integrina  $\alpha_v\beta_3$ , dolazi do značajnog smanjenja ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$ , ali i do povećanja ukupne količine podjedinice integrina  $\alpha_v$  na površini stanice, praćenog povećanom transkripcijom gena za podjedinicu integrina  $\alpha_v$ . Točan mehanizam ovih promjena, posebice transkripcijskog povećanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  nije poznat (Majhen i sur. 2009).

U staničnim modelima HEP2 (Ambriović-Ristov i sur. 2004) i Cal27 (ovaj rad) istraživana je povećana ekspresija kao posljedica stabilne transfekcije, međutim, u modelu stanica MDA-MB-453S istraživana je učinak utišavanja podjedinica  $\beta_3/\beta_5$  već prisutnih heterodimera integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  i pokazano je da postoji ravnoteža u njihovoj ekspresiji (Stojanović i sur., neobjavljeni podaci). Utišavanjem podjedinice integrina  $\beta_3$  smanjila se ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$ , ali se povećala ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$ . S druge strane, utišavanje podjedinice integrina  $\beta_5$  smanjilo je ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_5$ , i povećalo ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Pretpostavka je da se podjedinica integrina  $\alpha_v$ , oslobođena nakon transfekcije  $\beta_3$ - odnosno  $\beta_5$ - specifične siRNA, spojila sa podjedinicom  $\beta_5$  odnosno  $\beta_3$  prisutnom u stanici u suvišku i dovela do povećanja ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  odnosno  $\alpha_v\beta_3$ . Pri ovim utišavanjima količina ukupne podjedinice integrina  $\alpha_v$  nije se značajno mijenjala. Za ovakav jednostavan primjer tzv. vage u ekspresiji integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  vrlo je vjerojatno odgovorno to da ove stanice na svojoj površini nemaju integrin  $\alpha_v\beta_1$ , koji bi eventualno mogao povući slobodan  $\alpha_v$  nakon

utišavanja gena za  $\beta_3$  ili  $\beta_5$  podjedinice integrina. Još je primjera u literaturi koji pokazuju drugačije regulacije. Tako na modelu stanica karcinoma gušterače FG koje eksprimiraju integrin  $\alpha_v\beta_5$ , ali ne i integrin  $\alpha_v\beta_3$ , transfekcija gena za podjedinicu integrina  $\beta_3$  i *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  nije utjecala na ekspresiju drugih  $\alpha_v$  integrina (Leavesley i sur. 1992). Svi ovi rezultati pokazuju da je regulacija ekspresije integrina na površini stanice ovisna o modelu stanice i već postojećem repertoaru integrina.

Povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  na površini stanice nužno vodi prema povećanoj sposobnosti stanica da se vežu na komponente izvanstaničnog matriksa (Hynes 1992). Ova veza između ekspresije integrina i adhezije vrijedi i u modelu Cal27, u kojem stanice s povećanom ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  jače adheriraju na vitronektin i fibronektin, a uspješnost vezanja korelira s količinom integrina na površini stanice. Tako se na fibronektin, na koji se veže integrin  $\alpha_v\beta_3$ , jače vezao klon Cal27-2B1 koji ima više integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Slika 14.C), dok sposobnost vezanja na vitronektin, koji veže oba integrina, korelira s količinom ukupne ekspresije podjedinice integrina  $\alpha_v$  i najveća je u klonu Cal27-2B3 (Slika 14.B). I na stanicama tumora jajnika IGROV-1 pokazana je zajednička uloga ova dva integrina u vezanju stanica na vitronektin (Maubant i sur. 2007).

Unatoč tome što je objavljen niz radova koji pokazuju da ekspresija integrina može osigurati povećano preživljenje različitih tipova tumorskih stanica (Damiano i sur. 1999; Sethi i sur. 1999) nakon izlaganja protutumorskim lijekovima, u literaturi postoje oskudni podaci o tome da upravo integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  direktno posreduju u otpornosti na protutumorske lijekove, no svi oni redom pokazuju da povećana ekspresija ovih integrina dovodi do pojave smanjene osjetljivosti stanica na izlaganje djelovanju protutumorskih lijekova poticanjem signalnih puteva koji štite stanicu od smrti (Uhm i sur. 1999; Menendez i sur. 2005; Wang i sur. 2009). Stoga je vrlo izgledno da se modulacijom ekspresije integrina na površini stanica može mijenjati osjetljivost stanica na djelovanje protutumorskih lijekova. Brozovic i suradnici (2008) pokazali su na modelu stanica karcinoma grkljana čovjeka (HEp2), na kojima je transfekcijom inducirana ekspresija  $\alpha_v\beta_3$  integrina, zajednički mehanizam otpornosti ovih stanica na tri protutumorska lijeka: cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C povećanjem ukupne količine glutationa kao posljedice povećanja ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$ , koja je omogućila bolje preživljenje stanica djelotvornijim uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta nastalih djelovanjem ova tri lijeka. S obzirom da je isti princip *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  pomoću transfekcije plazmida koji nosi gen za podjedinicu

integrina  $\beta_3$  primijenjen na staničnom modelu Cal27, pretpostavili smo da ćemo i u ovom modelu, kao i u staničnom modelu HEP2, vidjeti povećanu otpornosti na ova tri protutumorska lijeka. To se pokazalo točnim, ali smo u staničnom modelu Cal27 primijetili povećanu otpornost stanica na djelovanje većeg broja protutumorskih lijekova koji svojim mehanizmima na izravan ili neizravan način utječu na DNA: cisplatinu, doksorubicin, mitomicin C, etopozid i 5-fluorouracil (Slika 15.A, B, C, D, E). Provjerili smo i osjetljivost stanica Cal27 staničnog modela na vinkristin i paklitaksel, lijekove čiji je mehanizam djelovanja vezan uz organizaciju mikrotubula, ali se ona nije mijenjala (Slika 15.F, G). Prema profilu protutumorskih lijekova mogli smo pretpostaviti da mehanizam otpornosti u staničnom modelu Cal27 neće biti jednak onome koji je zabilježen u staničnom modelu HEP2. Pretpostavka se pokazala točnom jer su sve stanice modela Cal27 pokazivale jednaku količinu glutaciona, te nisu mijenjale osjetljivost na protutumorske lijekove modulacijom količine glutaciona u stanici (Slika 18).

Pri svim ovim pokusima integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  bili su vezani za odgovarajuće proteine izvanstaničnog matriksa koji im omogućuju okidanje nizvodnih signala. Taj zaključak proizlazi iz činjenice da se opažena razlika u osjetljivosti stanica modela Cal27 na protutumorske lijekove ne mijenja kada se stanice uzgajaju na podlozi prethodno obloženoj vitronektinom, na koji se vežu oba integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  (rezultati nisu prikazani). Tumorske stanice mogu same proizvoditi i izlučivati komponente izvanstaničnog matriksa, što je i pokazano imunohistokemijskom analizom tumora malih stanica pluća (Sethi i sur. 1999). Budući da u većini slučajeva smanjeno vezanje stanica na izvanstanični matriks dovodi do anoikisa, smatra se da upravo ova sposobnost tumorskih stanica da same luče komponente izvanstaničnog matriksa kada su u nakupinama omogućuje njihovo preživljenje. Zanimljivo je da literaturni podaci pokazuju da je proliferacija često povezana s ekspresijom integrina na stanicama, kao što je to kod stanica tumora jajnika (Maubant i sur. 2002) i zvjezdastim stanicama jetre (Zhou i sur. 2004), gdje povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  i/ili  $\alpha_v\beta_3$  i njihovo vezanje na proteine izvanstaničnog matriksa povećava brzinu proliferacije stanica. U staničnom modelu Cal27 nema promjene u proliferaciji (Slika 14.A), a primijećeno grupiranje krivulja rasta stanica Cal27 i kontrolnog klona Cal27- $\Phi$  i onih klonova s povećanom ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , Cal27-2B1 i Cal27-2B3, posljedica je bolje adhezije klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na proteine izvanstaničnog matriksa vezanih na podlogu (Slika 14.B, C).

Proteini izvanstaničnog matriksa stupaju u interakciju s integrinima na površini stanice, čime dolazi do nakupljanja (engl. *clustering*) integrina na membrani stanice i dinamične reorganizacije struktura stanice (Paszek i sur. 2009), stoga postoji mogućnost da je u klonovima koji pokazuju otpornost na protutumorske lijekove došlo do smanjenog nakupljanja protutumorskih lijekova u stanici (Gottesman 2002). Izmjerena količina dimera gvanina nastalih djelovanjem cisplatine u stanicama modela Cal27 pokazala je korelaciju između količine dimera gvanina u stanicama i doze cisplatine kojoj su stanice izložene i potvrdila da nije došlo do smanjenog unosa cisplatine u stanice (Slika 17). Stoga je potrebno istražiti druge mehanizme otpornosti na protutumorske lijekove.

*De novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  i povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  razlikuje klonove Cal27-2B1 i Cal27-2B3 od kontrolnih stanica, međutim, upravo je *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  ta koja je odgovorna za otpornost Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na različite protutumorske lijekove. To su pokazali eksperimenti utišavanja podjedinica integrina  $\alpha_v$  i  $\beta_5$ . Izuzetno uspješno utišavanje podjedinice integrina  $\alpha_v$ , nakon kojeg se u stanicama očekuje smanjena ekspresija svih heterodimera integrina  $\alpha_v$ , dovodi do povećanja preživljenja stanica Cal27 i smanjenog ili nepromijenjenog preživljenja klona Cal27-2B1 nakon izlaganja djelovanju cisplatinu, mitomicinu C i etopozidu, protutumorskim lijekovima koje smo odabrali zbog drugačijih mehanizama djelovanja ali koji su svi povezani s utjecajem na DNA stanice (Slika 19). I dok je rezultat utišavanja podjedinice integrina  $\alpha_v$  u stanicama Cal27 odraz ukupnog utjecaja svih  $\alpha_v$  integrina koji se ekspimiraju na površini stanica Cal27, među kojima nema integrina  $\alpha_v\beta_3$ , u klonu Cal27-2B1 upravo je *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  i/ili povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  razlog za smanjeno preživljenje.

Postoje različiti radovi koji govore o utjecaju ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  i/ili  $\alpha_v\beta_5$  na otpornost stanica na djelovanje protutumorskih lijekova. Tako su u stanicama tumora dojke MCF-7 i MDA-MB-231 Wang i suradnici (2009) pokazali da faktor rasta veznog tkiva (CTFR) koji se veže na integrin  $\alpha_v\beta_3$  osigurava otpornost na doksorubicin i taksol povećanom ekspresijom Bcl-xL i cIAP1. Povećanje aktivnosti P-glikoproteina posredovano interakcijom proteina CCN1 (CYR61) i integrina  $\alpha_v\beta_3$  te aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta potiče otpornost stanica tumora bubrega na vinblastin (Long i sur. 2013). U stanicama tumora dojke MCF-7 otkriveno je da zaštita od oštećenja nastalih izlaganjem paklitakselu, doksorubicinu i  $\beta$ -lapachonu, posredovana CYR61 potaknutim povećanjem ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$ , može biti dokinuta upotrebom blokirajućih monoklonskih protutijela na

integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Menendez i sur. 2005). Uhm i suradnici (1999) pokazali su da stanice glioma čovjeka otporne na topotekan imaju povećanu ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  te da je mehanizam otpornosti povezan s povećanjem Bcl-2 i Bcl-XL. S druge strane, u stanicama tumora jajnika SKOV3 pokazano je da inhibicija ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  povećava otpornost ovih stanica na apoptozu izazvanu djelovanjem paklitaksela (Tumbarello i sur. 2012).

Da povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  nije uključena u povećanje otpornosti na protutumorske lijekove pokazali smo utišavanjem podjedinice integrina  $\beta_5$ , kojom može doći jedino do smanjene ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Iako utišavanje podjedinice integrina  $\beta_5$  u određenoj mjeri utječe na preživljenje stanica Cal27 i Cal27-2B1 (pri djelovanju etopozida, ali ne i cisplatine i mitomicina C), ne dolazi do utjecaja na razliku u osjetljivosti ovih stanica (Slika 20). Ključan dokaz za ovu tvrdnju je taj što se za sva tri protutumorska lijeka utišavanjem podjedinice integrina  $\beta_5$  ne dobiva isti obrazac otpornosti, dok se isti obrazac dobiva za utišavanje podjedinice integrina  $\alpha_v$ , a stanice Cal27 i Cal27-2B1 razlikuje upravo ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Slični podaci da integrin  $\alpha_v\beta_5$ , usprkos promijenjenoj ekspresiji, ne utječe na otpornost na protutumorske lijekove mogu se naći u literaturi. Tako su Maubant i suradnici (2007) pokazali na stanicama tumora jajnika IGROV-1 otpornim na cisplatinu da *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  ne mijenja otpornost ovih stanica na djelovanje cisplatine. S druge strane u stanicama dojke MCF7 otpornim na djelovanje doksorubicina putem povećane otpornosti na anoikis dolazi do drastičnog smanjenja ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$ , no niti ovdje promjena u ekspresiji ovog integrina ne igra ulogu u mehanizmu otpornosti (Morozevich i sur. 2006).

Integrini se vežu na proteine izvanstaničnog matriksa i prenose signale iz okoline u stanicu (Hynes 2002), no da bi to mogli napraviti moraju se vezati na protein kinaze koje se nalaze u fokalnim adhezijama. Kinaze na koje se integrini mogu direktno vezati su kinaza fokalnih adhezija (engl. *focal adhesion kinase*, FAK), nereceptorska tirozin kinaza Src (Src) i kinaza vezana za integrine (engl. *integrin linked kinase*, ILK) (van der Flier i Sonnenberg 2001; Millard i sur. 2011), a u stanicama modela Cal27 upravo su ekspresije Src i ILK kao i ekspresije njihovih fosforiliranih oblika promijenjeni (Slika 21). Promjene u ekspresiji protein kinaza primijećene su i u drugim modelnim sustavima u kojima nalazimo promjene u ekspresiji integrina i preživljenja. Tako je na stanicama tumora jajnika IGROV1 i SKOV-3

pokazano da integrini  $\alpha_v$ , točnije integrini  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , reguliraju proliferaciju stanica preko ILK (Cruet-Hennequart i sur. 2003). Stupanjem u interakciju s paksinom, proteinima PINCH-1 i PINCH-2 te proteinima koji vežu F-aktin, ILK aktivira PI3K/Akt signalni put kojim se stimulira preživljenje stanica (Dedhar 2000; Nikolopoulos i Turner 2001). Kako smo u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima primijetili povećanu ekspresiju ILK, pretpostavili smo njegovu ulogu u otpornosti iako je fosforilirani oblik pILK (T173), kojeg su Suh i suradnici (2011) povezali s povećanom signalizacijom ILK-a (Suh i Han 2011), u ovim stanicama smanjen. Naime, literaturni podaci pokazuju da je protein ILK istodobno i adaptorni protein i kinaza (Hannigan i sur. 2011), pa mu za modulaciju signalnih puteva nije nužno potrebna kinazna aktivnost.

Pokazali smo da povećana ekspresija ILK, za koji je poznato da se može direktno vezati na integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Hannigan i sur. 1996), nije odgovorna za otpornost stanica modela Cal27 na protutumorske lijekove. Utišavanje gena za ILK u stanicama Cal27-2B1, iako je bilo uspješno u smanjenju ekspresije ILK i utjecalo na preživljenje stanica, nije dovelo do smanjivanja otpornosti stanica Cal27-2B1 na cisplatinu, mitomicin C i etopozid u odnosu na stanice Cal27, štoviše profil preživljenja različit je za svaki ispitani protutumorski lijek, što je samo po sebi pokazatelj neuključenosti ILK (Slika 22). Također pretpostavljamo da ni povećana ekspresija ILK nije direktno povezana sa smanjenom ekspresijom Src u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima, jer se ekspresija Src/pSrc (Y418) nije promijenila nakon utišavanja ILK (Slika 22).

U ovom smo radu pretpostavili da su povećana ekspresija ILK i povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima povezane. Naime, ni utišavanje integrina  $\alpha_v\beta_5$  niti utišavanje ILK nije dovelo do promjena u otpornosti stanica Cal27 i Cal27-2B1. Iz rezultata utišavanja  $\alpha_v\beta_5$ , pri čemu je došlo do smanjivanja ekspresije Src/pSrc (Y418) i istovremenog povećanja ILK (Slika 27), zaključili smo da se u Cal27 stanicama integrin  $\alpha_v\beta_5$  veže na Src, dok se u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 veže na ILK. Dakle ekspresija Src i/ili pSrc (Y418) regulira ekspresiju ILK, dok obrnuto ne vrijedi.

Ovaj rezultat predstavlja potpuno novi podatak o povezanosti ILK i integrina  $\alpha_v\beta_5$ , s obzirom da dosadašnja istraživanja pokazuju da se ILK direktno veže i provodi signale s podjedinice integrina  $\beta_1$  i  $\beta_3$  (Hannigan i sur. 1996). Funkcija integrina  $\alpha_v\beta_5$  i njegova uloga u signalnim putevima u stanici puno je manje istražena od funkcije integrina  $\alpha_v\beta_3$ , vjerojatno

zato što je to integrin koji nalazimo gotovo na svim stanicama. Uz to, malo je podataka u literaturi koji pokazuju vezu između ekspresije Src i ILK. Oneyama i suradnici (2012) opisali su regulaciju kompleksa Src i ILK, u kojem povećana ekspresija Src preko inhibicije mi-RNA miR-542-3p dovodi do povećane ekspresije ILK.

Sličan učinak tj. smanjenje ekspresije Src/pSrc(Y418) dobiva se utišavanjem gena za podjedinicu integrina  $\alpha_v$  u stanicama Cal27, ali ne i u stanicama Cal27-2B1 (Slika 26). Međutim, nakon utišavanja gena za podjedinicu integrina  $\alpha_v$ , što dovodi do smanjene ekspresije svih integrina  $\alpha_v$ , pokazana je povećana otpornost na sva tri protutumorska lijeka (Slika 19). Kako je moguće da utišavanje podjedinice integrina  $\beta_5$ , što dovodi do smanjene ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$ , ne pokazuje isti učinak na osjetljivost na protutumorske lijekove? Vrlo je vjerojatno da izlaženje pSrc (Y418) iz fokalnih adhezija s integrinom  $\alpha_v\beta_5$  nema ulogu u osjetljivosti na protutumorske lijekove, već je upravo izlaženje pSrc (Y418) iz fokalnih adhezija nastalih vezanjem drugih integrina  $\alpha_v$  odgovorno za promjenu u osjetljivosti na protutumorske lijekove.

Mnogi radovi pokazuju da se integrin  $\alpha_v\beta_3$  veže direktno na Src (Arias-Salgado i sur. 2003) i na taj način može utjecati na proliferaciju tumora (Duxbury i sur. 2004a; Huvneers i sur. 2007), ali vrlo vjerojatno i na promjenu osjetljivosti na protutumorske lijekove. Za punu enzimsku aktivnost Src mora biti fosforiliran u svojoj kinaznoj domeni na tirozinu 418, što je jedno od mjesta autofosforilacije (Arias-Salgado i sur. 2003; Playford i Schaller 2004; Summy i Gallick 2006; Sen i Johnson 2011), te smo stoga osim ukupne količine Src posebnu pažnju posvetili upravo ovom Src obliku. Smanjena ekspresija Src i pSrc (Y418) u klonovima s *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Slika 21) neočekivani je rezultat. Prema podacima iz literature očekivali smo povećanje količine pSrc (Y418) u fokalnim adhezijama nakon *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Međutim, dogodilo se upravo obrnuto, *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  dovela je smanjenja količine Src i pSrc (Y418). Moguće je da je prvo uslijedilo smanjenje ekspresije Src, a onda zbog manje raspoloživosti Src dolazi i do smanjene količine pSrc (Y418). Kako bi istražili da li je smanjenje Src, i eventualno pSrc (Y418), dovoljno u Cal27 stanicama da promijeni osjetljivost na protutumorske lijekove, utišali smo Src u Cal27 stanicama. Uistinu, utišavanjem Src smanjila se ne samo količina Src nego i količina pSrc (Y418) u stanicama Cal27, što je povećalo preživljenje ovih stanica i time se približilo zabilježenom preživljenju u klonu Cal27-2B1 (Slika 23). Potvrdu ključne uloge pSrc (Y418) u osjetljivosti stanica Cal27/Cal27-2B1 na protutumorske lijekove dobili smo primjenom

inhibitora fosforilacije Src (Y418), dasatiniba (Shor i sur. 2007; Ceppi i sur. 2009). Rezultati nedvosmisleno pokazuju da se djelovanjem dasatiniba smanjila fosforilacija Src (Y418) u stanicama Cal27 (Slika 25.A), nakon čega su stanice postale otporne na djelovanje protutumorskih lijekova, i čak dostigle razinu osjetljivosti stanica Cal27-2B1 (Slika 25). Zanimljivo je spomenuti da dasatinib nije imao utjecaj ni na fosforilaciju Src u Cal27-2B1, niti na osjetljivost na protutumorske lijekove, moguće zbog ekspresije koja je već u početku izrazito niska. Vrlo je vjerojatno da u stanicama postoji određena razina ekspresije Src potrebna za ostvarivanje fosforilacije Src (Y418) ispod koje je fosforilacija otežana. Stoga zaključujemo da smo identificirali smanjenu ekspresiju pSrc (Y418), koji se nalazi na vrhovima aktinskih niti u fokalnim adhezijama (Slika 29) u stanicama Cal27, kontrolnim stanicama Cal27-Φ, ali i integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3, kao uzrok otpornosti stanica Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na protutumorske lijekove.

Na temelju svih iznesenih rezultata možemo postaviti hipotezu da je povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 dovela do povećane ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Integrin  $\alpha_v\beta_5$  koji je u stanicama Cal27 bio vezan na pSrc (Y418) u stanicama s povećanom ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  Cal27-2B1 je vezan za ILK. Nije nam poznato s kojom kinazom je vezan integrin  $\alpha_v\beta_3$ , no signal potaknut ovim integrinom je doveo do smanjenja ukupne količine proteina Src i pSrc (Y418) koji je izašao iz fokalnih adhezija vezanih za neki/e od integrina  $\alpha_v$ , zbog čega je došlo do povećane otpornosti ovih stanica na cisplatinu, mitomicin C i etopozid. Ova je hipoteza naizgled u potpunoj suprotnosti s većinom radova, koji pokazuju da integrin  $\alpha_v\beta_3$  svojim vezanjem na proteine izvanstaničnog matriksa pozitivno regulira aktivnost fosforilacijom Src, što dovodi do pojačanog rasta tumora i otpornosti na protutumorske lijekove (Huvneers i sur. 2007). Rezultat koji je također različit od gore navedenog opće prihvaćenog mišljenja je onaj koji su opisali Puigvert i suradnici (2009) koji su pokazali da povećana aktivnost pSrc (Y418) kao posljedica ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  dovodi do smanjenog preživljenja tumorskih stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima.

Važno je naglasiti da je dokaz o ključnoj ulozi smanjene količine pSrc (Y418) u stanicama Cal27-2B1 stabilno transficiranim genom za podjedinicu integrina  $\beta_3$  indirektan i dobiven inhibicijom pSrc (Y418) na stanicama Cal27. Pokazali smo da je smanjenje ekspresije pSrc (Y418) dasatinibom u stanicama Cal27, slično smanjenju ekspresije pSrc (Y418) u klonu Cal27-2B1, dovelo do povećanja otpornosti na tri protutumorska lijeka



(cisplatinu, mitomicin C i etopozid) na razinu odgovarajuću onoj u klonu Cal27-2B1. Pretpostavili smo i skup događaja koji su se pri tome dogodili: (i) ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  dovodi do povećane ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$ , te ovaj integrin više nije povezan s pSrc (Y418); (ii) integrin  $\alpha_v\beta_5$  u klonovima s *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  povezan je s ILK, a niti jedan od njih nije uključen u mehanizam otpornosti; (iii) gubitak ekspresije pSrc (Y418) u stanicama Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 glavni je uzrok povećane otpornosti stanica na protutumorske lijekove, a pSrc (Y418), koji se pri tome gubi iz fokalnih adhezija, vezan je na neke od integrina  $\alpha_v$ ; jedini integrin koji smo pri tome isključili je integrin  $\alpha_v\beta_5$ .

Za Src je pokazano da potiče preživljenje i otpornost na paklitaksel i cisplatinu u mišjim stanicama tumora jajnika ID8 (Pengetnze i sur. 2003). George i suradnici (2005) pokazali su da inhibicijom fosforilacije Src dolazi do ponovne osjetljivosti na paklitaksel u stanicama tumora jajnika čovjeka CaOV3TaxR i mišjim stanicama tumora jajnika ID8TaxR otpornim na djelovanje paklitaksela mehanizmom neovisnim o MDR1. Sličan učinak je pokazan i na stanicama tumora gušterače, gdje je inhibicija aktivnosti Src dovela do ponovne osjetljivosti na 5-fluorouracil regulacijom timidilat sintetaze (Ischenko i sur. 2008). U stanicama tumora mjehura čovjeka HAG-1 aktivacija Src potiče otpornost na cisplatinu preko Ras, PI3K ili PKC signalnog puta (Masumoto i sur. 1999). Eksperimenti na stanicama tumora debelog crijeva pokazali su da se smanjenjem fosforilacije Src povećava citotoksični učinak oksaliplatine (Kopetz i sur. 2009).

Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi pokazuju otpornost na protutumorske lijekove koji na izravan ili neizravan način utječu na DNA, što nas je potaklo da pokušamo identificirati molekulu koja je uključena u mehanizam otpornosti, a dio je jednog od procesa kojima je ciljna molekula DNA. Analiza ekspresije 94 različita gena uključena u signalne puteve koji reguliraju pokretljivost stanica, popravak DNA oštećenja, stanični ciklus, apoptozu i autofagiju (Slika 30) u pokušaju daljnje identifikacije izvršne molekule nažalost nije dala pozitivne rezultate. Na temelju prvotno uočenih promjena na konstitutivnoj razini i/ili u razini ekspresije gena nakon izlaganja djelovanju IC<sub>50</sub> koncentracije cisplatine izdvojili smo 7 različitih skupina gena (Tablica 25) i daljnjom analizom te pregledom literature, identificirali gene *c-IAP1* (*BIRC3*) i *IL6* kao potencijalne molekule uključene u mehanizam otpornosti. Oba ova gena povećana su u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima, i konstitutivno i nakon djelovanja cisplatine, gdje se ekspresija gena *c-IAP1* (*BIRC3*) znatno povećala i došla na razinu na kojoj nema razlike između kontrolnih i otpornih stanica, a

ekspresija gena *IL6* nakon djelovanja cisplatine u svim stanicama rasla uz zadržavanje povećane ekspresija u otpornim stanicama s obzirom na kontrolne. Kako je u literaturi pokazano da povećana ekspresija gena *c-IAP1 (BIRC3)* korelira sa povećanom otpornosti na djelovanje protutumorskih lijekova (Tamm i sur. 2000; Imoto i sur. 2001; Amantana i sur. 2004; Notarbartolo i sur. 2004), a povećana ekspresija gena *IL6* korelira s povećanom otpornosti na protutumorske lijekove u različitim vrstama tumora (Borsellino i sur. 1995; Mizutani i sur. 1995; Conze i sur. 2001; Wang i sur. 2010) pretpostavili smo da bi jedan, ili čak oba gena mogli biti uključeni u mehanizam otpornosti na djelovanje protutumorskih lijekova u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3. Da je pretpostavka kriva pokazuje analiza ekspresije istih gena nakon utišavanja Src (koji je uključen u mehanizam otpornosti) i ILK (koji nije uključen u mehanizam otpornosti) (Slika 31), iz koje je jasno da je ekspresija interleukina 6 isključivo vezana na ekspresiju ILK, što je u literaturi već poznato (Wani i sur. 2011), i nije odgovorna za otpornost integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova na protutumorske lijekove (ovaj rad). Isto vrijedi i za gen *c-IAP (BIRC3)*, koji kodira za inhibitore apoptoze. Očekivano je da će utišavanje Src u stanicama Cal27, koje čini stanice otpornima na djelovanje cisplatine i mitomicina C, dovesti do povećanja ekspresije *cIAP1 (BIRC3)* gena, međutim, to se nije desilo, već se štoviše ekspresija *cIAP1 (BIRC3)* gena smanjila (Slika 31). Očito je da se radi o nekim drugim molekulama i stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi identificirali izvršnu molekulu i detaljan mehanizam otpornosti stanica Cal27 na protutumorske lijekove posredovan ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Da bi se u višestaničnim organizmima mogli odvijati procesi normalnog razvoj tkiva, održavanja homeostaze i popravka, neophodno je da stanice imaju sposobnost migracije. Međutim, ova karakteristika stanica je ujedno i jedan od preduvjeta za invaziju i metastaziranje tumora u organizmu, a upravo vezanje integrina za proteine izvanstaničnog matriksa vodi do aktivacije signalnih putova koji omogućavaju integrinima da reguliraju oblik stanice i procese kao što su adhezija, migracija i dioba (Wong i sur. 1998; Hood i Cheresch 2002). U ovom smo radu pokazali i smanjenu sposobnost migracije integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 prema kontrolnim stanicama (Slika 32), što je u suprotnosti s literaturom koja uglavnom povezuje povećanu ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  s povećanom sposobnosti migracije stanica. Pretpostavljamo, iako za to nemamo direktan dokaz, da je to posljedica smanjene količine pSrc (Y418), s obzirom da je količina

pSrc (Y418) manja u Cal27-2B3 nego u Cal27-2B1 i korelira s migracijom u ovim stanicama, a puno je literaturnih podataka koji povezuju povećanu fosforilaciju Src (Y418) s povećanom sposobnošću stanica da migriraju (Shor i sur. 2007; Huveneers i sur. 2008; Meenderink i sur. 2010; Zhu i sur. 2013). Daljnji su pokusi potrebni kako bi se sa sigurnošću utvrdio točan uzrok.

Ovim radom smo željeli na modelu stanica karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka Cal27 istražiti ulogu *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  u osjetljivosti stanica na djelovanje različitih protutumorskih lijekova, u svrhu otkrivanja molekula uključenih u mehanizam otpornosti stanica na protutumorske lijekove. Otkrili smo da integrin  $\alpha_v\beta_3$  čini stanice otpornima na protutumorske lijekove izazivajući smanjenje ekspresije pSrc (Y418). Daljnji pokusi, kojima bi se u potpunosti rasvijetlio ovaj mehanizam, potrebni su za pravilnu procjenu pogodnosti inhibitora integrina  $\alpha_v\beta_3$  s ciljem povećanja osjetljivosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove i uspješnijeg liječenja tumora.

Kako je Src već prepoznat kao potencijalna ciljna molekula u terapiji tumora (Zhang i Yu 2012), neki njegovi inhibitori već se nalaze u kliničkim ispitivanjima (Kim i sur. 2009; Sen i Johnson 2011; Zhang i Yu 2012). Tako je za dasatinib pokazano da može inhibirati migraciju i invaziju tumorskih stanica, smanjiti rast tumora, inducirati apoptozu tumorskih stanica i povećati osjetljivost tumorskih stanica na djelovanje zračenja (Shor i sur. 2007; Ceppi i sur. 2009; Nautiyal i sur. 2009; Raju i sur. 2012). Dasatinib je također odobren za liječenje kronične mijeloidne leukemije i Philadelphia kromosom pozitivne akutne limfoplastične leukemije od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*). Postoje radovi koji pokazuju da se učinkovitost kemoterapije može povećati kombiniranjem klasičnih protutumorskih lijekova s dasatinibom (Milano i sur. 2009; Pichot i sur. 2009; Le i Bast 2011; Araujo i sur. 2012). Međutim, rezultati ove disertacije pokazuju da u nekim modelima kombinacija protutumorskih lijekova s inhibitorom aktivnosti Src može dovesti do upravo suprotnog učinka, i smanjenja učinkovitosti protutumorskih lijekova nakon dasatiniba, te je stoga potrebno dodatno evaluirati utjecaj inhibicije pSrc (Y418) na odgovor stanica na djelovanje protutumorskih lijekova.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Uspostavili smo model u kojem su transfekcijom stanica karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka Cal27 plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina  $\beta_3$  izdvojeni klonovi u kojima je došlo do *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$ , povećala se ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$ , povećala se adhezija na vitronektin i fibronektin koja korelira s količinom integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , a migracija se smanjila u odnosu na stanice Cal27.
2. Stanice s *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  i povećanom ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_5$  pokazuju otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, doksorubicin, mitomicin C, etopozid i 5-fluorouracil u odnosu na stanice Cal27, koja nije posljedica ni smanjenog nakupljanja lijeka u stanicama, niti promjena u količini glutationa.
3. Pokazali smo da je *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  ključna za primijećenu otpornost na protutumorske lijekove, dok povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_5$  to nije.
4. U integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima pokazana je smanjena količina proteina Src i pSrc (Y418), povećana količina ILK i smanjena količina pILK (Thr 173) u odnosu na Cal27 stanice.
5. Povećana ekspresija ILK nije uključena u primijećen mehanizam otpornosti stanica s *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$ , nego je smanjenje količine pSrc (Y418) odgovorno za ovaj fenomen.
6. U stanicama Cal27 Src je vezan na integrin  $\alpha_v\beta_5$ , dok je u stanicama u kojima je došlo do *de novo* ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_3$  i povećane ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  došlo do istiskivanja Src i vezanja integrina  $\alpha_v\beta_5$  na ILK. Nije poznato preko koje kinaze je vezan integrin  $\alpha_v\beta_3$ .
7. Gubitak ekspresije pSrc (Y418) u stanicama Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 glavni je uzrok povećane otpornosti stanica na protutumorske lijekove, a pSrc (Y418) koji se pri tome gubi iz fokalnih adhezija vezan je na neke od integrina  $\alpha_v$ ; jedini integrin koji smo pri tome isključili je integrin  $\alpha_v\beta_5$ .

8. Iako povećanje ekspresije ILK u klonu Cal27-2B1 koji eksprimira integrin  $\alpha_v\beta_3$  nije odgovorno za primijećeni fenomen otpornosti na protutumorske lijekove, pokazano je da ILK povećava ekspresiju IL-6 koji potencijalno može imati ulogu u poticanju angiogeneze u tumorima.
  
9. Naši rezultati pokazuju kako se lijekovi koji inhibiraju fosforilaciju Src (Y418), a koji su prepoznati kao molekule za liječenje mnogih tipova tumora, u nekim slučajevima ne mogu koristiti istovremeno s protutumorskim lijekovima koji djeluju preko molekule DNA, jer mogu izazvati povećano preživljenje stanica.

## **7. LITERATURA**

Abnet, C. C., F. Kamangar, F. Islami, D. Nasrollahzadeh, P. Brennan, K. Aghcheli, S. Merat, A. Pourshams, H. A. Marjani, A. Ebadati, M. Sotoudeh, P. Boffetta, R. Malekzadeh, S. M. Dawsey (2008). "Tooth loss and lack of regular oral hygiene are associated with higher risk of esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(11): 3062-3068.

Abram, C. L. i S. A. Courtneidge (2000). "Src family tyrosine kinases and growth factor signaling." Exp Cell Res **254**(1): 1-13.

Adams, J. C. i J. Lawler (2011). "The thrombospondins." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(10): a009712.

Albelda, S. M., S. A. Mette, D. E. Elder, R. Stewart, L. Damjanovich, M. Herlyn, C. A. Buck (1990). "Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression." Cancer Res **50**(20): 6757-6764.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Rafi, K. Roberts, P. Walter (2008). Molecular biology of the cell. M. Anderson and D. Granum. New York, Garland Science 1205-1268.

Amantana, A., C. A. London, P. L. Iversen, G. R. Devi (2004). "X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells." Mol Cancer Ther **3**(6): 699-707.

Ambriovic-Ristov, A., J. Gabrilovac, T. Cimboraz-Zovko, M. Osmak (2004). "Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin alpha(v)beta(3) and coxsackie adenovirus receptor." International Journal of Cancer **110**(5): 660-667.

Ambriovic-Ristov, A. i M. Osmak (2006). "Integrin-mediated drug resistance." Current Signal Transduction Therapy **1**(2): 227-237.

Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštović Radan N., Mihaljević S., Slade N., V. D. (2007). Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb, Institut Ruđer Bošković

Ang, K. K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D. I. Rosenthal, P. F. Nguyen-Tan, W. H. Westra, C. H. Chung, R. C. Jordan, C. Lu i sur. (2010). "Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer." N Engl J Med **363**(1): 24-35.

Angst, B. D., C. Marozzi, A. I. Magee (2001). "The cadherin superfamily: diversity in form and function." J Cell Sci **114**(Pt 4): 629-641.

Aoudjit, F. i K. Vuori (2001). "Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells." Oncogene **20**(36): 4995-5004.

Aplin, A. E., A. K. Howe, R. L. Juliano (1999). "Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth." Curr Opin Cell Biol **11**(6): 737-744.



Araujo, J. C., P. Mathew, A. J. Armstrong, E. L. Braud, E. Posadas, M. Lonberg, G. E. Gallick, G. C. Trudel, P. Paliwal, S. Agrawal, C. J. Logothetis (2012). "Dasatinib combined with docetaxel for castration-resistant prostate cancer: results from a phase 1-2 study." Cancer **118**(1): 63-71.

Arias-Salgado, E. G., S. Lizano, S. Sarkar, J. S. Brugge, M. H. Ginsberg, S. J. Shattil (2003). "Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13298-13302.

Armstrong, T., G. Packham, L. B. Murphy, A. C. Bateman, J. A. Conti, D. R. Fine, C. D. Johnson, R. C. Benyon, J. P. Iredale (2004). "Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **10**(21): 7427-7437.

Aszodi, A., K. R. Legate, I. Nakchbandi, R. Fassler (2006). "What mouse mutants teach us about extracellular matrix function." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 591-621.

Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, W. G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J. C. Jones i sur. (2005). "A simplified laminin nomenclature." Matrix Biol **24**(5): 326-332.

Balendran, A., A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C. P. Downes, D. R. Alessi (1999). "PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2." Curr Biol **9**(8): 393-404.

Barczyk, M., S. Carracedo, D. Gullberg (2010). "Integrins." Cell Tissue Res **339**(1): 269-280.

Bendas, G. i L. Borsig (2012). "Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins." Int J Cell Biol **2012**: 676731.

Bentley, A. A. i J. C. Adams (2010). "The Evolution of Thrombospondins and Their Ligand-Binding Activities." Mol Biol Evol **27**(9): 2187-2197.

Bershadsky, A. D., N. Q. Balaban, B. Geiger (2003). "Adhesion-dependent cell mechanosensitivity." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 677-695.

Bianchi-Smiraglia, A., S. Paesante, A. V. Bakin (2013). "Integrin beta5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways." Oncogene **32**(25): 3049-3058.

Blons, H., S. Gad, F. Zinzindohoue, I. Maniere, J. Beauregard, D. Tregouet, D. Brasnu, P. Beaune, O. Laccourreye, P. Laurent-Puig (2004). "Matrix metalloproteinase 3 polymorphism: a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **10**(8): 2594-2599.

Boggon, T. J. i M. J. Eck (2004). "Structure and regulation of Src family kinases." Oncogene **23**(48): 7918-7927.

Borsellino, N., A. Beldegrun, B. Bonavida (1995). "Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines." Cancer Res **55**(20): 4633-4639.

Boudeau, J., D. Miranda-Saavedra, G. J. Barton, D. R. Alessi (2006). "Emerging roles of pseudokinases." Trends Cell Biol **16**(9): 443-452.

Bromann, P. A., H. Korkaya, S. A. Courtneidge (2004). "The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases." Oncogene **23**(48): 7957-7968.

Brooks, P. C., S. Stromblad, R. Klemke, D. Visscher, F. H. Sarkar, D. A. Cheresh (1995). "Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin." J Clin Invest **96**(4): 1815-1822.

Brown, M. T. i J. A. Cooper (1996). "Regulation, substrates and functions of src." Biochim Biophys Acta **1287**(2-3): 121-149.

Brozovic, A., D. Majhen, V. Roje, N. Mikac, S. Jakopec, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriovic-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." Mol Pharmacol **74**(1): 298-306.

Bruckner, K. i R. Klein (1998). "Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands." Current Opinion in Neurobiology **8**(3): 375-382.

Brunton, V. G. i M. C. Frame (2008). "Src and focal adhesion kinase as therapeutic targets in cancer." Current Opinion in Pharmacology **8**(4): 427-432.

Byers, L. A., B. Sen, B. Saigal, L. Diao, J. Wang, M. Nanjundan, T. Cascone, G. B. Mills, J. V. Heymach, F. M. Johnson (2009). "Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **15**(22): 6852-6861.

Cabodi, S., M. del Pilar Camacho-Leal, P. Di Stefano, P. Defilippi (2010). "Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story." Nat Rev Cancer **10**(12): 858-870.

Cai, W. i X. Chen (2006). "Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism." Anticancer Agents Med Chem **6**(5): 407-428.

Calalb, M. B., T. R. Polte, S. K. Hanks (1995). "Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Sites in the Catalytic Domain Regulates Kinase-Activity - a Role for Src Family Kinases." Mol Cell Biol **15**(2): 954-963.

Calderwood, D. A. (2004). "Integrin activation." J Cell Sci **117**(Pt 5): 657-666.

Cambier, S., D. Z. Mu, D. O'Connell, K. Boylen, W. Travis, W. H. Liu, V. C. Broaddus, S. L. Nishimura (2000). "A role for the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8 in the negative regulation of epithelial cell growth." Cancer Res **60**(24): 7084-7093.

Cary, L. A., J. F. Chang, J. L. Guan (1996). "Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn." J Cell Sci **109**: 1787-1794.

Ceppi, P., M. Papotti, V. Monica, M. Lo Iacono, S. Saviozzi, M. Pautasso, S. Novello, S. Mussino, E. Bracco, M. Volante, G. V. Scagliotti (2009). "Effects of Src kinase inhibition induced by dasatinib in non-small cell lung cancer cell lines treated with cisplatin." Mol Cancer Ther **8**(11): 3066-3074.

Chen, J., A. Elfiky, M. Han, C. Chen, M. W. Saif (2014). "The role of Src in colon cancer and its therapeutic implications." Clin Colorectal Cancer **13**(1): 5-13.

Chen, Y. Y., Z. X. Wang, P. A. Chang, J. J. Li, F. Pan, L. Yang, Z. H. Bian, L. Zou, J. M. He, H. J. Liang (2009). "Knockdown of focal adhesion kinase reverses colon carcinoma multicellular resistance." Cancer Sci **100**(9): 1708-1713.

Chiquet-Ehrismann, R. i R. P. Tucker (2011). "Tenascins and the importance of adhesion modulation." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(5).

Chothia, C. i E. Y. Jones (1997). "The molecular structure of cell adhesion molecules." Annu Rev Biochem **66**: 823-862.

Chung, C. H., J. S. Parker, G. Karaca, J. Wu, W. K. Funkhouser, D. Moore, D. Butterfoss, D. Xiang, A. Zanation, X. Yin i sur. (2004). "Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression." Cancer Cell **5**(5): 489-500.

Cloos, J., M. R. Spitz, S. P. Schantz, T. C. Hsu, Z. F. Zhang, H. Tobi, B. J. Braakhuis, G. B. Snow (1996). "Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma." J Natl Cancer Inst **88**(8): 530-535.

Conze, D., L. Weiss, P. S. Regen, A. Bhushan, D. Weaver, P. Johnson, M. Rincon (2001). "Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells." Cancer Res **61**(24): 8851-8858.

Cooper, L. A., T. L. Shen, J. L. Guan (2003). "Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction." Mol Cell Biol **23**(22): 8030-8041.

Cox, D., M. Brennan, N. Moran (2010). "Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities." Nat Rev Drug Discov **9**(10): 804-820.

Critchley, D. R. i A. R. Gingras (2008). "Talin at a glance." J Cell Sci **121**(Pt 9): 1345-1347.

Crossin, K. L. i L. A. Krushel (2000). "Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." Dev Dyn **218**(2): 260-279.

Cruet-Hennequart, S., S. Maubant, J. Luis, P. Gauduchon, C. Staedel, S. Dedhar (2003). "alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells." Oncogene **22**(11): 1688-1702.

Culotti, J. G. i D. C. Merz (1998). "DCC and netrins." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 609-613.

D'Souza, G., A. R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, W. M. Koch, W. H. Westra, M. L. Gillison (2007). "Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer." N Engl J Med **356**(19): 1944-1956.

Daley, W. P., S. B. Peters, M. Larsen (2008). "Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine." J Cell Sci **121**(Pt 3): 255-264.

Damiano, J. S., A. E. Cress, L. A. Hazlehurst, A. A. Shtil, W. S. Dalton (1999). "Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines." Blood **93**(5): 1658-1667.

De Wever, O., P. Demetter, M. Mareel, M. Bracke (2008). "Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth." Int J Cancer **123**(10): 2229-2238.

Dedhar, S. (2000). "Cell-substrate interactions and signaling through ILK." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 250-256.

Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, S. Dedhar (1998). "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11211-11216.

Desgrosellier, J. S., L. A. Barnes, D. J. Shields, M. Huang, S. K. Lau, N. Prevost, D. Tarin, S. J. Shattil, D. A. Cheresh (2009). "An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression." Nat Med **15**(10): 1163-1169.

Desgrosellier, J. S. i D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer **10**(1): 9-22.

Di Florio, A., G. Capurso, M. Milione, F. Panzuto, R. Geremia, G. Delle Fave, C. Sette (2007). "Src family kinase activity regulates adhesion, spreading and migration of pancreatic endocrine tumour cells." Endocr Relat Cancer **14**(1): 111-124.

Dobreva, I., A. Fielding, L. J. Foster, S. Dedhar (2008). "Mapping the integrin-linked kinase interactome using SILAC." Journal of Proteome Research **7**(4): 1740-1749.

Dunehoo, A. L., M. Anderson, S. Majumdar, N. Kobayashi, C. Berklund, T. J. Siahaan (2006). "Cell adhesion molecules for targeted drug delivery." Journal of Pharmaceutical Sciences **95**(9): 1856-1872.

Dunty, J. M., V. Gabarra-Niecko, M. L. King, D. F. Ceccarelli, M. J. Eck, M. D. Schaller (2004). "FERM domain interaction promotes FAK signaling." Mol Cell Biol **24**(12): 5353-5368.

Duxbury, M. S., H. Ito, S. W. Ashley, E. E. Whang (2004a). "c-Src-dependent cross-talk between CEACAM6 and alpha(v)beta(b) integrin enhances pancreatic adenocarcinoma cell adhesion to extracellular matrix components." Biochem Biophys Res Commun **317**(1): 133-141.

Duxbury, M. S., H. Ito, E. Benoit, T. Waseem, S. W. Ashley, E. E. Whang (2005). "RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance." Clin Cancer Res **11**(9): 3433-3438.

Duxbury, M. S., H. Ito, M. J. Zinner, S. W. Ashley, E. E. Whang (2004b). "Focal adhesion kinase gene silencing promotes anoikis and suppresses metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells." Surgery **135**(5): 555-562.

Duxbury, M. S., H. Ito, M. J. Zinner, S. W. Ashley, E. E. Whang (2004c). "Inhibition of Src tyrosine kinase impairs inherent and acquired gemcitabine resistance in human pancreatic adenocarcinoma cells." Clinical Cancer Research **10**(7): 2307-2318.

El-Aneed, A. (2004). "An overview of current delivery systems in cancer gene therapy." J Control Release **94**(1): 1-14.

Engen, J. R., T. E. Wales, J. M. Hochrein, M. A. Meyn, 3rd, S. Banu Ozkan, I. Bahar, T. E. Smithgall (2008). "Structure and dynamic regulation of Src-family kinases." Cell Mol Life Sci **65**(19): 3058-3073.

Felding-Habermann, B., T. E. O'Toole, J. W. Smith, E. Fransvea, Z. M. Ruggeri, M. H. Ginsberg, P. E. Hughes, N. Pampori, S. J. Shattil, A. Saven, B. M. Mueller (2001). "Integrin activation controls metastasis in human breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1853-1858.

Fielding, A. B., I. Dobрева, P. C. McDonald, L. J. Foster, S. Dedhar (2008). "Integrin-linked kinase localizes to the centrosome and regulates mitotic spindle organization." J Cell Biol **180**(4): 681-689.

Francavilla, C., L. Maddaluno, U. Cavallaro (2009). "The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis." Semin Cancer Biol **19**(5): 298-309.

Frenette, P. S. i D. D. Wagner (1996). "Adhesion molecules--Part 1." N Engl J Med **334**(23): 1526-1529.

Frisch, S. M., K. Vuori, E. Ruoslahti, P. Y. Chan-Hui (1996). "Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase." J Cell Biol **134**(3): 793-799.

Futami, K., M. Takagi, A. Shimamoto, M. Sugimoto, Y. Furuichi (2007). "Increased chemotherapeutic activity of camptothecin in cancer cells by siRNA-induced silencing of WRN helicase." Biol Pharm Bull **30**(10): 1958-1961.

Gabarra-Niecko, V., M. D. Schaller, J. M. Dunty (2003). "FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer." Cancer Metastasis Rev **22**(4): 359-374.

Garces, C. A., E. V. Kurenova, V. M. Golubovskaya, W. G. Cance (2006). "Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells." Cancer Res **66**(3): 1446-1454.

Geiger, B. i K. M. Yamada (2011). "Molecular architecture and function of matrix adhesions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(5).

George, J. A., T. Chen, C. C. Taylor (2005). "SRC tyrosine kinase and multidrug resistance protein-1 inhibitions act independently but cooperatively to restore paclitaxel sensitivity to paclitaxel-resistant ovarian cancer cells." Cancer Res **65**(22): 10381-10388.

Ginsberg, M. H., A. Partridge, S. J. Shattil (2005). "Integrin regulation." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 509-516.

Goldman, I. D., S. Chattopadhyay, R. Zhao, R. Moran (2010). "The antifolates: evolution, new agents in the clinic, and how targeting delivery via specific membrane transporters is driving the development of a next generation of folate analogs." Curr Opin Investig Drugs **11**(12): 1409-1423.

Goldoni, S. i R. V. Iozzo (2008). "Tumor microenvironment: Modulation by decorin and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs." Int J Cancer **123**(11): 2473-2479.

Golubovskaya, V. M., S. Figel, B. T. Ho, C. P. Johnson, M. Yemma, G. Huang, M. Zheng, C. Nyberg, A. Magis, D. A. Ostrov, I. H. Gelman, W. G. Cance (2012). "A small molecule focal adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl)-3, 5, 7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1(3,7)]decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth in vivo." Carcinogenesis **33**(5): 1004-1013.

Golubovskaya, V. M., F. A. Kweh, W. G. Cance (2009). "Focal adhesion kinase and cancer." Histol Histopathol **24**(4): 503-510.

Gordon, M. K. i R. A. Hahn (2010). "Collagens." Cell Tissue Res **339**(1): 247-257.

Gottesman, M. M. (2002). "Mechanisms of cancer drug resistance." Annu Rev Med **53**: 615-627.

Guha, N., P. Boffetta, V. Wunsch Filho, J. Eluf Neto, O. Shangina, D. Zaridze, M. P. Curado, S. Koifman, E. Matos, A. Menezes i sur. (2007). "Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies." Am J Epidemiol **166**(10): 1159-1173.

Gumbiner, B. M. (2000). "Regulation of cadherin adhesive activity." Journal of Cell Biology **148**(3): 399-403.

Guo, W. i F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 816-826.

Gurova, K. (2009). "New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents." Future Oncol **5**(10): 1685-1704.

Hall, M. D., M. D. Handley, M. M. Gottesman (2009). "Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity." Trends Pharmacol Sci **30**(10): 546-556.

Hanahan, D. i R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hannigan, G., A. A. Troussard, S. Dedhar (2005). "Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK." Nat Rev Cancer **5**(1): 51-63.

Hannigan, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppelino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell, S. Dedhar (1996). "Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase." Nature **379**(6560): 91-96.

Hannigan, G. E., P. C. McDonald, M. P. Walsh, S. Dedhar (2011). "Integrin-linked kinase: not so 'pseudo' after all." Oncogene **30**(43): 4375-4385.

Hao, H., Y. Naomoto, X. Bao, N. Watanabe, K. Sakurama, K. Noma, T. Motoki, Y. Tomono, T. Fukazawa, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, J. Matsuoka, Z. G. Wang, M. Takaoka (2009). "Focal adhesion kinase as potential target for cancer therapy (Review)." Oncol Rep **22**(5): 973-979.

Hapke, S., H. Kessler, B. Lubber, A. Bengel, P. Hutzler, H. Hofler, M. Schmitt, U. Reuning (2003). "Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction." Biol Chem **384**(7): 1073-1083.

Harburger, D. S. i D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." J Cell Sci **122** (Pt 2): 159-163.

Hartwell, D. W. i D. D. Wagner (1999). "New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins." Thromb Haemost **82**(2): 850-857.

Haubner, R., H. J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger (2001). "Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography." Cancer Res **61**(5): 1781-1785.

Hauck, C. R., D. J. Sieg, D. A. Hsia, J. C. Loftus, W. A. Gaarde, B. P. Monia, D. D. Schlaepfer (2001). "Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells." Cancer Res **61**(19): 7079-7090.

Hermesen, M., M. A. Guervos, G. Meijer, J. Baak, P. van Diest, C. A. Marcos, A. Sampedro (2001). "New chromosomal regions with high-level amplifications in squamous cell carcinomas of the larynx and pharynx, identified by comparative genomic hybridization." J Pathol **194**(2): 177-182.

Hess, S., S. M. Kanse, C. Kost, K. T. Preissner (1995). "The versatility of adhesion receptor ligands in haemostasis: morpho-regulatory functions of vitronectin." Thromb Haemost **74**(1): 258-265.

Heyman, L., S. Kellouche, J. Fernandes, S. Dutoit, L. Poulain, F. Carreiras (2008). "Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro." Tumour Biol **29**(4): 231-244.

Hildebrand, J. D., M. D. Schaller, J. T. Parsons (1993). "Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions." J Cell Biol **123**(4): 993-1005.

Hood, J. D. i D. A. Cheresh (2002). "Role of integrins in cell invasion and migration." NATURE REVIEWS **2**: 91-100.

Hopkins, J., D. W. Cescon, D. Tse, P. Bradbury, W. Xu, C. Ma, P. Wheatley-Price, J. Waldron, D. Goldstein, F. Meyer, I. Bairati, G. Liu (2008). "Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(3): 490-499.

Huang, C., C. C. Park, S. G. Hilsenbeck, R. Ward, M. F. Rimawi, Y. C. Wang, J. Shou, M. J. Bissell, C. K. Osborne, R. Schiff (2011). "beta1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib." Breast Cancer Res **13**(4): R84.

Huhtala, M., J. Heino, D. Casciari, A. de Luise, M. S. Johnson (2005). "Integrin evolution: insights from ascidian and teleost fish genomes." Matrix Biol **24**(2): 83-95.

Humphries, M. J. i P. Newham (1998). "The structure of cell-adhesion molecules." Trends Cell Biol **8**(2): 78-83.

Hurt, E. M., K. Chan, M. A. D. Serrat, S. B. Thomas, T. D. Veenstra, W. L. Farrar (2010). "Identification of Vitronectin as an Extrinsic Inducer of Cancer Stem Cell Differentiation and Tumor Formation." Stem Cells **28**(3): 390-398.



Huveneers, S., S. Arslan, B. van de Water, A. Sonnenberg, E. H. Danen (2008). "Integrins uncouple Src-induced morphological and oncogenic transformation." J Biol Chem **283**(19): 13243-13251.

Huveneers, S., I. van den Bout, P. Sonneveld, A. Sancho, A. Sonnenberg, E. H. J. Danen (2007). "Integrin alpha(v)beta(3) controls activity and oncogenic potential of primed c-Src." Cancer Res **67**(6): 2693-2700.

Hynes, R. (1990). Fibronectins. New York Springer-Verlag.

Hynes, R. O. (1987). "Integrins A Family of Cell Surface Receptors." Cell **48**: 549-554.

Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.

Hynes, R. O. (1999). "Cell adhesion: old and new questions." Trends Cell Biol **9**(12): M33-37.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.

Hynes, R. O. (2009). "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." Science **326**(5957): 1216-1219.

Hynes, R. O. i A. D. Lander (1992). "Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons." Cell **68**(2): 303-322.

Hynes, R. O. i Q. Zhao (2000). "The evolution of cell adhesion." J Cell Biol **150**(2): F89-96.

Imoto, I., Z. Q. Yang, A. Pimkhaokham, H. Tsuda, Y. Shimada, M. Imamura, M. Ohki, J. Inazawa (2001). "Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas." Cancer Res **61**(18): 6629-6634.

Iozzo, R. V. i A. D. Murdoch (1996). "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function." FASEB J **10**(5): 598-614.

Iozzo, R. V., J. J. Zoeller, A. Nystrom (2009). "Basement membrane proteoglycans: modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis." Mol Cells **27**(5): 503-513.

Ischenko, I., P. Camaj, H. Seeliger, A. Kleespies, M. Guba, E. N. De Toni, B. Schwarz, C. Graeb, M. E. Eichhorn, K. W. Jauch, C. J. Bruns (2008). "Inhibition of Src tyrosine kinase reverts chemoresistance toward 5-fluorouracil in human pancreatic carcinoma cells: an involvement of epidermal growth factor receptor signaling." Oncogene **27**(57): 7212-7222.

Ishizawa, R. i S. J. Parsons (2004). "c-Src and cooperating partners in human cancer." Cancer Cell **6**(3): 209-214.

Izbicka, E. i A. W. Tolcher (2004). "Development of novel alkylating drugs as anticancer agents." Curr Opin Investig Drugs **5**(6): 587-591.

Janssen, M. L., W. J. Oyen, I. Dijkgraaf, L. F. Massuger, C. Frielink, D. S. Edwards, M. Rajopadhye, H. Boonstra, F. H. Corstens, O. C. Boerman (2002). "Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model." Cancer Res **62**(21): 6146-6151.

Januchowski, R., P. Zawierucha, M. Rucinski, M. Nowicki, M. Zabel (2014). "Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the a2780 ovarian cancer cell line." Biomed Res Int **2014**: 365867.

Jarvelainen, H., A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight, R. Penttinen (2009). "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." Pharmacol Rev **61**(2): 198-223.

Jin, C., Y. Jin, J. Wennerberg, K. Annertz, J. Enoksson, F. Mertens (2006). "Cytogenetic abnormalities in 106 oral squamous cell carcinomas." Cancer Genet Cytogenet **164**(1): 44-53.

Jinushi, M., S. Chiba, M. Baghdadi, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, K. Ito, H. Yoshiyama, H. Yagita, T. Uede, A. Takaoka (2012). "ATM-mediated DNA damage signals mediate immune escape through integrin-alpha(v)beta3-dependent mechanisms." Cancer Res **72**(1): 56-65.

Kadowaki, M., T. Sangai, T. Nagashima, M. Sakakibara, H. Yoshitomi, S. Takano, K. Sogawa, H. Umemura, K. Fushimi, Y. Nakatani, F. Nomura, M. Miyazaki (2011). "Identification of vitronectin as a novel serum marker for early breast cancer detection using a new proteomic approach." J Cancer Res Clin Oncol **137**(7): 1105-1115.

Kalra, J., C. Warburton, K. Fang, L. Edwards, T. Daynard, D. Waterhouse, W. Dragowska, B. W. Sutherland, S. Dedhar, K. Gelmon, M. Bally (2009). "QLT0267, a small molecule inhibitor targeting integrin-linked kinase (ILK), and docetaxel can combine to produce synergistic interactions linked to enhanced cytotoxicity, reductions in P-AKT levels, altered F-actin architecture and improved treatment outcomes in an orthotopic breast cancer model." Breast Cancer Res **11**(3): R25.

Kamangar, F., G. M. Dores, W. F. Anderson (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." J Clin Oncol **24**(14): 2137-2150.

Kang, Y., W. Hu, C. Ivan, H. J. Dalton, T. Miyake, C. V. Pecot, B. Zand, T. Liu, J. Huang, N. B. Jennings i sur. (2013). "Role of focal adhesion kinase in regulating YB-1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer." J Natl Cancer Inst **105**(19): 1485-1495.

Kansas, G. S. (1996). "Selectins and their ligands: Current concepts and controversies." Blood **88**(9): 3259-3287.

Kapp, T. G., F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, H. Kessler (2013). "Integrin modulators: a patent review." Expert Opin Ther Pat **23**(10): 1273-1295.

Karp, G. (2010). Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments. New York, John Wiley & Sons.

Kasugai, S., N. Hasegawa, H. Ogura (1990). "A simple in vitro cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A)." Japanese journal of pharmacology **52**(1): 95-100.

Kerr, J. R. (1999). "Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection." Mol Pathol **52**(4): 220-230.

Kim, L. C., L. X. Song, E. B. Haura (2009). "Src kinases as therapeutic targets for cancer." Nature Reviews Clinical Oncology **6**(10): 587-595.

Kopetz, S., D. P. Lesslie, N. A. Dallas, S. I. Park, M. Johnson, N. U. Parikh, M. P. Kim, J. L. Abbruzzese, L. M. Ellis, J. Chandra, G. E. Gallick (2009). "Synergistic Activity of the Src Family Kinase Inhibitor Dasatinib and Oxaliplatin in Colon Carcinoma Cells Is Mediated by Oxidative Stress." Cancer Res **69**(9): 3842-3849.

Kost, C., W. Stuber, H. J. Ehrlich, H. Pannekoek, K. T. Preissner (1992). "Mapping of binding sites for heparin, plasminogen activator inhibitor-1, and plasminogen to vitronectin's heparin-binding region reveals a novel vitronectin-dependent feedback mechanism for the control of plasmin formation." J Biol Chem **267**(17): 12098-12105.

Kozlova, N. I., G. E. Morozevich, A. A. Shtil, A. E. Berman (2004). "Multidrug-resistant tumor cells with decreased malignancy: a role for integrin  $\alpha v \beta 3$ ." Biochem Biophys Res Commun **316**(4): 1173-1177.

Kuphal, S., R. Bauer, A. K. Bosserhoff (2005). "Integrin signaling in malignant melanoma." Cancer Metastasis Rev **24**(2): 195-222.

Kutler, D. I., A. D. Auerbach, J. Satagopan, P. F. Giampietro, S. D. Batish, A. G. Huvos, A. Goberdhan, J. P. Shah, B. Singh (2003). "High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(1): 106-112.

Lange, A., S. A. Wickstrom, M. Jakobson, R. Zent, K. Sainio, R. Fassler (2009). "Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development." Nature **461**(7266): 1002-U1269.

Lara, P. N., Jr., J. Longmate, C. P. Evans, D. I. Quinn, P. Twardowski, G. Chatta, E. Posadas, W. Stadler, D. R. Gandara (2009). "A phase II trial of the Src-kinase inhibitor AZD0530 in patients with advanced castration-resistant prostate cancer: a California Cancer Consortium study." Anticancer Drugs **20**(3): 179-184.

Lasky, L. A. (1995). "Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response." Annu Rev Biochem **64**: 113-139.

Le, X. F. i R. C. Bast, Jr. (2011). "Src family kinases and paclitaxel sensitivity." Cancer Biol Ther **12**(4): 260-269.

Leavesley, D. I., G. D. Ferguson, E. A. Wayner, D. A. Cheresh (1992). "Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen." J Cell Biol **117**(5): 1101-1107.

Lee, S. L., E. C. Hsu, C. C. Chou, H. C. Chuang, L. Y. Bai, S. K. Kulp, C. S. Chen (2011). "Identification and characterization of a novel integrin-linked kinase inhibitor." J Med Chem **54**(18): 6364-6374.

Leemans, C. R., B. J. Braakhuis, R. H. Brakenhoff (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.

Legate, K. R., E. Montanez, O. Kudlacek, R. Fassler (2006). "ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(1): 20-31.

Legate, K. R., S. A. Wickstrom, R. Fassler (2009). "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling." Genes Dev **23**(4): 397-418.

Leiss, M., K. Beckmann, A. Giros, M. Costell, R. Fassler (2008). "The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo." Curr Opin Cell Biol **20**(5): 502-507.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nature Reviews Immunology **7**(9): 678-689.

Li, F., Y. Zhang, C. Wu (1999). "Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats." J Cell Sci **112 ( Pt 24)**: 4589-4599.

Liedert, B., D. Pluim, J. Schellens, J. Thomale (2006). "Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei." Nucleic Acids Res **34**(6).

Lippman, S. M. i W. K. Hong (1989). "Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease." Int J Radiat Oncol Biol Phys **17**(3): 691-694.

Liu, J., P. C. Costello, N. A. Pham, M. Pintillie, M. Jabali, J. Sanghera, M. S. Tsao, M. R. Johnston (2006). "Integrin-linked kinase inhibitor KP-392 demonstrates clinical benefits in an orthotopic human non-small cell lung cancer model." J Thorac Oncol **1**(8): 771-779.

Long, Q. Z., M. Zhou, X. G. Liu, Y. F. Du, J. H. Fan, X. Li, D. L. He (2013). "Interaction of CCN1 with alphavbeta3 integrin induces P-glycoprotein and confers vinblastine resistance in renal cell carcinoma cells." Anticancer Drugs **24**(8): 810-817.

Longley, D. B. i P. G. Johnston (2005). "Molecular mechanisms of drug resistance." J Pathol **205**(2): 275-292.

Lu, P., K. Takai, V. M. Weaver, Z. Werb (2011). "Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(12).

Lu, P., V. M. Weaver, Z. Werb (2012). "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression." J Cell Biol **196**(4): 395-406.

Lucero, H. A. i H. M. Kagan (2006). "Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function." Cell Mol Life Sci **63**(19-20): 2304-2316.

Luqmani, Y. A. (2005). "Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy." Med Princ Pract **14 Suppl 1**: 35-48.

Lynch, D. K., C. A. Ellis, P. A. Edwards, I. D. Hiles (1999). "Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism." Oncogene **18**(56): 8024-8032.

Mackinnon, A. C., H. Qadota, K. R. Norman, D. G. Moerman, B. D. Williams (2002). "C-elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes." Current Biology **12**(10): 787-797.

Majhen, D. i A. Ambriovic-Ristov (2006). "Adenoviral vectors--how to use them in cancer gene therapy?" Virus Res **119**(2): 121-133.

Majhen, D., J. Nemet, J. Richardson, J. Gabrilovac, M. Hajsig, M. Osmak, M. Eloit, A. Ambriovic-Ristov (2009). "Differential role of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in internalization and transduction efficacies of wild type and RGD<sub>4</sub>C fiber-modified adenoviruses." Virus Res **139**(1): 64-73.

Majhen, D., N. Stojanovic, T. Speljko, A. Brozovic, T. De Zan, M. Osmak, A. Ambriovic-Ristov (2011). "Increased expression of the coxsackie and adenovirus receptor downregulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin expression and reduces cell adhesion and migration." Life Sci **89**(7-8): 241-249.

Mao, Y. i J. E. Schwarzbauer (2005). "Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process." Matrix Biol **24**(6): 389-399.

Masuda, K., K. Banno, M. Yanokura, K. Tsuji, Y. Kobayashi, I. Kisu, A. Ueki, W. Yamagami, H. Nomura, E. Tominaga, N. Susumu, D. Aoki (2012). "Association of epigenetic inactivation of the WRN gene with anticancer drug sensitivity in cervical cancer cells." Oncol Rep **28**(4): 1146-1152.

Masumoto, N., S. Nakano, H. Fujishima, K. Kohno, Y. Niho (1999). "v-src induces cisplatin resistance by increasing the repair of cisplatin-DNA interstrand cross-links in human gallbladder adenocarcinoma cells." Int J Cancer **80**(5): 731-737.

Maubant, S., S. Cruet-Hennequart, L. Poulain, F. Carreiras, F. Sichel, J. Luis, C. Staedel, P. Gauduchon (2002). "Altered adhesion properties and alpha V integrin expression in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line." International Journal of Cancer **97**(2): 186-194.

Maubant, S., J. Leroy-Dudal, F. Carreiras, E. Deslandes, F. Duigou, C. Staedel, P. Gauduchon (2007). "Cell surface overexpression of alphavbeta5 integrin impedes alphavbeta3-mediated migration of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1." Cell Biol Int **31**(2): 109-118.

Mazon, R., Y. Tao, A. Lusinchi, J. Bourhis (2009). "Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer." Oral Oncol **45**(4-5): 402-408.

McCabe, N. P., S. De, A. Vasanthi, J. Brainard, T. V. Byzova (2007). "Prostate cancer specific integrin alphavbeta3 modulates bone metastatic growth and tissue remodeling." Oncogene **26**(42): 6238-6243.

McDonald, P. C., A. B. Fielding, S. Dedhar (2008). "Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology." J Cell Sci **121**(Pt 19): 3121-3132.

McLean, G. W., N. H. Komiyama, B. Serrels, H. Asano, L. Reynolds, F. Conti, K. Hodivala-Dilke, D. Metzger, P. Chambon, S. G. Grant, M. C. Frame (2004). "Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression." Genes Dev **18**(24): 2998-3003.

Meenderink, L. M., L. M. Ryzhova, D. M. Donato, D. F. Gochberg, I. Kaverina, S. K. Hanks (2010). "P130Cas Src-Binding and Substrate Domains Have Distinct Roles in Sustaining Focal Adhesion Disassembly and Promoting Cell Migration." PLoS One **5**(10).

Mehta, K. i Z. H. Siddik (2009). "Drug resistance in cancer cells." Springer, New York, NY.

Memmo, L. M. i P. McKeown-Longo (1998). "The alphavbeta5 integrin functions as an endocytic receptor for vitronectin." J Cell Sci **111** ( Pt 4): 425-433.

Menendez, J. A., L. Vellon, I. Mehmi, P. K. Teng, D. W. Griggs, R. 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): 761-779.

Milano, V., Y. Piao, T. LaFortune, J. de Groot (2009). "Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma." Mol Cancer Ther **8**(2): 394-406.

Millard, M., S. Odde, N. Neamati (2011). "Integrin targeted therapeutics." Theranostics **1**: 154-188.

Mitjans, F., T. Meyer, C. Fittschen, S. Goodman, A. Jonczyk, J. F. Marshall, G. Reyes, J. Piulats (2000). "In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins." Int J Cancer **87**(5): 716-723.

Mitra, S. K. i D. D. Schlaepfer (2006). "Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 516-523.

Miyamoto, S., H. Teramoto, O. A. Coso, J. S. Gutkind, P. D. Burbelo, S. K. Akiyama, K. M. Yamada (1995). "Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules." J Cell Biol **131**(3): 791-805.

Mizutani, Y., B. Bonavida, Y. Koishihara, K. Akamatsu, Y. Ohsugi, O. Yoshida (1995). "Sensitization of human renal cell carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum(II) by anti-interleukin 6 monoclonal antibody or anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody." Cancer Res **55**(3): 590-596.

Montanez, E., S. A. Wickstrom, J. Altstatter, H. Chu, R. Fassler (2009). "Alpha-parvin controls vascular mural cell recruitment to vessel wall by regulating RhoA/ROCK signalling." EMBO J **28**(20): 3132-3144.

Montero, J. C., S. Seoane, A. Ocana, A. Pandiella (2011). "Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors." Clin Cancer Res **17**(17): 5546-5552.

Morozevich, G. E., N. I. Kozlova, M. E. Preobrazhenskaya, N. A. Ushakova, I. A. Eltsov, A. A. Shtil, A. E. Berman (2006). "The role of beta1 integrin subfamily in anchorage-dependent apoptosis of breast carcinoma cells differing in multidrug resistance." Biochemistry (Mosc) **71**(5): 489-495.

Murase, S. i E. M. Schuman (1999). "The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 549-553.

Nakahara, S., E. Miyoshi, K. Noda, S. Ihara, J. Gu, K. Honke, H. Inohara, T. Kubo, N. Taniguchi (2003). "Involvement of oligosaccharide changes in alpha5beta1 integrin in a cisplatin-resistant human squamous cell carcinoma cell line." Mol Cancer Ther **2**(11): 1207-1214.

Nautiyal, J., P. Majumder, B. B. Patel, F. Y. Lee, A. P. Majumdar (2009). "Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by modulating EGFR signaling." Cancer Lett **283**(2): 143-151.

Nikolopoulos, S. N. i C. E. Turner (2001). "Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions." Journal of Biological Chemistry **276**(26): 23499-23505.

Nitiss, J. L. (2009). "Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy." Nat Rev Cancer **9**(5): 338-350.

Notarbartolo, M., M. Cervello, P. Poma, L. Dusonchet, M. Meli, N. D'Alessandro (2004). "Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells." Oncol Rep **11**(1): 133-136.

O'Connor, R., M. Clynes, P. Dowling, N. O'Donovan, L. O'Driscoll (2007). "Drug resistance in cancer – searching for mechanisms, markers and therapeutic agents." Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology **3**(6): 805-817.

Oneyama, C., E. Morii, D. Okuzaki, Y. Takahashi, J. Ikeda, N. Wakabayashi, H. Akamatsu, M. Tsujimoto, T. Nishida, K. Aozasa, M. Okada (2012). "MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase promotes Src-induced tumor progression." Oncogene **31**(13): 1623-1635.

Owen, J. D., P. J. Ruest, D. W. Fry, S. K. Hanks (1999). "Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2." Mol Cell Biol **19**(7): 4806-4818.

Pankov, R. i K. M. Yamada (2002). "Fibronectin at a glance." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3861-3863.

Parker, W. B. (2009). "Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer." Chem Rev **109**(7): 2880-2893.

Parsons, S. J. i J. T. Parsons (2004). "Src family kinases, key regulators of signal transduction." Oncogene **23**(48): 7906-7909.

Pasqualini, R., J. Bodorova, S. Ye, M. E. Hemler (1993a). "A Study of the Structure, Function and Distribution of Beta-5 Integrins Using Novel Anti-Beta-5 Monoclonal-Antibodies." J Cell Sci **105**: 101-111.

Pasqualini, R., J. Bodorova, S. Ye, M. E. Hemler (1993b). "A study of the structure, function and distribution of beta 5 integrins using novel anti-beta 5 monoclonal antibodies." J Cell Sci **105**(Pt 1): 101-111.

Paszek, M. J., D. Boettiger, V. M. Weaver, D. A. Hammer (2009). "Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate." PLoS Comput Biol **5**(12): e1000604.

Payne, S. i D. Miles (2008). "Mechanisms of anticancer drugs." Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery 7Ed: 3 volume set: 134.



- Pengetnze, Y., M. Steed, K. F. Roby, P. F. Terranova, C. C. Taylor (2003). "Src tyrosine kinase promotes survival and resistance to chemotherapeutics in a mouse ovarian cancer cell line." Biochem Biophys Res Commun **309**(2): 377-383.
- Persad, S. i S. Dedhar (2003). "The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression." Cancer Metastasis Rev **22**(4): 375-384.
- Petti, S. (2009). "Lifestyle risk factors for oral cancer." Oral Oncol **45**(4-5): 340-350.
- Pichot, C. S., S. M. Hartig, L. Xia, C. Arvanitis, D. Monisvais, F. Y. Lee, J. A. Frost, S. J. Corey (2009). "Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells." Br J Cancer **101**(1): 38-47.
- Pirazzoli, V., G. M. Ferraris, N. Sidenius (2013). "Direct evidence of the importance of vitronectin and its interaction with the urokinase receptor in tumor growth." Blood **121**(12): 2316-2323.
- Playford, M. P. i M. D. Schaller (2004). "The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology." Oncogene **23**(48): 7928-7946.
- Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith (2000). "Ligand binding to integrins." J Biol Chem **275**(29): 21785-21788.
- Podor, T. J., S. Campbell, P. Chindemi, D. M. Foulon, D. H. Farrell, P. D. Walton, J. I. Weitz, C. B. Peterson (2002). "Incorporation of vitronectin into fibrin clots. Evidence for a binding interaction between vitronectin and gamma A/gamma' fibrinogen." J Biol Chem **277**(9): 7520-7528.
- Preissner, K. T. (1989). "The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune systems." Blut **59**(5): 419-431.
- Preissner, K. T. (1991). "Structure and biological role of vitronectin." Annu Rev Cell Biol **7**: 275-310.
- Preissner, K. T. i D. Seiffert (1998). "Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling." Thromb Res **89**(1): 1-21.
- Puigvert, J. C., S. Huveneers, L. Fredriksson, M. O. H. Veld, B. van de Water, E. H. J. Danen (2009). "Cross-Talk between Integrins and Oncogenes Modulates Chemosensitivity." Mol Pharmacol **75**(4): 947-955.
- Raju, U., O. Riesterer, Z. Q. Wang, D. P. Molkenline, J. M. Molkenline, F. M. Johnson, B. Glisson, L. Milas, K. K. Ang (2012). "Dasatinib, a multi-kinase inhibitor increased radiation sensitivity by interfering with nuclear localization of epidermal growth factor receptor and by blocking DNA repair pathways." Radiother Oncol **105**(2): 241-249.

Ramirez, F. i H. C. Dietz (2009). "Extracellular microfibrils in vertebrate development and disease processes." J Biol Chem **284**(22): 14677-14681.

Ricard-Blum, S. (2011). "The collagen family." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(1): a004978.

Ricono, J. M., M. Huang, L. A. Barnes, S. K. Lau, S. M. Weis, D. D. Schlaepfer, S. K. Hanks, D. A. Cheresh (2009). "Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin alphavbeta5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis." Cancer Res **69**(4): 1383-1391.

Risinger, A. L., F. J. Giles, S. L. Mooberry (2009). "Microtubule dynamics as a target in oncology." Cancer Treat Rev **35**(3): 255-261.

Roberts, W. G., E. Ung, P. Whalen, B. Cooper, C. Hulford, C. Autry, D. Richter, E. Emerson, J. Lin, J. Kath i sur. (2008). "Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271." Cancer Res **68**(6): 1935-1944.

Rozario, T. i D. W. DeSimone (2010). "The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view." Dev Biol **341**(1): 126-140.

Santala, P. i J. Heino (1991). "Regulation of integrin-type cell adhesion receptors by cytokines." J Biol Chem **266**(34): 23505-23509.

Sarrazin, S., W. C. Lamanna, J. D. Esko (2011). "Heparan sulfate proteoglycans." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(7).

Sato, I., Y. Obata, K. Kasahara, Y. Nakayama, Y. Fukumoto, T. Yamasaki, K. K. Yokoyama, T. Saito, N. Yamaguchi (2009). "Differential trafficking of Src, Lyn, Yes and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain." J Cell Sci **122**(Pt 7): 965-975.

Satoh, T. H., T. A. Surmacz, O. Nyormoi, C. M. Whitacre (2003). "Inhibition of focal adhesion kinase by antisense oligonucleotides enhances the sensitivity of breast cancer cells to camptothecins." Biocell **27**(1): 47-55.

Sayed-yahosseini, S., L. Nini, T. S. Irvine, L. Dagnino (2012). "Essential role of integrin-linked kinase in regulation of phagocytosis in keratinocytes." FASEB J **26**(10): 4218-4229.

Schaefer, L. i R. V. Iozzo (2008). "Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction." J Biol Chem **283**(31): 21305-21309.

Schaefer, L. i R. M. Schaefer (2010). "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." Cell Tissue Res **339**(1): 237-246.

Schaller, M. D. i J. T. Parsons (1995). "pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk." Mol Cell Biol **15**(5): 2635-2645.

- Schlaepfer, D. D. i T. Hunter (1998). "Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?" Trends Cell Biol **8**(4): 151-157.
- Schroeck, F., N. Arroyo de Prada, S. Sperl, M. Schmitt, M. Viktor (2002). "Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin (Vn): mapping the binding sites on PAI-1 and Vn." Biol Chem **383**(7-8): 1143-1149.
- Schwartz, I., D. Seger, S. Shaltiel (1999). "Vitronectin." Int J Biochem Cell Biol **31**(5): 539-544.
- Schwartz, M. A., M. D. Schaller, M. H. Ginsberg (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 549-599.
- Schwarzbauer, J. E. i D. W. DeSimone (2011). "Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(7).
- Scully, C. i J. Bagan (2009). "Oral squamous cell carcinoma overview." Oral Oncol **45**(4-5): 301-308.
- Sen, B. i F. M. Johnson (2011). "Regulation of SRC family kinases in human cancers." J Signal Transduct **2011**: 865819.
- Sen, B., B. Saigal, N. Parikh, G. Gallick, F. M. Johnson (2009). "Sustained Src inhibition results in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and cancer cell survival via altered Janus-activated kinase-STAT3 binding." Cancer Res **69**(5): 1958-1965.
- Sethi, T., R. C. Rintoul, S. M. Moore, A. C. MacKinnon, D. Salter, C. Choo, E. R. Chilvers, I. Dransfield, S. C. Donnelly, R. Strieter, C. Haslett (1999). "Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo." Nat Med **5**(6): 662-668.
- Shah, J. P. i Z. Gil (2009). "Current concepts in management of oral cancer--surgery." Oral Oncol **45**(4-5): 394-401.
- Shapiro, C. L. i A. Recht (2001). "Side effects of adjuvant treatment of breast cancer." N Engl J Med **344**(26): 1997-2008.
- Shattil, S. J. (2005). "Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling." Trends Cell Biol **15**(8): 399-403.
- Shattil, S. J., C. Kim, M. H. Ginsberg (2010). "The final steps of integrin activation: the end game." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 288-300.
- Sheldrake, H. M. i L. H. Patterson (2009). "Function and antagonism of beta3 integrins in the development of cancer therapy." Curr Cancer Drug Targets **9**(4): 519-540.

Shillitoe, E. J. (2009). "The role of viruses in squamous cell carcinoma of the oropharyngeal mucosa." Oral Oncol **45**(4-5): 351-355.

Shimaoka, M. i T. A. Springer (2003). "Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function." Nat Rev Drug Discov **2**(9): 703-716.

Shor, A. C., E. A. Keschman, F. Y. Lee, C. Muro-Cacho, G. D. Letson, J. C. Trent, W. J. Pledger, R. Jove (2007). "Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival." Cancer Res **67**(6): 2800-2808.

Sieg, D. J., C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky, D. D. Schlaepfer (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." Nat Cell Biol **2**(5): 249-256.

Sieg, D. J., C. R. Hauck, D. D. Schlaepfer (1999). "Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration." J Cell Sci **112** ( Pt **16**): 2677-2691.

Siesser, P. M. i S. K. Hanks (2006). "The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer." Clin Cancer Res **12**(11 Pt 1): 3233-3237.

Sloan, E. K., N. Pouliot, K. L. Stanley, J. Chia, J. M. Moseley, D. K. Hards, R. L. Anderson (2006). "Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone." Breast Cancer Res **8**(2): R20.

Smith, C. S., V. M. Golubovskaya, E. Peck, L. H. Xu, B. P. Monia, X. Yang, W. G. Cance (2005). "Effect of focal adhesion kinase (FAK) downregulation with FAK antisense oligonucleotides and 5-fluorouracil on the viability of melanoma cell lines." Melanoma Res **15**(5): 357-362.

Song, W., R. Jiang, C. M. Zhao (2012). "Role of integrin-linked kinase in multi-drug resistance of human gastric carcinoma SGC7901/DDP cells." Asian Pac J Cancer Prev **13**(11): 5619-5625.

Sonoda, Y., Y. Matsumoto, M. Funakoshi, D. Yamamoto, S. K. Hanks, T. Kasahara (2000). "Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK) - Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60." Journal of Biological Chemistry **275**(21): 16309-16315.

Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol **57**: 827-872.

Stanchi, F., C. Grashoff, C. F. Nguemini Yonga, D. Grall, R. Fassler, E. Van Obberghen-Schilling (2009). "Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal-adhesion maturation." J Cell Sci **122**(Pt 11): 1800-1811.

- Stavrovskaya, A. A. (2000). "Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells." Biochemistry (Mosc) **65**(1): 95-106.
- Suh, H. N. i H. J. Han (2011). "Collagen I Regulates the Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells Through  $\alpha 2 \beta 1$  Integrin- and DDR1-Dependent Bmi-1." J Cell Physiol **226**(12): 3422-3432.
- Summy, J. M. i G. E. Gallick (2003). "Src family kinases in tumor progression and metastasis." Cancer Metastasis Rev **22**(4): 337-358.
- Summy, J. M. i G. E. Gallick (2006). "Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage." Clin Cancer Res **12**(5): 1398-1401.
- Suzuki, S. T. (1996). "Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway?" J Cell Biochem **61**(4): 531-542.
- Takada, Y., J. L. Strominger, M. E. Hemler (1987). "The Very Late Antigen Family of Heterodimers Is Part of a Superfamily of Molecules Involved in Adhesion and Embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3239-3243.
- Takada, Y., X. Ye, S. Simon (2007). "The integrins." Genome Biol **8**(5): 215.
- Tamm, I., S. M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D. A. Scudiero, G. Tudor, Y. H. Qui, A. Monks, M. Andreeff, J. C. Reed (2000). "Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias." Clin Cancer Res **6**(5): 1796-1803.
- Tan, C., S. Cruet-Hennequart, A. Troussard, L. Fazli, P. Costello, K. Sutton, J. Wheeler, M. Gleave, J. Sanghera, S. Dedhar (2004). "Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK)." Cancer Cell **5**(1): 79-90.
- Tessier-Lavigne, M. i C. S. Goodman (1996). "The molecular biology of axon guidance." Science **274**(5290): 1123-1133.
- Thomas, F., J. M. Holly, R. Persad, A. Bahl, C. M. Perks (2010). "Fibronectin confers survival against chemotherapeutic agents but not against radiotherapy in DU145 prostate cancer cells: involvement of the insulin like growth factor-1 receptor." Prostate **70**(8): 856-865.
- Thomas, J. W., M. A. Cooley, J. M. Broome, R. Salgia, J. D. Griffin, C. R. Lombardo, M. D. Schaller (1999). "The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin." J Biol Chem **274**(51): 36684-36692.
- Timpl, R. (1996). "Macromolecular organization of basement membranes." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 618-624.

Todd, R. C. i S. J. Lippard (2009). "Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds." Metallomics **1**(4): 280-291.

Troussard, A. A., P. C. McDonald, E. D. Wederell, N. M. Mawji, N. R. Filipenko, K. A. Gelmon, J. E. Kucab, S. E. Dunn, J. T. Emerman, M. B. Bally, S. Dedhar (2006). "Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival." Cancer Res **66**(1): 393-403.

Tsang, K. Y., M. C. Cheung, D. Chan, K. S. Cheah (2010). "The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation." Cell Tissue Res **339**(1): 93-110.

Tumbarello, D. A., J. Temple, J. D. Brenton (2012). "beta 3 integrin modulates transforming growth factor beta induced (TGFBI) function and paclitaxel response in ovarian cancer cells." Molecular Cancer **11**.

Uhm, J. H., N. P. Dooley, A. P. Kyritsis, J. S. Rao, C. L. Gladson (1999). "Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death." Clin Cancer Res **5**(6): 1587-1594.

Vakaloglou, K. i C. Zervas (2012). "Parvin-ILK: An intimate relationship." Bioarchitecture **2**(3): 91-94.

van der Flier, A. i A. Sonnenberg (2001). "Function and interactions of integrins." Cell Tissue Res **305**(3): 285-298.

van Nimwegen, M. J. i B. van de Water (2007). "Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy." Biochem Pharmacol **73**(5): 597-609.

Varki, A. (1997). "Selectin ligands: will the real ones please stand up?" J Clin Invest **100**(11 Suppl): S31-35.

Varma, R. R., S. M. Hector, K. Clark, W. R. Greco, L. Hawthorn, L. Pendyala (2005). "Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10." Oncol Rep **14**(4): 925-932.

Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin, E. Fuchs (2000). "Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion." Cell **100**(2): 209-219.

Vaughn, D. E. i P. J. Bjorkman (1996). "The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules." Neuron **16**(2): 261-273.

Vellon, L., J. A. Menendez, H. Liu, R. Lupu (2007). "Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression is a novel molecular response to chemotherapy-induced cell damage in a heregulin-dependent manner." Differentiation **75**(9): 819-830.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt i sur. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-1351.

Verma, A., H. Wang, B. Manavathi, J. Y. Fok, A. P. Mann, R. Kumar, K. Mehta (2006). "Increased expression of tissue transglutaminase in pancreatic ductal adenocarcinoma and its implications in drug resistance and metastasis." Cancer Res **66**(21): 10525-10533.

Volm, M., R. Koomagi, J. Mattern, T. Efferth (2002). "Protein expression profiles indicative for drug resistance of non-small cell lung cancer." Br J Cancer **87**(3): 251-257.

Waksman, G. i J. Kuriyan (2004). "Structure and specificity of the SH2 domain." Cell **116**(2 Suppl): S45-48, 43 p following S48.

Wang, L., J. Shen, L. J. Meng, W. F. Fan, J. Wang, B. R. Liu (2013). "[Correlation between the methylation of SULF2 and WRN promoter and chemosensitivity to irinotecan in gastric cancer]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi **35**(6): 418-422.

Wang, M. Y., P. S. Chen, E. Prakash, H. C. Hsu, H. Y. Huang, M. T. Lin, K. J. Chang, M. L. Kuo (2009). "Connective Tissue Growth Factor Confers Drug Resistance in Breast Cancer through Concomitant Up-regulation of Bcl-xL and cIAP1." Cancer Res **69**(8): 3482-3491.

Wang, Y., X. L. Niu, Y. Qu, J. Wu, Y. Q. Zhu, W. J. Sun, L. Z. Li (2010). "Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells." Cancer Lett **295**(1): 110-123.

Wani, A. A., S. M. Jafarnejad, J. Zhou, G. Li (2011). "Integrin-linked kinase regulates melanoma angiogenesis by activating NF-kappaB/interleukin-6 signaling pathway." Oncogene **30**(24): 2778-2788.

Wayner, E. A., R. A. Orlando, D. A. Cheresh (1991). "Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface." J Cell Biol **113**(4): 919-929.

Wegiel, B., A. Bjartell, Z. Culig, J. L. Persson (2008). "Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival." Int J Cancer **122**(7): 1521-1529.

Weis, S. M. i D. A. Cheresh (2011). "alphav Integrins in Angiogenesis and Cancer." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): a006478.

Wheeler, D. L., M. Iida, E. F. Dunn (2009). "The role of Src in solid tumors." Oncologist **14**(7): 667-678.

White, D. E., R. D. Cardiff, S. Dedhar, W. J. Muller (2001). "Mammary epithelial-specific expression of the integrin linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice." Oncogene **20**(48): 7064-7072.

Wickstrom, S. A. i R. Fassler (2011). "Regulation of membrane traffic by integrin signaling." Trends Cell Biol **21**(5): 266-273.

Wickstrom, S. A., A. Lange, M. W. Hess, J. Polleux, J. P. Spatz, M. Kruger, K. Pfaller, A. Lambacher, W. Bloch, M. Mann, L. A. Huber, R. Fassler (2010a). "Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae." Dev Cell **19**(4): 574-588.

Wickstrom, S. A., A. Lange, E. Montanez, R. Fassler (2010b). "The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase!" Embo Journal **29**(2): 281-291.

Wise, S. G. i A. S. Weiss (2009). "Tropoelastin." Int J Biochem Cell Biol **41**(3): 494-497.

Wong, N. C., B. M. Mueller, C. F. Barbas, Pete Ruminski, V. Quaranta, E. C. K. Lin, J. W. Smith (1998). "av Integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines." Clin. Exp. Metastasis(16): 50-61.

Woolgar, J. A. i A. Triantafyllou (2009). "Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis." Oral Oncol **45**(4-5): 361-385.

Wu, Q. i T. Maniatis (1999). "A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes." Cell **97**(6): 779-790.

Wu, Y. P., H. J. Bloemendal, E. E. Voest, T. Logtenberg, P. G. de Groot, M. F. Gebbink, H. C. de Boer (2004). "Fibrin-incorporated vitronectin is involved in platelet adhesion and thrombus formation through homotypic interactions with platelet-associated vitronectin." Blood **104**(4): 1034-1041.

Xiao, T., J. Takagi, B. S. Collier, J. H. Wang, T. A. Springer (2004). "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." Nature **432**(7013): 59-67.

Xiong, J. P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." Science **294**(5541): 339-345.

Xiong, J. P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout (2002). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." Science **296**(5565): 151-155.

Xu, L. H., X. Yang, R. J. Craven, W. G. Cance (1998). "The COOH-terminal domain of the focal adhesion kinase induces loss of adhesion and cell death in human tumor cells." Cell Growth Differ **9**(12): 999-1005.



Yamada, K. M. i S. Miyamoto (1995). "Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control." Curr Opin Cell Biol **7**(5): 681-689.

Yamaji, S., A. Suzuki, Y. Sugiyama, Y. Koide, M. Yoshida, H. Kanamori, H. Mohri, S. Ohno, Y. Ishigatsubo (2001). "A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction." Journal of Cell Biology **153**(6): 1251-1264.

Yau, C. Y., J. J. Wheeler, K. L. Sutton, D. W. Hedley (2005). "Inhibition of integrin-linked kinase by a selective small molecule inhibitor, QLTo254, inhibits the PI3K/PKB/mTOR, Stat3, and FKHR pathways and tumor growth, and enhances gemcitabine-induced apoptosis in human orthotopic primary pancreatic cancer xenografts." Cancer Res **65**(4): 1497-1504.

Yeatman, T. J. (2004). "A renaissance for SRC." Nat Rev Cancer **4**(6): 470-480.

Younes, M. N., S. Kim, O. G. Yigitbasi, M. Mandal, S. A. Jasser, Y. D. Yazici, B. A. Schiff, A. El-Naggar, B. N. Bekele, G. B. Mills, J. N. Myers (2005). "Integrin-linked kinase is a potential therapeutic target for anaplastic thyroid cancer." Mol Cancer Ther **4**(8): 1146-1156.

Yurchenco, P. D. (2011). "Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(2).

Zaidel-Bar, R. i B. Geiger (2010). "The switchable integrin adhesome." J Cell Sci **123**(Pt 9): 1385-1388.

Zhang, C., D. Wei, Z. Luo, Y. Liu, T. Liao (2010). "Synthetic peptide coupled to KLH elicits antibodies against beta8 integrin." Hybridoma (Larchmt) **29**(4): 361-366.

Zhang, N., Y. Yin, S. J. Xu, W. S. Chen (2008). "5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies." Molecules **13**(8): 1551-1569.

Zhang, S. Y. i D. H. Yu (2012). "Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph." Trends Pharmacol Sci **33**(3): 122-128.

Zhang, X. H., Q. Wang, W. Gerald, C. A. Hudis, L. Norton, M. Smid, J. A. Foekens, J. Massague (2009). "Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals." Cancer Cell **16**(1): 67-78.

Zhang, Y., H. Lu, P. Dazin, Y. Kapila (2004). "Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated anoikis: fibronectin and integrin alphav mediate survival signals through focal adhesion kinase." J Biol Chem **279**(46): 48342-48349.

Zhao, J., R. Pestell, J. L. Guan (2001). "Transcriptional activation of cyclin D1 promoter by FAK contributes to cell cycle progression." Mol Biol Cell **12**(12): 4066-4077.

Zhou, X., F. R. Murphy, N. Gehdu, J. Zhang, J. P. Iredale, R. C. Benyon (2004). "Engagement of alphavbeta3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells." J Biol Chem **279**(23): 23996-24006.

Zhu, M. Y., D. Chen, D. Y. Li, H. Ding, T. Zhang, T. D. Xu, Y. B. Zhang (2013). "Luteolin Inhibits Angiotensin II-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cell Proliferation and Migration Through Downregulation of Src and Akt Phosphorylation." Circulation Journal **77**(3): 772-779.

Web izvori:

ClinicalTrials. URL: <https://clinicaltrials.gov/> [24.02.2014.]

[Université de Fribourg | Universität Freiburg.](#)

URL: [:http://www.unifr.ch/pathology/en/background/tumorangiogenesis](http://www.unifr.ch/pathology/en/background/tumorangiogenesis) [05.03.2014.]

## 8. SAŽETAK

Integrini djeluju kao mehanosenzori, adhezijske molekule i mjesta prijenosa signala, a integrinima posredovane interakcije s izvanstaničnim matriksom važne su za prihvaćanje stanica, organizaciju citoskeleta, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica tijekom velikog broja bioloških procesa poput embrionalnog razvitka, imunskog odgovora, resorpcije kosti, agregacije trombocita te patoloških procesa poput upale, angiogeneze i metastaziranja tumora. Ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  povećana je u različitim tumorima u kojima potiče rast tumora, metastaziranje i preživljenje; njegova ekspresija korelira sa smanjenim preživljenjem pacijenata, a pokazana je i njegova uloga u otpornosti stanica na protutumorske lijekove. Zbog svih ovih karakteristika integrin  $\alpha_v\beta_3$  jedan je od meta u terapiji tumora. Temelj za ovo istraživanje opažena je otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C, na modelu stanica karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka Cal27 transficiranih plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina  $\beta_3$ . Cilj ove doktorske disertacije je istražiti mehanizam opažene otpornosti  $\beta_3$ -stabilno transficiranih klonova, adheziju i migraciju stanica u odnosu na roditeljsku staničnu liniju Cal27.

Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi razlikuju se od kontrolnih stanica po *de novo* ekspresiji integrina  $\alpha_v\beta_3$ , povećanoj ekspresiji integrina  $\alpha_v\beta_5$  i povećanoj adheziji na vitronektin i fibronektin koja korelira s ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  i/ili  $\alpha_v\beta_5$ . Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi pokazuju otpornost na protutumorske lijekove cisplatinu, doksorubicin, mitomicin C, etopozid i 5-fluorouracil u odnosu na stanice Cal27, koja nije posljedica ni smanjenog nakupljanja lijeka u stanicama, niti promjena u količini glutaciona. Za fenomen otpornosti zaslužna je *de novo* ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$ , a ne povećanje ekspresije integrina  $\alpha_v\beta_5$  u otpornim klonovima. Analiza ekspresije kinaza, preko kojih integrini mogu provoditi signale u stanicu, u integrin  $\beta_3$ -stabilno transficiranim klonovima pokazala je smanjenu količinu nereceptorske tirozin kinaze Src i pSrc (Y418), te povećanu količinu kinaze vezane za integrin (ILK) i smanjenu količinu pILK (T173). Utišavanjem ekspresije mRNA za ILK i Src te korištenjem dasatiniba, inhibitora fosforilacije pSrc (Y418), pokazano je kako je upravo smanjenje fosforilacije pSrc (Y418) koji se nalazi u fokalnim adhezijama, odgovorno za primijećeni fenomen otpornosti na protutumorske lijekove, pri čemu pSrc (Y418) nestaje iz fokalnih adhezija nekih od integrina  $\alpha_v$ . Iako pSrc (Y418) nestaje iz fokalnih adhezija nastalih vezanjem integrina  $\alpha_v\beta_5$ , pokazano je da to ne utječe na promjenu osjetljivosti stanica na protutumorske lijekove. Integrin  $\beta_3$ -stabilno transficirani klonovi pokazuju smanjenu sposobnost migracije što je vrlo vjerojatno posljedica smanjene

količine Src. Iako povećanje ekspresije ILK u klonu Cal27-2B1 koji eksplicira integrin  $\alpha_v\beta_3$  nije odgovorno za primijećeni fenomen otpornosti na protutumorske lijekove, pokazano je da ILK povećava ekspresiju interleukina 6 koji potencijalno može imati ulogu u poticanju angiogeneze u tumorima. Ovi rezultati pokazuju kako se lijekovi koji inhibiraju fosforilaciju Src, a koji su prepoznati kao molekule za liječenje mnogih tipova tumora, u nekim slučajevima ne mogu koristiti istovremeno s protutumorskim lijekovima koji djeluju preko molekule DNA, jer mogu imati manji terapijski učinak.

## 9. SUMMARY

Integrins act as mechanosensors, adhesion molecules and signal transduction platforms and integrin-mediated interactions with the extracellular matrix are required for cell attachment, cytoskeletal organization, migration, proliferation, differentiation and survival of cells in the context of a multitude of biological processes including embryonic development, immune response, bone resorption, platelet aggregation, and in pathological processes such as inflammation, angiogenesis and tumor metastasis. Expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$  is increased in a variety of tumors in which it promotes tumor growth, metastasis and survival; its expression correlates with decreased survival in patients, and the role in cell resistance to anticancer drugs has been shown. Because of these characteristics integrin  $\alpha_v\beta_3$  is one of the targets in tumor therapy. The basis for this study is the observed resistance to anticancer drugs cisplatin, doxorubicin and mitomycin C, in the model of human tongue squamous carcinoma cells Cal27 transfected with a plasmid containing a gene for an integrin  $\beta_3$  subunit. The aim of this doctoral thesis was to investigate the mechanism of the observed resistance in the integrin  $\beta_3$ -stably transfected cell clones, cell adhesion and migration in relation to the parental cell line Cal27.

Integrin  $\beta_3$ -stably transfected clones differ from the control cells in *de novo* expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$ , increased expression of integrin  $\alpha_v\beta_5$  and increased adhesion to vitronectin and fibronectin, which correlates with the amount of expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$  and/or  $\alpha_v\beta_5$ . Integrin  $\beta_3$ -stably transfected clones show resistance to antitumor drugs cisplatin, doxorubicin, mitomycin C, etoposide and 5-fluorouracil as compared to Cal27 cells, which is not a consequence of reduced drug accumulation in the cells, or a change in the amount of glutathione. *De novo* expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$ , and not the increased expression of integrin  $\alpha_v\beta_5$  in resistant clones is responsible for the resistance phenomenon. Analysis of the expression of kinases through which integrins can transfer signals into the cell, showed a reduced amount of nonreceptor tyrosin kinase Src and pSrc (Y418), an increase in the level of integrin linked kinase ILK and reduced amounts of pILK (T173) in the integrin  $\beta_3$ -stably transfected clones. By silencing the mRNA expression of ILK and Src and by using dasatinib, an inhibitor of pSrc (Y418) phosphorylation, it was demonstrated that the decreased phosphorylation of pSrc (Y418), which is located in the focal adhesions, is responsible for the phenomena of resistance to antitumor drugs, wherein pSrc (Y418) disappears from the focal adhesions formed by binding of some of  $\alpha_v$  integrins. Although pSrc (Y418) disappears from the focal adhesions formed by binding of integrin  $\alpha_v\beta_5$  it has

been shown that this does not affect cell sensitivity to anticancer drugs. Integrin  $\beta_3$ -stably transfected clones showed reduced migration ability, very likely due to the reduced amount of Src in the cells. Although an increase in the expression of ILK in the Cal27-2B1 clone expressing integrin  $\alpha_v\beta_3$  is not responsible for the phenomena of resistance to anticancer drugs, it has been shown that ILK increases the expression of interleukin 6, which could have a potential role in inducing angiogenesis in tumors.

These results show that drugs that inhibit the phosphorylation of Src, which has been identified as molecules for treatment of many cancers, cannot, in some cases, be used simultaneously with antitumor drugs which act through the DNA molecule, as they may have a lower therapeutic effect.



## **10. PRILOZI**

**Prilog 1. Ekspresija gena u Cal27 staničnom modelu dobivena uz pomoć metode *real-time* RT-PCR.** Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć dva kontrolna gena (GAPDH i ACTB). Crveno su označene vrijednosti veće 1,5 puta, a zeleno vrijednosti ekspresije gena manje od 0,5 puta u odnosu na vrijednosti Cal27 stanica.

Geni	Ekspresija ± SD															
	Cal27		Cal27-Φ		Cal27-2B1		Cal27-2B3		Cal27 IC50		Cal27-Φ IC50		Cal27-2B1 IC50		Cal27-2B3 IC50	
AKT1	1,00	0,43	0,87	0,26	1,12	0,50	1,11	0,35	0,60	0,07	0,46	0,03	0,83	0,11	0,64	0,03
APEX1	1,00	0,43	0,46	0,14	1,08	0,48	1,04	0,33	0,56	0,06	0,41	0,02	0,84	0,11	0,76	0,04
ARHGDI A	1,00	0,43	0,96	0,29	0,91	0,41	1,10	0,35	0,45	0,05	0,37	0,02	0,43	0,06	0,47	0,03
ATG3	1,00	0,43	1,18	0,36	0,79	0,35	0,62	0,19	0,47	0,05	0,41	0,02	0,45	0,06	0,41	0,02
ATG7	1,00	0,43	1,20	0,36	0,73	0,33	1,06	0,33	0,66	0,08	0,57	0,03	0,58	0,08	0,73	0,04
BAX	1,00	0,88	1,18	1,57	0,83	1,35	1,32	1,09	0,09	0,01	0,12	0,01	0,09	0,01	0,10	0,01
BCL2	1,00	0,48	1,54	0,66	1,94	0,97	1,62	0,53	0,78	0,09	0,71	0,04	0,76	0,10	0,91	0,05
BECN1	1,00	0,98	1,25	0,75	1,17	0,56	1,09	0,55	1,53	0,17	1,09	0,06	1,21	0,16	1,26	0,07
BID	1,00	0,75	1,20	0,62	1,12	0,50	0,82	0,48	1,04	0,12	0,91	0,05	1,10	0,14	0,97	0,05
BRCA1	1,00	0,76	0,37	0,34	0,20	0,22	0,42	0,35	1,12	0,93	0,97	1,06	1,16	1,02	1,39	1,30
BRCA2	1,00	0,59	0,15	0,06	0,08	0,04	0,22	0,13	0,92	0,23	0,67	0,08	0,69	0,13	0,65	0,18
CASP2	1,00	0,43	0,46	0,14	0,15	0,07	0,72	0,23	0,59	0,07	0,50	0,03	0,59	0,08	0,65	0,04
CCNA1	1,00	0,44	0,72	0,28	0,31	0,25	0,31	0,11	0,13	0,03	0,11	0,04	0,10	0,04	0,06	0,02
CCNB1	1,00	0,43	0,67	0,20	0,95	0,43	1,29	0,41	0,32	0,04	0,25	0,01	0,34	0,04	0,35	0,02
CCNE1	1,00	±0,43	1,36	0,41	1,00	0,45	2,70	0,85	0,72	0,08	0,52	0,03	1,02	0,13	1,52	0,08
CD44	1,00	0,43	1,03	0,31	0,71	0,32	0,87	0,27	0,38	0,04	0,33	0,02	0,32	0,04	0,37	0,02
CDC25a	1,00	1,57	0,66	1,12	0,33	0,73	0,87	1,30	0,64	1,06	0,64	1,16	0,74	1,31	0,77	1,26
CDC25b	1,00	0,43	1,41	0,42	0,89	0,40	2,37	0,75	0,99	0,11	1,15	0,07	1,70	0,22	1,33	0,07
CDKN1a	1,00	0,43	2,60	0,78	1,02	0,45	1,81	0,57	1,01	0,12	0,72	0,04	1,62	0,21	1,77	0,10
CDKN1b	1,00	0,92	0,97	0,38	0,77	0,39	1,11	0,46	0,82	0,09	1,04	0,06	1,56	0,20	0,93	0,05
cFOS	1,00	0,43	0,36	0,11	0,64	0,29	0,70	0,22	0,53	0,06	0,36	0,02	0,29	0,04	0,15	0,01
CHEK1	1,00	0,43	0,55	0,17	0,65	0,29	0,63	0,20	0,63	0,07	0,53	0,03	0,72	0,09	0,64	0,03
CHEK2	1,00	0,60	1,46	0,44	0,95	0,47	0,70	0,25	1,14	0,13	0,99	0,06	1,26	0,16	0,98	0,05
c-IAP1 (BIRC3)	1,00	1,12	1,18	1,11	2,75	3,63	3,97	7,91	14,80	1,69	9,09	0,53	13,05	1,70	11,01	0,59
C-JUN	1,00	0,43	0,14	0,04	0,43	0,19	0,90	0,29	0,66	0,08	0,48	0,03	0,68	0,09	0,37	0,02
CXCR4	1,00	0,88	6,85	3,09	6,36	3,13	0,92	0,49	2,25	0,57	4,53	0,93	2,65	1,06	0,62	0,39
CYP1A1	1,00	0,43	0,49	0,15	1,18	0,53	0,98	0,31	0,53	0,06	0,47	0,03	0,56	0,07	1,05	0,06
DDB2	1,00	0,96	1,74	0,80	1,07	0,63	0,82	0,43	1,55	0,18	1,19	0,07	1,74	0,23	1,44	0,08

DDIT3	1,00	0,50	1,57	0,92	0,60	0,35	0,65	0,33	0,44	0,05	0,47	0,03	1,20	0,16	0,91	0,05
ERCC1	1,00	1,32	1,42	0,85	1,03	0,97	0,74	0,66	0,93	0,11	0,89	0,05	0,99	0,13	0,83	0,04
FANCC	1,00	0,43	0,68	0,20	1,09	0,49	1,20	0,38	1,37	0,16	1,01	0,06	1,38	0,18	1,42	0,08
FAS-L	1,00	0,43	1,25	0,38	0,77	0,34	0,41	0,13	0,54	0,06	1,09	0,06	0,56	0,07	0,70	0,04
FAS-R	1,00	0,43	0,47	0,14	0,31	0,14	1,03	0,33	2,10	0,24	0,76	0,04	2,12	0,28	2,70	0,14
FEN1	1,00	0,43	1,13	0,34	0,99	0,44	0,72	0,23	0,60	0,07	0,53	0,03	0,57	0,07	0,63	0,03
GADD45A	1,00	0,43	0,78	0,23	0,95	0,42	0,61	0,19	0,48	0,05	0,41	0,02	0,69	0,09	0,57	0,03
GPX1	1,00	0,43	0,58	0,18	1,28	0,57	0,87	0,28	0,62	0,07	0,64	0,04	0,74	0,10	0,89	0,05
GSTM1	1,00	1,07	3,77	1,77	2,99	2,04	1,62	1,43	0,56	0,06	0,59	0,03	2,37	0,31	1,34	0,07
HIF1a	1,00	0,43	0,92	0,28	1,11	0,50	1,40	0,44	1,22	0,14	1,18	0,07	1,77	0,23	1,42	0,08
HMOX1	1,00	0,44	1,35	0,69	0,79	0,60	0,79	0,46	0,71	0,08	0,59	0,03	0,83	0,11	0,89	0,05
HSP90	1,00	0,43	1,29	0,39	0,27	0,12	0,82	0,26	0,68	0,08	0,47	0,03	0,63	0,08	0,57	0,03
HSPA1b	1,00	0,43	1,21	0,36	0,68	0,30	0,85	0,27	0,68	0,08	0,50	0,03	0,50	0,07	0,59	0,03
HUS	1,00	0,43	1,14	0,34	1,36	0,61	0,99	0,31	0,90	0,10	0,80	0,05	0,91	0,12	1,38	0,07
ICAM1	1,00	0,43	1,25	0,38	0,63	0,28	1,07	0,34	1,62	0,18	1,23	0,07	2,19	0,29	1,93	0,10
IL6	1,00	1,22	1,06	1,23	4,82	2,36	5,25	2,65	2,92	1,00	2,77	0,28	6,81	1,59	5,30	1,41
ITGB1	1,00	1,59	0,96	1,29	0,85	1,07	1,55	1,42	3,03	0,35	2,65	0,16	2,72	0,35	3,34	0,18
LAMP1	1,00	0,43	0,95	0,29	0,85	0,38	0,86	0,27	0,83	0,09	0,62	0,04	0,89	0,12	1,05	0,06
LIG1	1,00	0,43	0,64	0,19	0,71	0,32	1,08	0,34	1,08	0,12	0,82	0,05	0,96	0,12	0,84	0,05
LIG3	1,00	0,43	0,98	0,29	0,25	0,11	1,47	0,46	0,80	0,09	0,94	0,06	0,73	0,10	0,94	0,05
LIG4	1,00	1,24	1,07	0,98	0,83	0,70	1,01	0,68	1,69	0,19	1,49	0,09	1,13	0,15	1,39	0,07
MDM2	1,00	0,50	0,30	0,18	0,11	0,08	0,57	0,26	0,69	0,31	0,85	0,38	0,67	0,40	0,64	0,34
MGMT	1,00	0,43	1,09	0,33	1,04	0,46	0,34	0,11	0,29	0,03	0,28	0,02	0,26	0,03	0,15	0,01
MMP13	1,00	0,44	1,50	0,47	1,14	0,57	0,45	0,17	1,03	0,12	0,85	0,05	1,34	0,17	0,58	0,03
MMP3	1,00	0,46	1,71	0,96	7,02	3,49	3,39	1,08	0,42	0,18	0,40	0,25	1,17	0,39	0,64	0,24
MMP7	1,00	1,04	0,48	0,98	0,63	0,29	0,61	0,25	0,47	0,05	0,26	0,02	0,36	0,05	0,21	0,01
MPG	1,00	0,43	0,69	0,21	0,80	0,36	0,70	0,22	0,53	0,06	0,52	0,03	0,62	0,08	0,51	0,03
MRE11a	1,00	0,69	1,60	0,64	0,91	0,41	0,89	0,32	1,43	0,16	1,37	0,08	1,45	0,19	1,37	0,07
MSH2	1,00	0,43	0,66	0,20	0,70	0,31	0,58	0,18	0,66	0,08	0,55	0,03	0,53	0,07	0,60	0,03
NOS3	1,00	0,43	2,44	0,73	1,20	0,54	0,57	0,18	1,96	0,22	3,07	0,18	4,23	0,55	3,29	0,18
OGG1	1,00	0,43	0,80	0,24	1,09	0,49	1,38	0,43	0,77	0,09	0,81	0,05	0,91	0,12	0,90	0,05
PARP1	1,00	0,43	0,93	0,28	1,02	0,46	1,08	0,34	0,63	0,07	0,62	0,04	0,67	0,09	0,66	0,04

PCNA	1,00	0,43	0,64	0,19	1,15	0,52	0,74	0,23	0,56	0,06	0,44	0,03	0,57	0,07	0,56	0,03
POLD1	1,00	0,43	0,37	0,11	0,08	0,04	0,61	0,19	0,58	0,07	0,59	0,03	0,69	0,09	0,67	0,04
POLE	1,00	0,43	0,12	0,04	0,01	0,01	0,52	0,16	0,40	0,05	0,39	0,02	0,51	0,07	0,41	0,02
PTEN	1,00	0,43	0,61	0,18	0,71	0,32	0,80	0,25	0,46	0,05	0,39	0,02	0,52	0,07	0,61	0,03
RAC1	1,00	0,43	1,10	0,33	1,16	0,52	1,20	0,38	0,78	0,09	0,55	0,03	0,69	0,09	0,72	0,04
RAD51	1,00	0,43	0,23	0,07	0,25	0,11	0,38	0,12	0,20	0,02	0,15	0,01	0,22	0,03	0,17	0,01
REV1	1,00	0,57	1,27	0,44	0,96	0,47	0,93	0,38	1,28	0,15	0,75	0,04	1,09	0,14	1,08	0,06
REV3	1,00	0,43	0,23	0,07	0,18	0,08	0,66	0,21	1,01	0,12	0,77	0,05	0,97	0,13	1,00	0,05
RHOA	1,00	0,43	1,14	0,34	1,70	0,76	1,30	0,41	1,00	0,11	0,79	0,05	1,26	0,16	0,93	0,05
RHOB	1,00	0,43	0,90	0,27	0,81	0,36	1,18	0,37	0,78	0,09	0,72	0,04	0,82	0,11	0,48	0,03
SOD1	1,00	0,43	0,53	0,16	1,63	0,73	1,27	0,40	0,97	0,11	0,89	0,05	1,37	0,18	1,15	0,06
TIAM1	1,00	0,76	1,01	0,62	0,77	0,70	0,91	0,30	1,33	0,15	1,05	0,06	0,78	0,10	0,90	0,05
TIMP2	1,00	0,43	1,31	0,40	0,63	0,28	1,68	0,53	1,40	0,16	1,94	0,11	1,70	0,22	2,30	0,12
TOP2A	1,00	0,43	0,70	0,21	0,52	0,24	0,87	0,27	0,70	0,08	0,49	0,03	0,60	0,08	0,78	0,04
TOP2B	1,00	0,63	0,61	0,20	0,21	0,10	0,44	0,24	1,26	0,39	1,28	0,15	1,49	0,26	1,38	0,31
TREX1	1,00	0,43	1,38	0,42	1,13	0,51	0,86	0,27	1,50	0,17	0,86	0,05	0,94	0,12	1,22	0,07
TRP53	1,00	0,66	1,53	1,63	1,46	0,92	1,59	0,54	1,07	0,12	0,84	0,05	1,46	0,19	2,09	0,11
TRP73	1,00	0,44	0,58	0,32	0,37	0,26	0,53	0,18	0,74	0,13	0,90	0,41	1,30	0,50	0,97	0,23
TXNRD1	1,00	0,43	1,15	0,35	0,78	0,35	0,78	0,25	0,77	0,09	0,70	0,04	0,75	0,10	0,70	0,04
VCAM	1,00	0,43	3,95	1,19	0,39	0,18	0,84	0,27	1,44	0,16	1,26	0,07	1,63	0,21	1,85	0,10
WEE1	1,00	0,43	0,72	0,22	0,62	0,28	0,87	0,28	0,35	0,04	0,43	0,03	0,95	0,12	0,41	0,02
WRN	1,00	0,81	0,78	0,71	0,19	0,25	0,29	0,19	1,08	0,80	0,94	0,94	0,82	0,61	0,81	0,56
WRNIP1	1,00	0,43	1,01	0,30	1,48	0,66	1,22	0,38	0,52	0,06	0,69	0,04	0,69	0,09	0,65	0,03
XPA	1,00	0,43	1,88	0,57	1,08	0,49	1,01	0,32	0,56	0,06	0,47	0,03	0,70	0,09	0,71	0,04
XPC	1,00	0,43	1,51	0,45	0,66	0,29	0,90	0,28	0,54	0,06	0,66	0,04	1,07	0,14	0,92	0,05
XRCC1	1,00	0,43	0,66	0,20	0,86	0,39	1,00	0,31	0,67	0,08	0,66	0,04	0,76	0,10	0,83	0,04
XRCC3	1,00	0,43	1,06	0,32	0,36	0,16	0,98	0,31	0,60	0,07	0,65	0,04	0,83	0,11	0,74	0,04
XRCC4	1,00	0,54	1,38	0,51	0,98	0,48	0,93	0,32	0,54	0,06	0,48	0,03	0,44	0,06	0,63	0,03

## **11. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 15. studenog 1984. godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature u Prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji u Zagrebu, 2003. godine upisala sam studij biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Diplomski rad na temu „Otpornost na citostatike posredovana integrinom  $\alpha_v\beta_3$  u stanicama pločastog epitela jezika“ izradila sam u Laboratoriju za genotoksične agense Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov. Diplomirala sam 19. ožujka 2009. godine i time stekla zvanje diplomiranog inženjera biologije – smjer molekularna biologija, a od svibnja iste godine zaposlena sam kao znanstveni novak-asistent u Laboratoriju za genotoksične agense Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti upisala sam 2010. godine. Kao istraživač obavljam znanstvena istraživanja u sklopu znanstvenog projekta NZZ „Molekularni mehanizmi povećanja osjetljivosti na protutumorske lijekove stanica karcinoma dojke i melanoma čovjeka utišavanjem integrina“ dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, bilateralnih suradnji s Njemačkom „Povećanje osjetljivosti stanica melanoma i glioma na alkilirajuće lijekove utišavanjem integrina  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_3\beta_1$  i  $\alpha_4\beta_1$ “ dr. sc. Andreje Ambriović Ristov i „Spojevi sa platinom: Stanični odgovor i mehanizmi otpornosti“ dr. sc. Maje Osmak, i bilateralne suradnje sa Slovenijom „Kompleksi platine i diazenkarboksamida kao potencijalni citostatici“ dr. sc. Anamarie Brozović. Također sam kao dio istraživačkog tima obavljala znanstvena istraživanja u sklopu znanstvenog projekta MZOS „Povećanje transdukcije adenovirusnih vektora i otpornost stanica na citostatike“ (098-0982913-2850) dr. sc. Andreje Ambriović Ristov.

Koautor sam 14 sažetaka na 11 domaćih i međunarodnih kongresa i skupova, a sudjelovala sam i na četiri radionice. Na 8 skupova aktivno sudjelovala izlažući svoj rad u obliku poster prezentacija ili u obliku usmenog priopćenja, te sam na kongresu koje je organiziralo Hrvatsko društvo za istraživanje raka pod naslovom „HDIR-1 "From Bench to Clinic" First Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation“, održanom na Institutu Ruđer Bošković dobila nagradu EACR za najbolji poster.

Do sada sam objavila 5 izvornih znanstvenih radova citiranih u bazi publikacija Current Contents, a na jednom od njih sam i prvi autor.

Tijekom jeseni 2012 i 2013 godine provela sam po 2,5 tjedna na studijskom boravku u laboratoriju dr. Fritza, Institute für Toxikologie, Duesseldorf, Njemačka.

Predsjednica sam Vijeća asistenata i predstavnica asistenata Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković od 2011 godine, te jedna od voditeljica sekcije Hrvatskog prirodoslovnog društva – "Mladi istraživači" od 2011 godine.

Sudjelovala sam u organizaciji projekta „Seeing in the dark“ i kongresa "HDIR-2-Second Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation" , na kojem sam jedna od urednika knjige sažetaka.

Od 2014.godine dio sam organizacijskog odbora ljetne škole "Power of Viral Vectors in Gene Therapy and Basic Science" i kongresa "HDIR-3-Third Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation".

Član sam Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (preko društva i član FEBS), Hrvatskog društva za istraživanje raka (preko društva i član EACR), Hrvatskog genetičkog društva i Hrvatskog mikrobiološkog društva.

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima:

1. Brozovic A, **Stojanović N**, Ambriović-Ristov A, Brozović Krijan A, Polanc S, Osmak M. 3-Acetyl-bis(2-chloro-4-nitrophenyl)triazene is a potent antitumor agent that induces oxidative stress and independently activates the stress-activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway. *Anticancer Drugs*. 2014 Mar;25(3):289-95. doi: 10.1097/CAD.000000000000060.
2. Majhen D, **Stojanović N**, Vukić D, Pichon C, Leduc C, Osmak M, Ambriović-Ristov A. Increased adenovirus Type 5 mediated transgene expression due to RhoB down-regulation. *PLoS One*. 2014 Jan 22;9(1):e86698.
3. Vajs J, Soviček S, Kureljak P, **Stojanović N**, Steiner I, Eljuga D, Urankar D, Kočevar M, Košmrlj J, Polanc S, Osmak M. Synthesis and biological activity of new diazenedicarboxamides as potential anticancer agents. *Acta Chim Slov*. 2013;60(4):842-52.
4. **Stojanovic N**, Urankar D, Brozović A, Ambriović-Ristov A, Osmak M, Kosmrlj J. Design and evaluation of biological activity of diazenecarboxamide-extended cisplatin and carboplatin analogues. *Acta Chim Slov*. 2013;60(2):368-74.
5. Majhen D, **Stojanović N**, Špeljko T, Brozovic A, De Zan T, Osmak M, Ambriović-Ristov A. Increased expression of the coxsackie and adenovirus receptor downregulates  $\alpha\beta_3$  and  $\alpha\beta_5$  integrin expression and reduces cell adhesion and migration. *Life Sci*. 2011 Aug 15;89(7-8):241-9

Kongresno priopćenje u CC časopisu:

**Stojanovic, N.**; Brozovic, A.; Majhen, D.; Bressy, C.; Benihoud, K.; Herak Bosnar, M.; Osmak, M.; Ambriovic-Ristov, A.(2012). " Overexpression of Integrin  $\alpha\beta_3$  in Human Laryngel Carcinoma (Hep2) and Tongue Squamous Carcinoma (Cal27) Cells: Adhesion, Migration, Invasion and Resistance to Antitumor Drugs".*European Journal of Cancer* 48: S48.



Sažeci u zbornicima skupova:

1. **Stojanović, N.**; Majhen, D.; Dekanić, A.; Ferenčak, K.; Bardak, I.; Tomić, M.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..Chemosensitisation of human breast carcinoma cell line MDA-MB-435S to vincristine and paclitaxel by silencing integrin  $\alpha_v$  or  $\alpha_4$ . 1st Regional Congress: Education and Research in Oncology, Books of Abstracts, Zagreb, 2013.
2. Vajs, J.; Steiner, I.; Soviček, S.; Kureljak, P.; **Stojanović, N.**; Eljuga, D.; Kočevan, M.; Košmrlj, J.; Polanc, S.; Osmak, M..Novel diazenedicarboxamides as potential anticancer agents. 1st Regional Congress: Education and Research in Oncology, Books of Abstracts, Zagreb, 2013.
3. Ambriović-Ristov, A ; **Stojanović, N** ; Majhen, D ; Dekanić, A ; Bardak, I ; Osmak, M. Integrins  $\alpha\beta_3$ ,  $\alpha\beta_5$ ,  $\alpha_3\beta_1$  and  $\alpha_4\beta_1$  modulate survival upon cisplatin treatment in MDA-MB-435S breast carcinoma cells. Tumour Microenvironment,EACR,Dublin, 2012.
4. **Stojanović, N.**; Brozović, A.; Majhen, D.; Bressy, C.; Benihoud, K.; Herak Bosnar, M.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..Overexpression of integrin  $\alpha\beta_3$  in human laryngeal carcinoma (HEp2) and tongue squamous carcinoma (Cal27) cells: adhesion, migration, invasion and resistance to antitumor drugs. 3rd Congress of Croatian Geneticists with international participation , Book of Abstracts, Krk,2012 (kongresno priopćenje).
5. **Stojanović, N.**; Majhen, D.; Dekanić, A.; Bardak, I.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..Integrins  $\alpha\beta_3$ ,  $\alpha\beta_5$ ,  $\alpha_3\beta_1$  and  $\alpha_4\beta_1$  modulate survival upon cisplatin treatment in MDA-MB-435S breast carcinoma cells. HDIR-2 "From Bench to Clinic" Second Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation, Periodicum biologorum 114, Suppl 1, Zagreb, 2012.
6. **Stojanović, N.**; Urankar, D.; Brozović, A.; Ambriović-Ristov, A.; Polanc, S.; Košmrlj, J.; Osmak, M.. Hybrid molecules as potential anticancer drugs: platinum complexes with diazenedicarboxamides. HDIR-2 "From Bench to Clinic" Second Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation, Periodicum biologorum 114, Suppl 1, Zagreb, 2012.

7. **Stojanović, N.**; Brozović, A.; Majhen, D.; Herak Bosnar, M.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..Overexpression of  $\alpha\beta_3$  and  $\alpha\beta_5$  integrins in tongue squamous carcinoma cells (Cal27) inhibits migration and confers resistance to several antitumor drugs. FEBS/EACR advanced lecture course : Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer, Book od Abstract, Spetses,-Grčka, 2011.
8. **Stojanović, N.**; Brozović, A.; Majhen, D.; Herak Bosnar, M.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..Overexpression of integrin  $\alpha\beta_3$  in tongue squamous carcinoma cells (Cal27) inhibits migration and confers resistance several antitumor drugs. HDIR-1 "From Bench to Clinic" First Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation, Book od Abstracts, Zagreb, 2010.
9. Špeljko, T.; Majhen, D.; **Stojanović, N.**; Brozović, A.; Vuković, L.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..The influence of Coxsackie adenovirus receptor expression on integrin expression in human embryonal rhabdomyosarcoma cell line. HDIR-1 "From Bench to Clinic" First Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation, Book od Abstracts, Zagreb, 2010.
10. Vukić, D.; Majhen, D.; **Stojanović, N.**; Brozović, A.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..Increased Ad5-mediated transgene expression in cisplatin-resistant human laryngeal carcinoma cells. HDIR-1 "From Bench to Clinic" First Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation, Book od Abstracts, Zagreb, 2010.
11. Brozović, A.; **Stojanović, N.**; Majhen, D.; Osmak, M.; Ambriović Ristov, A..  $\alpha\beta_3$  integrin mediated drug resistance in human tongue squamous cell carcinoma. Scientific program and abstract book, Firenze, 2009.
12. Majhen, D.; Brozović, A.; Gabrilovac, J.; **Stojanović, N.**; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A..Integrin  $\alpha\beta_3$  : link between resistance to cisplatin and adenovirus transduction efficacy. ADENOVIRUSES: basic biology to gene therapy, Book of Abstracts, Zadar, 2008.

13. **Stojanović, N.**; Brozović, A.; Majhen, D.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A.. $\alpha\beta_3$  integrin mediated drug resistance in human tongue squamous cell carcinoma. ADENOVIRUSES: basic biology to gene therapy, Book of Abstracts, Zadar, 2008.
  
14. **Stojanović, N.**; Brozović, A.; Majhen, D.; Osmak, M.; Ambriović-Ristov, A.. $\alpha\beta_3$  integrinom posredovana otpornost na citostatike u ljudskim stanicama karcinoma pločastog epitela jezika. Znanstveni simpozij 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zbornik sažetaka, Zagreb, 2008.