

Interakcija akvaporina 3 s putem prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt u staničnim linijama tumora dojke

Lučić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:098725>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivan Lučić

**INTERAKCIJA AKVAPORINA 3 S PUTE
PRIJENOSA SIGNALA EGFR/PI3K/Akt U
STANIČNIM LINIJAMA TUMORA DOJKE**

Diplomski rad

Zagreb, 2022

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za oksidacijski stres na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Ane Čipak Gašparović i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta IP-2020-02-3617 (AquaBCaRe) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

ZAHVALE

Izrazito sam zahvalan svojoj mentorici dr. sc. Ani Čipak Gašparović na ukazanom povjerenju i razumijevanju, te svim savjetima kojima mi je pomogla u izvedbi i pisanju ovog diplomskog rada.

Također, veliku zahvalu dugujem prof. dr.sc. Nadi Oršolić na odličnim predavanjima iz brojnih predmeta, pomoći i savjetima prilikom pisanja ovog diplomskoga rada.

Zahvaljujem se i dr. sc. Lidiji Milković, mag. exp. biol. Moniki Mlinarić i svima iz Laboratorija za oksidacijski stres na Institutu Ruđer Bošković na njihovoj pomoći.

Posebnu zahvalu iskazujem svojoj obitelji i djevojci Terezi na razumijevanju i podršci tokom cijelog mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

INTERAKCIJA AKVAPORINA 3 S PUTEV PRIJENOSA SIGNALA EGFR/PI3K/Akt U STANIČNIM LINIJAMA TUMORA DOJKE

Ivan Lučić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Akvaporin 3 (AQP3), membranska pora, prekomjerno je ispoljena u brojnim tumorima, uključujući i tumore dojke. Cilj rada bio je istražiti međusobnu povezanost proteina AQP3 i puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt praćenjem aktivacije puta preko omjera proteina pAkt/Akt i utišavanjem proteina AQP3 u staničnim linijama tumora dojke (pozitivne na receptore za estrogen i progesteron - MCF7, pozitivne na receptor HER2 - SKBR3 i trostruko negativnu - SUM159) te na ne-tumorskoj liniji epitela dojke (MCF10A). Također, istražen je utjecaj lokalizacije receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) u lipidne splavi na aktivaciju ovog puta prijenosa signala. Proučavana je stanična vijabilnost i ekspresija proteina PI3K, Akt, pAkt i AQP3. Kod stanične linije MCF7 tretman faktorom rasta EGF aktivira protein Akt, ali ne i protein PI3K. Kod stanične linije SKBR3 disrupcija lipidnih splavi aktivira protein Akt, neovisno o utišavanju gena za protein AQP3. Kod stanične linije SUM159 dolazi od pojačane ekspresije proteina PI3K uz tretman faktorom rasta EGF što se gubi utišavanjem gena za protein AQP3. Kod stanične linije MCF10A tretmani ne utječu na ekspresiju proteina PI3K i aktivaciju proteina Akt, međutim utišavanjem gena za protein AQP3 raste aktivacija proteina Akt. Na kraju, u staničnoj liniji SUM159 uočena je ovisnost ekspresije proteina AQP3 o aktivaciji proteina Akt, ali ne i proteina PI3K.

Ključne riječi: AQP3, put prijenosa signala PI3K, lipidne splavi

Ključne riječi: AQP3, put prijenosa signala PI3K, lipidne splavi

(56 stranica, 15 slika, 1 tablica, 91 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dr. sc. Ana Čipak Gašparović

Komentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Nada Oršolić

prof. dr. sc. Biljana Balen

izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Rad prihvaćen: 6.10.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

INTERACTION OF AQUAPORIN 3 AND EGFR/PI3K/Akt SIGNALING PATHWAY IN BREAST CANCER CELL LINES

Ivan Lučić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Aquaporin 3 (AQP3), a membrane pore, is overexpressed in numerous tumors, including breast tumors. The aim of this work was to investigate the relationship between AQP3 and EGFR/PI3K/Akt signaling pathway by monitoring the activation of the pathway via the pAkt/Akt ratio and AQP3 silencing in three breast tumor cell lines (positive for estrogen and progesterone receptors - MCF7, positive for HER2 receptor - SKBR3 and triple negative - SUM159) and in a non-tumor line of breast epithelium. In addition, the influence of epidermal growth factor receptor (EGFR) localization in the lipid raft on the activation of this pathway was investigated. Cell viability and protein expression of PI3K, Akt, pAkt and AQP3 were investigated. In the MCF7 cell line, treatment with the EGF activates the Akt but not the PI3K. In the SKBR3 cell line, disruption of lipid rafts activates Akt, independent of gene silencing for AQP3. In the SUM159 cell line, treatment with EGF results in increased expression of PI3K, which is lost by silencing the gene for AQP3. In the MCF10A cell line, the treatments have no effect on PI3K expression and Akt activation, but silencing the gene for the AQP3 increases Akt activation. Finally, in the SUM159 cell line, the expression of the AQP3 was dependent on the activation of the Akt, but not on PI3K.

(56 pages, 15 figures, 1 tables, 91 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. sc. Ana Čipak Gašparović

Co-mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Reviewers:

Prof. Dr. Nada Oršolić

Prof. Dr. Biljana Balen

Assoc. Prof. Dr. Duje Lisičić

Thesis accepted: 6.10.2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Akvaporini	1
1.2. Put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt	6
1.3. Povezanost AQP3 i EGFR	12
1.4. Tumor dojke.....	13
2. Cilj istraživanja	18
3. Materijali i metode.....	19
3.1. Stanične kulture	19
3.2. Razbijanje lipidnih splavi.....	20
3.3. Test stanične vijabilnosti.....	21
3.4. Izolacija proteina.....	22
3.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	22
3.6. Priprema uzoraka za gel elektroforezu.....	23
3.7. Gel elektroforeza i mokri prijenos proteina na nitroceluloznu membranu	23
3.8. Transfekcija stanica	26
3.8.1. Transfekcija stanica otopinom Lipofectamine 3000.....	27
3.8.2. Transfekcija stanica metodom kalcijevim fosfatom	28
3.9. Statistička obrada podataka.....	28
4. Rezultati	29
4.1. Utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije faktorom rasta EGF	29
4.1.1. MTT	29
4.1.1. Utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt faktorom rasta EGF na AQP3	30
4.2. Utjecaj utišavanja AQP3 pomoću male interferirajuće RNA (siRNA).....	35
4.2.1. Izbor metode za utišavanje ekspresije gena	36
4.2.2. Utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije faktorom rasta EGF	37
5. Rasprava.....	43
6. Zaključci	48
7. Literatura.....	49
8. Životopis	1

POPIS KRATICA

AKT - protein kinaza B (engl. *Protein kinase B*)

AQP - akvaporin (engl. *Aquaporin*)

AR - amfiregulin (engl. *Amphiregulin*)

BAD - BCL2 agonist proteina stanične smrti (engl. *BCL2 associated agonist of cell death*)

bFGF - bazični faktor rasta fibroblasta (engl. *Basic fibroblast growth factor*)

BSA - goveđi serumski albumin (engl. *Bovine serum albumin*)

BTC - betacelulin (engl. *Betacellulose*)

DMSO - dimetil sulfoksid (engl. *Dimethyl sulfoxide*)

DTT - ditiotreitol (engl. *Dithiothreitol*)

ECM - izvanstanični matriks (engl. *Extracellular matrix*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGF - epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal growth factor*)

EGFR - receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal growth factor receptor*)

EPG - epigen (engl. *Epigen*)

EPR - epiregulin (engl. *Epiregulin*)

ER - receptor za estrogen (engl. *Estrogen receptor*)

GADPH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

HB-EGF - faktor rasta sličan EGF-u koji veže heparin (engl. *Heparin-binding EGF-like growth factor*)

HER2 - humani epidermalni čimbenik rasta 2 (engl. *Human epidermal growth factor receptor 2*)

IL-8 - interleukin 8 (engl. *Interleukin 8*)

MBCD - metil-β-ciklodekstrin (engl. *Methyl-β-cyclodextrin*)

MMP - matriks metaloproteinaze (engl. *Matrix metalloproteinase*)

mTOR - mehanička meta rapamicina (engl. *Mechanistic target of rapamycin*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)

NRG - neuregulin (engl. *Neuregulin*)

NSCLC - karcinom pluća nemalih stanica (engl. *Non small cell lung cancer*)

PBS - fosfatni pufer (engl. *Phosphate buffered saline*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)

PI3K - fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-kinase*)

PIP2 - fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PIP3 - fosfatidilinozitol-3,4,5 -trifosfat (engl. *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*)

PKC - protein kinaza C (engl. *Protein kinase C*)

PR - receptor za progesteron (engl. *Progesterone receptor*)

PTEN - homolog fosfataze i tenzina (engl. *Phosphatase and tensin homolog*)

PTP1B - protein tirozin fosfataze 1B (engl. *Protein tyrosine phosphatase 1B*)

RIPA pufer - (engl. *Radio immuno precipitation assay*)

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*)

SDS - natrijev dodecil sulfat (engl. *Sodium dodecyl sulfate*)

TBS - tris pufer (engl. *Tris-buffered saline*)

TBST - TBS s 0,1% Tween 20

TEMED - N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (engl. *N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine*)

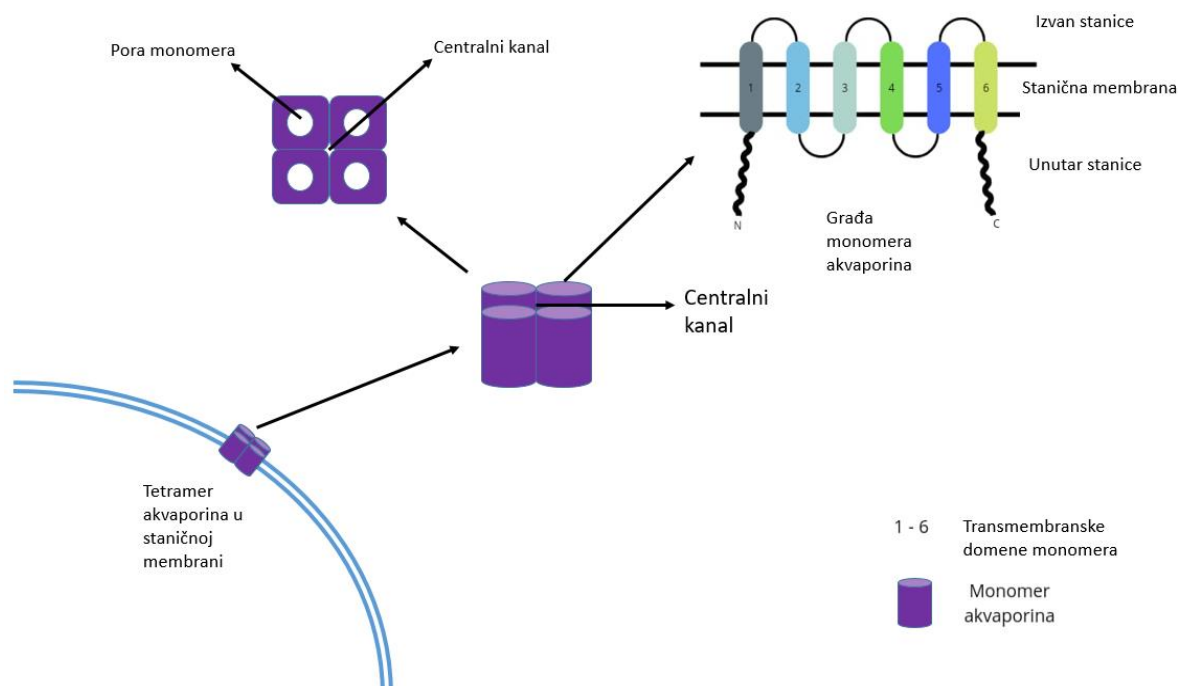
TGF- α - transformirajući faktor rasta alfa (engl. *Transforming growth factor alpha*)

VEGF - faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *Vascular endotel growth factor*)

1. UVOD

1.1. Akvaporini

Voda je ključan faktor za normalno funkcioniranje svih stanica. Transport vode je zato jedan od osnovnih procesa koji je nužan za normalnu funkciju stanica. Proteini zaduženi za transport vode nazivaju se akvaporini - ime su dobili po svojoj funkciji - predstavljaju kanale koji služe za protok vode unutar i izvan stanice. Iako se prije smatralo da voda difundira preko stanične membrane, ovaj proces je prespor u odnosu na podatke koji nam ukazuju da je brzina protoka vode unutar i izvan stanice puno brža i puno bolje kontrolirana nego što bi to očekivali samom difuzijom. Akvaporini omogućuju aktivan način regulacije ovog transporta (Milković i Čipak Gašparović, 2021).



Slika 1. Struktura akvaporina. Akvaporini su građe tetramera. Monomer je građen tako da se oba termina nalaze u citoplazmi, a kroz membranu prolazi 6 transmembranskih domena. Svaki monomer funkcionira kao zaseban kanal i reguliran je neovisno o drugima, dok je centralni dio tetramera također kanal, s manje istraženom funkcijom (napravljeno po uzoru na King i sur., 2004).

Akvaporini su porodica transmembranskih proteinskih kanala. Ovi proteini visoko su konzervirani i tvore tetramere (Slika 1). Tetrameri su sastavljeni od četiri ista monomera od

320 aminokiselina molekulske mase oko 28 kDa (da Silva i Soveral, 2017). Svaki od ovih monomera sastavljen je od šest transmembranskih domena (King i sur., 2004). Monomeri su zasebni kanali i regulirani su neovisno jedni o drugima, za razliku od ionskih kanala kod kojih je kanal uvijek centralni. Sami centar tetramera također čini kanal, ali njegova funkcija nije u potpunosti definirana te se smatra da može služiti za prijenos nekih iona (Verkman, 2013).

Kod ljudi poznajemo 13 tipova akvaporina i možemo ih dodatno podijeliti po njihovoj funkciji: ortodoksni akvaporini u koje spadaju proteini AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 i 8, akvagliceroporini u koje spadaju proteini AQP3, 7, 9 i 10 te S-akvaporini u koje spadaju proteini AQP11 i 12 (da Silva i Soveral, 2017). Ortodoksni akvaporini služe za transport vode, a akvagliceroporini sudjeluju i u transportu malih nenabijenih molekula, prvenstveno glicerola (Verkman, Anderson i Papadopoulos, 2014). S-akvaporini ili neortodoksni smješteni su isključivo unutar stanice, na membranama organela. Nalaze se samo u animalnim stanicama, a njihova uloga i propusnost nisu dovoljno istraženi. Trenutno se pretpostavlja da sudjeluju u intravezikularnom transportu i regulaciji volumena organela (Itoh i sur., 2005).

Akvaporini sudjeluju u regulaciji osmotskog tlaka stanice, te homeostazi vode u cijelom nizu vrsta organizama, od jednostaničnih pa sve do sisavaca. Kod sisavaca akvaporini kontroliraju homeostazu vode ne samo na razini stanice već i na razini organizma. Sudjeluju u kontroli volumena krvi i osmolarnosti putem regulacije samog unosa vode, ali i izlučivanja vode putem bubrega (Madeira i sur., 2016).

Biolška aktivnost akvaporina regulira se posttranslacijski, pri čemu se transport vode regulira samim otvaranjem i zatvaranjem monomera ili se regulira putem transporta samog proteina unutar stanice, odnosno transportom proteina do stanične membrane kada za to postoji potreba (Kreida i Törnroth-Horsefield, 2015).

Kontrola protoka tvari kroz akvaporine ostvaruje se regulacijom pH, regulacijom tlaka, gradijentom otapala, fosforilacijom proteina, regulacijom temperature, promjenom membranske napetosti i gradijentom otapala (Soveral i sur., 2008; Rodrigues i sur., 2016). Od svih skupina akvaporina, ortodoksni akvaporini najbrže odgovaraju na različite podražaje. Iako svaki monomer funkcionira sam za sebe, akvaporini se nalaze u obliku tetramera te ne postoje dokazi o kooperaciji podjedinica, pa i dalje ne znamo zašto se točno nalaze u membrani u obliku tetramera (Ozu i sur., 2018). Akvagliceroporini imaju promjer pore veći nego ortodoksni akvaporini, što im omogućava transport drugih molekula osim vode, poput glicerola

pomoću čije unutarstanične koncentracije mogu regulirati osmotski tlak (Rodrigues i sur., 2016).

Zbog funkcije regulacije osmotskog tlaka putem transporta vode i glicerola, akvaporini mogu posljedično utjecati na brojne stanične funkcije, kao što su migracija, adhezija i proliferacija. Utjecaj akvaporina na migraciju povezan je s depolimerizacijom aktina i posljedičnim ulaskom vode u stanicu, gdje dolazi do lokalne ekspanzije membrane što omogućuje migraciju stanica (Tomita i sur., 2017). Učinak akvaporina na proliferaciju je ovisan o tipu akvaporina i o vrsti tumorskih stanica. Prekomjerna ekspresija proteina AQP3 korelirana je s povećanom proliferacijom kod staničnih linija raka želuca MCG803 i SGC7901, a njegova smanjena ekspresija povezana je sa smanjenom proliferacijom stanica ovih staničnih linija (Chen i sur., 2014).

Prekomjerna ekspresija proteina AQP3 povezana je i s pojačanom ekspresijom matriks metaloproteinaza MMP2 i MMP9, enzima čiji katalitički mehanizam zahtijeva prisutnost metala. Ovi enzimi sudjeluju u angiogenezi, preživljavanju, rastu i metastaziranju tumora. Smanjena ekspresija proteina AQP3 dovela je smanjene ekspresije enzima MMP2 i MMP9 u staničnoj liniji SCG7901. Također, povećana ekspresija proteina AQP3 u stanicama raka želuca povezana je s lošijim ishodima pacijenata koji imaju ovaj tip tumora (Marlar i sur., 2017).

Utišavanje gena za protein AQP3 u stanicama stanične linije raka pluća dovelo je do pojačane aktivacije puta prijenosa signala Wnt/ β -katenin. Povećana aktivnost puta prijenosa signala Wnt/ β -katenin može utjecati na smanjenu diferencijaciju i izbjegavanje programirane stanične smrti, što ukazuje na povezanost proteina AQP3 sa stupnjem diferenciranosti stanica raka pluća. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu mogućnost korištenja proteina AQP3 u određivanju progresije stanica raka pluća (Liu i sur., 2020).

Protein AQP3 je uključen u proces epitelno mezenhimalne tranzicije. Pojačana ekspresija ovog proteina kao odgovor na epidermalni faktor rasta (EGF, engl. *Epidermal growth factor*) u stanicama raka debelog crijeva povezana je s povećanom migracijom stanica, invazijom i metastazama (Huang i sur., 2010).

Kod većine stanica sisavaca migracija stanica je najveća tijekom ranog razvoja organizma, a smanjuje se nakon diferencijacije stanica. Kod tumorskih stanica, proces migracije može se ponovno aktivirati te je poznato da akvaporini AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8 i AQP9 sudjeluju u migraciji stanica raka. Akvaporini stoga imaju jasan potencijal kao prognostički

biljezi te kao terapijski ciljevi za modulaciju procesa epitelno mezenhimalne tranzicije i stanične adhezije (De Ieso i Yool, 2018).

Određeni tipovi akvaporina mogu sudjelovati i u prijenosu drugih molekula osim vode, poput vodikovog peroksida (H_2O_2), ugljikovog dioksida (CO_2), dušikovog oksida (NO) i uree (Wang i sur., 2020). H_2O_2 smatra se vrlo važnim faktorom u brojnim biološkim procesima poput stanične signalizacije. Akvaporini koji imaju mogućnost transporta H_2O_2 nazivaju se peroksiaporini i kod čovjeka uključuju proteine AQP0, AQP1, AQP3, AQP5, AQP8, AQP9 i AQP11 (Rodrigues i sur., 2019).

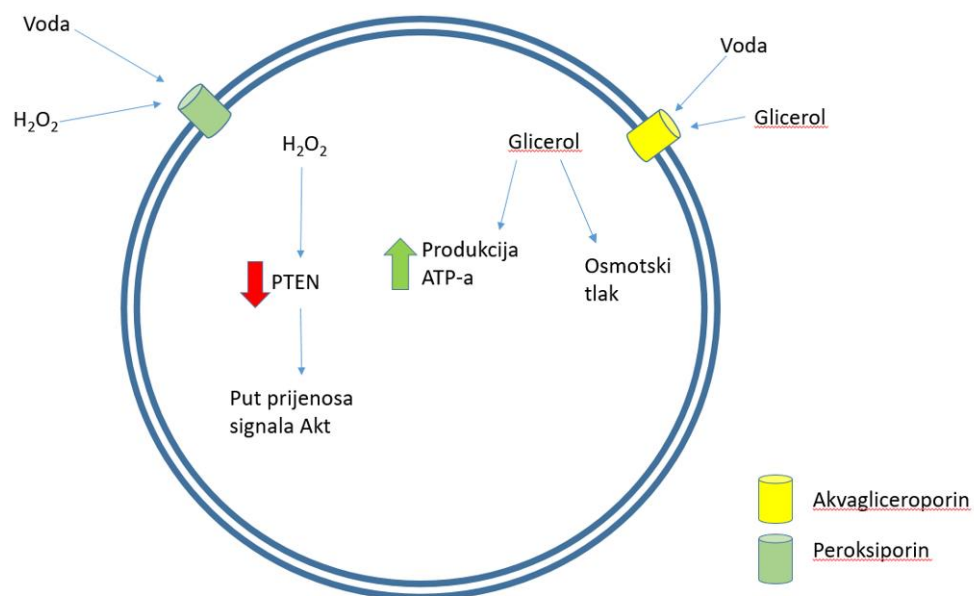
Budući da H_2O_2 može utjecati na redoks signalne puteve, regulacija unosa H_2O_2 može pridonijeti modulaciji tih procesa, što rezultira rastom i preživljavanjem tumora (Bienert i Chaumont, 2014). Oksidacijski stres također može utjecati na sve tri faze razvoja tumora (inicijacija, promocija, progresija), a H_2O_2 jedna je od centralnih molekula oksidacijskog stresa. Točni mehanizmi djelovanja akvaporina na puteve prijenosa signala još nisu poznati, ali možemo naslutiti da se radi o kompleksnoj interakciji. Budući da je ekspresija akvaporina povećana kod cijelog niza tumora, oni predstavljaju potencijalnu metu budućih tretmana (Milković i Čipak Gašparović, 2021).

Obzirom da je protein AQP3 pretjerano eksprimiran u stanicama tumora dojke, trenutno se razmatra kao mogući prognostički biljeg (uz protein AQP5) za rak dojke pozitivan na receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2, engl. *Human epidermal growth factor receptor 2*) te trostruko negativan rak dojke (Zhu i sur., 2018). Pokazano je da je ekspresija gena za protein AQP3, između ostalog, ovisna o estrogenu i reagira na njegovu prisutnost tako da povećava ekspresiju proteina AQP3. Ovaj mehanizam ukazuje na potencijalnu vezu između proteina AQP3 i raka dojke pozitivnog na receptor za estrogen (Huang i sur., 2015). Jedan od mogućih mehanizama kojim protein AQP3 može dovesti do usmjerene migracije stanica tumora dojke je putem unosa H_2O_2 u stanicu. Na taj način može dovesti do oksidacije proteina homolog fosfataze i tenzina (PTEN, engl. *Phosphatase and tensin homolog*) i protein tirozin fosfataze 1B (PTP1B, engl. *Protein tyrosine phosphatase 1B*), nakon koje slijedi aktivacija puta prijenosa signala Proteinska kinaza B (Akt, engl. *Protein kinase B*) (Satooka i Hara-Chikuma, 2016).

Istraživanja su potvrdila da se prekomjernom ekspresijom proteina AQP3 povećava i migracija stanica raka dojke pozitivnih na receptor za estrogen (Huang i sur., 2015) i keratinocita. U keratinocitima protein AQP3 olakšava transport glicerola jer spada u akvagliceroporine, što

rezultira stvaranjem molekule ATP i posljedičnom proliferacijom (Hara-Chikuma i Verkman, 2008).

Protein AQP3 olakšava transport vode, H_2O_2 i glicerola, što znači da je ovaj protein potencijalno uključen u veliki broj unutarstaničnih procesa koji su promijenjeni kod tumorskih stanica i koji podržavaju progresiju tumora. Transport vode i glicerola djeluje na metaboličke procese, dok H_2O_2 utječe na puteve prijenosa signala. U staničnim linijama raka dojke MCF7 (tumori pozitivni na receptore za estrogen (ER) i progesteron (PR)), SKBR3 (tumori pozitivni na receptor HER2) i SUM159 (trostruko negativni tumori - negativni na receptore HER2, ER i PR), protein AQP3 je najviše ispoljen tip akvaporina, a kod tumora pozitivnih na receptor HER2, H_2O_2 je pojačao ekspresiju ovog proteina (Rodrigues i sur., 2019). Uloga akvaporina u tumorima prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Uloga akvaporina u tumorskim stanicama. Akvaporini su tetrameri koji, osim protoka vode, mogu regulirati i protok H_2O_2 (onda ih nazivamo peroksiporini i na slici su predstavljeni zelenim valjkom) i protok glicerola (onda ih nazivamo akvagliceroporini i na slici su predstavljeni žutim valjkom). H_2O_2 može dovesti do oksidacije tumor supresorske molekule PTEN, koja onda ne može negativno regulirati put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt. Ulazak glicerola u stanicu utječe na osmotski tlak i produkciju molekule ATP, a posljedično može utjecati na migraciju i proliferaciju tumorskih stanica (napravljeno po uzoru na Milković i Čipak Gašparović, 2021).

1.2. Put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt

Receptori epidermalnog faktora rasta velika su skupina receptora koja imaju aktivnost tirozin kinaze, a koji su pretjerano ispoljeni ili pak promijenjeni u nekoliko vrsta tumora, uključujući tumor pluća, dojke, jednjaka i vrata. Pokazano je da promijenjena, odnosno pojačana aktivnost receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. *Epidermal growth factor receptor*) igra ulogu u razvoju i rastu tumorskih stanica. Receptor EGFR i članovi njegove obitelji direktno sudjeluju u brojnim putevima prijenosa signala koji utječu na rast, diferencijaciju, signalizaciju, migraciju, adheziju i preživljavanje tumorskih stanica. Zbog ovoga su receptor EGFR i članovi njegove obitelji privlačni potencijalni kandidati za terapiju usmjerenu protiv tumora (Grandis i Sok, 2004). Obitelj receptora ERBB sastoji se od četiri zasad poznata člana: ERBB1 (HER1/EGFR), ERBB2 (HER2^{Neu}), ERBB3 (HER3) i ERBB4 (HER4). Ovi receptori građeni od tri glavne domene: ekstracelularne (N-terminalne), koja veže ligand, hidrofobne transmembranske domene i citoplazmatske (C-terminalne domene), koja ima aktivnost tirozin kinaze. Citoplazmatska domena, s aktivnošću tirozin kinaze, visoko je očuvana, a izvanstanična domena, koja veže ligand, je varijabilna što za posljedicu ima vezanje različitih liganda (Ferguson i sur., 2003). Kako bi došlo do aktivacije ovih receptora i prijenosa signala mora doći do dimerizacije receptora, gdje dolazi do stvaranja homodimera, ali i heterodimera čime se može formirati ukupno 28 različitih kombinacija (Lemmon i Schlessinger, 2010). Izvanstanična domena receptora EGFR sastoji se od 621 aminokiseline i podijeljena je u četiri domene. Domene I i III bogate su leucinom i sudjeluju u vezanju liganda na receptor. Domena II tvori homodimere ili heterodimere s analognom domenom drugih članova obitelji receptora ERBB. Domene II i IV ne dolaze u direktan kontakt s ligandom i bogate su cisteinom (Wee i Wang, 2017). Transmembranska domena je hidrofobna i građena je od 23 aminokiseline, te služi kao sidro receptora u plazmatskoj membrani (Carpenter i sur., 1991). Unutarstanična domena građena je od 542 aminokiseline i uključuje fleksibilni jukstamembranski segment, domenu koja ima aktivnost tirozin kinaze i C-terminalni rep. Domena koja ima aktivnost tirozin kinaze može se podijeliti na N-dio (uglavnom β -nabrana ploča) i C-dio (uglavnom α -spiralna struktura), s ATP-veznim mjestom smještenim između ova dva dijela (Walton i sur., 1990). Ova obitelj receptora aktivira se autofosforilacijom. Autofosforilacija je fosforilacija proteina od strane drugog, identičnog proteina, u ovom slučaju drugog člana dimera (Wee i Wang, 2017). C-terminalni rep u svojoj strukturi sadrži tirozine koji, kada se fosforiliraju, omogućuju vezanje različitih unutarstaničnih proteina na aktivirani receptor (Zhang i sur., 2006). Na ovaj

način, izvanstanično vezanje liganda na receptor može dovesti do aktivacije nizvodnih puteva prijenosa signala.

Mutacije receptora EGFR javljaju se na izvanstaničnoj regiji, domeni kinazne aktivnosti i C-terminalnom repu, dok su mutacije u transmembranskoj regiji rijetke (Pines i sur., 2010). Dio mutacija receptora EGFR dovodi do konstitutivne aktivacije ovog receptora zbog stabilne dimerizacije podjedinica koja postaje neovisna o vezanju liganda s receptorima iz obitelji ERBB. Također, neke mutacije omogućuju ovim receptorima da izbjegnu/smanje regulaciju endocitozom koja ja prisutna u normalnim uvjetima (Gan i sur., 2013). Jedna od najpoznatijih i najbolje istraženih promjena vanjske domene receptora EGFR je virusni homolog receptora EGFR, v-ERBB, kojem potpuno nedostaje vanjska domena vezanja liganda, a nalazi se u obliku dimera koji je konstitutivno aktivan (Downward i sur., 1984). Druga jako česta i dobro istražena varijanta receptora EGFR je EGFRvIII. Do pojave ove varijante dolazi zbog delecije egzona 2-7 i učestalo se javlja kod glioblastoma (20% njih). EGFRvIII ima signalizaciju neovisnu o ligandu, ali ima nisku konstitutivnu aktivnost i ti receptori nisu regulirani endocitozom, kao što je slučaj kod nemutiranih receptora EGFR (Gani sur., 2013).

Na temelju brojnih istraživanja, možemo vidjeti trend gdje specifične vrste tumora imaju veću učestalost mutacija na točno specifičnim mjestima. Veliki broj kolorektalnih karcinoma sadrži amplificiranje gena za receptor EGFR (Cappuzzo i sur., 2008), dok većina glioblastoma nosi aberacije na vanjskoj domeni (Lee i sur., 2006). Karcinomi pluća nemalih stanica (NSCLC, engl. *Non small cell lung cancer*) najčešće imaju mutacije u domeni kinazne aktivnosti (Pines i sur., 2010).

Faktor rasta EGF kod čovjeka je protein molekulske mase 6 kDa, a sastavljen je od 53 aminokiseline. Kod čovjeka se faktor rasta EGF nalazi u visokim koncentracijama u žuči, mlijeku i urinu, u srednjim koncentracijama folikularnoj tekućini, suzama i sjemenoj plazmi, a u niskim koncentracijama u serumu, plazmi i slini (Conte i Sigismund, 2016). Slijedom tkivne raspodjele faktor rasta EGF uključen je u pravilno formiranje mozga, reproduktivnog i gastrointestinalnog sustava, kože, ali i u pravilnoj funkciji kardiovaskularnog sustava, te regeneraciji epitela (Edwin i sur., 2018)

Članovi obitelji receptora za epidermalni faktor rasta mogu biti aktivirani od strane 13 poznatih liganada, koji osim faktor rasta EGF uključuju i, transformirajući faktor rasta alfa (TGF- α , engl. *Transforming growth factor alpha*), amfi- i epiregulin (AR, engl. *Amphiregulin*, EPR, engl. *Epiregulin*), neuregulin 1 koji ima 6 podtipova (NRG1, engl. *Neuregulin*), te neuregulin 2-4,

betacelulin (BTC, engl. *Betacelluloline*), epigen (EPG, engl. *Epigen*) i faktor rasta koji veže heparin sličan faktoru rasta EGF (HB-EGF, engl. *Heparin-binding EGF-like growth factor*) (Yarden i Sliwkowski, 2001).

Svaki od navedenih liganada aktivira receptor EGFR na sličan način, gdje dolazi do vezanja liganda, dimerizacije receptora, autofosforilacije receptora i posljedičnog aktiviranja nizvodnih puteva prijenosa signala. Vezanje bilo kojeg od ovih liganda inducira internalizaciju receptora EGFR i prijenos do ranih endosoma (Roepstorff i sur., 2009). Ipak, pokazano je da aktivacija receptora EGFR različitim ligandima ima daljnje specifične učinke u stanici, međutim točan mehanizam kojim svaki ligand aktivira nizvodne puteve prijenosa signala nije u potpunosti razjašnjen (Singh i Harris, 2005). Jedna teorija govori da svaki ligand preferencijalno dovodi do sparivanja specifičnih dimera receptora EGFR unutar ove obitelji, što dovodi do različitih bioloških učinaka (Wee i Wang, 2017). Na primjer, proteini NRG i EGF mogu stimulirati serin/treonin kinaze ERK1/2, protein NRG djeluje prvenstveno preko heterodimera receptora HER2 i HER3 što posljedično primarno stimulira protein Akt, a faktor rasta EGF uglavnom djeluje preko receptora HER1 i HER2 heterodimera tako da preferirano stimulira protein kinazu C (PKC) (Sweeney i sur., 2001). Druga teorija predlaže da nakon endocitoze, dolazi do razvrstavanja ovih receptora s ligandom na način ovisan o sparivanju - receptori vezani s faktorom rasta EGF bivaju usmjereni na lizosomsku razgradnju ili recikliranje, dok se receptori vezani s proteinom BTC i HB-EGF usmjeravaju na lizosomsku razgradnju, a oni s proteinom EPI i TGF- α bivaju usmjereni na recikliranje (Roepstorff i sur., 2009). Različito razvrstavanje receptora ovisno o ligandu može biti posljedica različitih osjetljivosti ovih kompleksa na pH (Wee i Wang, 2017). Kompleksi koji su stabilni na nižem pH sporije disociraju, što može uputiti kompleks na degradaciju. Ako je kompleks ligand-receptor nestabilan na nižem pH, to može dovesti do recikliranja receptora i njegovog ponovnog lociranja u plazmatsku membranu (French i sur., 1995). Ligand stoga utječe na lokaciju receptora EGFR u stanici, te je moguće da svaki ligand stvara različite obrasce puta prijenosa signala koji posljedično djeluju na procese unutar stanice (Wee i Wang, 2017). Za kraj, jedna hipoteza zastupa stajalište da svaki ligand može utjecati na različite konformacije dimeriziranih receptora, što u konačnici dovodi do različite dostupnosti supstrata C-terminalnom repu (Wilson i sur., 2009).

Prilikom vezanja faktora rasta EGF na receptor, potrebno je da se faktor rasta EGF veže za oba člana dimera zasebno te ovaj događaj prethodi dimerizaciji receptora (Wee i Wang, 2017). U stanju kada ligand nije vezan za receptor, domena II je blokirana od strane domene IV budući da su povezane disulfidnom vezom te ne dolazi do autofosforilacije. Nakon vezanja faktora

rasta EGF na svaki od receptora, vezanje faktora rasta EGF na monomere receptora EGFR u domenama I i III dovodi do promjena u rasporedu ostalih domena, što omogućuje interakciju domena II i dovodi do stabilizirane "otvorene" konformacije. Dimerizacija domene II dovodi do daljnjih promjena u konformaciji u transmembranskoj domeni koja također dovodi do promjene u jukstamembranskom segmentu unutarstaničnog dijela receptora (Burgess i sur., 2003). Homodimer receptora EGFR je asimetrični par u kojem se unutarstanični C-kraj aktivacijske kinaze stavlja u aktivno mjesto primajuće kinaze. Ova interakcija aktivira primajuću kinazu, što rezultira autofosforilacijom (Zhang i sur., 2006).

Tumorski mikrookoliš sadrži puno tipova stanica uključujući, fibroblaste, limfocite B i T, antigen prezentirajuće stanice, prirodne stanice ubojice, upalne i endotelne stanice i njihove prekursore i komponente izvanstaničnog matriksa (ECM, engl. *Extracellular matrix*) (Seshacharyulu i sur., 2012). Sve ove komponente tumorskog mikrookoliša imaju ulogu u inicijaciji i progresiji tumora (Wee i Wang, 2017). Receptor EGFR je ispoljen u gotovo svim tipovima stanica, osim u zrelim stanicama hematopoetskog i limfatičkog sustava (Normanno i sur., 2006). Put prijenosa signala EGFR u tumorskim stanicama ima ulogu u proliferaciji tumorskih stanica, angiogenezi i nastanku metastaza. Receptor EGFR može aktivirati put prijenosa signala koji može stimulirati stvaranje i izlučivanje niza angiogenih regulacijskih čimbenika, neki od kojih su i faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF, engl. *Vascular endothel growth factor*), bazični faktor rasta fibroblasta (bFGF, engl. *Basic fibroblast growth factor*) i interleukin 8 (IL-8, engl. *Interleukin 8*) (De Luca i sur., 2007). Ovo znači da konstitutivna aktivacija puta prijenosa signala EGFR, koja je česta kod brojnih tumora, direktno doprinosi preživljavanju tumorskih stanica tako da olakšava dovođenje hranjivih tvari i kisika.

Nakon aktivacije receptora EGFR autofosforilacijom, put prijenosa signala nastavlja se na osovinu fosfoinozimid 3-kinaza/Akt (PI3K, engl. *Phosphoinositide 3-kinase*) koja postaje fosforilirana čime ove molekule aktivno sudjeluju u regulaciji metabolizma stanice, veličini stanice, preživljavanja, proliferacije i pokretljivosti stanica. Put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt je vrlo često kod tumora pretjerano aktivan, zbog pretjerane aktivacije ili mutacije članova obitelji EGFR, ili proteina PI3K i/ili Akt. Ovome problemu pridonosi činjenica da veliki broj tumora ima smanjenu ekspresiju tumorskog supresora PTEN, koji deaktivira protein PI3K i služi u regulaciji ranije navedenih bioloških aktivnosti stanice. Put prijenosa signala PI3K/Akt također je promijenjen kod drugih patoloških stanja poput dijabetesa i autizma (Dibble i Cantley, 2015) (Slika 3). Protein PI3K se sastoji od regulacijske podjedinice p85 koja igra ulogu u vezanju za receptor i katalitičke podjedinice, p110, koja

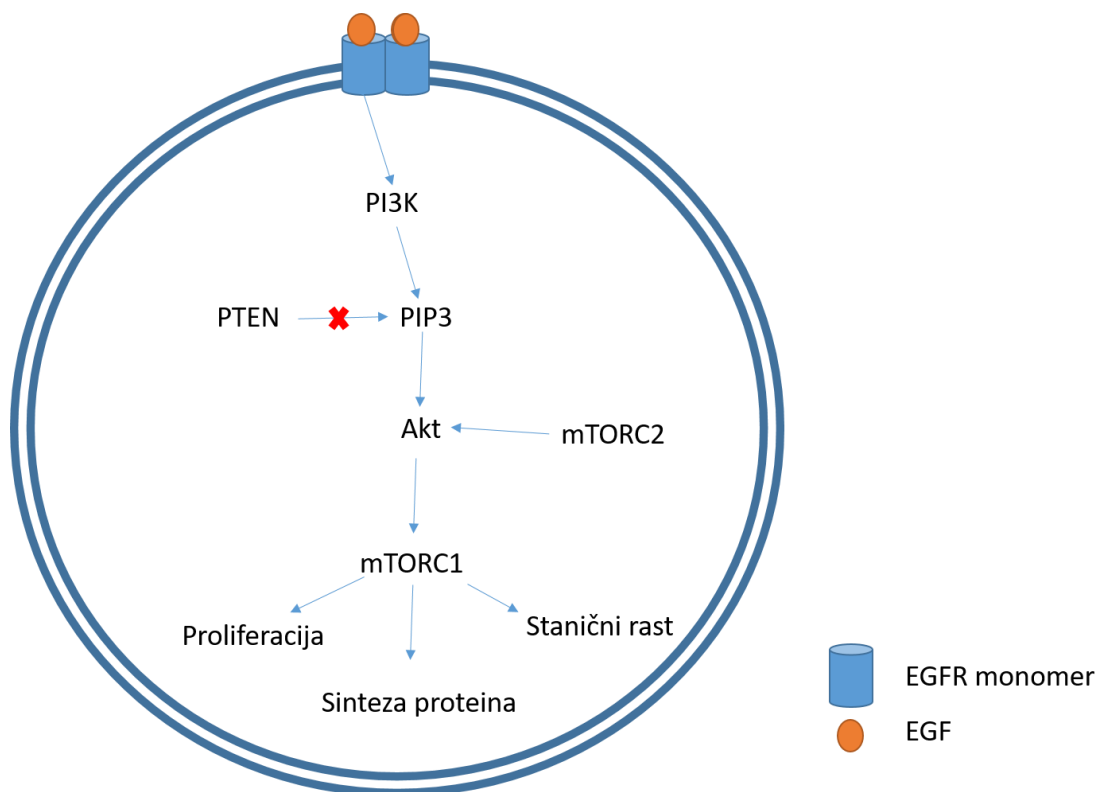
fosforilira membranski lipid fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (PIP2, engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) kako bi se stvorio fosfatidilinozitol-3,4,5 -trifosfat (PIP3, engl. *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) (Carpenter i sur., 1990). Sekundarni glasnik PIP3 aktivira daljnje nizvodne puteve prijenosa signala. Budući da je molekula PIP3 važan sekundarni glasnik u stanici, antagonist proteina PI3K, protein PTEN, svoju funkciju obavlja tako što defosforilira i smanjuje aktivnost upravo proteina PI3K. Aktivirani protein PI3K dalje prenosi signal na protein Akt. Ovaj protein je serin/treonin kinaza sa širokim spektrom supstrata. Ovaj protein utječe na preživljavanje, rast, migraciju i proliferaciju stanica, ali i na metabolizam i sintezu proteina. Protein Akt se aktivira dvostrukim regulatornim mehanizmom - da bi bio aktivan, mora doći do njegove translokacije u staničnu membranu i mora doći do fosforilacije na dva mjesta. Aktivirani receptor EGFR potiče translokaciju proteina Akt u staničnu membranu zbog fosforilacije sekundarnog glasnika PIP3, koja je ovisna o aktivaciji proteina PI3K. Molekula PIP3 se veže na protein Akt preko domene PH (od engl. *Pleckstrin homology domain*) (Franke i sur., 1997).

Postoje tri člana obitelji Akt: Akt1, Akt2 i Akt3. Protein Akt1 lokaliziran je u citoplazmi i jezgri, protein Akt2 u mitohondrijima, a protein Akt3 u jezgri i jezgrinoj membrani (Santi i Lee, 2010). Ipak, njihova se lokalizacija može razlikovati ovisno o tipu stanice (Cariaga-Martinez i sur., 2013). Svaki od navedenih članovi obitelji Akt može biti pretjerano eksprimiran u tumoru pri čemu je pretjerana ekspresija pojedinog član vezana uz određeni tip tumora (Wee i Wang, 2017).

Prekomjerna ekspresija receptora EGFR, bez prisutnosti samih faktora rasta, ne aktivira konstitutivno protein Akt. Međutim pokazalo se da prekomjerna ispoljenost receptora HER2 u stanicama raka dojke dovodi do pojačane aktivnosti proteina Akt (Zhou i sur., 2000). Protein Akt djeluje na anti-apoptotski odgovor izravnom fosforilacijom pro-apoptotskog proteina BAD. Na ovaj način, protein Akt direktno doprinosi izbjegavanju stanične smrti apoptozom (Datta i sur., 1997). Protein Akt također utječe na katalitičku aktivnost enzima kaspaze-9 njenom fosforilacijom, što za rezultat ima izbjegavanje apoptoze (Cardone i sur., 1998). Jedan od najvažnijih puteva koje protein Akt aktivira je aktivacija proteina mehanička meta rapamicina (mTOR, engl. *Mammalian target of rapamycin*). Protein mTOR je sastavni dio dva različita kompleksa: mTORC1 i mTORC2 (Peterson i sur., 2009), od kojih kompleks mTORC2 može direktno aktivirati protein Akt, dok je kompleks mTORC1 nizvodno od proteina Akt te sudjeluje u regulaciji različitih staničnih funkcija (Saxton i Sabatini, 2017). Protein Akt je jedan od glavnih pokretača Warburgovog efekta, budući da povećava unos glukoze kroz regulaciju

njenog transportera. Warburgov efekt odnosi se na fenomen gdje tumorske stanice veliki dio svoje energije mogu dobivati pomoću aerobne glikolize, za razliku od normalnih stanica koje najveći dio svoje energije dobivaju pomoću oksidativne fosforilacije. Aerobna glikoliza omogućuje paralelno stvaranje molekula poput riboza-5-fosfata i acetil koenzim A, koje su potrebne tumorskim stanicama za brzi i nekontrolirani rast (Vander Heiden i sur., 2009).

Put prijenosa signala PI3K/Akt/mTOR može utjecati i na procese koji sudjeluju u unosu hranjivih tvari u stanicu, uključujući glukozu, lipide i nukleotide, kako bi tumorske stanice mogle održavati svoju visoku biološku aktivnost - pojačanu proliferaciju, potrošnju energije i rast (Lieni sur., 2016). Mutacije na ovom putu prijenosa signala mijenjaju metabolizam stanice, stoga je ovaj put prijenosa signala potencijalna meta mnogih tretmana (Wee i Wang, 2017).



Slika 3. Shema puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt. Put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt regulira brojne stanične procese, mnogi od kojih su pretjerano aktivni u tumorskim stanicama. Vezanje faktora rasta EGF na receptor EGFR dovodi do dimerizacije monomera receptora EGFR i autofosforilacije. Ovo posljedično dovodi do aktivacije proteina PI3K i nastanka sekundarnog glasnika PIP3, koji aktivira protein Akt. Protein Akt je zadužen za daljnju aktivaciju brojnih proteina, uključujući i protein mTOR. Tumor supresor PTEN funkcionira tako da deaktivira sekundarni glasnik PIP3 i onemogućuje aktivaciju nizvodnih komponenti ovog puta prijenosa signala. Kao što je pokazano na Slici 1., H₂O₂ može direktno oksidirati protein PTEN i onemogućiti negativnu regulaciju ovog puta prijenosa signala (napravljeno po uzoru na Wee i Wang, 2017).

Sama lokalizacija receptora EGFR utječe na aktivaciju puteva prijenosa signala koji su stimulirani aktivacijom ovog receptora (Sadowski i sur., 2009). Poznato je da receptor EGFR može biti lokaliziran u lipidnim splavima, koje su manje fluidne od okolne stanične membrane (Guéguinou i sur., 2015). Poznato je da je receptor EGFR lokaliziran unutar lipidnih splavi kod tumorske stanične linije SiHa (Zhang i sur., 2016) kao i kod tumorske stanične linije HeLa (Macdonald i Pike, 2005). Pretpostavlja se da se lokalizacijom monomera receptora EGFR u lipidnim splavima koja su područja gušće pakiranih lipida i manje fluidnosti osigurava njihova međusobna blizina te se faktor rasta EGF lakše veže na dva monomera i dolazi do dimerizacije i posljedične aktivacije.

Rezultati istraživanja Zhuang i sur. (2002) pokazuju da je put prijenosa signala osovnom EGFR/Akt1, djelomično pod kontrolom dijela membrane bogatog kolesterolom (lipidnih splavi) u staničnoj liniji ljudskog adenokarcinoma prostate LNCaP (Zhuang i sur., 2002).

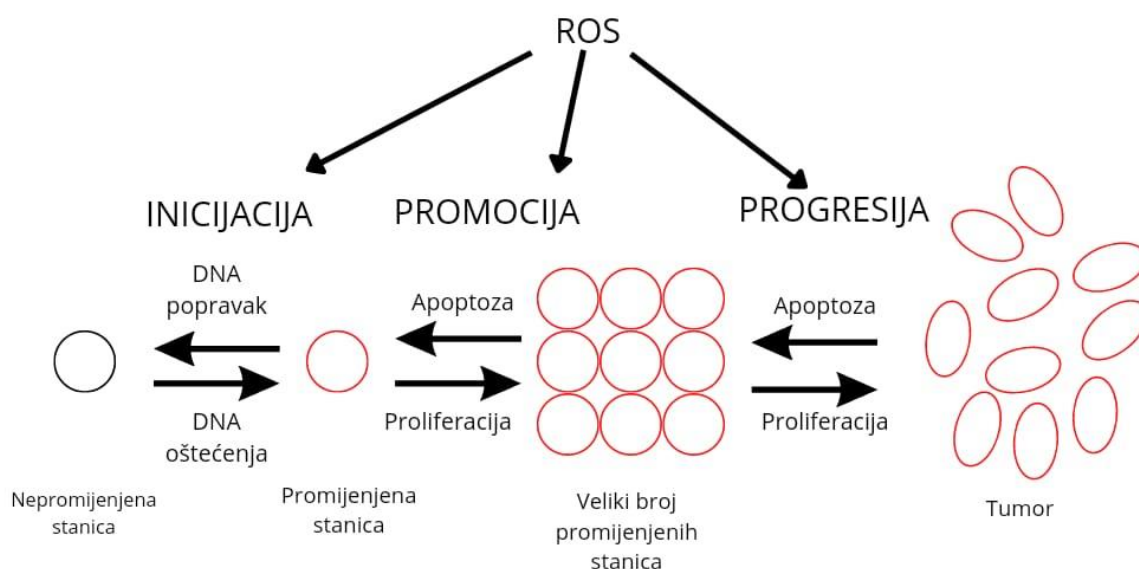
1.3. Povezanost AQP3 i EGFR

Cao i sur. (2006) ustanovili su da se ekspresija proteina AQP3 povećala povećanjem koncentracije primijenjenog faktora rasta EGF u fibroblastima ljudske kože i u keratinocitima. Također, faktor rasta EGF je potaknuo povećanu ekspresiju proteina AQP3 koja je ovisila i o vremenu izlaganja faktoru rasta EGF. Rezultati tog istraživanja ukazuju na to da su putevi prijenosa signala ERK i PI3K uključeni u regulaciju ekspresije proteina AQP3 uvjetovanu faktorom rasta EGF, ali i da utječu na migraciju stanica u fibroblastima ljudske kože (Cao i sur., 2006). Također, pokazano je da faktor rasta EGF povećava ekspresiju proteina AQP3 preko puta prijenosa signala PI3K/Akt, te da također utječe na sposobnost migracije stanica kod stanične linije ljudskog kolorektalnog karcinoma HCT116. Ova povezanost ekspresije proteina AQP3 i primijenjenog faktora rasta EGF ovisna je o dozi i vremenu izlaganja stanica faktoru rasta EGF (Li i sur., 2012). Huang i sur. (2010) pokazali su da je ekspresija proteina AQP3 ovisna i o koncentraciji i o vremenu izlaganja faktoru rasta EGF na ljudskoj staničnoj liniji raka želuca, SGC7901, i ljudskoj staničnoj liniji adenokarcinoma želuca, AGS, gdje se ekspresija povećava s povećanjem doze primijenjenog faktora rasta EGF, ali i s duljinom izlaganja faktoru rasta EGF. Uz to, povećanu ekspresiju proteina AQP3 pratila je i povećana migracija i proliferacija ovih stanica (Huang i sur., 2010).

1.4. Tumor dojke

Tumori su karakterizirani nekontroliranim rastom stanica kao i njihovom imortalizacijom, koja nastaje zbog niza promjena na staničnoj razini. U većini slučajeva dolazi do inaktivacije tumor supresorskih gena i/ili aktivacije onkogeno što dovodi do disregulacije staničnog ciklusa i izbjegavanja apoptoze. Mutacije onkogeno i tumor supresor gena djeluju slično na fiziološkoj razini: dolazi do disregulacije staničnog ciklusa u korist proliferacije. Do pojačane proliferacije dolazi zbog aktivacije gena koji pokreću stanični ciklus, inhibicije apoptoze i bolje opskrbe stanica tumora hranjivim tvarima zbog angiogeneze. U tumorskim stanicama dolazi i do mutacija u genima odgovornim za popravak oštećenja molekule DNA, a to uključuje gene za popravak nepodudarnosti (DNA mismatch repair), gene za popravak izrezivanjem baza (engl. *Base excision repair*) i gene za popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide excision repair*) (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Tumore, vrlo općenito dijelimo na benigne (dobročudne) tumore, one koji ne prolaze kroz bazalnu membranu i koji su manje opasni te maligne (zloćudne) tumore koji prolaze bazalnu membranu čime su izrazito invazivni za domaćina. Maligni mogu stvarati metastaze (koje definiramo kao tumorske stanice kćeri koje su se fizički odvojile od primarnog tumora i locirale drugdje u tijelu). Ovaj proces je ovisan o regulaciji staničnih molekula koje sudjeluju u staničnoj adheziji, ali i pojačanoj regulaciji proteina koji utječu na pokretljivost stanica. Djelovanjem membranskih metaloproteinaza tumor omogućuje svojim stanicama širenje u druge dijelove tijela, pri čemu razgrađuje okolno tkivo (Sarkar i sur., 2013). Glavna obilježja zloćudnih tumora su nekontrolirano dijeljenje stanica, neovisnost o signalima iz okoliša, mogućnost izbjegavanja djelovanja supresora rasta, sposobnost invazije okolnog tkiva, imortalizacija stanica (nisu ograničene u smislu broja replikacija), poticanje angiogeneze (bolja opskrbljenost tumora kisikom i hranom) i izbjegavanje programirane stanične smrti (Hanahan i Weinberg 2000).



Slika 4. Povezanost oksidacijskog stresa i tumora. Oksidacijski stres direktno utječe na tri faze kancerogeneze. Normalna stanica može zbog mutacija uzrokovanih ROS dobiti karakteristike koje joj omogućuju da potencijalno postane tumorska stanica. U ovoj fazi inicijacije, moguće je popravkom molekule DNA povratiti „normalna“ svojstva stanice i spriječiti daljnju progresiju u tumor. Ako ova stanica nastavi akumulirati mutacije, u fazi promocije dobivamo veliki broj stanica koje su promijenjene i koje akumuliraju dodatne mutacije koje stanice čine još više otpornima. Mehanizmi popravka više ne mogu „smanjiti štetu“ i ovaj proces daljnje akumulacije mutacija se može spriječiti apoptozom. Ako stanice ne prođu kroz proces apoptoze, postaju sve više otporne i tada govorimo o tumorskim stanicama (napravljeno po uzoru na Valluru i sur., 2014)

Oksidacijski stres, neravnoteža između produkcije i eliminacije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive oxygen species*) također doprinosi nastanku tumora (Slika 4), ali i njegovoj promociji i progresiji. Jedna od glavnih molekula oksidacijskog stresa je H_2O_2 , čiji je transport direktno povezan s akvaporinima. H_2O_2 je i u fiziološkim uvjetima uključen u brojne stanične procese - diferencijaciju, preživljavanje, rast stanica, autofagiju i apoptozu, upalne procese i zacjeljivanje rana kao i brojne druge (Sies 2017). Budući da je stabilan i ima dulji životni vijek, H_2O_2 može difundirati, a taj proces kroz membranu reguliraju akvaporini. Zbog svojih brojnih uloga, koncentracija H_2O_2 često je povišena kod tumorskih stanica u odnosu na normalne (Szatrowski i Nathan, 1991). Jedan od bitnih puteva prijenosa signala u kojima sudjeluje H_2O_2 je i put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt. Protein PTEN je tumor supresor koji negativno regulira put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt. Poznato je da povećana koncentracija unutarstaničnog vodikovog peroksida, može dovesti do reverzibilne inaktivacije

proteina PTEN, što posljedično dovodi do povećane aktivacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt (Lee i sur., 2002).

Rak dojke je skup različitih zloćudnih bolesti do kojih dolazi zbog promjena u stanicama mliječnih žlijezdi. Zbog velikog napretka u znanosti posljednjih godina, naše razumijevanje ove bolesti puno je bolje shvaćeno (Feng i sur., 2018). Postoje brojni čimbenici koji povećavaju šansu za nastanak tumora dojke, a dio ovih faktora izvan je kontrole pojedinca (Kamińska i sur., 2015).

Neki od faktora koji utječu na povećani rizik od tumora dojke su:

Obiteljska povijest - 15% žena s rakom dojke ima člana obitelji s ovom bolešću, a što su članovi obitelji koji su imali rak genetski sličniji pojedincu, šansa da ju pojedinac dobije postaje veća (Feng i sur., 2018).

Pokazano je da žene s gušćim tkivom dojke na mamografiji imaju rizik koji je oko 1,5-2 puta veći od žena s prosječnom gustoćom tkiva dojki. Na ovaj parametar utječe više faktora, poput dobi žene, trudnoće, je li žena u menopauzi i upotrebe hormonske terapije (Feng i sur., 2018).

Oko 85% karcinoma dojke javlja se kod žena koje nemaju direktnu obiteljsku povijest ove bolesti. Ovo znači da se u većini slučajeva radi o genetskim mutacijama koje se događaju zbog procesa starenja i brojnih faktora moguće povezanih s načinom života (Feng i sur., 2018).

Žene koje koriste oralne kontracepcijske tablete imaju malo veći rizik od nastanka tumora dojke od žena koje nikada nisu koristile oralne kontracepcijske tablete. Ovaj rizik se postepeno smanjuje i vraća u normalne vrijednosti nakon prestanka uzimanja oralnih kontracepcijskih tableta (Feng i sur., 2018). Hormon estrogen, često u kombinaciji s progesteronom, daje se ženama s ciljem ublažavanja simptoma menopauze i sprječavanja osteoporoze. Kombinirana hormonska terapija također povećava rizik od nastanka tumora dojke, kao i šanse da tumor dovede do smrti. Ovaj rizik povezan je s trenutnim i nedavnim korištenjem kombinirane hormonske terapije, a nakon 5 godina nekorištenja ovaj rizik se u potpunosti vrati u normalne vrijednosti koje vidimo u općoj populaciji (Feng i sur., 2018).

Budući da je masno tkivo značajan faktor koji utječe na koncentraciju ovoga hormona, višak masnog tkiva nakon menopauze može povećati razinu estrogena i povećati rizik od raka dojke. Osim toga, prekomjerna tjelesna masa dovodi do stalne kronične upale, smanjene kvalitete života i povezana je s nezdravom prehranom i višom razinom inzulina u krvi. Ove visoke razine inzulina povezane su s određenim vrstama raka, uključujući rak dojke. Kakogod, povezanost

između prekomjerne tjelesne mase i rizika od raka dojke složena je i nije u potpunosti razjašnjena (Feng i sur., 2018). Trudnoća je također povezana s ovim rizikom. Žene koje nisu rodile niti jedno dijete ili su pak prvo dijete rodile nakon 30. godine svog života imaju nešto veći rizik od nastanka tumora dojke. Žene koje su prvo dijete dobile u ranijoj životnoj dobi, ili su rodile više djece, imaju smanjeni rizik od raka dojke (Sun i sur., 2017). Dob prve menstruacije također je povezana s ovim rizikom, gdje žene koje su imale prvu menstruaciju ranije u životu, imaju potencijalno više menstrualnih ciklusa, pa će tako tijekom života biti dulje vremena izložene višoj razini hormona estrogena i progesterona (Sun i sur., 2017). Žene će također imati više menstrualnih ciklusa ako kasnije prođu kroz menopauzu, osobito nakon 55. godine života što dovodi do malo većeg rizika od raka dojke (Sun i sur., 2017; Feng i sur., 2018). Tjelesna aktivnost i životni stil igraju veliku ulogu - žene koje su fizički aktivne u prosjeku imaju 25% manji rizik od raka dojke od žena koje su manje aktivne (Lynch i sur., 2010), te je redovita tjelesna aktivnost potencijalno niskorizičan, jeftin i učinkovit način prevencije raka dojke kod žena (Sun i sur., 2017). Primijećena je veza između konzumacije alkohola i povećanog rizika od tumora dojke. Žene koje konzumiraju preko 35 grama alkohola dnevno, imaju značajno povećan rizik od nastanka tumora dojke (Hamajima i sur., 2002).

Karcinom je zloćudni tumor koji nastaje iz promijenjenih stanica epitela i ujedno je najčešći oblik tumora dojke, dok su sarkomi i limfomi rjeđi. Karcinomi se dijele u ovisnosti o točnom mjestu nastanka. Duktalni karcinomi nastaju u mliječnim kanalićima tkiva dojke. Lobularni nastaju iz samih mliječnih žlijezdi dojke. Karcinom može biti lokaliziran na epitelno tkivo i onda se naziva karcinom *in situ*. Kako bolest odmiče, ovaj karcinom može narušiti cjelovitost i funkciju bazalne membrane, te se proširiti u okolno tkivo, a tada se kategorizira kao invazivni karcinom (Makki, 2015).

Perou i sur. (2000) proučavali su razlike u ekspresiji gena unutar grupe pacijenata s tumorom dojke. Uveli su klasifikaciju tumora dojke na molekulskoj razini na četiri tipa: pozitivni na receptor HER2, bazalni, luminalni i normalni. Gledajući receptore za estrogene, tumore dojke možemo podijeliti na tumore pozitivne na receptor za estrogen (u koje spada luminalni tip tumora) i one koji nisu pozitivni na receptor za estrogen. Sørliie i sur. (2001) predložili su da se luminalni tip tumora podijeli na luminalni tip A (pozitivan na receptore za estrogen i progesteron, negativan na receptor HER2) s boljom prognozom i luminalni tip B (pozitivan na receptore za estrogen, progesteron i HER2) s lošijom prognozom.

Iako je podjela na temelju ekspresije gena moguća, njena šira upotreba u kliničkoj praksi nije

učestala zbog svoje nepraktičnosti. Zbog toga, tumori dojke su klasificirani u podtipove i prema imunofenotipu, gledajući ispoljenost receptora za progesteron (PR), estrogen (ER) i HER2. Ovi tumori se stoga dijele na tumore pozitivne na receptore za estrogen (ER) i progesteron (PR), tumore pozitivne na receptor HER2 te trostruko negativne tumore (negativni na receptore ER, PR i HER2) koji se ujedno smatraju i najagresivnijim oblikom (Zaha, 2014). Iako postoje i brojne druge klasifikacije, karakterizacija tumora dojke na ove tri skupine je dovoljno jednostavna i omogućuje davanje prikladne terapije. Tumori pozitivni na receptore ER i PR mogu se liječiti hormonskom terapijom i imaju najmanji potencijal od razvoja malignog oblika bolesti (Sørliie i sur. 2001). Tumori pozitivni na receptor HER2 mogu biti liječeni pomoću kemoterapije i primjene antitijela za receptor HER2, dok se kod trostruko negativnih tumora uglavnom primjenjuje samo kemoterapija (Zaha, 2014).

Danas se tumori dojke dijele prema imunofenotipu na luminalne A koji su ER+PR+, HER2 negativni, proliferacijski index Ki67 niski, luminalne B koji su ER+PR+, HER2 negativni proliferacijski index Ki67 visoki, luminalne B koji su ER+ PR+, HER2 pozitivni proliferacijski index Ki67 visoki, samo HER2 pozitivni tumori i trostruko negativni tumori dojke (ER,PR HER2 negativni, Ki67 visok) (Yersal, 2014).

2. Cilj istraživanja

Budući da znamo da je protein AQP3 prekomjerno ispoljen u brojnim tumorima, uključujući i tumore dojke, te da je ekspresija proteina AQP3 djelomično pod utjecajem faktora rasta EGF, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi međusobnu povezanost ekspresije proteina AQP3 i puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt. Također, kako se zna da se receptor EGFR lokalizira u lipidne splavi ispitalo se locira li se i protein AQP3 u lipidne splavi. Međusobna ovisnost ekspresije proteina AQP3 i receptora EGFR praćena je stimulacijom ciljnog puta prijenosa signala faktorom rasta EGF te njegovom inhibicijom razbijanjem lipidnih splavi (deplecijom kolesterola metil- β -ciklodekstrinom (MBCD, engl. *Methyl- β -cyclodextrin*)) u tri stanične linije tumora dojke i u ne-tumorskoj staničnoj liniji epitela dojke. Razbijanjem lipidnih splavi provjerena je moguća ovisnost proteina AQP3 o lipidnim splavima. Moguća ovisnost puta prijenosa signala EGFR o ekspresiji proteina AQP3 praćena je utišavanjem gena za protein AQP3. Utjecaj ekspresije proteina AQP3 i učinak stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt i razbijanja lipidnih splavi praćen je putem vijabilnosti (redukcijom boje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid - MTT) i ekspresije proteina Akt, pAkt, PI3K i AQP3 u stanicama pomoću metode Western blot. Kako bi se pratio utjecaj ekspresije proteina AQP3 na put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt, utišana je ispoljenost proteina AQP3 pomoću specifične male interferirajuće RNA (siRNA, engl. *Small interfering RNA*) za gen za protein AQP3 te se istražio utjecaj utišavanja ekspresije proteina AQP3 na ekspresiju proteina Akt, pAkt, PI3K.

3. Materijali i metode

3.1. Stanične kulture

Pokuse vezane uz stanične kulture napravio sam u zaštitnoj komori za rad u sterilnim uvjetima koja se nalazi u posebnoj (sterilnoj) prostoriji. Postupak rada sa staničnim kulturama bio je jednak za sve četiri ljudske stanične linije tumora dojke koje su korištene u ovom radu: SKBR3, MCF7, SUM159 i MCF10A. Stanice se čuvaju u krio epruvetama u tekućem dušiku na -196 °C kada se ne koriste za pokuse. Za potrebe pokusa, stanice su izvađene iz tekućeg dušika i odmrznute u čašici s mlakom vodom. Krio epruvete sam otvarao unutar zaštitne komore. Otopljenu suspenziju stanica, odmah po otapanju pomiješao sam s 5 mL medija za uzgoj stanica (DMEM s 10% fetalnim telećim serumom (FCS od engl. *Foetal calf serum*) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD; dalje u tekstu: medij) za stanične linije SKBR3, MCF7 i SUM159, dok sam za staničnu liniju MCF10A koristio njihov medij (DMEM:F12 (Sigma Aldrich) = 1:1, 10% FCS, EGF (Peprotech, London, Velika Britanija) (20 ng/mL), Inzulin actrapid (Novo nordisk, Bagsværd, Danska) (10 µg/mL), Cholera toxin (Sigma Aldrich) (100 ng/mL) u staklenoj epruveti. Epruvetu sam zatvorio aluminijskom folijom i suspenzija stanica je centrifugirana 5 minuta na 1300 okretaja u minuti (rpm) u centrifugi Heraeus Function Line Labofuge 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Nakon centrifugiranja suspenzije, supernatant sam izlio i bacio, a talog sam resuspendirao u 1 mL odgovarajućeg medija. Nakon dodavanja 9 mL medija u bocu (TC Flask T75, Cell+, Vented Cap, Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) u kojoj se uzgajaju stanice, suspenziju stanica od 1 mL prebacio sam u istu. Stanice su uzgajane u inkubatoru za uzgoj stanica Heraeus Hera Cell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na 37 °C i 5% CO₂ u vlažnoj atmosferi. Nakon toga, stanice sam ostavio da rastu u inkubatoru tijekom faze eksponencijalnog rasta (~48 sati) te sam ih prije faze usporenog rasta tripsinizirao (odvajanje adherentnih stanica s površine posude za kulturu). Proces tripsinizacije krenuo sam s izlivanjem većeg dijela medija u kojemu su stanice rasle, te prebacivanjem manjeg dijela medija u sterilnu staklenu epruvetu. Nakon toga, dodao sam 3 mL pufera PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl i 10 mM KH₂PO₄) (Grammol, Zagreb, Hrvatska), kako bi isprao ostatke medija. Pufer PBS sam nakon toga izlio, te dodao 3 mL tripsina (Sigma Aldrich) s 1% EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Kemika, Zagreb, Hrvatska) koji je ostavljen u boci u trajanju od ~5 minuta za stanične linije SKBR3, MCF7 i SUM159 i ~10 minuta za staničnu liniju MCF10A. Stavljanjem boce pod mikroskop, potvrdio sam da su se

stanice odvojile od površine boce i zaokružile, što označava uspješnu tripsinizaciju. Nakon toga sam u bocu dodao manji volumen starog medija sačuvanog u sterilnoj staklenoj epruvetu, pri čemu serum FCS iz medija inhibira djelovanje tripsina (kako se stanice ne bi oštetile djelovanjem tripsina), a zatim sam sav sadržaj iz boce prebacio u sterilnu staklenu epruvetu. Epruvetu sam zatvorio aluminijskom folijom i suspenzija stanica je centrifugirana 5 minuta na 1300 rpm u centrifugi. Nakon toga, izlio sam supernatant i dodao 1 mL odgovarajućeg medija, te sam stanice resuspendirao. 20 μ L suspenzije stanica razrijedio sam s tripanskim modrilom (Sigma Aldrich) u omjeru 1:10 i neobojene, žive stanice sam izbrojao u Bürker-Türk-ovoj komorici pod invertnim mikroskopom Axiovert 25 (ZEISS, Oberkochen, Njemačka). Ukupan broj stanica u suspenziji dobio sam koristeći formulu:

Ukupan broj stanica = (izbrojane stanice / broj polja) * razrjeđenje * volumen polja * volumen suspenzije stanica

Prebrojane stanice sam dalje koristio za ponovno nasađivanje u boce ili sam ih uzgajao za pokuse. Ako su bile potrebne za kasnije korištenje, stanice sam smrzavao na način da sam talog od 1.5 - 3 milijuna stanica pomiješao s 1 mL medija za zamrzavanje (FCS:DMEM:dimetil sulfoksid (DMSO, *Dimethyl sulfoxide*) = 5:4:1)) (DMSO - Sigma Aldrich) u krio epruvetama. Prvo su ostavljene u krio epruvetama na parama tekućeg dušika (manje od 24 sata), a zatim su spuštene u tekući dušik na -196 °C.

3.2. Razbijanje lipidnih splavi

Lipidne splavi su dijelovi stanične membrane koji su bogati kolesterolom i sfingolipidima što uzrokuje manju fluidnost lipida i proteina u ovim područjima. Deplecija kolesterola dovodi do razbijanja lipidnih splavi i disocijacije proteina koji su inače povezani s ovom regijom, a sve zbog povećane fluidnosti. Molekula MBCD (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) djeluje isključivo površinski i na način da veže na sebe kolesterol čime uzrokuje razbijanje lipidnih splavi unutar kratkog vremena (Barman i Nayak, 2007). Dodavanjem faktora rasta EGF ispitao sam aktivnost puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt u ovisnosti s lipidnim splavima. Sve četiri stanične linije nasadio sam ovisno o pokusu u pločice s 96 jažica za vijabilnost ili s 12 jažica za analizu proteina, tako da sam sve četiri stanične linije nasađivao u koncentraciji od 10 000 stanica u 100 μ L po jažici u pločici od 96 jažica, odnosno 250 000 stanica u 1 mL po

jažici u pločici od 12 jažica. Nakon nasađivanja, stanice su inkubirane 24 sata. Nakon 24 sata bacio sam stari medij, a u dio jažica dodao sam medij DMEM ili medij za MCF10A (bez seruma FCS) i pufer HEPES (Carl Roth) s 5 mM otopinom MBCD, dok sam u druge dodao medij DMEM ili medij za MCF10A (bez seruma FCS) i pufer HEPES. Otopinu MBCD sam otopio u odgovarajućem volumenu pufera HEPES tako da je radna koncentracija iznosila 5 mM pa je nakon dodavanja ove otopine i medija DMEM u jažicu u omjeru 1:1, konačna koncentracija iznosila 2,5 mM. Stanice su inkubirane dva sata. Nakon toga sam bacio medij sa stanica i na dio stanica tretiranih otopinom MBCD i na dio kontrola s puferom HEPES dodao sam odgovarajući volumen medija sa serumom FCS. Također, dio stanica tretiranih otopinom MBCD i dio kontrola s puferom HEPES tretirao sam odgovarajućim medijem s 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ faktora rasta EGF. Na kraju je svaka stanična linija imala četiri tretmana - kontrola, tretman s faktorom rasta EGF, tretman s otopinom MBCD i tretman s otopinom MBCD i faktorom rasta EGF. Nakon 24 sata stanice u pločicama s 96 jažica testirao sam na vijabilnost, a iz stanica u pločicama s 12 jažica izolirao sam proteine.

3.3. Test stanične vijabilnosti

Kako bi ustanovio utječe li tretman na preživljavanje i proliferaciju stanica, koristio sam test stanične vijabilnosti (EZ4U, Biomedica, Austrija). Ovaj test koristi se kako bi ustanovili koliko je vijabilnih stanica ostalo nakon tretmana i temelji se na redukciji boje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT). Ova boja lako prolazi kroz staničnu membranu i žive stanice je oksidiraju u mitohondrijima pri čemu nastaje žuto obojenje. Budući da se ovaj proces odvija samo u živim stanicama i sposobnost oksidacije nestaje vrlo brzo nakon stanične smrti, stupanj obojenja direktno korelira s brojem vijabilnih stanica. Intenzitet obojenja očitavao sam na čitaču mikrotitarskih pločica pri dvostrukoj valnoj duljini 450/620 nm.

3.4. Izolacija proteina

Izolacija proteina iz stanica od interesa prethodi metodi Western blot. Western blot je imunokemijska metoda pomoću koje detektiramo i kvantificiramo proteine korištenjem antitijela koja su specifična za ciljne proteine. Izolaciju proteina izvodio sam na ledu. Stanice sam nasadio u mikrotitarske pločice s 12 jažica (TPP, Trasadingen, Švicarska) i tretirao kako je opisano ranije. Stanicama sam uklonio medij, a zatim isprao dva puta s puferom PBS. Nakon toga sam dodao 30-60 μL pufera RIPA (50 mM tris-Cl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% natrijev dodecil sulfat (SDS, engl. *Sodium dodecyl sulfat*) (Sigma Aldrich) s 10%-tnim inhibitorom proteaza i fosfataza (Sigma Aldrich) po jažici. Volumen dodanog pufera RIPA ovisio je o brojnosti stanica, te sam koristio veći volumen ako je više stanice bilo vijabilno u jažicama. Nakon 10 minuta inkubacije stanica na ledu, jažice sam postrugao dva puta strugačem, zatim prebacio u mikroeprovete od 1,5 mL i centrifugirao na 13400 rpm u centrifugi MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Nakon toga sam supernatant (u kojemu se nalaze proteini) izvadio iz mikroeprovete i premjestio u drugu prethodno označenu mikroeprovetu, a talog sam bacio.

3.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina u uzorcima određena je metodom po Bradfordu (Bradford 1976) - koja se temelji na promjeni crveno-smeđe boje *Coomassie brilliant blue* u plavu nakon vezanja boje na amino skupine proteina. Apsorbancija se očitava pomoću čitača mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 595 nm. Promjena boje proporcionalna je koncentraciji proteina u uzorku, pa se uzorci mogu kvantificirati pomoću proteinskih standarda poznate koncentracije. Za standarde, koristio sam rastuće koncentracije proteina goveđi serumski albumin (BSA, engl. *Bovine serum albumin*) (Sigma Aldrich) od 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ u 20% pufera RIPA u puferu PBS. Budući da su standardi otopljeni u 20% pufera RIPA u puferu PBS, uzorke proteina u puferu RIPA razrijedio sam u puferu PBS u omjeru 1:5. Nakon razrjeđivanja uzoraka (2,5 μL uzorka u 10 μL pufera PBS), 5 μL uzorka pipetirao sam u dvije jažice mikrotitarske pločice (96 jažica) u tehničkim duplikatima, 5 μL svakog standarda također sam pipetirao u tehničkim duplikatima. Na njih sam dodao 200 μL reagensa za bojanje proteina (BioRad Laboratories, Hercules, California, SAD). Nakon 5 minuta izmjerio sam apsorbancija

na čitaču mikrotitarskih pločica (EZRead 2000, Biochrom Ltd, Velika Britanija) na valnoj duljini od 595 nm. Koncentraciju proteina u uzorcima odredio sam metodom linearne regresije koristeći baždarnu krivulju apsorbancije ranije navedenih standarda uz korekciju razrjeđenja. Koncentraciju proteina izrazio sam kao μg proteina po mL otopine.

3.6. Priprema uzoraka za gel elektroforezu

Prethodno određene koncentracije proteina podesio sam tako da u svakoj jažici za elektroforezu nanosim jednaku količinu proteina. U mikroeprevetu za lančanu reakciju polimerazom (PCR, engl. *Polymerase chain reaction*), pipetirao sam odgovarajuću količinu uzorka, dodao 4 μL Laemmli pufera za nanošenje uzoraka (0,01% boje bromfenol plavo (Michrome, London, Velika Britanija), 4% SDS (Sigma Aldrich), 125 mM tris HCl (Sigma Aldrich), 150 mM ditiotreitola (DTT, engl. *Dithiothreitol*) (Sigma Aldrich), 20% glicerol (Kemika)), te do 20 μL ukupnog volumena dodao pufer PBS. Volumen od 20 μL koristio sam jer je prikladan za nanošenje u gel s češljicom od 12 jažica. 20 μL uzoraka dobivenih na prethodno opisan način, zagrijao sam na 95 °C u uređaju Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u trajanju od 5 minuta kako bi se proteini denaturirali.

3.7. Gel elektroforeza i mokri prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Poliakrilamidna gel elektroforeza služi za razdvajanje proteina na temelju molekulske mase. Za elektroforezu sam složio sljedeće elemente: stakalce sam stavio na stakalce s razmaknicom od 1 mm. Ovaj par stakalaca pričvrstio sam na stalak za izlivanje gela za elektroforezu. Između stakalaca prvo sam otpipetirao gel za razdvajanje (5,4 mL reH₂O, 3,6 mL 30% akrilamid/bisakrilamid (Acryl/Bis) (Carl Roth), 3 mL pufer 1 (1,5 M tris (Sigma Aldrich), pH 8,8), 100 μL 10% amonijevog persulfata (APS, engl. *Ammonium persulfate*), (Bio-Rad Laboratories), 10 μL tetrametiletilendiamin (TEMED, engl. *Tetramethylethylenediamine*) (Carl Roth) koji sam odmah prekrpio etanolom, a za polimerizaciju gela čekao sam 20 minuta. Gel sam pipetirao do razine 2 cm ispod dna jažice. Nakon toga sam uklonio etanol, a stakla sam osušio filter papirom. Zatim sam na gel za razdvajanje otpipetirao gel za sabijanje (4,35 mL reH₂O, 1,27 mL 30% Acryl/Bis, 1,87 mL pufer 2 (0,5 M tris, pH 6,8), 100 μL 10% APS.

Odmah nakon izlivanja gela za sabijanje, stavio sam češljic, kako bi dobio jažice za nanos proteina, te se gel polimerizirao nakon 10 minuta. Stalak s gelovima uklonio sam s postolja za izlivanje gela i stavio u prozirnu kadicu za elektroforezu. Pufer za elektroforezu (25 mM tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS) ulio sam tako da prekriva gelove (otprilike 0,5 L). Češljic sam pažljivo izvadio, a jažice isprao puferom za elektroforezu, kako bi uklonio dio nepolimeriziranog gela koji je možda ostao u jažicama. U jažice sam nanosio 20 μ L pripremljenih uzoraka s proteinima ili 4 μ L biljega (Color-coded Prestained Protein Marker, Broad Range (10-250 kDa); Cell Signaling Technology, Danvers, SAD). Ako je broj uzoraka zajedno s biljegom bio manji od 12, prazne jažice napunio sam s "blankom" koji se sastojao od pufera PBS i Laemmli pufera u omjeru 5:1. Kada sam sve uzorke otpipetirao u jažice, sustav za elektroforezu sam zatvorio i priključio na uređaj za električno napajanje (Clever Scientific, Warwickshire, Velika Britanija). Postavke uređaja namjestio sam na konstantnu voltažu, 90 V u trajanju od 65 minuta. Prelaskom proteina u gel za razdvajanje i postepenim razdvajanjem biljega, nakon 65 minuta voltažu sam podigao na 105 V do završetka elektroforeze.

Nakon elektroforeze slijedi prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu Roti®-NC (Carl Roth). Nakon elektroforeze, stakalce s razmaknicom i stakalce razdvojio sam pomoću plastične špatule. Gel za sabijanje sam uklonio, a gel za razdvajanje u kojemu se nalaze proteini, premjestio sam sa stakalca na donji filter papir koji se nalazi na crnoj kazeti u "sandwich" sustavu za prijenos. Sandwich sustav za prijenos sastavio sam na sljedeći način: nitroceluloznu membranu izrezao sam na odgovarajuće dimenzije, zatim stavio u reH₂O, a zatim u pufer za prijenos (25 mM tris, 192 mM glicin (Carl Roth), 20% metanol (Grammol)). U kadicu u kojoj se slaže „sandwich“ za prijenos proteina s gela na membranu, prvo sam stavio crnu kasetu, a na nju spužvicu koju sam prethodno stavio u pufer za prijenos. Na spužvicu sam stavio filter papir koji sam prethodno stavio u pufer za prijenos, a na njega gel. Zatim sam na gel položio nitroceluloznu membranu, te sam mjehuriće zraka istisnuo pomoću valjka. Na nitroceluloznu membranu stavio sam filter papir koji sam također stavio u pufer za prijenos. Mjehuriće zraka sam ponovno istisnuo pomoću valjka. Na filter papir sam stavio spužvicu koju sam prethodno natopio u pufer za prijenos. Na ovu spužvicu stavio sam crvenu kasetu, te sam ovaj "sandwich" stegnuo i stavio u posudu sa stalkom za prijenos proteina koju sam zatim stavio u kadicu za prijenos koju sam prethodno napunio puferom za prijenos do razine označene na kadici. Pufer za prijenos sam u kadici stavio do razine gdje u potpunosti prekriva cijeli "sandwich". Kadicu sam zatim položio u stiropornu kutiju s ledom kako bi spriječio pregrijavanje sustava te sam tako pripremljeni sustav priključio na aparat za električno

napajanje. Postavke uređaja sam namjestio na konstantnu jakost struje, 240 mA u trajanju od 90 minuta. Proteini koji su elektroforezom razdvojeni prema molekulskoj masi, preneseni su s gela za elektroforezu na nitroceluloznu membranu korištenjem električnog polja u smjeru okomitom na površinu gela. Po završetku ovog procesa, membranu sam izvadio u posudicu i stavio u reagens Ponceau S (Sigma Aldrich) tako da je cijela membrana prekrivena reagensom. Ovaj proces bojanja proteina reagensom Ponceau S trajao je 5 minuta. Obojenjem membrane provjerio sam uspješnost prijenosa proteina uz dodatnu kontrolu jednakog nanošenja proteina te sam membranu slikao na skeneru. Nakon toga, membrane sam izrezao tako da sam višak nitrocelulozne membrane (dio bez proteina i biljega) uklonio škarama. Dio membrane s proteinima stavio sam u 5% nemasnog mlijeka u prahu (Carl Roth) u puferu TBST (50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20 (Carl Roth)) u prethodno označene posudice. Nitrocelulozne membrane s proteinima inkubirane su 60 minuta na sobnoj temperaturi. Dodavanje 5% nemasnog mlijeka u prahu u pufer TBST smanjuje nespecifično vezanje antitijela na samu membranu. Nakon 60 minuta membrane sam isprao puferom TBST tri puta u trajanju od 5 minuta. Nakon ovog procesa, dodao sam primarno antitijelo od interesa koje sam razrijedio prema uputama proizvođača, te se inkubacija odvijala sa specifičnim primarnim antitijelima (kunić ili miš) na 4 °C preko noći na klackalici SK-R1807-E (DLAB Scientific Co., Beijing, Kina) Sva korištena antitijela navedena su u Tablici 1. Nakon inkubacije, membrane sam isprao tri puta po 5 minuta u puferu TBST kako bi se isprala nevezana antitijela. Nakon toga, membrane su inkubirane s antikunićjim-IgG ili antimišjim-IgG sekundarnim antitijelom s enzimom peroksidaze hrena (HRP, engl. *Horseradish peroxidase*) 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon sat vremena, membrane sam isprao tri puta s puferom TBST u trajanju od 5 minuta. Zatim sam ih izvadio iz pufera TBST na prozirnu foliju, te sam višak pufera uklonio stavljanjem papirnato g ubrusa na membranu i nježnim stiskanjem. Na njih sam nakon toga otpipetirao 1,2 mL kemiluminiscencijskog reagensa sa supstratom za enzim HRP (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD)). Membrane sam odmah pokrio kako bi bile u mraku. Nakon 5 minuta membranu sam stavio između dvije plastične folije, a višak kemiluminiscencijskog reagens sa supstratom za enzim HRP istisnuo sam pomoću plastičnog valjka. Membranu sam zatim slikao na uređaju Alliance Q9 mini (UVITEC, Cambridge, Velika Britanija). Slike sam analizirao softverom za analizu Nine Alliance. Dobivene rezultate normalizirao sam koristeći kontrolni (održavateljski, engl. *Housekeeping*) protein β -aktin i intenzitet obojenja Ponceau S reagensom.

Tablica 1. Popis korištenih antitijela

Proizvođači	Antitijelo	Kataloški brojevi
Cell Signaling Technology, Danvers, SAD	PI3K	CST-4249S
	Akt	CST-4691s
	pAkt	CST-4060S
	beta aktin	CST-8457S
Santa Cruz Technology, Dallas, SAD	AQP3	sc-51001

3.8. Transfekcija stanica

Molekula siRNA je dvolančana molekula RNA koja u stanici služi za ciljano utišavanje gena. Ovo omogućuje specifično ispitivanje uloga zasebnih gena u staničnim procesima od interesa. Transfekcija stanice pomoću molekule siRNA zahtijeva uspješan ulazak molekule siRNA u stanicu prilikom čega se ona ne smije degradirati te zahtijeva uspješno utišavanje ciljnog gena. Kako postoje različite metode transfekcije molekulom siRNA, prvo sam ispitao uspješnost dviju metoda - transfekcije uz otopinu Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) i transfekcije uz kalcijev fosfat. Nakon usporedbe rezultata u daljnjim pokusima sam koristio transfekciju kalcijevim fosfatom.

Protokoli za obje metode su niže opisani, a odabir metode je obrazložen u poglavlju Rezultati.

3.8.1. Transfekcija stanica otopinom Lipofectamine 3000

Sve četiri stanične linije nasadio sam na pločicu s 12 jažica i tretirao po sljedećoj shemi:

siAQP3A	siAQP3B	siAQP3C	Scramble siRNA
siAQP3A	siAQP3B	siAQP3C	Scramble siRNA
siAQP3A	siAQP3B	siAQP3C	Kontrola

Otopina Lipofectamine 3000 je kemijska smjesa koja može formirati liposome unutar kojih se može nalaziti molekula siRNA. Stanična membrana i molekula siRNA su negativno nabijene, a otopina Lipofectamine 3000 je kationski liposom. Ovi liposomi mogu se spojiti sa staničnom membranom i na taj način olakšati ulazak molekule siRNA u stanicu. Sve četiri stanične linije nasađivao sam u brojnosti od 100 000 stanica u 500 μ L odgovarajućeg medija po jažici. Nakon toga su stavljene u inkubator preko noći. Nakon 24 sata, pripremio sam otopinu Lipofectamine 3000 u mediju Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, omjer 50:3).

1 μ M otopine siRNA za utišavanje proteina gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GADPH, engl. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Thermo Fisher Scientific), proteina AQP3 (Origine, Rockville, SAD) i scramble siRNA (Origine) razrijedio sam s medijem Opti-MEM tako da je dobivena koncentracija otopine siRNA bila 10, 25 i 30 nM. Otopinu medija Opti-MEM i otopinu Lipofectamine 3000 pomiješao sam s razrijeđenom otopinom siRNA u omjeru 1:1 i ostavio na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Medij sam uklonio sa stanica i na stanice dodao 500 μ L medija Opti-MEM i 100 μ L pomiješane otopine Lipofectamine 3000 i siRNA. Stanice su nakon toga inkubirane četiri sata, te sam nakon 4, 5 ili 24 sata na njih dodao 500 μ L njihovog medija s udjelom seruma FCS od 20% (tako da konačna koncentracija seruma FCS u jažici bude 10%). Uspješnost transfekcije provjerio sam u dva koraka. U prvom koraku putem molekule siGAPDH koja je obilježena fluorescentnom bojom Cy3 pri čemu sam pod fluorescentnim mikroskopom provjerio uspješnost ulaska molekule siGAPDH u stanice. Drugi korak je potvrda uspješnosti transfekcije stanica metodom Western blot, gdje sam gledao ispoljenost proteina GAPDH i AQP3. Ustanovio sam da je najbolje vrijeme inkubiranja stanica s otopinom siRNA četiri sata, a sve tri koncentracije otopine siRNA od (10, 25 i 30 nM) dale su podjednake rezultate utišavanja. Stanice su inkubirane u trajanju od 72 sata, nakon čega sam

iz njih izolirao proteine, na način koji je ranije objašnjen.

3.8.2. Transfekcija stanica metodom kalcijevim fosfatom

Osim metode korištenja otopine Lipofectamine 3000 za unos molekule siRNA u stanicu, koristio sam metodu kalcijevog fosfata (2,5 M CaCl₂) (Grammol). Sve četiri stanične linije nasadio sam u pločicu s 12 jažica, tako da su sve četiri stanične linije nasadene u brojnosti od 100 000 stanica u 500 µL odgovarajućeg medija po jažici. Nakon toga su ostavljene u inkubatoru preko noći. Drugi dan, a 30 minuta prije izvođenja utišavanja, promijenio sam medij u DMEM (bez antibiotika, 10% seruma FCS) ili odgovarajući medij za MCF10A. Pripremio sam otopinu siRNA s CaCl₂ kako bi dobio CaCl₂ mix na sljedeći način: 50 µL pufera HBSP 2x (280 mM NaCl, 1,5 mM NA₂HPO₄ (Grammol), 10 mM KCl, 50 mM HEPES, pH namješten na 7,04) pomiješao sam s 15 µL 1 µM otopine siRNA, 5 µL otopine 2,5 M CaCl₂ i 30 µL H₂O, kako bi dobio 30 nM otopinu siRNA. Ovaj proces napravio sam za sve tri otopine siAQP3 (A, B, C) i nespecifičnu kontrolnu otopinu siRNA (engl. *scramble* siRNA). Scramble siRNA korištena je kao negativna kontrola. Ukupni volumen siRNA CaCl₂ mixa od 100 µL nakapan je na stanice i ostavljen 24 sata. Nakon 24 sata, jažice su isprane s puferom PBS i na njih je stavljen njihov medij. Nakon 72 sata od početnog tretmana, izolirani su proteini za daljnju analizu pomoću metode Western blot.

3.9. Statistička obrada podataka

Statističku obradu podataka, kao i grafičke prikaze napravio sam uz pomoć programa GraphPad Prism 8.0 (Prism, GraphPad, SAD). Rezultati su izraženi prema kontroli te kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata (osim stanične linije MCF7 s utišavanjem gena za protein AQP3) sa standardnom devijacijom. Za statističku obradu rezultata koristio sam Studentov t-test (usporedba ekspresije proteina AQP3 nakon tretmana otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF bez utišavanja za svaku staničnu liniju, kao i sve usporedbe ekspresije proteina unutar stanične linije nakon utišavanja) te dvosmjernu analizu varijance (engl. *two-way ANOVA*) (ekspresija proteina PI3K i omjer proteina pAkt/Akt u svim staničnim linijama bez utišavanja). $P < 0,05$ označavao je statistički značajne vrijednosti.

4. Rezultati

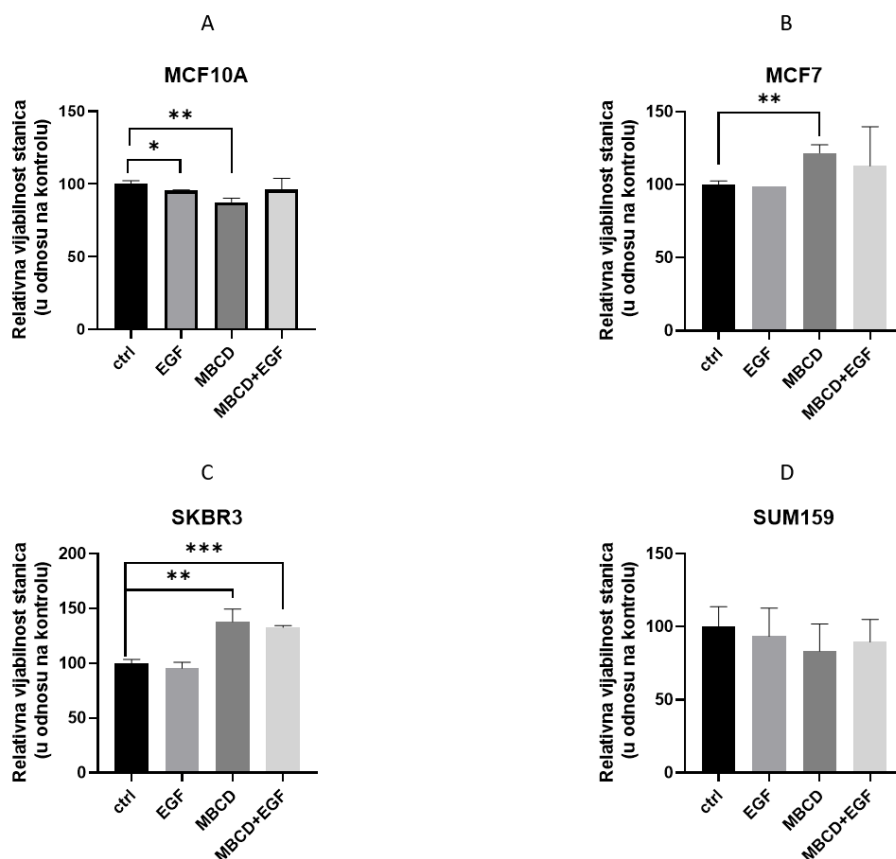
4.1. Utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije faktorom rasta EGF

4.1.1. MTT

Kako bi istražili utjecaj stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt te utječe li smještaj ovog receptora u lipidne splavi na isti put prijenosa signala, pratili smo vijabilnost stanica nakon razbijanja lipidnih splavi otopinom MBCD te je put stimuliran faktorom rasta EGF.

Kod stanične linije MCF10A (ne-tumorogena epitelna stanična linija) postoji statistički značajan pad vijabilnosti stanica nakon tretmana faktorom rasta EGF ($P=0,0329$) i nakon tretmana otopinom MBCD ($P=0,0041$), dok tretman otopinom MBCD s faktorom rasta EGF nema statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 5A). Kod stanične linije MCF7 (pozitivna na estrogenski i progesteronski receptor) postoji samo statistički značajan porast u vijabilnosti stanica nakon tretmana otopinom MBCD ($P=0,0037$), dok tretman faktorom EGF i tretman otopinom MBCD s faktorom rasta EGF nema statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 5B).

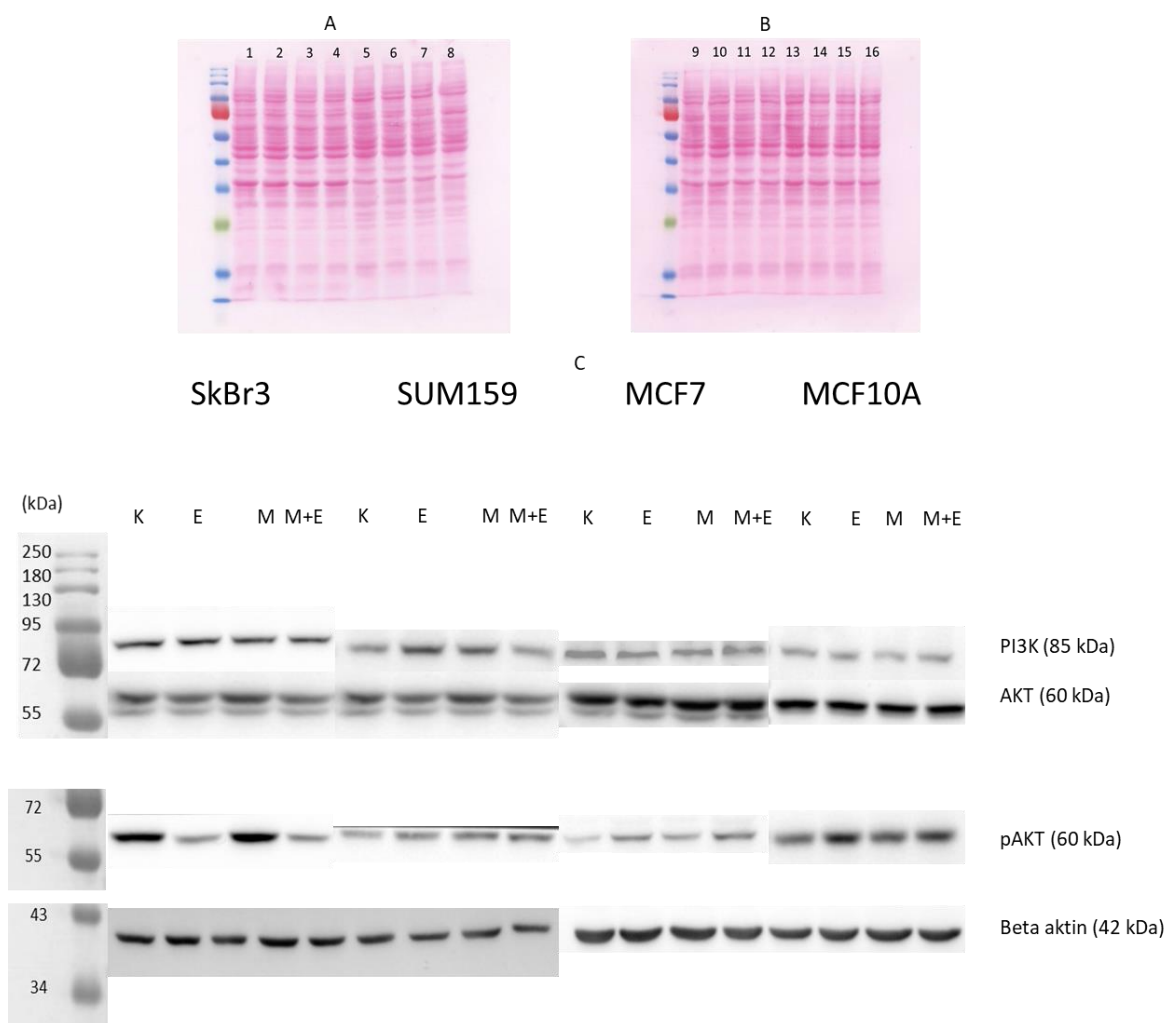
Kod stanične linije SKBR3 (pozitivna na receptor HER2) postoji statistički značajan porast u vijabilnosti stanica nakon tretmana otopinom MBCD ($P=0,0055$) i tretmana otopinom MBCD s faktorom rasta EGF u odnosu na kontrolu ($P=0,0001$) (Slika 5C). Kod stanične linije SUM159 (trostruko negativna) nema statistički značajnih razlika u vijabilnosti stanica kada uspoređujemo kontrolu i tretmane (Slika 5D).



Slika 5. Prikaz vijabilnosti stanica pomoću metode MTT u staničnim linijama tumora dojke nakon tretmana otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (faktorom rasta EGF, otopinom MBCD i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF) prema kontroli (ctrl) te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata \pm standardna devijacija. Statistički značajne razlike (P) u odnosu na kontrolu označene su: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.1.1. Utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt faktorom rasta EGF na AQP3

Kako bi istražili utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt, na četiri stanične linije tumora dojke ispitana je ekspresija proteina PI3K, Akt i pAkt (Slika 6). Omjer ekspresije proteina pAkt/Akt korišten je kao procjena aktivacije ovog puta prijenosa signala, a rezultati su kvantificirani u programu GraphPad te su dobivene vrijednosti prikazane na Slici 6.



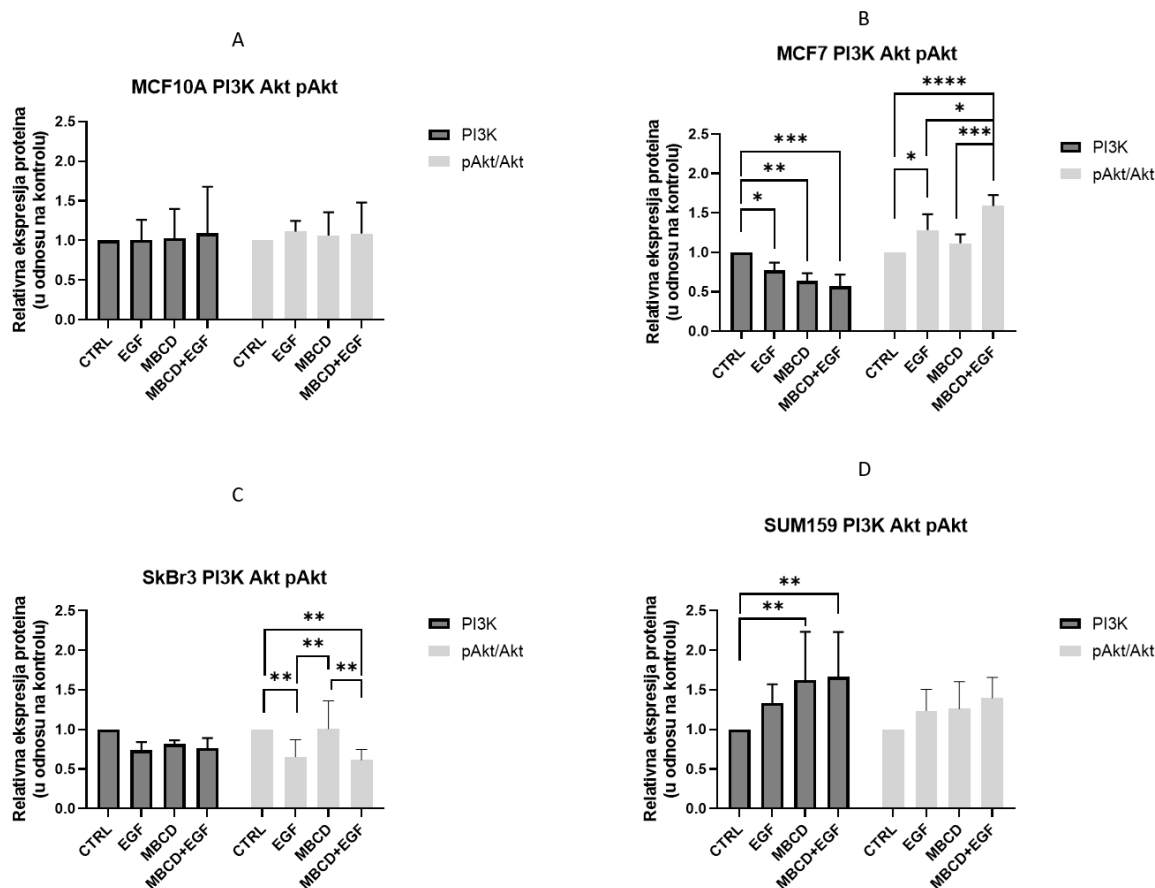
Slika 6. Ekspresija proteina PI3K, pAKT i Akt u staničnim linijama SKBR3 SUM159, MCF7 i MCF10A. Slike A i B prikazuje ukupne proteine na membrani obojene Ponceau S (A prikazuje stanične linije SkBr3 i SUM159, a B stanične linije MCF7 i MCF10A). Slika C prikazuje antitijelima označene proteine od interesa (PI3K, pAKT i Akt) na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: K - kontrola, E - EGF, M - MBCD.

Kod stanične linije MCF7, ekspresija proteina PI3K je statistički značajno pala kada su stanice tretirane faktorom rasta EGF ($P = 0,0318$), otopinom MBCD ($P=0,007$) i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF ($P= 0,0001$). Omjer ekspresije proteina pAkt/Akt također se značajno statistički razlikovao. U odnosu na kontrolu, tretman faktorom rasta EGF povećao je omjer proteina pAkt/Akt ($P= 0,0153$) i tretman otopinom MBCD s faktorom rasta EGF povećao je omjer pAkt/Akt ($P <0,0001$). Tretman otopinom MBCD s faktorom rasta EGF u odnosu na tretman samo s faktorom rasta EGF, statistički je značajno povećao omjer pAkt/Akt ($P= 0,0160$). Tretman otopinom MBCD s faktorom rasta EGF u odnosu na tretman samo s otopinom MBCD povećao je omjer proteina pAkt/Akt ($P =0.007$) (Slika 7B).

Kod stanične linije SUM159, ekspresija proteina PI3K statistički značajno je narasla kada su stanice tretirane otopinom MBCD ($P=0,0018$), i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF ($P=0,0025$) u odnosu na kontrolu. Omjer ekspresije proteina pAkt/Akt nije se statistički značajno razlikovao između tretmana i kontrole (Slika 7D).

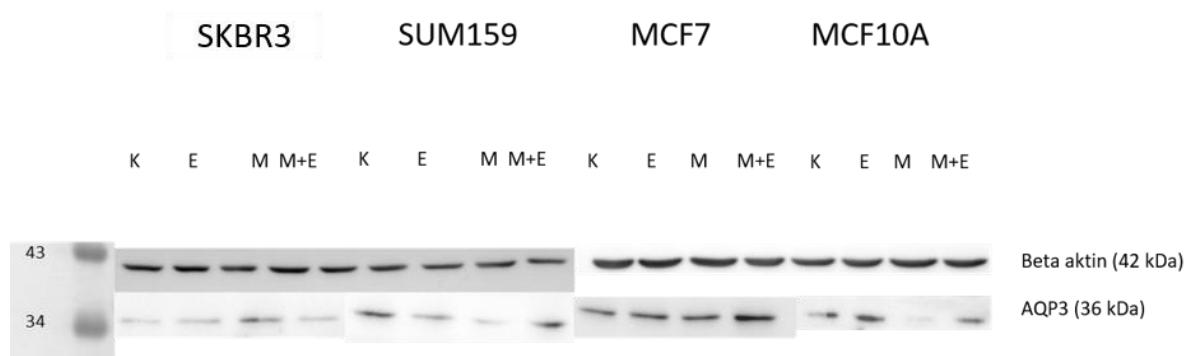
Kod stanične linije MCF10A, nije bilo statistički značajne razlike niti u ekspresiji proteina PI3K niti u omjeru ekspresije proteina pAkt/Akt (Slika 7A).

Kod stanične linije SKBR3, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji proteina PI3K. Kada govorimo o omjeru ekspresije proteina pAkt/Akt, došlo je do statistički značajnog pada u usporedbi kontrole s tretmanom faktorom rasta EGF ($P= 0,0067$) i s tretmanom otopinom MBCD s faktorom rasta EGF ($P= 0,0062$). Tretman otopinom MBCD u usporedbi s tretmanom faktorom rasta EGF doveo je do statistički značajnog porasta omjera ekspresije proteina pAkt/Akt ($P=0,0053$). Tretman otopinom MBCD u usporedbi s tretmanom otopine MBCD s faktorom rasta EGF doveo je do statistički značajnog porasta omjera ekspresije proteina pAkt/Akt ($P= 0,0049$) (Slika 7C).



Slika 7. Ekspresija proteina PI3K i omjera ekspresije proteina pAkt/Akt nakon tretmana otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupni nanos proteina i u odnosu na β -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (faktorom rasta EGF, otopinom MBCD i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata \pm standardna devijacija. Statistički značajne razlike (P) u odnosu na kontrolu označene su: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

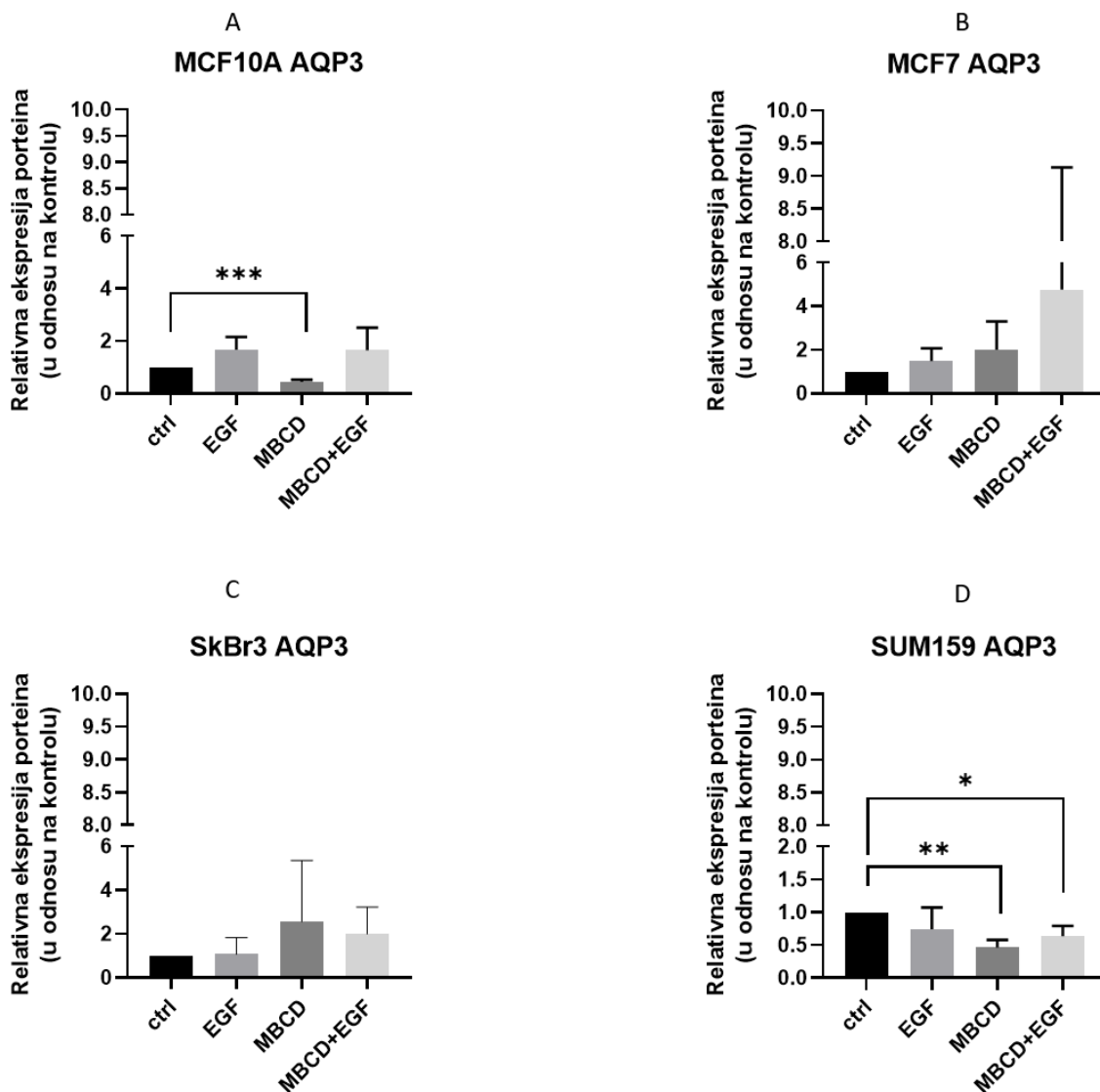
Kako bi istražili utječe li stimulacija puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt na ekspresiju proteina AQP3, put prijenosa signala je stimuliran faktorom rasta EGF. Budući da je cilj istražiti utječe li i smještaj receptora EGFR u lipidne splavi na isti put prijenosa signala i ekspresiju proteina AQP3, lipidne splavi su razbijene pomoću otopine MBCD (Slika 8).



Slika 8. Ekspresija proteina AQP3 u staničnim linijama SKBR3, SUM159, MCF7 i MCF10A. Slika prikazuje antitijelima označene proteine od interesa (AQP3) na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: K - kontrola, E - EGF, M - MBCD.

Kod stanične linije MCF7 i SKBR3 (Slika 9B i 9C), možemo vidjeti da nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji proteina AQP3 ovisno o tretmanima. Kod stanične linije MCF10A (Slika 9A) došlo je do statistički značajnog pada ekspresije proteina AQP3 kod tretmana otopinom MBCD u odnosu na kontrolu ($P=0,0003$).

Kod stanične linije SUM159 došlo je do statistički značajnog pada ekspresije proteina AQP3 kod tretmana otopinom MBCD ($P=0,0013$) i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF ($P=0,0150$) (Slika 9D).



Slika 9. Ekspresija proteina AQP3 nakon tretmana otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (faktorom rasta EGF, otopinom MBCD i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF) prema kontrolu te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih tripplikata \pm standardna devijacija.. Statistički značajne razlike (P) u odnosu na kontrolu označene su: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.2. Utjecaj utišavanja AQP3 pomoću male interferirajuće RNA (siRNA)

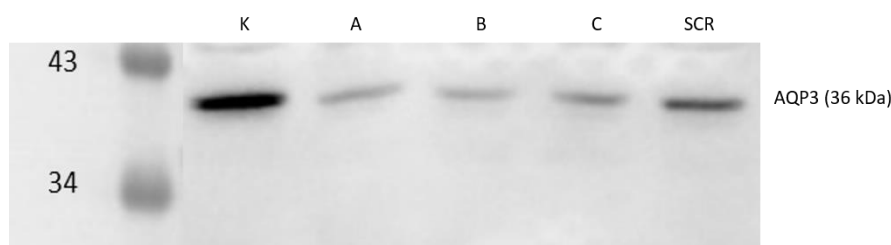
Kako bi ustanovili utjecaj utišavanja gena za protein AQP3 na aktivaciju puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt, ekspresija gena koji kodira za ovaj protein utišana je pomoću molekule siRNA. Nakon utišavanja ekspresije ovog gena, tretman faktorom rasta EGF i otopinom

MBCD je izvršen na isti način kao i u stanicama na kojima nije rađeno utišavanje.

4.2.1. Izbor metode za utišavanje ekspresije gena

Proces izbora metode za utišavanje gena uključivao je tretiranje stanica pomoću otopine Lipofectamine 3000 ili pomoću metode kalcij fosfat. Kako bi uspješnost metode bila ispitana, utišavan je gen koji kodira za protein GAPDH. Uspješnost ulaska molekule siRNA za gen koji kodira za protein GAPDH u stanicu potvrđena je vizualno pomoću fluorescentnog mikroskopa budući da je molekula siGAPDH obilježena fluorescentnom bojom Cy3. Proteini nisu analizirani metodom Western blot, jer je nakon utišavanja gena za protein GAPDH ostao vrlo mali broj vijabilnih stanica te nije bilo dovoljno proteina za analizu.

Nakon što su se obje metode pokazale vijabilnim (na temelju ulaska siRNA u stanicu), nastupilo je utišavanje gena za protein AQP3 pomoću molekule siRNA. Metodom Western blot dobiveno je vrlo uspješno utišavanje gena za protein AQP3 u staničnoj liniji SUM159 (Slika 10) korištenjem tri različite molekule siRNA (siRNA A, siRNA B, siRNA C) - sve tri molekule siRNA pokazale su se vrlo učinkovitim. Molekula siRNA A utišala je ekspresiju gena za protein AQP3 na 23,2%, siRNA B na 18% i siRNA C na 27,4% kontrolne vrijednosti. Obzirom da utišavanje nikada ne može biti 100%, stupanj utišavanja koji smo dobili smatramo dovoljno velikim da rezultati koje dobijemo budu prihvatljivi. Zbog jednostavnosti i visoke uspješnosti ove metode, daljnja utišavanja su rađena na ovaj način. U pokusima dalje nismo koristili tzv. kontrolnu siRNA budući da su nabavljene dvije od različitih proizvođača (Origine i Sigma), a obje su utišavale djelomično više proteina (AQP3, NRF2, beta aktin) čime njihova uloga kontrolne siRNA nije zadovoljena.



Slika 10. Ekspresija proteina AQP3 nakon utišavanja gena za protein AQP3 pomoću molekule siRNA u staničnoj liniji tumora dojke SUM159. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega (prikazan na lijevoj strani slike - biljezi molekulskih masa 43 kDa i 34 kDa). Kratice: K - kontrola, A - siRNA A, B - siRNA B, C - siRNA C, SCR - negativna kontrola.

4.2.2. Utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije faktorom rasta EGF

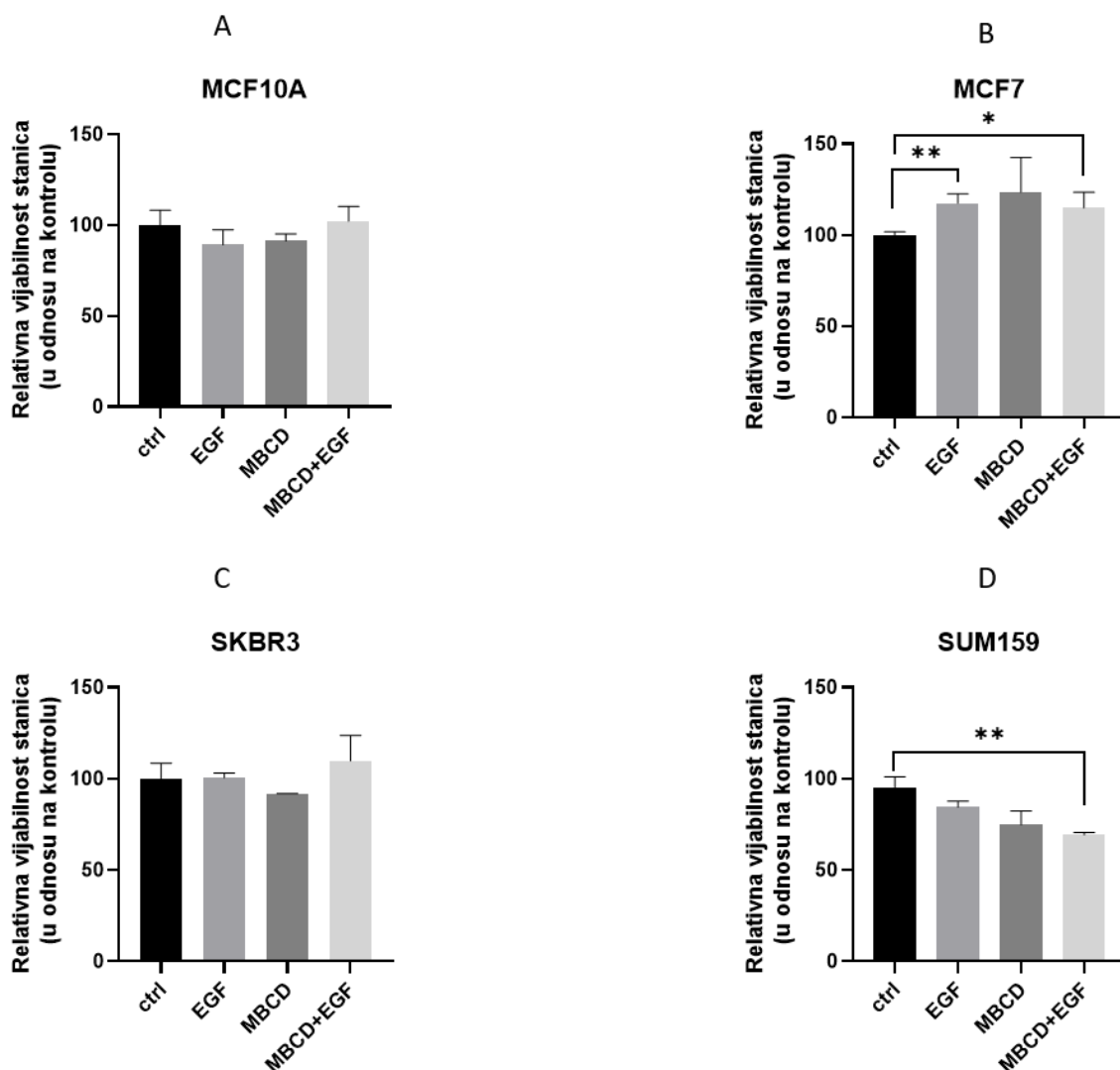
4.2.2.1. MTT

Kako bi istražili utjecaj stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt te utječe li smještaj ovog receptora u lipidne splavi na isti put prijenosa signala, pratili smo vijabilnost stanica nakon utišavanja gena za protein AQP3 pomoću molekule siRNA i razbijanja lipidnih splavi otopinom MBCD te stimuliranja puta prijenosa signala faktorom rasta EGF (Slika 11).

Kod stanične linije MCF7 s utišanim genom za protein AQP3 postoji statistički značajan rast vijabilnosti stanica nakon tretmana faktorom rasta EGF ($P=0,0052$) i nakon tretmana otopinom MBCD s faktorom rasta EGF ($P=0,0397$), dok tretman otopinom MBCD nema statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 11B).

Kod stanične linije SUM159 s utišanim genom za protein AQP3 postoji statistički značajan pad u vijabilnosti stanica samo nakon tretmana otopinom MBCD s faktorom rasta EGF ($P=0,0041$), dok tretmani faktorom rasta EGF i otopinom MBCD nemaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 11D).

Kod staničnih linija MCF10A s utišanim AQP3 i SKBR3 s utišanim AQP3 nema statistički značajnih razlika u vijabilnosti stanica u usporedbi kontrole i tretmana (Slika 11A i 11C)

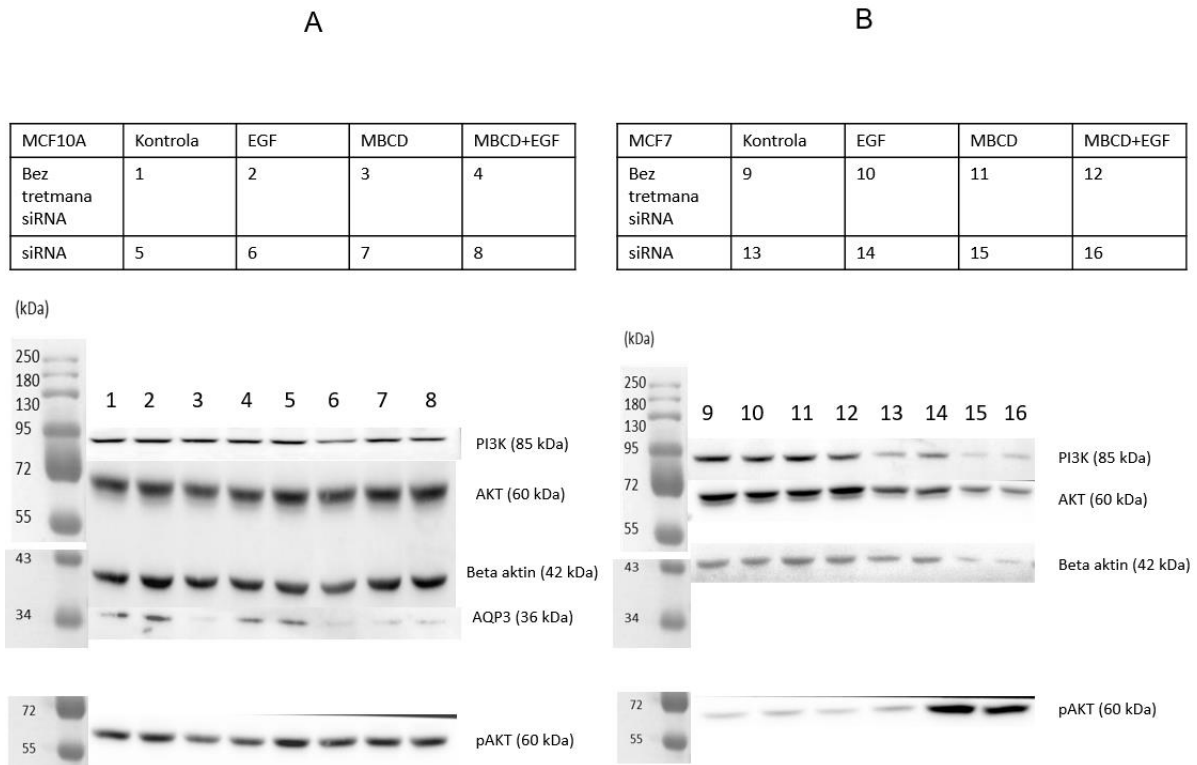


Slika 11. Prikaz vijabilnosti stanica pomoću metode MTT u staničnim linijama tumora dojke nakon utišavanja gena za protein AQP3 i tretmana otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (faktorom rasta EGF, otopinom MBCD i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata \pm standardna devijacija. Statistički značajne razlike (P) u odnosu na kontrolu označene su: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

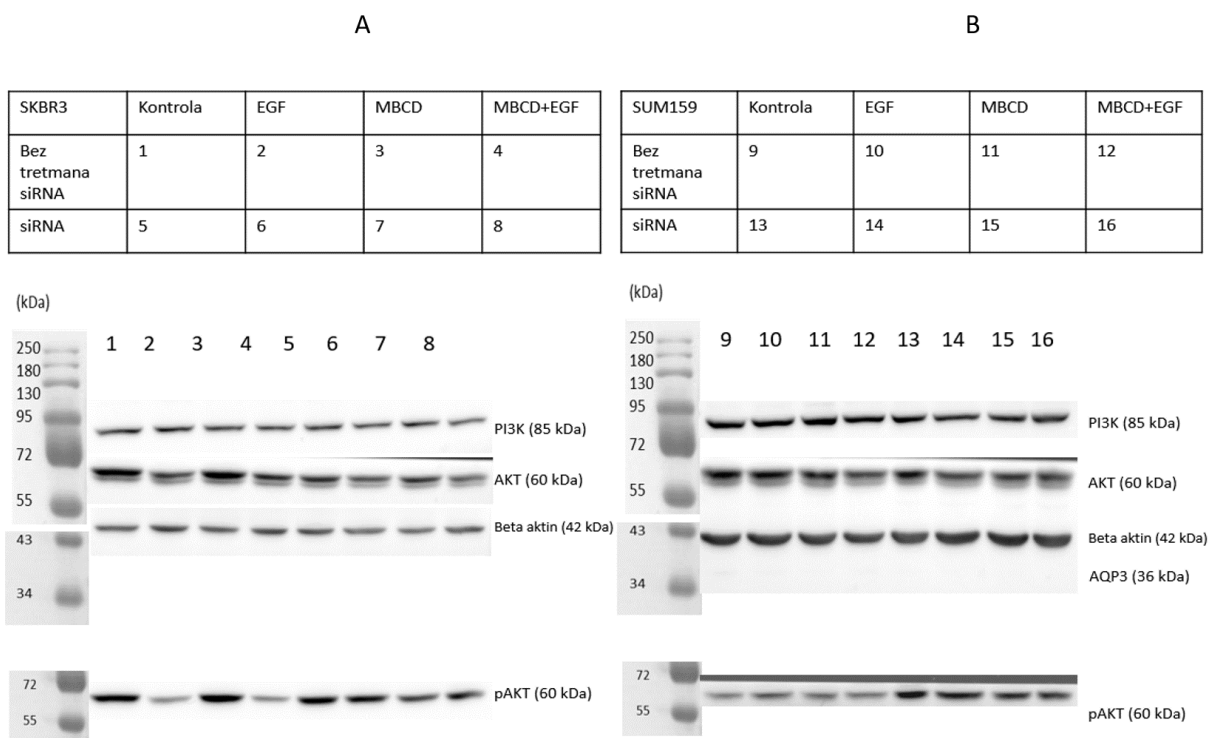
4.2.2.2. Utjecaj utišavanja AQP3 na put prijenosa signala PI3K/Akt

Korištenjem molekule siRNA utišana je ekspresija gena za protein AQP3 u četiri humane stanične linije tumora dojke pomoću metode kalcij fosfat, koja je opisana u poglavlju Materijali i metode. Kako bi istražili utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt nakon utišavanja gena za protein AQP3, na četiri humane stanične linije tumora dojke ispitana je ekspresija proteina PI3K, Akt i pAkt (Slika 12A - MCF10A, Slika

12B - MCF7, Slika 13A - SKBR3, Slika 13B - SUM159). Omjer ekspresije proteina pAkt/Akt korišten je kao procjena aktivacije ovog puta prijenosa signala, a rezultati su kvantificirani u programu GraphPad te su dobivene vrijednosti prikazane na Slici 13, 14 i 15. Budući da je cilj istražiti utječe li utišavanje gena za protein AQP3 i smještaj receptora EGFR u lipidne splavi na put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt i ekspresiju proteina AQP3, lipidne splavi su razbijene pomoću otopine MBCD (Slika 8).



Slika 12. Ekspresija proteina pAKT, Akt, AQP3 i PI3K nakon utišavanja gena za protein AQP3 pomoću molekule siRNA. Slika prikazuje antitijelima označene proteine od interesa (PI3K, pAKT, AQP3 i Akt) na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: A - stanična linija MCF10A, B - stanična linija MCF7

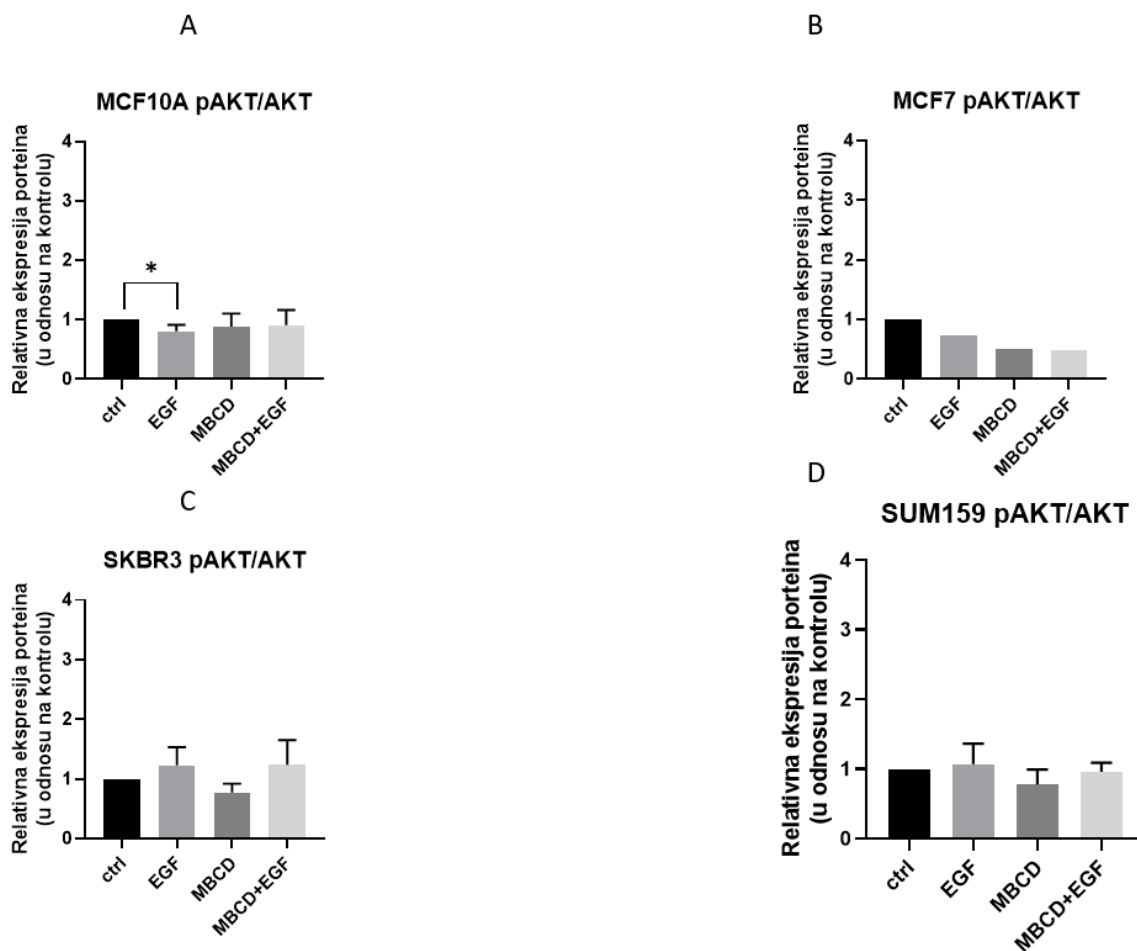


Slika 13. Ekspresija proteina pAKT, Akt, AQP3 i PI3K nakon utišavanja gena za protein AQP3 pomoću molekule siRNA. Slika prikazuje antitijelima označene proteine od interesa (PI3K, pAKT, AQP3 i Akt) na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: A - stanična linija SKBR3, B - stanična linija SUM159

Kod stanične linije MCF7 utišavanje nije bilo učinkovito, i nije bilo značajne razlike u količini proteina kroz biološke triplikate te zato nije napravljena usporedba između utišavanja gena za protein AQP3 i tretmana otopinom MBCD i faktorom rasta EGF s i bez utišavanja (Slika 14B i 15B).

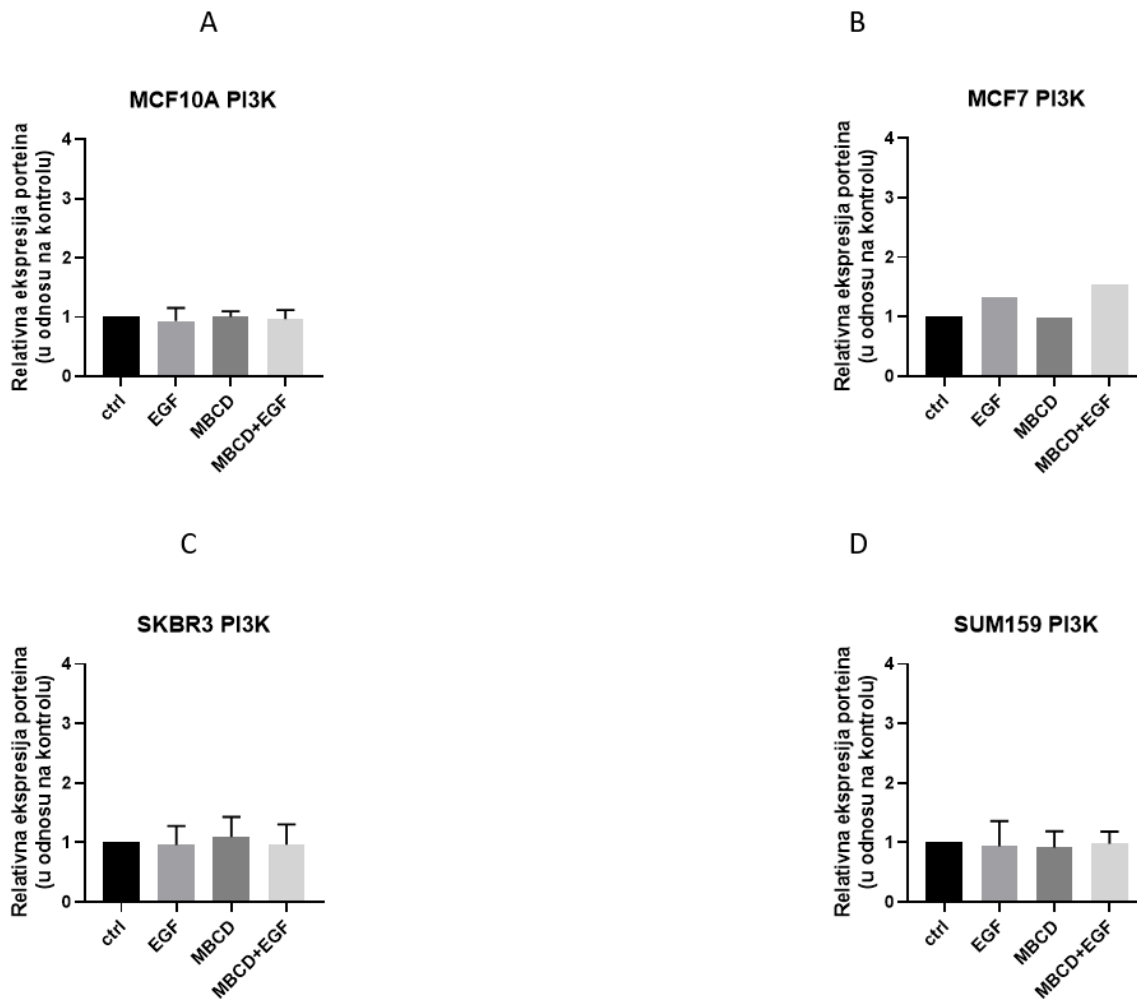
Kod stanične linije SKBR3 i SUM159 nema statistički značajne razlike u omjeru proteina pAkt/Akt (Slika 14C i 14D).

Kod stanične linije MCF10A postoji statistički značajan pad u omjeru proteina pAkt/Akt kod tretmana faktorom rasta EGF u odnosu na kontrolu ($P= 0,0381$) (Slika 14A).



Slika 14. Prikaz omjera ekspresije proteina pAkt/Akt nakon utišavanja gena za protein AQP3 i tretmana otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupni nanos proteina i u odnosu na β -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (faktorom rasta EGF, otopinom MBCD i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata \pm standardna devijacija (osim MCF7 koji je monoplikat). Statistički značajne razlike (P) u odnosu na kontrolu označene su: * $P < 0,05$.

Kod staničnih linija tumora dojke MCF10A (Slika 15A), SKBR3 (Slika 15C) i SUM159 (Slika 15D), nije postojala statistički značajna razlika u ekspresiji proteina PI3K nakon utišavanja gena za protein AQP3 pomoću metode kalcij fosfata i tretmana stanica otopinom MBCD i faktorom rasta EGF kako je ranije opisano.



Slika 15. Prikaz ekspresije proteina PI3K nakon utišavanja gena za protein AQP3 i tretmana otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF u staničnim linijama tumora dojke. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupni nanos proteina i u odnosu na β -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (faktorom rasta EGF, otopinom MBCD i otopinom MBCD s faktorom rasta EGF) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih tripplikata \pm standardna devijacija (osim MCF7 koji je monoplifikat).

5. Rasprava

Tumor dojke je drugi po redu uzrok smrtnosti od tumora kod žena (Azamjah i sur., 2019). Brojni čimbenici rizika doprinose nastanku tumora dojke, kao što su: godine života, utjecaj estrogena, spol (puno je rjeđi kod muškaraca), nasljedni faktori, mutacije gena i nezdrav način života (Sun i sur., 2017). Kako bi se pojednostavilo istraživanje na staničnoj razini, karakterizacija tumora dojke na tri skupine, pozitivnih na ER i PR, pozitivnih na HER2 i trostruko negativnih, dovoljno je jednostavna i grupira ih prema terapiji. Prateći ovu podjelu, u ovom istraživanju korištene su ljudske stanične linije tumora dojke: s ispoljenim receptorima za estrogen i progesteron, MCF7, linija s pretjerano ispoljenim HER2, SKBR3 te trostruko negativna stanična linija, SUM159. Kao kontrolna stanična linija korištena je ne-tumorska ljudska stanična linija dojke, MCF10A. Kod brojnih tumora pronalazimo i promjene u putevima prijenosa signala, a to je slučaj i kod tumora dojke (Wee i Wang, 2017). Put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt sudjeluje u regulaciji brojnih staničnih funkcija, uključujući proliferaciju, preživljavanje i metabolizam (Lien i sur., 2016). Ovaj put prijenosa signala može biti stimuliran faktorom rasta EGF, te posljedično imati učinak na regulaciju staničnih funkcija. Poznato je da je receptor EGFR lokaliziran u lipidnim splavima (Guéguinou i sur., 2015), te je cilj ovog istraživanja ispitati utjecaj razbijanja lipidnih splavi i stimulacije faktorom rasta EGF na put prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt. Budući da su akvaporini također često pretjerano ispoljeni kod tumora dojke (Milković i Čipak Gašparović, 2021), a postoji povezanost između ekspresije AQP3 i primijenjenog faktora rasta EGF kod brojnih staničnih linija (keratinociti, adenokarcinom želuca, kolorektalni karcinom), drugi cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost ekspresije proteina AQP3 i aktivacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt u ovim staničnim linijama tumora dojke. Utjecaj proteina AQP3 na aktivaciju puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt nakon tretmana razbijanja lipidnih splavi s ili bez faktora rasta EGF, ispitivan je utišavanjem ekspresije gena za AQP3 siRNA.

Prvo je praćen utjecaj razbijanja lipidnih splavi i tretmana faktorom rasta EGF na vijabilnost stanica. Kod stanične linije MCF10A razbijanje lipidnih splavi ili tretmana stanica faktorom rasta EGF smanjilo je vijabilnost stanica, dok je kod stanične linije MCF7 nakon razbijanja lipidnih splavi došlo do porasta vijabilnosti stanica. Kod stanične linije SKBR3 došlo je do pada vijabilnosti nakon razbijanja lipidnih splavi, neovisno o tretmanu faktorom rasta EGF. Budući da je kod ove stanične linije receptor HER2 pretjerano ispoljen, rezultati upućuju da razbijanje lipidnih splavi u kojima se mogu nalaziti receptori HER2 (tj. EGFR2) ima negativan

utjecaj na preživljavanje stanica. Kod trostruko negativne stanične linije (SUM159) koja se ujedno smatra i najagresivnijom od korištenih staničnih linija, tretman otopinom MBCD s ili bez faktora EGF nema utjecaj na vijabilnost stanica.

Analiza proteina ukazuje da je stanična linija MCF7 najviše podložna promjenama u putu prijenosa signala PI3K/Akt. Naime, i tretman razbijanja lipidnih splavi i faktor rasta EGF sami ili u kombinaciji utjecali su na ekspresiju proteina PI3K. Ekspresija proteina PI3K značajno pada u svim uvjetima, što ukazuje da je ovaj put prijenosa signala manje aktivan nakon tretmana. Kako bi potvrdili dolazi li doista do smanjenja aktivacije ovog puta prijenosa signala, ispitana je ekspresija proteina Akt te njegovog fosforiliranog (aktivnog) oblika pAkt te je omjer proteina pAkt/Akt korišten kao indikator aktivacije. Omjer ekspresije proteina pAkt/Akt također se značajno statistički razlikuje, no za razliku od ekspresije proteina PI3K koja se smanjuje, tretman faktorom rasta EGF povećao je omjer proteina pAkt/Akt, sam ili u kombinaciji s tretmanom razbijanja lipidnih splavi u odnosu na kontrolu. Suprotni trendovi u ekspresiji proteina PI3K i omjera proteina pAkt/Akt ukazuje na aktivaciju proteina Akt, ali nizvodno od proteina PI3K. Tretman razbijanja lipidnih splavi s faktorom rasta EGF u odnosu na tretman samo s faktorom rasta EGF, povećao je omjer proteina pAkt/Akt. Ovo ukazuje da razbijanje lipidnih splavi dovodi do pojačane aktivacije ovog puta prijenosa signala, u odnosu na sami tretman s faktorom rasta EGF.

Kod trostruko negativne stanične linije SUM159, ekspresija proteina PI3K raste kada su stanice tretirane razbijanjem lipidnih splavi i tretmanom razbijanja lipidnih splavi s faktorom rasta EGF u odnosu na kontrolu, dok je omjer ekspresije proteina pAkt/Akt bio nepromijenjen. Ovo ukazuje na aktivaciju proteina PI3K zbog tretmana razbijanja lipidnih splavi s ili bez faktora rasta EGF, ali ova aktivacija se ne prenosi dalje putem pojačane fosforilacije proteina Akt. Kod stanične linije SKBR3 ekspresija proteina PI3K nije se značajno promijenila u tretmanima u odnosu na kontrolu. Međutim, omjer ekspresije proteina pAkt/Akt je promijenjen na način da u usporedbi s kontrolom pada kod tretmana faktorom rasta EGF, samog ili u kombinaciji s tretmanom razbijanja lipidnih splavi. Ovo ukazuje da tretiranje stanica faktorom rasta EGF, neovisno o razbijanju lipidnih splavi, dovodi do smanjene aktivacije ovog puta prijenosa signala. Zanimljivo, razbijanje lipidnih splavi ne dovodi do promjene u omjeru proteina pAkt/Akt.

Kod stanične linije MCF10A, nema razlike niti u ekspresiji proteina PI3K niti u omjeru ekspresije proteina pAkt/Akt, što ukazuje da ovaj tretman ne djeluje na put prijenosa signala

EGFR/PI3K/Akt u ovoj staničnoj liniji.

Kako bi vidjeli utječe li aktivacija puta prijenosa signala PI3K/Akt na ekspresiju proteina AQP3, ispitan je i utjecaj tretmana razbijanja lipidnih splavi i/ili tretmana faktorom rasta EGF ovih staničnih linija na ekspresiju proteina AQP3. Kod staničnih linija MCF7 i SKBR3 nije bilo značajne razlike u ekspresiji proteina AQP3 u ovisnosti o razbijanju lipidnih splavi te o tretmanu faktorom rasta EGF. Međutim, kod stanične linije SUM159 dolazi do statistički značajnog pada ekspresije proteina AQP3 nakon samog tretmana razbijanja lipidnih splavi te tretmana razbijanja lipidnih splavi u kombinaciji s faktorom rasta EGF. Ovaj trend se ne primjećuje kod samog tretmana ovih stanica faktorom rasta EGF, te ukazuje da je razbijanje lipidnih splavi, neovisno o kasnijem tretiranju faktorom rasta EGF, povezano sa smanjenom ekspresijom proteina AQP3 u trostruko negativnim stanicama tumora dojke. U ne-tumorskoj staničnoj liniji MCF10A dolazi do pada ekspresije proteina AQP3 nakon razbijanja lipidnih splavi u odnosu na kontrolu. Ovo ukazuje da razbijanje lipidnih splavi bez stimulacije faktorom rasta EGF kod ove stanične linije, uzrokuje smanjenu ekspresiju proteina AQP3. Kada se povežu rezultati ekspresije proteina PI3K i AQP3 uočavaju se suprotni trendovi; padom ekspresije proteina PI3K raste ekspresija proteina AQP3 kod MCF7 i SUM159, a kod SKBR3 i MCF10A gdje nema promjene u ekspresiji proteina PI3K nema ni promjene u ekspresiji proteina AQP3. Ovi podaci suprotni su radu Park i sur., (2022), koji su povezali tretman ekstraktom gljive, koji stimulira ekspresiju proteina AQP3 preko indukcije puta prijenosa signala PI3K/Akt/mTOR. Ova razlika bi mogla doći od načina aktivacije puta prijenosa signala, budući da u našem modelu protein PI3K i omjer proteina pAkt/Akt ne pokazuju međusobnu povezanost.

Drugi dio istraživanja bio je povezan s utišavanjem gena za protein AQP3 i posljedičnom reakcijom stanica na tretman razbijanja lipidnih splavi, tretman faktorom rasta EGF i tretman razbijanja lipidnih splavi s faktorom rasta EGF. Uhodavanje metode utišavanja i izbor same metode provedeno je na staničnoj liniji SUM159. Izbor metode provjerio se i potvrdio i na ostale tri stanične linije, s time da kod stanične linije MCF7 u pojedinim pokusima nije došlo do utišavanja te su bili skupljeni samo monoplakati. Nakon uhodavanja metode utišavanja, istražila se vijabilnost stanica s utišanim genom za protein AQP3 u ovisnosti o narušavanju lipidnih splavi i tretmanu faktorom rasta EGF. Kod stanične linije MCF7 postoji statistički značajan rast vijabilnosti stanica nakon utišavanja gena za protein AQP3 i stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt pomoću faktora rasta EGF i nakon razbijanja lipidnih splavi nakon čega slijedi stimulacija puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt pomoću faktora rasta

EGF, dok samo razbijanje lipidnih splavi bez stimulacije ovog puta prijenosa signala faktorom rasta EGF nema statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Kod ove stanične linije vidimo da je stimulacija ovog puta prijenosa signala faktorom rasta EGF nakon utišavanja gena za protein AQP3, neovisno o narušavanju lipidnih splavi dovela do povećane vijabilnosti. Kod stanične linije SUM159 postoji statistički značajan pad u vijabilnosti stanica nakon utišavanja gena za protein AQP3 i nakon tretmana narušavanja lipidnih splavi i stimulacije ovog puta prijenosa signala faktorom rasta EGF, dok tretman same stimulacije faktorom rasta EGF ili samo narušavanje lipidnih splavi nakon utišavanja gena za protein AQP3 nema statistički značajan utjecaj na vijabilnost stanica. Kod stanične linije MCF10A i SKBR3 nema statistički značajnih razlika u vijabilnosti stanica kada uspoređujemo kontrolu i tretmane nakon utišavanja gena za protein AQP3.

Nakon analize vijabilnosti pristupilo se analizi puta prijenosa signala PI3K/Akt i utjecaja utišavanja gena za protein AQP3 na njega. Kod stanične linije MCF7 u tretmanima utišavanja gena za protein AQP3 nismo dobili reprezentativne biološke triplicate, nego samo monoplakat, te na njemu nismo mogli vršiti adekvatnu statističku obradu podataka. Nakon utišavanja gena za protein AQP3 i razbijanja lipidnih splavi, a zatim stimulacije puta prijenosa signala EGFR/PI3K/Akt kod staničnih linija SUM159 i SKBR3 nema statistički značajne razlike u omjeru proteina pAkt/Akt, koji je korišten kao indikator aktivacije ovog puta prijenosa signala. Ipak, kod stanične linije MCF10A nakon utišavanja gena za protein AQP3 postoji statistički značajan pad u omjeru proteina pAkt/Akt kod tretmana faktorom rasta EGF u odnosu na kontrolu. Ovo znači da tretman faktorom rasta EGF smanjuje aktivaciju ovog puta prijenosa signala kod stanične linije MCF10A. Također možemo primijetiti da se ovo događa neovisno o količini proteina PI3K koji se nalazi uzvodno od proteina Akt, jer nema statistički značajne razlike u ekspresiji ovog proteina kod stanične linije MCF10A. Ovaj trend vidimo i kod staničnih linija SUM159 i SKBR3 s utišanim genom za protein AQP3, gdje također nema razlike u ekspresiji proteina PI3K neovisno o tretmanu razbijanja lipidnih splavi, tretmanu faktorom rasta EGF i tretmanu razbijanja lipidnih splavi s faktorom rasta EGF.

Rezultati rada upućuju da postoji međusobna ovisnost ekspresije proteina AQP3 i pAkt čime se otvara novo područje regulacije ove membranske pore koja sudjeluje u regulaciji protoka vode, H₂O₂ i glicerola. Akvaporini su otkriveni relativno nedavno i ne postoji veliki broj istraživanja s kojima bi mogli usporediti ove rezultate. Kao potvrda naših rezultata i navedenog zapažanja je i rezultat da ekspresija proteina AQP3 korelira s povećanjem omjera proteina pAkt/Akt što je uskladu s istraživanjem na hipoksičnim staničnim linijama hepatocelularnog

karcinoma, gdje prekomjerna ekspresija proteina AQP3 pozitivno korelira s fosforilacijom proteina Akt i Erk (Malale i sur., 2020), no ovaj rad je u međuvremenu povučen.

6. Zaključci

U svim staničnim linijama došlo je do uspješnog utišavanja AQP3.

1. Stanična linija SKBR3 smanjuje aktivaciju proteina Akt nakon tretmana faktorom rasta EGF i kombinacijom tretmana MBCD + EGF. Ove promjene ne događaju se preko uzvodnog proteina PI3K te nestaju nakon utišavanja gena za protein AQP3 i tretmana otopinom MBCD i faktorom rasta EGF.

2. Kod stanične linije SUM159 dolazi do povećane ekspresije proteina PI3K nakon tretmana otopinom MBCD i kombinacijom tretmana MBCD + EGF, što ne prati aktivacija proteina Akt.

3. Kod ne-tumorske stanične linije MCF10A, nema razlike u ekspresiji proteina PI3K niti u aktivaciji proteina Akt nakon tretmana otopinom MBCD i faktorom rasta EGF.

4. Kod stanične linije MCF7 dolazi do aktivacije proteina Akt faktorom rasta EGF s ili bez otopine MBCD u odnosu na kontrolu. Istovremeno dolazi do pada ekspresije proteina PI3K.

5. Tretmani otopinom MBCD i/ili faktorom rasta EGF utječu na ekspresiju proteina AQP3 specifično ovisno o liniji, kod MCF10A i SUM159 tretman otopinom MBCD dovodi do značajno smanjene ekspresije proteina AQP3 u odnosu na kontrolu, a kod SUM159 ekspresija proteina AQP3 ostaje smanjena i kod tretmana otopinom MBCD s faktorom rasta EGF.

6. Nakon utišavanja gena za protein AQP3 u sve četiri stanične linije, gube se gotovo sve statistički značajne razlike u aktivaciji proteina Akt i ekspresiji proteina PI3K, osim što dolazi do pada omjera proteina pAkt/Akt kod MCF10A nakon tretmana faktorom rasta EGF u odnosu na kontrolu.

7. Tretman otopinom MBCD i faktorom rasta EGF utječe na vijabilnost stanica, gdje otopina MBCD povećava vijabilnost stanične linije MCF7, dok tretman otopinom MBCD i tretman faktorom rasta EGF zasebno smanjuju vijabilnost kod stanične linije MCF10A. Kod stanične linije SKBR3 tretman otopinom MBCD s ili bez faktora rasta EGF povećava vijabilnost stanica, dok kod stanične linije SUM159 tretman ne utječe na vijabilnost. Nakon utišavanja gena za protein AQP3 dolazi do smanjene vijabilnosti kod stanične linije MCF7 nakon tretmana faktorom rasta EGF i kombiniranog tretmana MBCD + EGF. Kod stanične linije SUM159 nakon utišavanja gena za protein AQP3 dolazi do smanjene vijabilnosti nakon kombiniranog tretmana MBCD + EGF.

7. Literatura

1. Azamjah, N., Soltan-Zadeh, Y., Zayeri, F., 2019. Global trend of breast cancer mortality rate: A 25-year study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 20(7): 2015-2020.
2. Barman, S., Nayak, D., 2007. Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances Influenza A virus budding from MDCK cells. **Journal of Virology**, 81(22): 12169-12178.
3. Bienert, G., Chaumont, F., 2014. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1840(5): 1596-1604.
4. Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72: 248-254.
5. Burgess, A., Cho, H., Eigenbrot, C., Ferguson, K., Garrett, T., Leahy, D., Lemmon, M., Sliwkowski, M., Ward, C., Yokoyama, S., 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. **Molecular Cell**, 12(3): 541-552.
6. Cao, C., Sun, Y., Healey, S., Bi, Z., Hu, G., Wan, S., Kouttab, N., Chu, W., Wan, Y., 2006. EGFR-mediated expression of aquaporin-3 is involved in human skin fibroblast migration. **Biochemical Journal**, 400(2): 225-234.
7. Cappuzzo, F., Finocchiaro, G., Rossi, E., Jänne, P., Carnaghi, C., Calandri, C., Bencardino, K., Ligorio, C., Ciardiello, F., Pressiani, T., Destro, A., Roncalli, M., Crino, L., Franklin, W., Santoro, A., Varella-Garcia, M., 2008. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. **Annals of Oncology**, 19(4): 717-723.
8. Cardone, M., Roy, N., Stennicke, H., Salvesen, G., Franke, T., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, 282(5392): 1318-1321.
9. Cariaga-Martinez, A., López-Ruiz, P., Nombela-Blanco, M., Motiño, O., González-Corpas, A., Rodríguez-Ubreva, J., Lobo, M., Cortés, M., Colás, B., 2013. Distinct and specific roles of Akt1 and Akt2 in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells. **Cellular Signalling**, 25(7): 1586-1597.
10. Carpenter, C., Duckworth, B., Auger, K., Cohen, B., Schaffhausen, B., Cantley, L., 1990. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, 265(32): 19704-19711.

11. Carpenter, C., Ingraham, H., Cochet, C., Walton, G., Lazar, C., Sowadski, J., Rosenfeld, M., Gill, G., 1991. Structural analysis of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. **Journal of Biological Chemistry**, 266(9): 5750-5755.
12. Chen, J., Wang, T., Zhou, Y., Gao, F., Zhang, Z., Xu, H., Wang, S., Shen, L., 2014. Aquaporin 3 promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 33(1): 38.
13. Conte, A., Sigismund, S., 2016. Chapter Six - The ubiquitin network in the control of EGFR endocytosis and signaling. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, 141: 225-276.
14. da Silva, I., Soveral, G., 2017. Aquaporins in obesity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 969: 227-238.
15. Datta, S., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, 91(2): 231-241.
16. De Ieso, M., Yool, A., 2018. Mechanisms of aquaporin-facilitated cancer invasion and metastasis. **Frontiers in Chemistry**, 6. 135.
17. De Luca, A., Carotenuto, A., Rachiglio, A., Gallo, M., Maiello, M., Aldinucci, D., Pinto, A., Normanno, N., 2007. The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. **Journal of Cellular Physiology**, 214(3): 559-567.
18. Dibble, C., Cantley, L., 2015. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. **Trends in Cell Biology**, 25(9): 545-555.
19. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., Waterfield, M., 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. **Nature**, 307(5951): 521-527.
20. Edwin, F., Wiepz, G., Singh, R., Peet, C., Chaturvedi, D., Bertics, P., Patel, T., 2018. A historical perspective of the EGF receptor and related systems, **Methods in Molecular Biology**, 327: 1-24.
21. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson, C. B., 2009. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, 324(5930): 1029-1033.
22. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H., Haydon, R., He, T., Ren, G., 2018. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, 5(2): 77-106.

23. Ferguson, K., Berger, M., Mendrola, J., Cho, H., Leahy, D., Lemmon, M., 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. **Molecular Cell**, 11(2): 507-517.
24. Franke, T., Kaplan, D., Cantley, L., Toker, A., 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. **Science**, 275(5300): 665-668.
25. French, A., Tadaki, D., Niyogi, S., Lauffenburger, D., 1995. Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. **Journal of Biological Chemistry**, 270(9): 4334-4340.
26. Gan, H., Cvrljevic, A., Johns, T., 2013. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. **FEBS Journal**, 280(21): 5350-5370.
27. Grandis, J., Sok, J., 2004. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. **Pharmacology & Therapeutics**, 102(1): 37-46.
28. Guéguinou, M., Gambade, A., Félix, R., Chantôme, A., Fourbon, Y., Bougnoux, P., Weber, G., Potier-Cartreau, M., Vandier, C., 2015. Lipid rafts, KCa/CICa/Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids?. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1848(10): 2603-2620.
29. Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E. E., Heath, C. W., Jr, Coates, R. J., Liff, J. M., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Morabia, A., Schuman, L., Stewart, W., Szklo, M., Bain, C., Schofield, F., Siskind, V., Band, P., ... Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer - collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **British Journal of Cancer**, 87(11): 1234-1245.
30. Hanahan, D., Weinberg, R., 2000. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 100(1): 57-70.
31. Hara-Chikuma, M., Verkman, A., 2008. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. **Molecular and Cellular Biology**, 28(1): 326-332.
32. Huang, Y., Zhou, J., Shi, S., Xu, H., Qu, F., Zhang, D., Chen, Y., Yang, J., Huang, H., Sheng, J., 2015. Identification of Estrogen Response Element in Aquaporin-3 Gene that Mediates Estrogen-induced Cell Migration and Invasion in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. **Scientific Reports**, 5(1): 12484.
33. Huang, Y., Zhu, Z., Sun, M., Wang, J., Guo, R., Shen, L., Wu, W., 2010. Critical role of aquaporin-3 in the human epidermal growth factor-induced migration and proliferation in the human gastric adenocarcinoma cells. **Cancer Biology & Therapy**, 9(12): 1000-1007.

34. Itoh, T., Rai, T., Kuwahara, M., Ko, S., Uchida, S., Sasaki, S., Ishibashi, K., 2005. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 330(3): 832-838.
35. Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., Starosławska, E., 2015. Breast cancer risk factors. **Menopausal Review**, 3: 196-202.
36. King, L., Kozono, D., Agre, P., 2004. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 5(9): 687-698.
37. Kreida, S., Törnroth-Horsefield, S., 2015. Structural insights into aquaporin selectivity and regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, 33: 126-134.
38. Lee, J., Vivanco, I., Beroukhim, R., Huang, J., Feng, W., DeBiasi, R., Yoshimoto, K., King, J., Nghiemphu, P., Yuza, Y., Xu, Q., Greulich, H., Thomas, R., Paez, J., Peck, T., Linhart, D., Glatt, K., Getz, G., Onofrio, R., Ziaugra, L., Levine, R., Gabriel, S., Kawaguchi, T., O'Neill, K., Khan, H., Liao, L., Nelson, S., Rao, P., Mischel, P., Pieper, R., Cloughesy, T., Leahy, D., Sellers, W., Sawyers, C., Meyerson, M., Mellinghoff, I., 2006. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. **PLoS Medicine**, 3(12): e485.
39. Lee, S., Yang, K., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S., 2002. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. **Journal of Biological Chemistry**, 277(23): 20336-20342.
40. Lemmon, M., Schlessinger, J., 2010. Cell signaling by receptor Tyrosine kinases. **Cell**, 141(7): 1117-1134.
41. Li, A., Lu, D., Zhang, Y., Li, J., Fang, Y., Li, F., Sun, J., 2012. Critical role of aquaporin-3 in epidermal growth factor-induced migration of colorectal carcinoma cells and its clinical significance. **Oncology Reports**, 29(2): 535-540.
42. Lien, E., Lyssiotis, C., Cantley, L., 2016. Metabolic reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR pathway in cancer. **Metabolism in Cancer**, 207: 39-72.
43. Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Jing, H., 2020. Molecular mechanism of AQP3 in regulating differentiation and apoptosis of lung cancer stem cells through Wnt/GSK-3 β / β -Catenin pathway. **Official Journal of the Balkan Union of Oncology**, 25(4):1714-1720.
44. Lynch, B., Neilson, H., Friedenreich, C., 2010. Physical activity and breast cancer prevention. **Physical Activity and Cancer**, 186: 13-42.
45. Macdonald, J., Pike, L., 2005. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. **Journal of Lipid Research**, 46(5): 1061-1067.

46. Madeira, A., Moura, T., Soveral, G., 2016. Detecting aquaporin function and regulation. **Frontiers in Chemistry**, 4: 3.
47. Makki, J., 2015. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, 8: S31563.
48. Malale, K., Fu, J., Qiu, L., Zhan, K., Gan, X., Mei, Z., 2020. Hypoxia-induced aquaporin-3 changes hepatocellular carcinoma cell sensitivity to sorafenib by activating the PI3K/Akt signaling pathway. **Cancer Management and Research**, 12: 4321-4333.
49. Marlar, S., Jensen, H., Login, F., Nejsum, L., 2017. Aquaporin-3 in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 18(10): 2106.
50. Milković, L., Čipak Gašparović, A., 2021. AQP3 and AQP5—potential regulators of redox status in breast cancer. **Molecules**, 26(9): 2613.
51. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D., 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, 366(1): 2-16.
52. Okano, J., Gaslightwala, I., Birnbaum, M., Rustgi, A., Nakagawa, H., 2000. Akt/Protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. **Journal of Biological Chemistry**, 275(40): 30934-30942.
53. Ozu, M., Galizia, L., Acuña, C., Amodeo, G., 2018. Aquaporins: More than functional monomers in a tetrameric arrangement. **Cells**, 7(11): 209.
54. Park, S., Jo, I., Park, S., Park, M., Mun, Y., 2022. Poria cocos extract from mushrooms stimulates aquaporin-3 via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, 15: 1919-1931.
55. Peterson, T., Laplante, M., Thoreen, C., Sancak, Y., Kang, S., Kuehl, W., Gray, N., Sabatini, D., 2009. DEPTOR Is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. **Cell**, 137(5): 873-886.
56. Pines, G., Köstler, W., Yarden, Y., 2010. Oncogenic mutant forms of EGFR: Lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. **FEBS Letters**, 584(12): 2699-2706.
57. Rodrigues, C., Milković, L., Bujak, I., Tomljanović, M., Soveral, G., Čipak Gašparović, A., 2019. Lipid profile and aquaporin expression under oxidative stress in breast cancer cells of different malignancies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019: 2061830.
58. Rodrigues, C., Mósca, A., Martins, A., Nobre, T., Prista, C., Antunes, F., Čipak Gašparović, A., Soveral, G., 2016. Rat aquaporin-5 is pH-gated induced by phosphorylation and is

- implicated in oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, 17(12): 2090.
59. Rodrigues, C., Pimpão, C., Mósca, A., Coxixo, A., Lopes, D., da Silva, I., Pedersen, P., Antunes, F., Soveral, G., 2019. Human aquaporin-5 facilitates hydrogen peroxide permeation affecting adaptation to oxidative stress and cancer cell migration. **Cancers**, 11(7): 932.
60. Roepstorff, K., Grandal, M., Henriksen, L., Knudsen, S., Lerdrup, M., Grøvdal, L., Willumsen, B., van Deurs, B., 2009. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. **Traffic**, 10(8): 1115-1127.
61. Sadowski, L., Pilecka, I., Miaczynska, M., 2009. Signaling from endosomes: Location makes a difference. **Experimental Cell Research**, 315(9): 1601-1609.
62. Santi, S., Lee, H., 2010. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 298(3): C580-C591.
63. Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., Longacre, M., 2013. Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview. **International Journal of Molecular Sciences**, 14(10): 21087-21113.
64. Satooka, H., Hara-Chikuma, M., 2016. Aquaporin-3 controls breast cancer cell migration by regulating hydrogen peroxide transport and its downstream cell signaling. **Molecular and Cellular Biology**, 36(7): 1206-1218.
65. Saxton, R., Sabatini, D., 2017. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 168(6), pp.960-976.
66. Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A., Batra, S., 2012. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 16(1): 15-31.
67. Sies H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, 11: 613-619.
68. Singh, A., Harris, R., 2005. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. **Cellular Signalling**, 17(10): 1183-1193.
69. Sørli, T., Perou, C., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M., van de Rijn, M., Jeffrey, S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J., Brown, P., Botstein, D., Lønning, P., Børresen-Dale, A., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(19): 10869-10874.

70. Soveral, G., Madeira, A., Loureiro-Dias, M., Moura, T., 2008. Membrane tension regulates water transport in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1778(11): 2573-2579.
71. Sun, Y., Zhao, Z., Yang, Z., Xu, F., Lu, H., Zhu, Z., Shi, W., Jiang, J., Yao, P., Zhu, H., 2017. Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, 13(11): 1387-1397.
72. Sweeney, C., Fambrough, D., Huard, C., Diamonti, A., Lander, E., Cantley, L., Carraway, K., 2001. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ERBB receptors. **Journal of Biological Chemistry**, 276(25): 22685-22698.
73. Szatrowski, T.P., Nathan, C.F., 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Research**, 51: 794-798.
74. Tomita, Y., Dorward, H., Yool, A., Smith, E., Townsend, A., Price, T., Hardingham, J., 2017. Role of aquaporin 1 signalling in cancer development and progression. **International Journal of Molecular Sciences**, 18(2): 299.
75. Valluru, L., Dasari, S., Wudayagiri, R., 2014. Role of free radicals and antioxidants in gynecological cancers: current status and future prospects. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, 3(1): 15.
76. Vander Heiden, M., Cantley, L., Thompson, C., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, **Science**, 324(5930): 1029-33.
77. Verkman, A., 2013. Aquaporins. **Current Biology**, 23(2): R52-R55.
78. Verkman, A., Anderson, M., Papadopoulos, M., 2014. Aquaporins: important but elusive drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, 13(4): 259-277.
79. Vogelstein, B., Kinzler, K., 2004. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, 10(8): 789-799.
80. Walton, G., Chen, W., Rosenfeld, M., Gill, G., 1990. Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates. **Journal of Biological Chemistry**, 265(3): 1750-1754.
81. Wang, H., Schoebel, S., Schmitz, F., Dong, H., Hedfalk, K., 2020. Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1862(2): 183065.
82. Wee, P., Wang, Z., 2017. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. **Cancers**, 9(5): 52.

83. Wilson, K., Gilmore, J., Foley, J., Lemmon, M., Riese, D., 2009. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: Implications for cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, 122(1): 1-8.
84. Yarden, Y., Sliwkowski, M., 2001. Untangling the ERBB signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2(2): 127-137.
85. Yersal, O., 2014. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World Journal of Clinical Oncology**, 5(3): 412.
86. Zaha, D., 2014. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, 5(3): 382.
87. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P., Kuriyan, J., 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. **Cell**, 125(6): 1137-1149.
88. Zhang, Z., Wang, L., Du, J., Li, Y., Yang, H., Li, C., Li, H., Hu, H., 2016. Lipid raft localization of epidermal growth factor receptor alters matrix metalloproteinase-1 expression in SiHa cells via the MAPK/ERK signaling pathway. **Oncology Letters**, 12(6): 4991-4998.
89. Zhou, B., Hu, M., Miller, S., Yu, Z., Xia, W., Lin, S., Hung, M., 2000. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF- κ B pathway. **Journal of Biological Chemistry**, 275(11): 8027-8031.
90. Zhu, Z., Jiao, L., Li, T., Wang, H., Wei, W., Qian, H., 2018. Expression of AQP3 and AQP5 as a prognostic marker in triple negative breast cancer. **Oncology Letters**, 16(2): 2661-2667 .
91. Zhuang, L., Lin, J., Lu, M.L., Solomon, K.R., Freeman, M.R., 2002. Cholesterol-rich lipid rafts mediate Akt-regulated survival in prostate cancer cells. **Cancer Research**, 62(8): 2227-2231.

8. Životopis

Ime i prezime: Ivan Lučić

Datum rođenja: 12.10.1997.

Mjesto rođenja: Sisak, Hrvatska

OBRAZOVANJE:

2020. - 2022. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, sveučilišni diplomski studij Eksperimentalna biologija, modul: Fiziologija i imunobiologija

2017. - 2020. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, sveučilišni preddiplomski studij Biologija

2012. - 2016. Srednja škola Petrinja, Opća gimnazija

2004. - 2012. Osnovna škola Mate Lovraka Petrinja

TEČAJEVI:

2020. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka (kategorija A)

STIPENDIJE:

2018. - 2020. Ministarstvo znanosti i obrazovanja, STEM stipendija

2020. – 2022. Sveučilište u Zagrebu, stipendija za izvrsnost