

Remodeliranje aktinskog citoskeleta i bijeg stanica raka od imunskog nadzora

Semenić, Lana

Undergraduate thesis / Završni 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:500847>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-30**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lana Semenčić

**Remodeliranje aktinskog citoskeleta
i bijeg stanica raka od imunosnog nadzora**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lana Semenčić

**Actin cytoskeleton remodeling
and immune evasion of cancer cells**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Remodeliranje aktinskog citoskeleta i bijeg stanica raka od imunosnog nadzora

Lana Semenčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ovaj rad istražuje mehanobiologiju raka i imunosnog sustava, pritom razmatrajući remodeliranje aktinskog citoskeleta kao potencijalnu strategiju imunosnog bijega. Poput koncepta imunosnog nadzora, koji je danas široko prihvaćen, uloga fizikalnih svojstava tumorskih stanica u progresiji raka isprva je naišla na kontroverze. Međutim, otkriće pozitivne korelacije između krutosti izvanstaničnog matriksa i tumorskog fenotipa dugotrajno je obilježilo mehanobiologiju raka kao obećavajuće područje istraživanja. S vremenom, interes istraživača proširio se na čimbenike stanične krutosti i njihov značaj u imunosnoj sinapsi. Stanicama raka se tijekom metastatske kaskade mijenjaju morfologija i elastična svojstva, za što je velikim dijelom zaslužna dinamičnost aktinskog citoskeleta. Tijekom prostiranja po perivaskularnoj niši, dolazi do pojačanja signalizacije transkripcijskim čimbenikom povezanim s miokardinom (MRTF). Ona povećava broj aktinskih filamenata u stanici, čija organizacija u stresna vlakna povećava staničnu krutost. Ovo ih čini prepoznatljivijima za limfocite i time podložnijima eliminaciji. Budući da se radi o nužnom koraku metastatske kaskade, stanice raka moraju precizno regulirati ovu signalizaciju kako bi ostvarile imunosni bijeg te formirale metastatsku koloniju. Kao drugi potencijalni mehanizam bijega predstavio se aktinski odgovor tumorske stanice, ali su mu detalji ostali nepoznati.

Ključne riječi: imunosna sinapsa, mehanobiologija, mehanonadzor, metastaza
(35 stranica, 14 slika, 0 tablica, 83 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Actin cytoskeleton remodeling and immune evasion of cancer cells

Lana Semenčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

This thesis explores cancer and immune system mechanobiology, while considering actin cytoskeleton remodeling as a potential immune evasion strategy. Similarly to the now widely accepted concept of immunosurveillance, the role of cellular mechanical properties in cancer progression ran into controversy at first. However, the discovery of a positive correlation between extracellular matrix stiffness and tumor phenotype has lastingly marked cancer mechanobiology as a promising field of study. Over time, researchers' interest has encompassed cell stiffness determining factors and their significance in immune synapse. During metastatic cascade, cancer cells undergo changes in morphology and elastic properties. This is primarily caused by actin cytoskeleton dynamics. Spreading of cancer cells across the perivascular niche is characterized by an increase in myocardin-related transcription factor (MRTF) signaling. This increases the amount of cellular actin filaments, which then assemble into stress fibers, thus increasing cellular stiffness. The increase in stiffness makes cells more stimulatory to lymphocytes and therefore more susceptible to elimination. Since the aforementioned step is crucial in the metastatic cascade, cancer cells need to finely regulate MRTF signaling in order to successfully avoid elimination and form colonies. Tumor cell actin response has been suggested as an alternative evasion mechanism, however its details remain elusive.

Keywords: immune synapse, mechanobiology, mechanosurveillance, metastasis
(35 pages, 14 figures, 0 tables, 83 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Nada Oršolić, PhD

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	RAZRADA TEME.....	2
2.1	Građa i funkcija aktinskog citoskeleta.....	2
2.1.1	Struktura aktinskih filamenata i njihova organizacija u stanici	2
2.1.2	Kinetika polimerizacije aktina	4
2.1.3	Veze aktinskog citoskeleta s okolišem	5
2.1.4	Mehaničke sile kod pokretanja stanica i njihovo mjerenje	7
2.1.5	Aktinske strukture u migraciji stanica i invaziji	9
2.2	Rak i njegova mehanobiologija	11
2.2.1	Začetak neoplazme ili tumora	11
2.2.2	Odvajanje tumorske stanice od lokalnog okoliša i invazija.....	12
2.2.3	Od intravazacije do metastatske kolonizacije	14
2.2.4	Krutost izvanstaničnog matriksa (ECM-a) i razvoj tumora	16
2.2.5	Pitanje krutosti metastatskih stanica	17
2.3	Mehaničke sile u imunoreakciji na tumor	19
2.3.1	Prepoznavanje i ubijanje stanica raka	20
2.3.2	Građa imunosne sinapse (IS-a)	21
2.3.3	Mehanoosjetljivost receptora	22
2.3.4	Aktinski citoskelet tumorske stanice i imunosni bijeg	24
2.3.5	Mehanistička podloga imunosnog bijega ovisnog o aktinu.....	26
3.	ZAKLJUČAK	27
4.	LITERATURA.....	28
5.	ŽIVOTOPIS	35

KRATICE

ADP/ATP	adenozin-5'-difosfat/adenozin-5'-trifosfat (engl. <i>adenosine-5'-diphosphate/adenosine-5'-triphosphate</i>)
AFM	mikroskopija atomskih sila (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
APC	antigen-predočna stanica (engl. <i>antigen-presenting cell</i>)
Arp2/3	kompleks proteina povezanih s aktinom 2/3 (engl. <i>actin-related protein complex 2/3</i>)
C _c	kritična koncentracija (engl. <i>critical concentration</i>)
CAF	tumoru pridruženi fibroblast (engl. <i>cancer-associated fibroblast</i>)
CAM	stanične adhezijske molekule (engl. <i>cell adhesion molecules</i>)
CD4 CD8	klaster diferencijacije 4, klaster diferencijacije 8 (engl. <i>cluster of differentiation 4, cluster of differentiation 8</i>)
CTF	stanična sila povlačenja (engl. <i>cell traction force</i>)
CTL	citotoksični limfocit T (engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
EMT	epitelno-mezenhimska tranzicija (engl. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
FAK	fokalna adhezijska kinaza (engl. <i>focal adhesion kinase</i>)
Fas	površinski antigen povezan s FS-7 (engl. <i>FS-7-associated surface antigen</i>)
GDP/GTP	gvanozin-5'-difosfat/gvanozin-5'-trifosfat (engl. <i>guanosine-5'-diphosphate/guanosine-5'-triphosphate</i>)
HIF-1	inducibilni čimbenik hipoksije 1 (engl. <i>hypoxia-inducible factor 1</i>)
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula 1 (engl. <i>intercellular adhesion molecules</i>)
IFN- γ	interferon- γ (engl. <i>interferon-γ</i>)
IS	imunosna sinapsa (engl. <i>immune synapse</i>)

$k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$	konstanta brzine asocijacije/disocijacije (engl. <i>association/dissociation rate constant</i>)
LFA-1	limfocitni funkcionalni antigen 1 (engl. <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>)
LOX	lizil oksidaza (engl. <i>lysyl oxidase</i>)
MHC-I MHC-II	molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, klasa I i II (engl. <i>major histocompatibility complex molecules, class I and II</i>)
MMP	matriks metaloproteinaza (engl. <i>matrix metalloproteinase</i>)
MRTF	transkripcijski čimbenik povezan s miokardinom (engl. <i>myocardin-related transcription factor</i>)
NAD (NAD ⁺ /NADH)	nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirani/reducirani oblik) (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NK stanica	prirodno-ubilačka stanica (engl. <i>natural killer cell</i>)
NKG2D	receptor prirodno-ubilačke skupine 2D (engl. <i>natural killer group 2D</i>)
PDMS	polidimetilsiloksan (engl. <i>polydimethylsiloxane</i>)
ROCK	Rho-pridružena protein kinaza (engl. <i>Rho-associated protein kinase</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SMAC; cSMAC pSMAC dSMAC	supramolekularni aktivacijski klasteri; centralni, periferni i distalni (engl. <i>supramolecular activation clusters; central, peripheral and distal</i>)
TCR	receptor stanica T (engl. <i>T cell receptor</i>)
TFM	mikroskopija elastičnih deformacija podloge (engl. <i>traction force microscopy</i>)
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)
TNF	čimbenik nekroze tumora (engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
VEGF	čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WASP	protein Wiskott-Aldrichovog sindroma (engl. <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>)

1. UVOD

Stanična migracija i morfogeneza imaju važnu ulogu u mnogim razvojnim procesima i funkciji imunostnog sustava te su konzervirane u metazoa. Primarno ih regulira reorganizacija aktinskog citoskeleta koja zahtijeva prostornu i vremensku koordinaciju signalnih puteva s aktinskim regulatornim i aktin-vezujućim proteinima. Više je patoloških stanja u ljudi povezano s aberantnom i dereguliranom mobilnosti stanica i invazijom, kao što je slučaj kod raka (Mondal i ostali 2021).

Svi zloćudni tumori mogu metastazirati, pri čemu stanice primarnog tumora migriraju do udaljenih organa (Andreis i ostali 2010; Talmadge i Fidler 2010). Metastatska kaskada može se podijeliti na nekoliko stadija: lokalna invazija, intravazacija, prijenos u krvotoku, ektravazacija i kolonizacija (Pecorino 2012; Martin i ostali 2013; Mondal i ostali 2021). Na putu do mjesta buduće metastaze, stanica prolazi kroz različita okruženja, kao što su gusti izvanstanični matriks (ECM, engl. *extracellular matrix*), tijesni međustanični prostori krvožilnog endotela ili pak nutrijentima bogata perivaskularna niša (Pecorino 2012; Er i ostali 2018). Ove procese omogućavaju promjene u aktinskom citoskeletu, pri čemu se mijenjaju elastična svojstva stanice (Xu i ostali 2012; Jacobs i ostali 2013).

Metastatska se kaskada u svakom koraku može zaustaviti, zbog čega je na razini pojedinačne stanice poznata kao izuzetno neučinkovit proces (Janssen i ostali 2017). Imunosni sustav također sudjeluje u borbi protiv tumora. U protutumorskoj imunostnoj reakciji sudjeluju nespecifični i specifični oblici imunosti, uključujući prirodno-ubilačke stanice (NK stanice, engl. *natural killer cells*) i citotoksični limfociti T (CTL-ovi) (Andreis i ostali 2010). Oni prepoznaju tumorsku stanicu, s njom ulaze u bliski kontakt u imunostnoj sinapsi (IS) te ju nastoje eliminirati (Usmani i Mempel 2021).

Krutost (engl. *stiffness*) materijala je mjera opiranja deformaciji kada na njega djeluje vanjska sila (Gkretsi i Stylianopoulos 2018). Budući da se radi o opipljivoj značajki tkiva, već joj je dugo poznata važnost u dijagnostici tumora. Naime, postoji veza između krutosti ECM-a i tumorskog fenotipa (Huang i Ingber 2005). Interes istraživača usmjerio se i na krutost pojedinačnih stanica koja se može mjeriti mikroskopijom (Xu i ostali 2012). Huse (2017) navodi kako su veze između liganada, staničnih receptora, unutarstaničnih signalnih puteva i transkripcijskih regulatora primarno shvaćane kao kemijski entitet, što, iako nije pogrešno, stavlja na stranu važnost utjecaja mehaničkih sila. Budući da istraživanja sugeriraju da fizikalna priroda IS-a igra važnu ulogu u citotoksičnosti, moduliranje fizikalnih svojstava stanica raka predstavilo se kao potencijalan mehanizam bijega od ovog "poljupca smrti" (Huse 2017; Tello-Lafoz i ostali 2021; Usmani i Mempel 2021).

2. RAZRADA TEME

2.1 Građa i funkcija aktinskog citoskeleta

Citoskelet je heterogena stanična struktura s tri glavne sastavnice: aktinski filamenti, mikrotubuli i intermedijarni filamenti. On nije potpuno kontinuiran niti uniforman u prostoru, već mu se sadržaj i raspored sastavnih dijelova mijenja od jezgre prema perifernim dijelovima stanice. Građa mu varira i u vremenu, odgovarajući na podražaje iz unutarnjeg i vanjskog mikrookoliša (Tafazzoli-Shadpour i ostali 2020).

Aktin je najzastupljeniji citoskeletni protein većine stanica (Cooper 2019). Molekule globularnog monomera nazvanog G-aktin (globularni aktin) polimeriziraju u F-aktin (filamentozni aktin), koji u citoplazmi tvori aktinske filamente ili mikrofilamente (Nelson i ostali 2008; Glyakina i Galzitskaya 2020). Procese polimerizacije i depolimerizacije reguliraju posebni aktin-vezujući proteini (Cooper 2019; Glyakina i Galzitskaya 2020). Aktinski su filamenti najzastupljeniji u perifernim dijelovima stanice, tj. staničnom korteksu, za razliku od mikrotubula i intermedijarnih filamenata koji se nalaze većinom u unutrašnjosti (Bray 2001; Tafazzoli-Shadpour i ostali 2020). Zaslužni su za različite stanične funkcije, kao što su kretanje, promjena oblika stanice, citokineza, egzo- i endocitoza, preraspodjela površinskih receptora i sl. (Cooper 2019; Glyakina i Galzitskaya 2020). Općenito, smatraju se fizikalno najvažnijim dijelovima citoskeleta, zahvaljujući svojoj ključnoj ulozi u svim aspektima stanične deformabilnosti i pokretljivosti (Tafazzoli-Shadpour i ostali 2020).

2.1.1 Struktura aktinskih filamenata i njihova organizacija u stanici

Molekula G-aktina najčešće se sastoji od 375 aminokiselinskih ostataka i ima molekularnu masu od 42 kDa (Bray 2001). U dubokom rascjepu u središtu molekule nosi čvrsto vezan esencijalni kofaktor adenzin-5'-trifosfat (ATP) ili adenzin-5'-difosfat (ADP) (Bray 2001; Alberts i ostali 2017). Unutar tog rascjepa nalazi se i vezno mjesto za drugi esencijalni kofaktor, Ca^{2+} . Aminokiselinski sastav tipičan mu je za globularni protein, uz blago prevladavanje kiselih ostataka, što mu daje izoelektričnu točku oko pH 5,5 (Bray 2001). U eukariota postoji nekoliko različitih tipova aktina koje kodiraju geni unutar aktinske porodice, no njihova je primarna struktura visoko konzervirana (Cooper 2019). U kralježnjaka postoje tri klase izoformi različitih izoelektričnih točaka: α -aktin, većinom karakterističan za mišićne stanice, te β - i γ -aktin, karakteristični za ostale stanice (Bray 2001; Vedula i Kashina 2018; Glyakina i Galzitskaya 2020). Malo se zna o specifičnosti interakcija izoformi s drugim staničnim proteinima (Müller i ostali 2013).

F-aktin je desna helikalna struktura širine oko 8 nm sastavljena od dva protofilamenta. Zbog asimetričnih podjedinica iste orijentacije, aktinski filamenti imaju strukturno različite krajeve, tj. polarni su. Imaju brzo-rastući plus kraj (engl. *plus end*, *barbed end*) i sporo-rastući minus kraj (engl. *minus end*,

pointed end). Pojedinačni aktinski filamenti prilično su fleksibilni, a njihova se krutost može povezati s duljinom perzistencije (engl. *persistence length*), minimalnom duljinom filamenta pri kojoj će ga nasumične termalne fluktuacije vjerojatno saviti tako da orijentacija krajeva postane nasumična. Ona iznosi 18 μm , što nije mnogo (za usporedbu, kod mikrotubula iznosi 6000 μm), ali u živoj stanici pomoćni proteini križno povezuju i skupljaju mikrofilamente u svežnjeve, pritom stvarajući kruće strukture (Bray 2001; Alberts i ostali 2017).

Strukture višeg reda u koje se aktinski filamenti organiziraju unutar stanice su svežnjevi (engl. *bundles*) i mreže. Svežnjevi mogu biti statični ili kontraktilni (Bray 2001). U njima su aktinski filamenti malim i krutim proteinima križno povezani u guste paralelne nizove, dok su u mrežama aktinski filamenti velikim i fleksibilnim proteinima križno povezani u ortogonalne nizove (Cooper 2019). Jedna takva mreža, nazvana stanični korteks, nalazi se uz unutarnju stranu plazmatske membrane i predstavlja mjesto najveće koncentracije aktinskih filamenata u stanici (Alberts i ostali 2017; Cooper 2019). Njene su uloge mehanička potpora, određivanje oblika stanice i gibanje stanične površine, što otvara mogućnost migracije pojedinih stanica, među kojima su i tumorske (Jacobs i ostali 2013; Cooper 2019).

Aktin stupa u interakciju s velikim brojem staničnih proteina (Izdebska i ostali 2020). Aktin-vezujući proteini uključeni su u vezanje za krajeve filamenata, križno povezivanje, odsijecanje i stvaranje svežnjeva aktinskih filamenata (Aseervatham 2020). Uz barem jednu aktin-vezujuću domenu prisutnu kod svih aktin-vezujućih proteina, mnogo ih sadrži i regulatornu domenu koja veže Ca^{2+} ili fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat, uključene u brojne signalne puteve (Waelkens i ostali 1995; Bray 2001; Nelson i ostali 2008). Aktin-vezujući proteini također prostorno i vremenski kontroliraju polimerizaciju i depolimerizaciju aktinskih filamenata (Aseervatham 2020). Ovo je važno za stvaranje aktinskih struktura koje stanice koriste tijekom metastaze, npr. invadopodija (Jacquemet i ostali 2015; Aseervatham 2020). Također, u stanicama raka prisutna je aberantna regulacija dinamičke ravnoteže između G- i F-aktina. Općenito, pronađeno je mnogo kompleksnih poveznica između aktin-vezujućih proteina i ove bolesti (Aseervatham 2020).

U mnogo tipova kretanja stanica, aktinski filamenti povezani su s miozinom, tropomiozinom i troponinom. Miozin je prototip molekularnog motora, proteina koji pretvara kemijsku energiju iz ATP-a u mehaničku energiju (Cooper 2019). Ovaj model pokretanja otkriven je na primjeru mišića, ali ima i brojne uloge u pokretima nemišićnih stanica, kao što su migracija, stanična dioba te unutarstanični transport vezikula i organela (Huse 2017; Cooper 2019). Rjeđe spominjane uloge aktinskih filamenata uključuju sidrenje enzima, označavanje specifičnih lokacija unutar stanice (npr. mjesto pupanja u stanici kvasca), prijenos mRNA do mjesta povezivanja s ribosomima i drugo (Bray 2001).

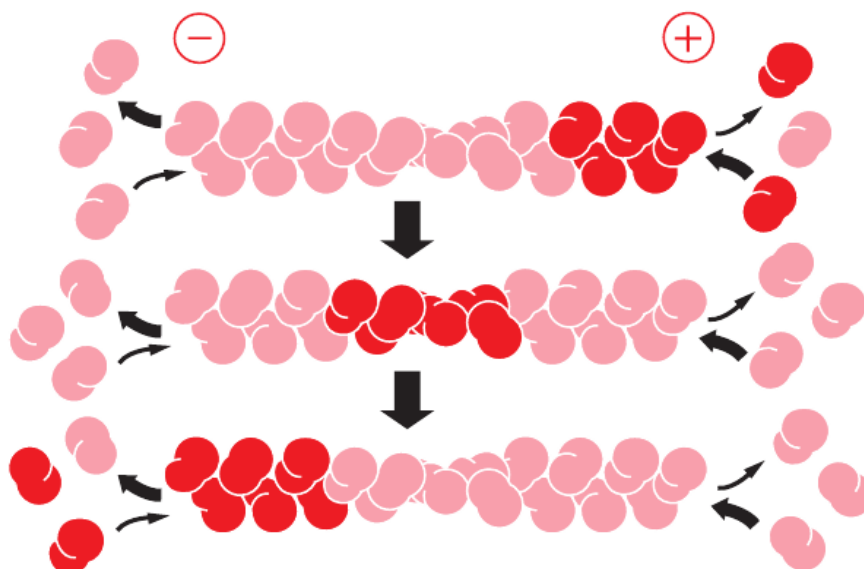
2.1.2 Kinetika polimerizacije aktina

Za mehanička svojstva stanice posebno je važno dinamičko remodeliranje filamentoznih aktinskih struktura u njezinom korteksu (Mierke 2018). Polimerizacija aktina može se opisati krivuljom podijeljenom u tri faze: *lag* faza (engl. *lag phase*), faza rasta (engl. *growth phase*) i ustaljeno stanje (engl. *steady state*) (Alberts i ostali 2017). Trajanje *lag* faze odgovara vremenu potrebnom za nukleaciju. Naime, helikalni polimer stabiliziran je interakcijama susjednih podjedinica. Dvije se molekule G-aktina relativno slabo vežu jedna za drugu, ali je trimer stabilniji i zbog toga može poslužiti kao klica za polimerizaciju. U stvaranju klice mogu sudjelovati protein Wiskott-Aldrichovog sindroma (WASP, engl. *Wiskott-Aldrich syndrome protein*) i kompleks proteina povezanih s aktinom 2/3 (Arp-2/3, engl. *actin related protein 2/3 complex*) (Ritter i ostali 2013; Alberts i ostali 2017). U fazi rasta dolazi do produljenja polimera. Nakon nekog vremena se postiže tzv. kritična koncentracija (C_c) G-aktina u kojoj su G-aktin i F-aktin u kemijskoj ravnoteži (1) te vrijedi (2). Konstante brzine polimerizacije i depolimerizacije označavaju se kao k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$], odnosno k_{off} [s^{-1}], dok K_d predstavlja konstantu disocijacije (Bray 2001; Alberts i ostali 2017).

$$k_{on}C = k_{off} \quad (1)$$

$$C_c = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_d \quad (2)$$

Dok je brzina polimerizacije proporcionalna koncentraciji slobodnog G-aktina ($k_{on}C$), brzina depolimerizacije je konstantna (k_{off}). Obje su konstante puno veće za plus kraj nego za minus kraj. Dakle, iznad kritične koncentracije, plus kraj raste mnogo brže, isto kao što ispod kritične koncentracije brže depolimerizira (Bray 2001; Alberts i ostali 2017). Svejedno, uz pretpostavku da sve podjedinice imaju jednak nukleotidni status, dva kraja aktinskog filameta imaju jednak neto afinitet za nove podjedinice. G-aktin dolazi u dva nukleotidna statusa: D oblik (vezan za ADP) i T oblik (vezan za ATP). Aktin može katalizirati hidrolizu ATP-a, koja je vrlo spora u slobodnom G-aktinu, ali je brža kad je ugrađen u F-aktin. S hidrolizom dolazi do negativne promjene slobodne energije (ΔG). ΔG disocijacije je negativnija u slučaju polimera D oblika nego polimera T oblika. Ovo znači da je omjer k_{off}/k_{on} veći za D oblik, a on prema (1) odgovara kritičnoj koncentraciji. U stanici su slobodne molekule G-aktina pretežno u T obliku, a hidroliza se obično događa nakon ugradnje u filament. Dakle, tipičan F-aktin sadrži i D i T oblik monomera. Čim je dulje G-aktin dio filameta, tim je veća vjerojatnost da je u D obliku. Pri koncentracijama manjima od kritične koncentracije D oblika i većima od kritične koncentracije T oblika dolazi do fenomena koji se naziva hod u mjestu (engl. *treadmilling*), što znači da se podjedinice tijekom vremena kreću od plus do minus kraja polimera, iako on održava konstantnu duljinu (Slika 1). Ovo zahtjeva utrošak energije u obliku hidrolize ATP-a (Alberts i ostali 2017).



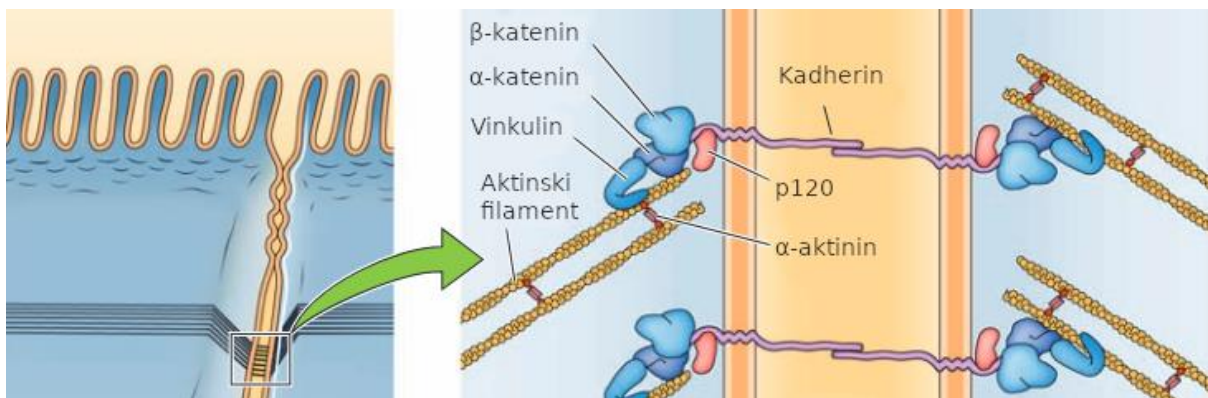
Slika 1. Shematski prikaz "hoda u mjestu". Kritična koncentracija plus kraja aktinskog filameta (monomerna jedinica u T obliku) manja je od kritične koncentracije minus kraja (monomerna jedinica u D obliku). Kada je koncentracija G-aktina između ove dvije vrijednosti, dolazi do hoda u mjestu, tj. smanjenja minus kraja i povećanja plus kraja. Iako postoji "tok" monomera kroz polimer, duljina filameta ostaje konstantna Preuzeto od Alberts i ostali (2017).

Iznad kritične koncentracije G-aktina, promjena slobodne energije (ΔG) za njegov dodatak u aktinski filament je negativna i elongacija je spontana. Stanica tada može iskoristiti oslobađanje slobodne energije za guranje plazmatske membrane prema vodećem kraju (naprijed), pritom se suprotstavljajući mehaničkom otporu (Lauffenburger i Horwitz 1996; Alberts i ostali 2017). Također, aktinska polimerizacija ima važnu ulogu u formiranju IS-a između efektorske i ciljne stanice jer predstavlja pogon za retrogradni tok (Comrie i ostali 2015a).

2.1.3 Veze aktinskog citoskeleta s okolišem

Većina stanica ima specijalizirane regije stanične membrane zaslužne za povezivanje sa susjednim stanicama ili ECM-om (Shankar i Nabi 2015). Molekule stanične adhezije mogu stvarati stabilne stanične veze, kao što to obično rade integrini i kadherini. Veze mogu biti i nestabilne, kao što je to u slučaju selektina i imunoglobulinske superobitelji (Cooper 2019).

Svežnjevi aktinskih filamenata susjednih stanica usridreni su u *zonuli adherens*, sastavljenoj od različitih tipova proteina. U epitelnim stanicama ovi međustanični spojevi čine adhezijski pojas (engl. *adhesion belt*) u kojem epitelni kadherin (E-kadherin) sidri svežnjeve aktinskih filamenata (Slika 2). Kadherini susjednih stanica povezuju se poput kuka. Citoplazmatski im je dio povezan s β -kateninom i p120-kateninom, koji reguliraju mehaničku stabilnost. α -katenin je povezan s β -kateninom, vinkulinom i kortikalnim aktinskim citoskeletom. Vinkulin također veže aktin (Schmalhofer i ostali 2009; Cooper 2019).

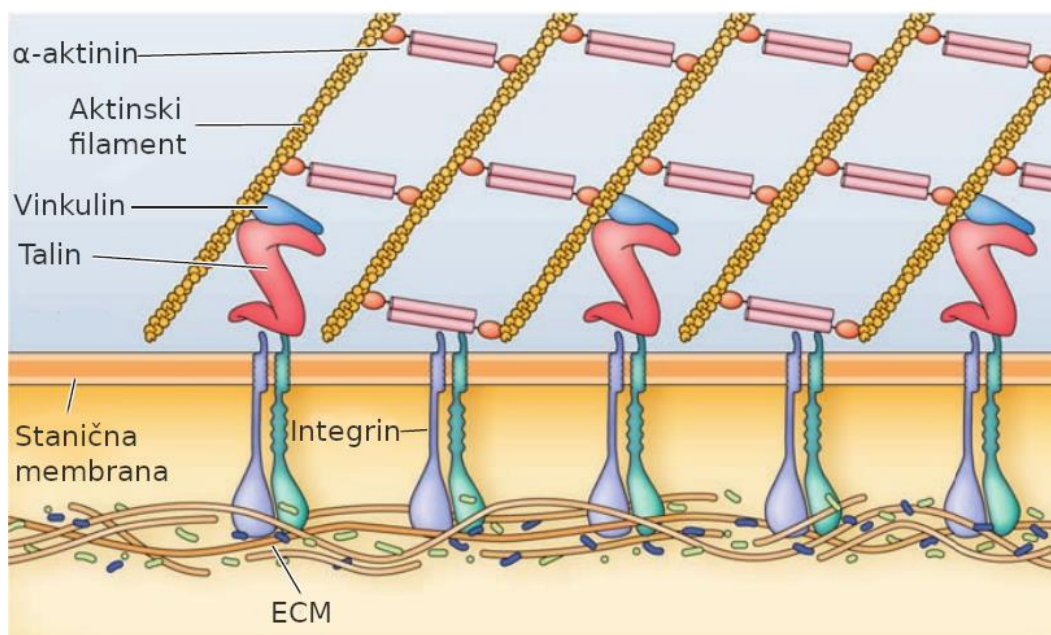


Slika 2. Sastavnice adhezijskog pojasa epitelnih stanica. Kadherini susjednih stanica povezuju se poput kuka. Sa citoplazmatske su strane povezani s β -kateninom i p120-kateninom. α -katenin i vinkulin su u izravnom kontaktu s kortikalnim aktinskim citoskeletom. Preuzeto i prilagođeno prema Cooper (2019).

ECM je složena mreža izvanstaničnih proteina, proteoglikana i glikoproteina koja čini okosnicu tkiva i organa. Ove se molekule povezuju u supramolekularne nakupine, kao što su fibrili i plosnate mreže, te omogućuju ECM-u da podnosi mehaničke sile koje stanice generiraju uslijed kretanja tijela. Važni biofizikalni parametri ECM-a su topografija, molekularna gustoća, krutost i vlačno naprezanje. ECM također dolazi u obliku tanke bazalne membrane koja čini granicu strome s drugim tkivima te služi kao mehanički supstrat za adheziju stanica. Epitelne i endotelne stanice poravnate su uz bazalnu membranu, a ona utječe i na njihovo preživljavanje, proliferaciju i druge fiziološke funkcije (Eble i Niland 2019). Za sidrenje stanice u ECM zaduženi su integrinski receptori, heterodimeri sastavljeni od α i β podjedinice (Pecorino 2012). Preko N-terminalnih domena α i β podjedinica vezuju se za izvanstanične ligande, poput kolagena i fibronektina (Mierke 2018; Bourgot i ostali 2020). Unutar stanice ne stupaju u izravan kontakt s aktinskim filamentima, već se C-terminalni rep β podjedinica s njima povezuje posredstvom α -aktinina ili talina i vinkulina (Slika 3) (Alberts i ostali 2017; Cooper 2019). Veliki svežnjevi aktinskih filamenata koji vrše napetost nad podlogom nazivaju se stresna vlakna. α -aktinin križno povezuje spomenute aktinske filamente, a tropomiozin ih stabilizira (Cooper 2019). Vinkulin i talin čine sloj za prijenos sile (Kanchanawong i ostali 2010). Ovakvo povezivanje aktinskih filamenata preko klizajućeg sloja molekula nazvano je modelom spojke (engl. *clutch model*) (Paluch i ostali 2016).

Područje sidrenja stanice u ECM važno je za signalizaciju (Bray 2001). Integrinima nedostaju signalizacijske domene, stoga ovu ulogu preuzimaju druge molekule, kao što su kinaze fokalnih adhezija (FAK) i članovi Src obitelji (Parsons i Parsons 2004; Eble i Niland 2019). Supramolekularne proteinske slagaline s ulogom sidrenja i signalizacije nazivaju se adhesomima. Dije se u skupine ovisno o zrelosti i sposobnosti podupiranja stabilne adhezije ili migracije (Eble i Niland 2019). Primjerice, fokalni kompleksi su prekursori stabilnih fokalnih adhezija koje mogu većom silom djelovati na podlogu (Galbraith i ostali 2002). Za njihovo stvaranje važan supstrat te sinergija između biokemijskih i mehaničkih čimbenika. Fokalne adhezije na temelju podražaja iz ECM-a, mehaničke napetosti i

fosforilacijskih signala utječu na rast, diobu, diferencijaciju i migraciju stanica (Bray 2001; Galbraith i ostali 2002).



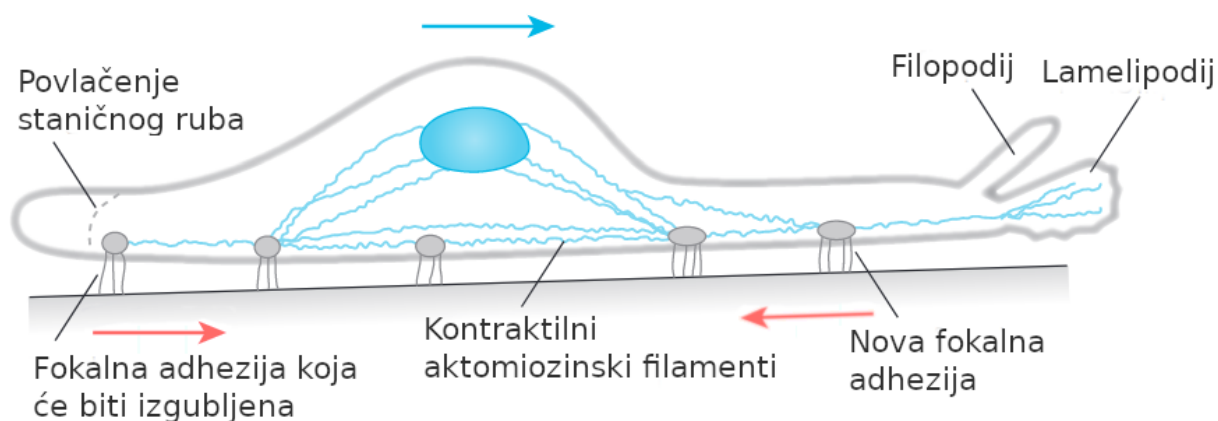
Slika 3. Shematski prikaz fokalnih adhezija kod kojih su vidljivi aktinski filamenti organizirani u stresna vlakna. Integrini sidre stanicu u ECM. Aktinski filamenti nisu povezani s njima izravno, nego posredstvom drugih proteina. U jednom slučaju se integrin veže s talinom, a u drugom s α -aktininom. Preuzeto i prilagođeno prema Cooper (2019).

2.1.4 Mehaničke sile kod pokretanja stanica i njihovo mjerenje

Dinamičko remodeliranje citoskeleta način je na koji stanice mogu djelovati silama na svoj okoliš, pri čemu obično aktinski citoskelet nosi najveći dio mehaničkog opterećenja (Huse 2017). Sile povlačenja kojima stanica djeluje na podlogu (CTF, engl. *cell traction force*), primjerice na ECM, od ključne su važnosti za metastazu, kao i mnoge druge biološke procese (Wang i Lin 2007). Fokalne adhezije su senzori i regulatori zaduženi za dvosmjernu signalizaciju između izvanstaničnih podražaja i aktinskog citoskeleta (Kurzawa i ostali 2017).

CTF-ovi nastaju uslijed aktomiozinskih kontrakcija i polimerizacije aktina (Slika 4). Stresna vlakna čine semi-sarkomerne strukture u kojima poprečni mostovi izazivaju vlak (engl. *tension*). On kontrahira tijelo stanice i biva prenesen do ECM-a (Wang i Lin 2007). Polimerizacija aktina u području fokalnih adhezija pojačava CTF-ove i služi kao okidač procesa stanične migracije (Tafazzoli-Shadpour i ostali 2020). Trenutno nedostaje kvantitativnih podataka vezanih za sile temeljene na polimerizaciji, što je dovelo do pretpostavke da su one kratkotrajnije i u mjerenjima prikrivene kontraktilnim silama. Svedeno, F-aktinske izbočine mogu deformirati podloge i površine drugih stanica, što podrazumijeva da sile nisu zanemarive (Huse 2017). Smatra se da su dinamika aktomiozinski stvorene sile i njezin prijenos u elastičnom mikrookolišu izrazito važni za način na koji stanice prepoznaju mehanička svojstva mikrookoliša i odgovaraju na njih (Mierke 2018).

Makroskopski gledano, pokretanje stanice po površini (Slika 4) može se podijeliti u četiri stadija (Jacobs i ostali 2013). Prvi je produljivanje prednjeg kraja stanice (engl. *leading edge*), pri čemu se stvaraju aktinske strukture (npr. lamelipodiji ili filopodiji) (Jacobs i ostali 2013; Cooper i ostali 2019). Slijedi njihovo prihvaćanje za podlogu koje mora biti dovoljno stabilno da stanica ostane usidrena tijekom sljedećeg koraka - translokacije prema mjestu sidrenja. Translokaciju često karakterizira visok stupanj aktomiozinske kontraktilnosti. Zadnji korak je otpuštanje stražnjeg dijela stanice od podloge. U stanici se simultano može odvijati više navedenih stadija (Jacobs i ostali 2013).

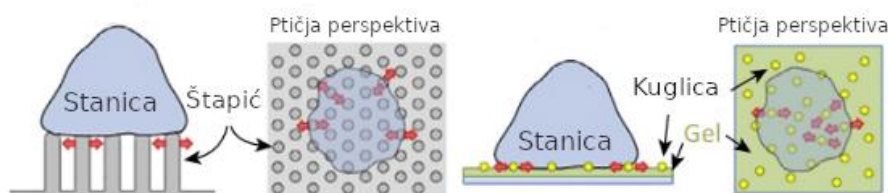


Slika 4. Shematski prikaz pokretanja stanice u smjeru plave strelice. Smjer CTF-ova označen je crvenim strelicama. Strukture na prednjem kraju stanice su filopodiji ili lamelipodiji. Preuzeto i prilagođeno prema Jacobs i ostali (2013) uz nadopunu prema Wang i Lin (2007).

Na CTF-ove utječu molekule koje reguliraju slaganje stresnih vlakana i fokalnih adhezija, primjerice mala GTPaza Rho i Rho-pridružena proteinska kinaza (ROCK, engl. *Rho-associated protein kinase*). Slično, kinaza lakog lanca miozina (MLCK, engl. *myosin light-chain kinase*) regulira nemišićni miozin II, a time i CTF-ove (Wang i Lin 2007). Međutim, jedan od aktualnih problema u staničnoj mehanici je činjenica da nisu identificirani regulatorni parametri koji određuju iznose ovih sila (Kurzawa i ostali 2017).

Iako proučavanje sila odgovornih za kretanje stanica može biti izazovno, tijekom zadnja dva desetljeća poboljšane su rezolucija i pouzdanost dvodimenzionalne i trodimenzionalne mikroskopije elastičnih deformacija podloge (TFM, engl. *traction force microscopy*) (Bray 2001; Mierke 2018). Ona omogućava proučavanje stanične adhezije i migracije na kvantitativan način. To se može postići kretanjem stanica po poliakrilamidnom gelu s fluorescentno označenim kuglicama nano- do mikrometerske veličine (Slika 5). Površina gela je prekrivena adhezivnim ligandima poput laminina ili kolagena. Adhezijom i kontrakcijom stanica dolazi do pomicanja fluorescentnih biljega na kuglicama. Na temelju tih pomaka, sile se mapiraju Fourierovim tehnikama koristeći poznatu elastičnost gela. Drugi način za izvedbu ove metode je korištenje konfiguracija polidimetilsiloksanskih (PDMS) mikroštipića (engl. *PDMS micropillar arrays*), gdje je poliakrilamidni gel zamijenjen fleksibilnim štipićima. Sile se računaju na temelju njihovih elastičnih deformacija, dimenzija i sastava (Huse 2017; Mierke 2018). Iako

su kontraktilne sile povezane s CTF-ovima, treba uzeti u obzir rasipanje ("disipaciju") mehaničkog rada aktomiozinske kontrakcije. Dio rada zbog nje nije prenesen do ECM-a i ne može se procijeniti njegova vrijednost mjerenjem deformacije supstrata (Kurzawa i ostali 2017).



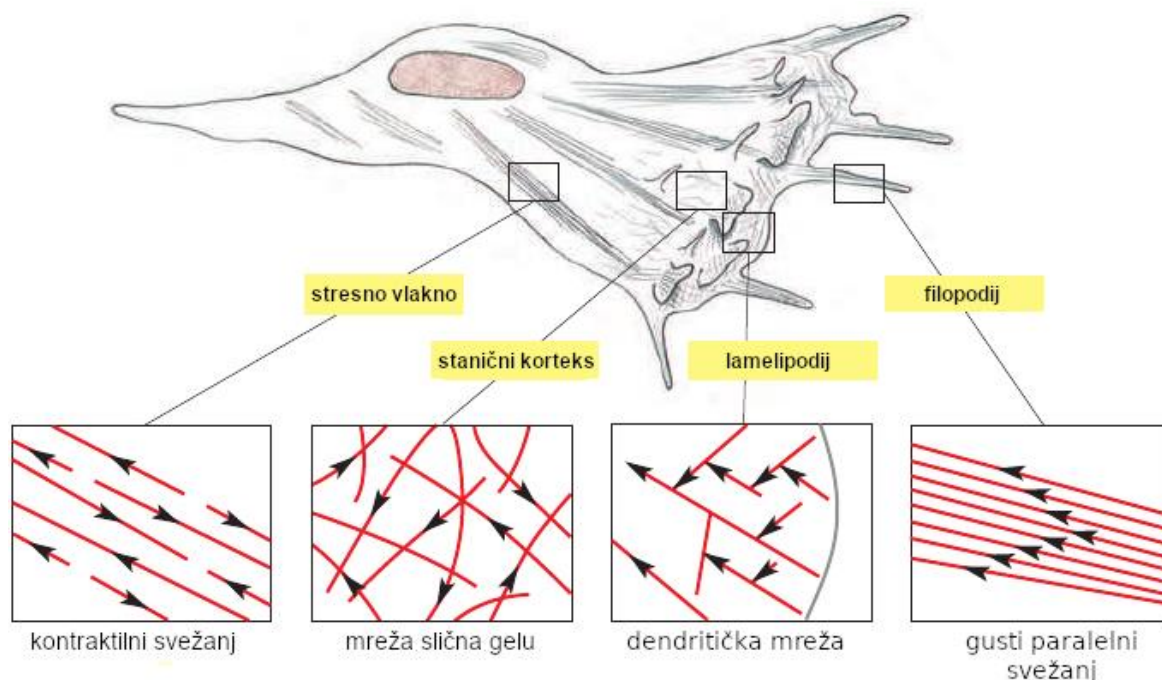
Slika 5. Shematski prikaz mikroskopije elastičnih deformacija podloge (TFM). Na desnoj je slici podloga sastavljena od konfiguracije fleksibilnih mikroštapčića, a na lijevoj se radi o gelu u kojem se nalaze fluorescentno označene kuglice. Sile kojima stanice djeluju na podlogu (CTF), računaju se na temelju elastičnih deformacija mikroštapčića, odnosno pomaka kuglica. Preuzeto i prilagođeno prema Basu i Huse (2017).

Dosadašnji su eksperimenti ukazali na to da stanice raka imaju veću kontraktilnost od normalnih stanica te da postoji pozitivna korelacija između iznosa CTF-ova i invazivnosti (Tafazzoli-Shadrpour i ostali 2020), no treba napomenuti da to ne vrijedi za sve stanične tipove (Koch i ostali 2012). Što se tiče daljnjeg procesa migracije, neki stanični tipovi imaju manje CTF-ove u malim, uskim prostorima. Dakle, mogli bi koristiti različite mehanizme kretanja ovisno o okolišu (Stroka i Konstantopoulos 2014). Uočena je i pozitivna korelacija između prosječne i lokalne krutosti stanica i CTF-ova (Trepac i ostali 2004; Canović i ostali 2014; Schierbaum i ostali 2019; Rheinlaender i ostali 2021). Međutim, kod lokalne je krutosti korelacija uočena kod normalnih stanica, ali ne i stanica raka (Rheinlaender i ostali 2021). Osim za proučavanje migracije stanica, TFM se može koristiti za proučavanje sila u mehanički aktivnim IS-ovima, budući da PDMS mikroštapčići mogu biti presvučeni ligandima staničnih receptora (Wang i ostali 2022).

2.1.5 Aktinske strukture u migraciji stanica i invaziji

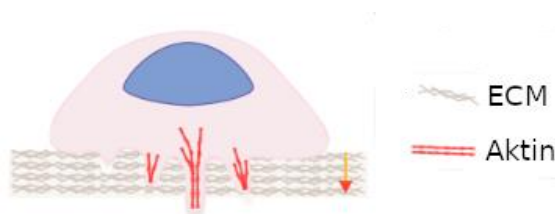
Raznovrsni tipovi staničnih kretnji ostvaruju se rastezanjem stanične membrane za kojeg je zaslužan aktinski citoskelet (Slika 6). Pseudopodiji su membranske izbočine umjerene širine u kojima su aktinski filament križno povezani u trodimenzionalnu mrežu. Odgovorni su za fagocitozu i kretanje ameba po podlozi (Cooper 2019). Lamelipodiji su tanke, široke, plosnate membranske izbočine na prednjem dijelu pokretnih stanica. Obogaćeni su razgranatom mrežom aktinskih filamenata koji guraju staničnu membranu prema naprijed (Alberts i ostali 2017; Huse 2017). Mnoge ih stanice koriste na plosnatim, dvodimenzionalnim podlogama. U trodimenzionalnim okruženjima ovo je samo jedan od nekoliko načina migracije (Petrie i Yamada 2012). Filopodiji su tanke projekcije stanične membrane koje poglavito pomažu stanici u istraživanju okoline. Rastu produljivanjem paralelnih aktinskih filamenata organiziranih u svežnjeve (Bray 2001; Alberts i ostali 2017; Cooper 2019). Osim što se mogu rastegnuti na velike udaljenosti, također mogu probiti želatinozni ECM (Petrie i Yamada 2012). Istraživanja su pokazala da isti tip stanice koji migrira unutar ECM-a može izmijenjivati tipove struktura na prednjem

dijelu. Predložen je univerzalni mehanizam kontrole trodimenzionalne stanične migracije koji uključuje stanica-ECM adhezije, RhoA signalizaciju i aktomiozinsku kontraktilnost (Petrie i Yamada 2012).



Slika 6. Prikaz aktinskih konfiguracija u fibroblastu *in vitro*. Aktinski su filament prikazani crveno, a strelice pokazuju prema minus kraju. Stresna su vlakna sastavljena od kontraktilnih svežnjeva, a stanični korteks čini mreža nalik gelu. U lamelipodiju se nalazi aktinska dendritička mreža, a u filopodiju su paralelni aktinski filament organizirani u svežnjeve. Preuzeto i prilagođeno prema Alberts i ostali (2017).

Invadopodiji se stvaraju pod utjecajem tumorskog mikrookoliša, primjerice čimbenika rasta i hipoksičnih uvjeta (Slika 7). Najprikladniji podražaj je krutost ECM-a koju osjećaju mehanosjetljivi integrini (Eble i Niland 2019). Nakon toga se u srži stvara aktinska mašinerija slična onoj u filopodijima, stvorena od linearnih, paralelnih aktinskih filamenta organiziranih u svežnjeve (Huang i Ingber 2005; Jacquemet i ostali 2015; Eble i Niland 2019). Oni stabiliziraju invadopodij i produžuju ga kroz ECM (Eble i Niland 2019). Od filopodija se razlikuju po tome što su stabilniji, pojavljuju se ispod staničnog tijela i mogu proteolitički razgrađivati ECM (Jacquemet i ostali 2015; Eble i Niland 2019).



Slika 7. Građa invadopodija koji prodiru kroz izvanstanični matriks (ECM). U srži invadopodija nalaze se aktinski svežnjevi koji mu stabiliziraju strukturu i produžuju ga. Preuzeto i prilagođeno prema Jacquemet i ostali (2015).

2.2 Rak i njegova mehanobiologija

Normalne stanice postaju tumorske zbog genskih mutacija i epigenetičkih promjena. Gubitak homeostaze tkiva i promjene u njegovoj arhitekturi potiču razvoj raka (Mierke 2018). Stanice raka karakterizira neograničen replikativni potencijal, neovisnost o signalima rasta, paralelna rezistencija na signale za inhibiciju rasta, bijeg od aktivacije stanične smrti, prolongirana angiogeneza te mogućnost invazije i metastaziranja (Ortega i ostali 2010). Iako je metastaza česta kao klinički ishod, na razini pojedinačne stanice vrlo je neučinkovit proces koji može biti zaustavljen tijekom svakog koraka kompleksne kaskade (Andreis i ostali 2010; Janssen i ostali 2017). Manje od 0,01% cirkulirajućih tumorskih stanica uspijeva u stvaranju sekundarnih tumora (Langley i Fidler 2011). U prošlom su desetljeću provedena brojna istraživanja uloge mehaničkih svojstava stanica raka u migraciji. Mehanički parametri koji određuju brzinu migracije stanice kroz ECM su dinamika između adhezije i deadhezije stanice, dinamika remodeliranja citoskeleta, stanična fluidnost i krutost, remodeliranje ECM-a, enzimatska razgradnja ECM-a i stvaranje kontraktilnih sila. Specifična vrijednost samo jednog od ovih parametara neće ograničiti migratorni potencijal, već je važna ravnoteža između svih njih (Mierke 2018). Svojstvo na koje će u ovom radu biti stavljen najveći naglasak je stanična krutost, zbog interesa za nju u pregledanoj literaturi i prijedloga da u budućnosti postane dijagnostički parametar (Xu i ostali 2012; Bergman i ostali 2021; Tello-Lafoz i ostali 2021).

2.2.1 Začetak neoplazme ili tumora

Razvoj tumora započinje genska mutacija. Protoonkogeni su skupina gena koji uslijed mutacije mogu transformirati normalnu stanicu u stanicu raka. Kada mutiraju, nazivaju se onkogeni (Mierke 2018). Tumor supresorski geni kodiraju za proteine koji inhibiraju stvaranje i rast tumora (Pecorino 2012). Puni kapacitet za metastaziranje postiže se kombinacijom aktivacije protoonkogena i inaktivacije ili gubitka tumor supresorskih gena (Mierke 2018). Metastaza je obilježje zloćudnih tumora. Benigni tumori ne metastaziraju, iako i dalje mogu biti opasni, npr. ako blokiraju žilu ili živac (Pecorino 2012; Eble i Niland 2019).

U početku razvoja tumora, većina stanica raste u hipoksičnim uvjetima jer kapilarna mreža nije dovoljno razvijena da ih sve opskrbljuje dostatnom količinom kisika (Nelson i ostali 2008). Tijekom prekomjernog rasta primarnog solidnog tumora dolazi do brze uspostave gradijenta kisika, tako da ga najmanje ima u centru tumorske mase, a najviše na rubovima. Zbog ove drastične promjene u okolišnim uvjetima, stanice reprogramiraju energetske metabolizam (Mierke 2018). Stanice udaljene 100-200 μm od najbližih kapilara oslanjaju se na glikolizu, koja je puno manje učinkovita od potpune oksidacije piruvata do ugljikovog dioksida u mitohondrijima (Nelson i ostali 2008). Stanice to nadoknađuju povećanjem sinteze glikolitičkih enzima i membranskih prijenosnika za unos glukoze (Nelson i ostali 2008; Mierke 2018). Također, stanica u hipoksičnim uvjetima treba razviti toleranciju na niski pH

izvanstanične tekućine. Naime, u glikolizi nastaje reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), a treba se regenerirati njegov oksidirani oblik (NAD⁺) potreban za korake glikolize u kojima se dobiva energija. Stanici nedostaje kisika, stoga se to ne može dogoditi u oksidativnoj fosforilaciji, već u procesu mliječno-kiselog vrenja, gdje se piruvat reducira u laktat koji se oslobađa i snižava pH (Nelson i ostali 2008).

Patološka hipoksija potpomaže preživljavanje i diobu tumorskih stanica. Stimulira kompleksnu mrežu signalnih puteva među kojima se posebno ističe put inducibilnog čimbenika hipoksije (HIF, engl. *hypoxia-inducible factor*) (Muz i ostali 2015). HIF-1 je protein koji na razini transkripcije potiče stvaranje glikolitičkih enzima, glukoznih membranskih prijenosnika i drugih proteina, poput čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF). VEGF pak stimulira angiogenezu i vaskulogenezu, izrast krvnih žila prema tumoru. U angiogenezi se nove krvne žile stvaraju iz već postojećih, dok vaskulogeneza uključuje progenitorske stanice endotela mobilizirane iz koštane srži (Nelson i ostali 2008; Muz i ostali 2015). Stvaranje krvnih žila brzo je i kaotično. Neožile u tumorima često su abnormalne, nezrele i propusne, a ovisno o tipu tumora nedostatne ili prekomjerne. Opskrbljivanje stanica raka kisikom i nutrijentima potiče njihovu proliferaciju, što rezultira još većim zahtjevima tumorskog tkiva i ponovljenom hipoksijom. Hipoksija tada ponovno stimulira angiogenezu. Ovaj začarani krug dovodi do toga da tumorsko tkivo postaje izrazito hipoksično, dok u isto vrijeme ima prekomjerno krvožilje koje je disfunkcionalno (Muz i ostali 2015).

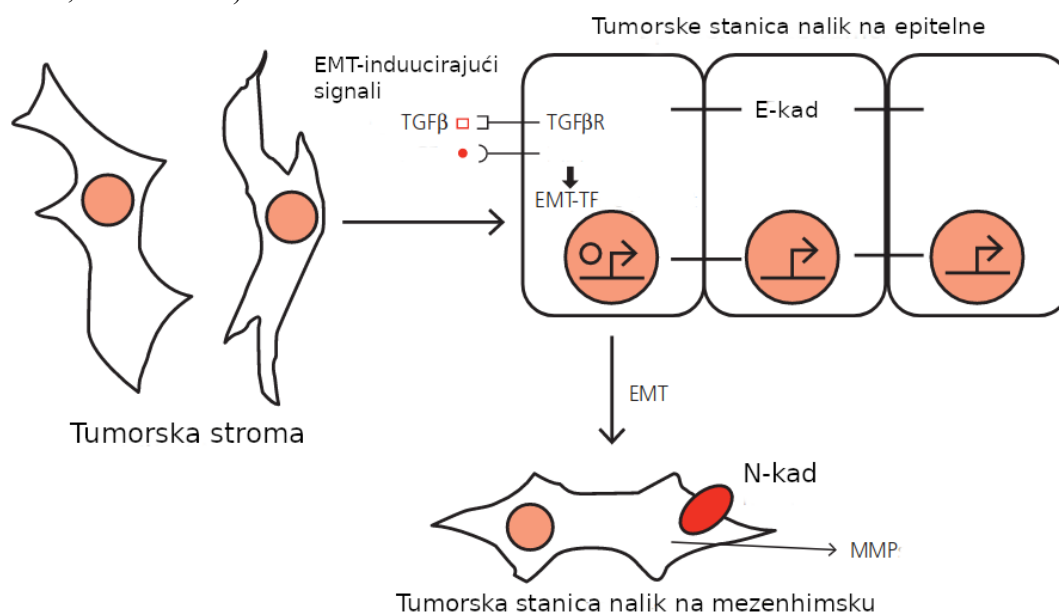
Hipoksične stanice agresivnije su i invazivnije od normoksičnih (Muz i ostali 2015). Osim što potiče stvaranje invadopodija, hipoksija uzrokuje epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT), transdiferencijaciju stanica kojom se mijenja ekspresija gena pred migraciju (Muz i ostali 2015; Eble i Niland 2019).

2.2.2 Odvajanje tumorske stanice od lokalnog okoliša i invazija

Rastući tumor izložen je vanjskim silama koje pritišću stanice (Er i ostali 2022). Metastaza stanicama pruža bijeg od ovih fizikalnih i topografskih ograničenja, kao i od hipoksičnog okoliša (Muz i ostali 2015; Er i ostali 2022). Započinje odvajanjem tumorskih stanica od lokalnog okoliša: susjednih stanica i ECM-a (Langley i Fidler 2011; Pecorino 2012). Budući da su veze stanica s okolišem uključene i u signalizaciju, dolazi do promjena u unutarstaničnim funkcijama, uključujući procese odgovorne za pokretljivost (Bray 2001; Pecorino 2012).

Za početak je korisno opisati dva stanična fenotipa: polarizirane epitelne stanice smještene u bliski kontakt sa svojim susjedima i visoko pokretljive mezenhimske stanice (Pecorino 2012). Prelazak stanice iz jednog fenotipa u drugi važan je za mnoge normalne procese, poput embrionalnog razvoja, zacjeljivanja rana i popravka tkiva (Mierke 2018). EMT je promjena staničnog fenotipa u kojoj se epitelne stanice oslobađaju prekidanjem stanica-stanica i stanica-ECM veza, nakon čega se pretvaraju u

mezenhimske, migratorne stanice. Obrnuta promjena predvidivo je nazvana mezenhimsko-epitelna tranzicija (MET) (Shankar i Nabi 2015; Mierke 2018). EMT jedan je od brojnih procesa rane embriogeneze koji se reaktivira u stanicama raka, zbog čega je važno promotriti njegove molekularne karakteristike u kontekstu biologije tumora (Slika 8). E-kadherin, prevladavajuća adhezijska molekula epitelnih stanica, djeluje kao supresor invazije, a u EMT-u se gubi (Pecorino 2012; Shankar i Nabi 2015). Njegovu ekspresiju inhibira povećana razina transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF- β , engl. *transforming growth factor β*) prisutnog u hipoksiji (Muz i ostali 2015). S druge strane postoji tzv. neuralni kadherin, N-kadherin, mezenhimski biljeg koji promovira migraciju i invaziju (Mariotti i ostali 2007; Mierke 2018).



Slika 8. Shematski prikaz epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) u slučaju tumora. Stromalne stanice oslobađaju signale koji induciraju EMT, primjerice TGF- β . Kontakt s odgovarajućim receptorima (TGF- β R) nakon signalne kaskade dovodi do transkripcije EMT transkripcijskih faktora (EMT-TF), primjerice Twist. Oni pak reguliraju skupinu gena koja orkestrira EMT. Obilježja mezenhimalnih stanica su ekspresija N-kadherina (N-kad) i sekrecija metaloproteinaza (MMP). Preuzeto i prilagođeno prema Pecorino (2012).

Sekrecija proteaza također je molekularno obilježje migrirajućih tumorskih stanica koje su prošle kroz EMT. Invazija tumorskih stanica u okolno tkivo zahtijeva razgradnju ECM-a i strome, za što su važne serinske proteaze i metaloproteinaze matriksa (MMP). Tumorske stanice najčešće induciraju proizvodnju MMP-ova u susjednim stromalnim stanicama, ali neke ih mogu proizvoditi i same. U normalnim je uvjetima metaloproteinazna aktivnost strogo regulirana na više razina, uključujući ekspresiju gena, aktivaciju proteolitičkim cijepanjem i tkivne inhibitore. Povećana razina MMP-ova prisutna je u gotovo svim tumorima, zbog čega im se ekspresijski profil koristi za određivanje stupnja tumorske progresije. Osim strukturnih komponenti ECM-a, mogu cijepati i druge proteine, primjerice faktore rasta (Pecorino 2012).

Tumorske se stanice od normalnih razlikuju i po aktinskom citoskeletu. U epitelnim stanicama aktinski filamenti su organizirani u tanke kortikalne svežnjeve, dok su u mezenhimskim stanicama prisutna deblja stresna vlakna na ventralnoj površini (Haynes i ostali 2011; Shankar i Nabi 2015). Predloženo je da aktinsko remodeliranje predstavlja uzvodni regulator EMT-a u metastatskim stanicama. Aktivacija GTPaze RhoA dovodi do remodeliranja aktinskog citoskeleta ovisnog o ROCK-u i prekidanju staničnih adhezija temeljenih na E-kadherinu. Inducirana depolimerizacija F-aktina smanjuje RhoA aktivaciju, što povećava razinu E-kadherina i uzrokuje MET (Shankar i Nabi 2015). S obzirom na poznati utjecaj aktina na fizikalna svojstva stanice, ovdje je zanimljivo spomenuti da u slučaju raka dojke ekspresija E-kadherina korelira s povećanom krutosti, suprotno od ekspresije N-kadherina (Alibert i ostali 2017).

EMT je u raku još povezan s lokaliziranom imunosupresijom, zaštitom od senescencije, karakteristikama "stem" stanica, promjenama u genomskoj stabilnosti i povećanom rezistencijom na lijekove (Derynck i Weinberg 2019). Međutim, cijela slika je kompleksnija nego se možda čini. EMT i MET obično nisu potpune pretvorbe iz jednog fenotipa u drugi, već mogu rezultirati intermedijarnim fenotipom. Ovo se još naziva djelomičnim EMT-om (Mierke 2018). Zanimljivo je da kad stanice raka dođu do udaljenih organa, MET također može podržavati metastatski rast (Diepenbruck i Christofori 2016).

Što se tiče integrina i stanica-ECM veza, unutarstanični im signali mogu uzrokovati konformacijsku promjenu izvanstanične domene koja mijenja afinitet prema ligandima. Vezanje liganda za integrine potiče njihovo klasteriranje i utječe na citoskelet preko interakcije s aktin-vezujućim proteinima i kinazama, među kojima je FAK za koju se smatra da ima ulogu u staničnoj pokretljivosti (Pecorino 2012). Također, integrini reguliraju Rho GTPaze, a Rho regulira aktivnost miozina. Osim što odgovaraju na kemijske signale, integrini su i mehanoosjetljivi, pa podražaj koji utječe na signalne puteve može biti i mehaničke prirode (Paszek i ostali 2005). Od izrazite je važnosti povećanje krutosti ECM-a, obilježje koje se koristi u ranom otkrivanju raka (Najafi i ostali 2019).

2.2.3 Od intravazacije do metastatske kolonizacije

Krvne žile granica su između krvi i tkiva koja regulira prijenos brojnih tvari i stanica do udaljenih dijelova tijela (McDowell i Quail 2019). Propusno i heterogeno krvožilje nastalo zbog hipoksije olakšava ulazak tumorskih stanica u cirkulaciju (Pecorino 2012; Muz i ostali 2015). Postojeće krvožilje može se mijenjati u upalnom procesu, pa tako povećanje propusnosti krvnih žila olakšava prolazak leukocitima, ali ponovno i tumorskim stanicama (McDowell i Quail 2019).

Prilikom intravazacije, tumorske stanice prolaze kroz tanke stijenke krvnih ili limfatičkih žila da bi ušle u sustavnu cirkulaciju (Langley i Fidler 2011; Martin i ostali 2013). Pritom se moraju prihvatiti za stromalnu stranu žile, razgraditi bazalnu membranu krvne žile (u limfatičkih žila nije prisutna) i proći

između endotelnih stanica da bi ušle u cirkulaciju (transendotelni put) (Pecorino 2012). U cirkulaciji tumorske stanice putuju pojedinačno ili kao male nakupine, nakon čega staju u distalnim mikrovaskularnim mrežama (Langley i Fidler 2011; Pecorino 2012). U procesima intravazacije i migracije mogu im pomagati makrofagi. Uloga makrofaga povezanih s tumorom je kompleksna, budući da postoji više populacija s protumorskim i/ili protutumorskim svojstvima (Janssen i ostali 2017). Imaju izuzetnu fenotipsku plastičnost i široki raspon funkcija koje potiču različiti okolišni signali. Primjerice, interferon- γ (IFN- γ) i ligandi receptora sličnog Toll-u (engl. *Toll-like receptor*) mogu ih potaknuti na eliminaciju tumorskih stanica, dok ih interleukin-4 i interleukin-13 potiču na remodeliranje tkiva i podržavanje razvoja tumora (Kitamura i ostali 2015).

Još je krajem 19. stoljeća zabilježeno da metastaza nije sasvim nasumična s obzirom na ciljni organ, zbog čega je predložena tzv. hipoteza sjemena i tla (engl. *seed and soil hypothesis*). Prema njoj, tumorske stanice ("sjeme") preferiraju rast u određenim tumorskim mikrookolišima ("tlo"). Danas postoje dokazi da primarni tumor može prilagođavati mjesto buduće metastaze nazvano premetastatska niša (Pecorino 2012). Također postoji anatomska ili mehanička hipoteza, koja najveću važnost predaje anatomiji krvne i limfatičke drenaže na mjestu primarnog tumora. Zagovornici ove hipoteze tvrdili su da stanice staju pri prvom organu do kojeg dođu, zbog čega će on sadržavati najveći broj metastaza (Langley i Fidler 2011). Ovo sugerira i činjenica da su tumorske stanice velike u odnosu na promjer kapilara, što im otežava prolazak kroz njih (Pecorino 2012). Danas se smatra da niti jedna od ovih dviju hipoteza ne isključuje drugu i da relativna važnost navedenih mehanizama ovisi o promatranom tumoru (Langley i Fidler 2011).

Tumorske se stanice u cirkulaciji zaustavljaju mehanički ili molekularnim interakcijama, povezivanjem na molekule iz obitelji selektina (posebice E-selektin). Krvožilje organa međusobno se razlikuje po ekspresiji selektina, što bi moglo podržavati hipotezu sjemena i tla. Perivaskularna niša okoliš je bogat nutrijentima na abluminalnoj strani mikrožila (Tello-Lafoz i ostali 2021). Stanice se prilikom ekstravazacije oslanjaju na transkripcijski čimbenik povezan s miokardinom (MRTF, engl. *myocardin-related transcription factor*) za snažnu adheziju i proširivanje po abluminalnoj strani perivaskularne bazalne membrane (Usmani i Mempel 2021). Iz krvne ili limfatičke žile tumorske stanice izlaze procesom ekstravazacije. Uz određene iznimke, koraci su slični kao kod intravazacije, samo u suprotnom smjeru kretanja: stanica se poveže na endotelnu stranu krvne žile, prolazi kroz endotelne stanice i bazalnu membranu, te migrira u okolnu stromu (Pecorino 2012). Osim što ekstravazacija može nastupiti transcelularnim putem (kroz jednu od endotelnih stanica), moguć je i paracelularni put (kroz međustanične spojeve u endotelu). Neke tumorske stanice mogu potaknuti povlačenje endotelnih stanica kemijskim putem, dok se druge dijele unutar lumena žile dok ju novonastala masa stanica ne probuši (Langley i Fidler 2011). Zadnji je korak metastaze kolonizacija: uspostava novog, rastućeg tumora (Pecorino 2012). Tumorske i stromalne stanice uspostavljaju recipročne signalne puteve koji potiču

tumorski rast. Tumorske se stanice i dalje dijele, što zahtijeva sintezu proangiogenetskih proteina koji potiču susjedne stanice mikrovaskularnog endotela na angiogenezu. Ponavljanjem ovog cijelog slijeda događaja mogu se stvoriti nove metastaze (Langley i Fidler 2011).

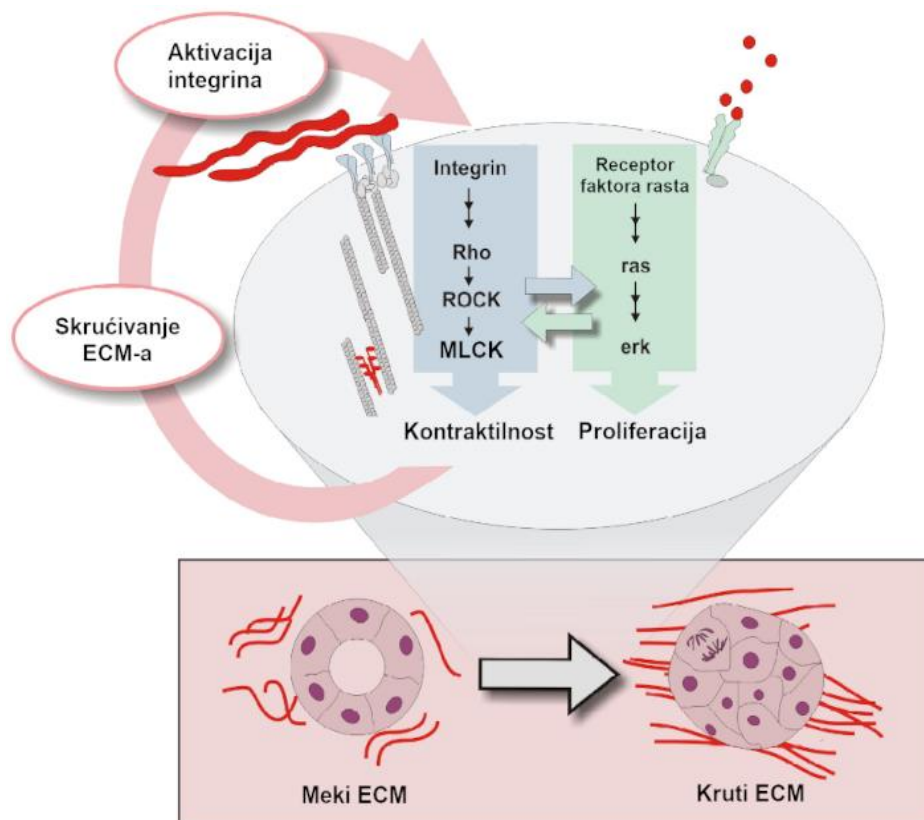
2.2.4 Krutost izvanstaničnog matriksa (ECM-a) i razvoj tumora

Kao što su to sročili Huang i Ingber (2005), rak se često otkriva na temelju opipljive promjene u krutosti tkiva, ali su se istraživanja svejedno dugo fokusirala na biokemijske signalne mehanizme. Važnost biokemijskih signala je neupitna, budući da oni vode stanicu kroz sve stadije metastatske kaskade. Međutim, trebalo je vremena da se razjasni kako točno fizikalni čimbenici iz okoline potiču biokemijski odgovor stanice koji vodi prema tumorskom fenotipu. Proces prevođenja mehaničkih sila u biokemijske signale naziva se mehanotransdukcija (Stroka i Konstantopoulos 2014). Mehanotransdukcijiska svojstva integrina i njihova regulatorna uloga u sudbini stanice predstavili su mogućnost da su upravo oni posrednici između krutosti tkiva i zloćudnosti (Paszek i ostali 2005). Poznato je da prenose sile do drugih sastavnica fokalnih adhezija, koje su povezane s aktinskim citoskeletom i usmjeravaju velik dio stanične signalizacije (Huang i Ingber 2005).

Tijekom progresije tumora, ECM prolazi kroz opsežno remodeliranje. Mogu se izdvojiti dvije važne modifikacije: krutost i proteazna razgradnja (Najafi i ostali 2019). U proteinskom sastavu ECM-a prevladavaju kolageni. Oni stvaraju supramolekularne strukture, poput fibrila i mreža. Za križno povezivanje kolagena odgovorni su izvanstanični enzimi iz obitelji lizil oksidaza (LOX, engl. *lysyl oxidase*) i transglutaminaza (Bourgot i ostali 2020). Aktivacija tumoru pridruženih fibroblasta (CAF, engl. *cancer associated fibroblasts*) igra ključnu ulogu u razvoju fibroze, viška vezivnog tkiva koji uzrokuje skrućivanje strome (Chandler i ostali 2019; Bourgot i ostali 2020). Kontraktilne sile CAF-ova induciraju reorijentaciju i poravnavanje nitastih proteina (Bourgot i ostali 2020). Za povećanje krutosti ECM-a vjerojano je još važnije križno povezivanje kolagena za koje je zaslužan LOX (Najafi i ostali 2019; Bourgot i ostali 2020). Kolageni se mogu vezati za integrine izravno ili posredstvom drugih molekula (npr. fibronektin). Unutarstanična signalizacija može potaknuti vezanje talina za citoplazmatski dio β podjedinice integrina, što uzrokuje konformacijsku promjenu koja povećava afinitet za izvanstanične ligande (Bourgot i ostali 2020).

Vlačna homeostaza (engl. *tensional homeostasis*) predstavlja sposobnost stanica, tkiva ili organa da pod djelovanjem vanjske sile održavaju homeostatsku razinu mehaničkog naprezanja. U epitelu vlačnu homeostazu održava recipročno djelovanje staničnih kontraktilnih sila i egzogenih sila. Gubitak ove homeostaze obilježje je nekih bolesti, uključujući i rak (Stamenović i Smith 2020). Čak i malo povećanje krutosti ECM-a pojačava citoskeletnu kontraktilnost i destabilizira arhitekturu tkiva. Ovo se događa putem klasteriranja integrina, tj. stvaranja heterooligomera iz $\alpha\beta$ heterodimera (Paszek i ostali 2005; Bourgot i ostali 2020). Klasteriranje je važno za mehanotransdukciju. Heterooligomeri se unutar

stanice povezuju sa citoskeletnim signalnim kompleksom zaduženim za stvaranje stresnih vlakana. Ovo rezultira stvaranjem fokalnih kompleksa (Bourgot i ostali 2020). Sila kojom kruti ECM djeluje na stanicu potiče sazrijevanje fokalnih kompleksa u fokalne adhezije. Fokalne adhezije potiču Rho/ROCK signalizaciju, što ima posljedicu aktivacije MLCK-a koji potiče aktivnost miozina, a time i kontraktilnost. Nadalje, Rho-inducirani citoskeletni vlak regulira aktivaciju kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (ERK, engl. *extracellular signal-regulated kinase*). U obrnutom smjeru, uočeno je i da ERK podržava Rho/ROCK signalizaciju. Vlak dodatno povećava krutost ECM-a. Ova pozitivna povratna sprega pojačava tumorski rast i ometa organizaciju tkiva (Slika 9). Dakle, mekoća ECM-a favorizira održavanje vlačne homeostaze, dok njegovo skrućivanje potiče tumorigenično ponašanje (Huang i Ingber 2005; Paszek i ostali 2005). Unatoč tome što se pokazalo da je mehanosjetljiva uloga adhesoma značajna za stanično "donošenje odluka", molekularna joj podloga još uvijek nije sasvim razjašnjena (Mierke 2018).



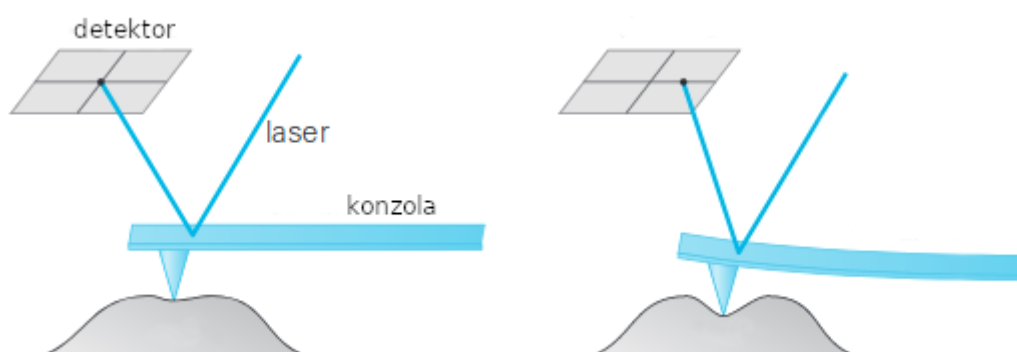
Slika 9. Shematski prikaz mehanizma kojim krutost izvanstaničnog matriksa (ECM-a) narušava vlačnu homeostazu i potiče razvoj tumorskog fenotipa. Kruti ECM aktivira integrine i potiče stvaranje fokalnih adhezija. Ovo potiče Rho/ROCK signalizaciju. MLCK potiče aktomiozinsku kontrakciju. Preuzeto i prilagođeno prema Huang i Ingber (2005).

2.2.5 Pitanje krutosti metastatskih stanica

Uzevši u obzir razne citoskeletne promjene kroz koje tumorske stanice prolaze, ne začuđuje da se mijenjaju i njihova elastična svojstva (Xu i ostali 2012; Tafazzoli-Shadpour i ostali 2020). Više je istraživanja krutost stanica pokušalo povezati sa sadržajem pojedinih citoskeletnih proteina, najčešće

aktina, i to u korteksu i aktomiozinskim kompleksima (Alibert i ostali 2017). Promjene u aktinskom citoskeletu posebno su zanimljive jer utječu na CTF-ove, deformabilnost i pokretljivost stanice (Tafazzoli-Shadpour i ostali 2020).

Mikroskopijom atomskih sila (AFM, engl. *atomic force microscopy*) mogu se pomoću male konzole odrediti karakteristike stanica. Te karakteristike mogu biti oblik ili mehanička svojstva, kao što je lokalna krutost (Jacobs i ostali 2013; Alibert i ostali 2017). Mjera krutosti elastičnog materijala je Youngov modul (Xu i ostali 2012). Na slobodnom kraju konzole nalazi se šiljak koji ulazi u doticaj sa površinom stanice, pri čemu se konzola elastično deformira. Ova se deformacija detektira pomoću laserske zrake koja se reflektira s njene površine (Slika 10) (Jacobs i ostali 2013). Valja napomenuti kako u određivanju krutosti stanice AFM-om može dominirati utjecaj staničnog korteksa (Alibert i ostali 2017). AFM se koristi i u određivanju krutosti kolagenskih matriksa (Mierke 2022).



Slika 10. Shematski prikaz mjerenja krutosti stanice mikroskopijom atomskih sila (AFM). Mala konzola na slobodnom kraju ima vršak koji dolazi u dodir sa stanicom, što dovodi do elastične deformacije konzole. Ona se pak mjeri pomoću laserske zrake koja se odbija s njezine površine. Preuzeto i prilagođeno prema Jacobs i ostali (2013).

Još uvijek nema konsenzusa o tome jesu li stanice raka općenito mekše ili kruće od normalnih. Uz to, nisu razjašnjene razlike u drugim svojstvima materijala između različitih staničnih tipova (Alibert i ostali 2017). Većina istraživanja ipak ukazuje na to da su izolirane stanice raka mekše (Xu i ostali 2012; Alibert i ostali 2017). Smatra se da bi intravazacija i ekstravazacija mogle biti potpomognute ukoliko su stanice mekane (deformabilne), s obzirom na to da moraju migrirati kroz male međustanične prostore i provlačiti se između gusto složenih nitastih proteina ECM-a (Alibert i ostali 2017; Tafazzoli-Shadpour i ostali 2020; Er i ostali 2022). S druge strane, stanice raka se prilikom okupiranja metastatske niše moraju raširiti po bazalnoj membrani na abluminalnoj površini krvnih žila, što ih čini krućima (Er i ostali 2018; Tello-Lafoz i ostali 2021).

Uočena je povezanost između zloćudnosti stanica i razine polimerizacije aktina (mjerene omjerom količina F-aktina i G-aktina). Međutim, istraživanja na različitim staničnim tipovima dala su oprečne rezultate. Zabilježene su i pozitivna i negativna korelacija između relativnog sadržaja G-aktina i metastatskog potencijala. Osim brojnosti aktinskih filamenata treba uzeti u obzir i njihovu organizaciju kao ključan čimbenik krutosti (Alibert i ostali 2017). Na krutost stanice utječu i deformabilnost jezgre

(koja je u tumorskih stanicama veća i nepravilnijeg oblika), stanična membrana (npr. sadržaj kolesterola), organeli i signalni putevi (Alibert i ostali 2017; Lei i ostali 2021). Još jedna stvar koju valja uzeti u obzir činjenica je da mehanička svojstva stanica regulira njihov mikrookoliš, što dodatno povećava jaz između *in vitro* i *in vivo* uvjeta (Han i ostali 2020). Dakle, krutost stanice raka potrebno je staviti u kontekst stadija metastaze i prostora u kojem se ona nalazi.

2.3 Mehaničke sile u imunoreakciji na tumor

Imunosni nadzor uključuje neprestano nadziranje tijela i uništavanje zloćudnih stanica koje se u njemu pojavljuju. Zbog poteškoća u dokazivanju, ova ideja nailazila je na brojne kontroverze (Andreis i ostali 2010). To se počelo mijenjati kada je razvoj genetičkog inženjerstva omogućio uzgoj sojeva miševa kojima nedostaju određene komponente imunskog sustava ili imaju poremećene signalne puteve važne za imunosne efekte. Pokazalo se kako im neosjetljivost na IFN- γ te nedostatak CTL-ova i NK stanica povećava podložnost obolijevanju od zloćudnih tumora (Pecorino 2012; Kitamura i ostali 2015). Slično je uočeno i kod ljudi s imunodeficijencijama (Finn 2018). Makar je slabo vjerojatno da su tumori oblikovali evoluciju imunskog sustava, svejedno postoji mogućnost obrane od njih mehanizmima koji su slični u zaštiti od patogena (Usmani i Mempel 2021).

Imunosni sustav nije uvijek uspješan u sprječavanju stvaranja tumora. Štoviše, može čak i poticati tumorski razvoj (Pecorino 2012). Spoznaje o imunosnom nadzoru i protumorskom djelovanju imunskog sustava objedinjene su u konceptu imunskog uređivanja (engl. *immunoediting*) (Dunn i ostali 2002). Sastoji se od tri faze: eliminacija, ravnoteža i bijeg (Phan i Croucher 2020). Faza eliminacije u osnovi predstavlja moderni pogled na imunosni nadzor, gdje imunosni sustav uništava transformirane stanice prije nego postanu klinički uočljive (Vesely i Schreiber 2013). Preživjele varijante tumorskih stanica mogu ući u fazu ravnoteže, gdje je brzina uklanjanja tumorskih stanica usklađena s brzinom njihove proliferacije, što rezultira stabilnom subkliničkom tumorskom masom (Vesely i Schreiber 2013; Phan i Croucher 2020). U fazi bijega tumorske stanice nadvladaju imunosni sustav i dolazi do nekontroliranog proširenja tumora (Dunn i ostali 2002; Vesely i Schreiber 2013; Phan i Croucher 2020).

Tello-Lafoz i ostali (2021) predložili su da imunosni nadzor ima mehaničku dimenziju, engl. *mechanosurveillance*, koja će ovdje biti prevedena kao mehanonadzor. Ovo otvara mogućnost da postoji i mehanička dimenzija imunskog bijega, tj. da tumorske stanice mijenjaju svoja fizikalna svojstva kako bi izbjegle citotoksičnu eliminaciju. Poznato je da mehanotransdukcija ima kritičnu ulogu u aktivaciji nekih staničnih tipova (Basu i ostali 2016). Zaista, IS je fizikalno aktivna struktura koja stvara mehaničke sile temeljene na aktinu na nanonjutnovskoj skali (Basu i ostali 2016; Tello-Lafoz i ostali 2021). Dobro je potvrđeno da krutost ligand-prezentirajuće površine može utjecati na signalizaciju posredovanu nekim od aktivacijskih imunoreceptora, kao što su integrini (Huse 2017).

2.3.1 Prepoznavanje i ubijanje stanica raka

Imunosne stanice naučene su raspoznavati vlastito od tuđeg, ali stanice raka nakupljaju dovoljan broj promjena da eksprimiraju antigene koji se prepoznavaju kao strani (Andreis i ostali 2010; Janssen i ostali 2017). Tumorski je antigen bilo koja tvar zloćudnih stanica koja nije prisutna u normalnim stanicama istog tkiva i stadija razvoja, a uzrokuje imunoreakciju. Po kemijskom sastavu, oni su peptidi koji nastaju preradbom tumorskih proteina. Predočavaju se na proteinima klase I glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. MHC-I, *major histocompatibility complex class I*) koji mogu biti prepoznati od strane imunskog sustava (Andreis i ostali 2010). Metastatsku kolonizaciju sprječavaju CTL-ovi i NK stanice. Na primjeru raka dojke pokazano je da smanjenje njihove brojnosti pojačava metastaziranje bez da utječe na rast primarnog tumora (Kitamura i ostali 2015).

CTL-ovi su dio adaptivnog imunskog sustava (Andreis i ostali 2010; Usmani i Mempel 2021). Njihov protutumorski odgovor ima dva koraka: *de novo* stvaranje protutumorskih limfocita T i uništavanje tumorske stanice. Prvi korak zahtijeva vezanje receptora stanica T (TCR, engl. *T cell receptor*) za MHC proteine i kostimulatorni signal. Ovo im pružaju profesionalne antigen-predodne stanice (APC, engl. *antigen-presenting cell*): dendritičke stanice, makrofagi i B limfociti. Iako sve stanice s jezgrom predočavaju MHC-I na površini, profesionalni APC-ovi stanice uz njega imaju MHC-II, kostimulatorne molekule i receptore za prepoznavanje molekularnih uzoraka. MHC-I omogućuje predočavanje endogenih antigena limfocitima T s klasterom diferencijacije 8 (CD8⁺, engl. *cluster of differentiation 8*), kao što su CTL-ovi. S druge strane, egzogeni antigeni predočavaju se na MHC-II, i to CD4⁺ limfocitima T (de Charette i ostali 2016).

Suprotno CTL-ovima, NK stanice dio su prirodnog imunskog sustava, stoga mogu ubiti svoju metu bez predaktivacije antigenom. Čine prvu liniju imunodne obrane protiv tumorskih stanica (Al Absi i ostali 2018). Efektorsku im funkciju kontrolira interakcija više aktivirajućih i inhibitornih signala (Dustin i Long 2010). Prepoznavanje zloćudnih stanica temelji im se na gubitku inhibitornih MHC-I molekula (engl. *missing-self*) i/ili prekomjernoj ekspresiji stresom induciranih liganada (engl. *altered-self*), kao što su ligandi NKG2D (engl. *natural killer group 2D*) receptora (Al Absi i ostali 2018; Usmani i Mempel 2021).

Kada CTL ili NK stanica dođe u doticaj s tumorskim antigenom, induciraju se signalni putevi koji unutar nekoliko minuta dovode do formiranja IS-a sa ciljnom stanicom (Huse 2017; Al Absi i ostali 2018). CTL-ovi i NK stanice zajedno izlažu stanice raka selekcijskom pritisku, a one odgovaraju na njega mehanizmima imunskog bijega (Huse 2017; Carré i ostali 2021). Neke od strategija kojima stanice raka bježe od imunskog nadzora uključuju promjenu ekspresije površinskih biljega, inhibiciju imunskih stanica i uspostavu imunosupresivnog tumorskog mikrokoliša (Wurzer i ostali 2019). Novija istraživanja pokazuju kako bi jedna od njih mogla biti i smanjenje krutosti stanice (Tello-Lafoz i ostali 2021)

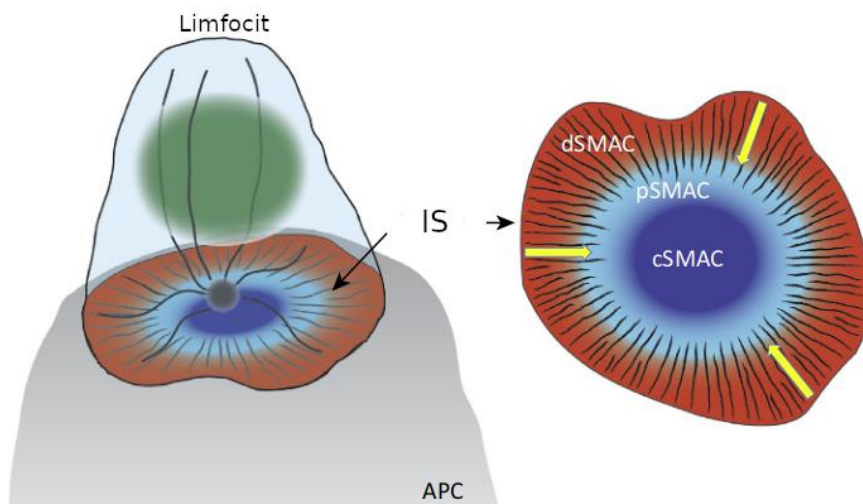
CTL-ovi i NK stanice mogu lizirati ciljane stanice koristeći citotoksičnost posredovanu granulama (Tuomela i ostali 2022). Tijekom procesa degranulacije, u ciljnu se stanicu otpuštaju specijalizirani sekretorni lizosomi nazvani litičkim granulama. Oni sadrže smjesu granzimskih preoteaza i perforina (Tello-Lafoz i ostali 2021; Wang i ostali 2022). Perforin je citolitički protein koji narušava cjelovitost stanične membrane formiranjem pora. Kroz novonastale pore ulaze granzimske proteaze. One pak cijepanjem različitih supstrata induciraju kolaps citoskeleta, disfunkciju mitohondrija i programiranu staničnu smrt (Wang i ostali 2022). Drugi način ubijanja posredovan je tzv. receptorima smrti (engl. *death receptors*), npr. Fas receptor (engl. *FS-7-associated surface antigen*) (Tuomela i ostali 2022).

2.3.2 Građa imunosne sinapse (IS-a)

IS-ovi su raznovrsni po građi i funkciji, ali može se stvoriti poopćeni model koji je sličan u CTL-ova i NK stanica (Davis 2002; Ritter i ostali 2013). "Kanonski" IS podijeljen je u supramolekularne aktivacijske klastere (SMAC, engl. *supramolecular activation clusters*) (Slika 11). Centralni SMAC (cSMAC) sadrži antigenske receptore i povezane signalne proteine. Okružuju ga koncentrični krugovi, periferni SMAC (pSMAC) i distalni SMAC (dSMAC). pSMAC je bogat adhezijskim molekulama, npr. $\alpha_L\beta_2$ integrinom koji se naziva limfocitni funkcionalni antigen 1 (LFA-1, engl. *lymphocyte function-associated antigen 1*) (Basu i Huse 2017). On je prevladavajući integrin u IS-u, gdje ga dovodi retrogradni tok aktina (Comrie i ostali 2015a; Basu i Huse 2017). dSMAC je prsten aktinskih filamenata koji stvara vanjsku granicu IS-a i time svojevrsnu "oazu" u kojoj su receptor-ligand interakcije izolirane od vanjskih sila, npr. toka fluida (Basu i Huse 2017). Snažnim prljanjem uz ciljnu stanicu blokira se pristup inhibitornim molekulama i ograničava difuzija ispuštenih citotoksičnih tvari (Huse 2017). Perforin i granzim ubijaju gotovo sve eukariotske stanice, stoga je važno zaštititi druge stanice u okolini. Uz zaštitu, ograničavanje difuzije ima i ulogu povećanja učinkovitosti ubijanja (Huse 2017; Wang i ostali 2022).

Aktinski filamenti kontroliraju rast i organizaciju IS-a (Basu i ostali 2016). Inhibitori aktinske polimerizacije mogu omesti aktivaciju CTL-ova. Ovo se nekad objašnjavalo time da aktin ima ulogu u stvaranju signalnih mikroklastera TCR-a (Ritter i ostali 2013). Za migraciju TCR-ova od perifernog dijela IS-a prema središtu (cSMAC-u) zaslužan je aktinski retrogradni tok (Slika 11) (Huse 2017). Mehanizam mu nije potpuno razjašnjen (Ritter i ostali 2013). Glavni mu je pogon polimerizacija aktina, makar postoji i doprinos miozinskih motora (Roy i Burkhardt 2018). Pretpostavljalo se da relativno niske razine aktinskih filamenata u cSMAC-u čine plazmatsku membranu efektorske stanice pristupačnijom za litičke granule koje treba otpustiti. Međutim, vizualizacija cSMAC-a visoke rezolucije pokazala je da on ipak sadrži značajne količine rezidualnih aktinskih filamenata među kojima postoje male praznine gdje se događa degranulacija. Pokraj tih praznina nalaze se mehanički aktivne izbočine bogate aktinskim filamentima, što ukazuje na to da kortikalni aktin može imati izravnu ulogu u

degranulaciji nego se prethodno smatralo. U nedavno ažuriranom modelu IS-a, degranulaciju vodi dinamično međudjelovanje integrina i aktinskih filamenata (Wang i ostali 2022).



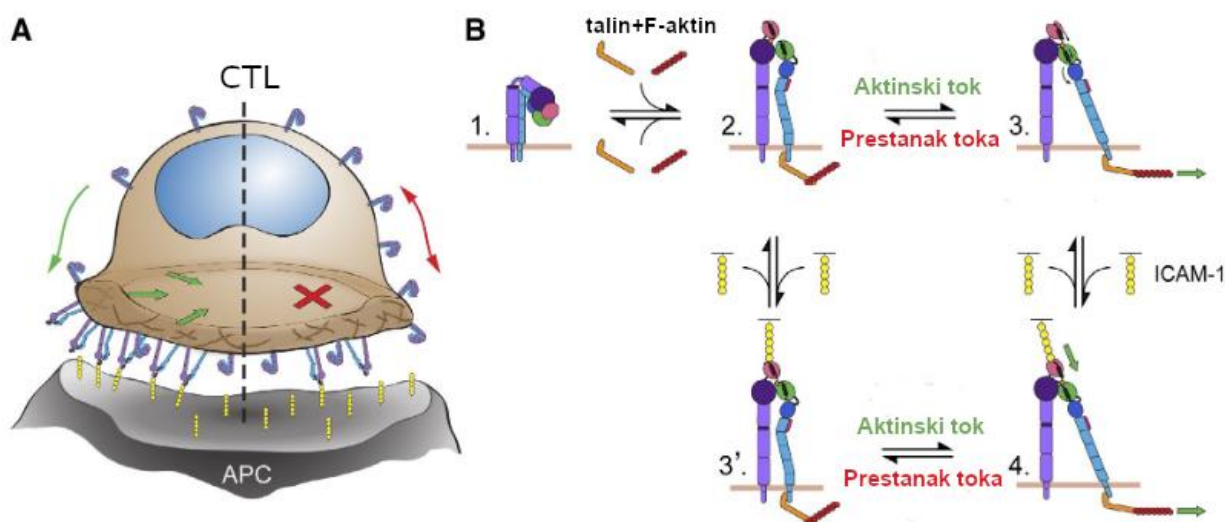
Slika 11. Shematski prikaz zrelog "kanonskog" IS-a između limfocita i APC-a. Žute strelice pokazuju smjer aktinskog retrogradnog toka. IS je podijeljen u distalni, periferni i centralni supramolekularni aktivacijski klaster (dSMAC, pSMAC i cSMAC). Preuzeto i prilagođeno prema Basu i Huse (2017).

2.3.3 Mehanoosjetljivost receptora

Sastav i unutrašnja struktura stanica kontinuirano se mijenjaju u odgovoru na fizikalne i kemijske podražaje iz okoline (Bray 2001). Signalizacijom "izvana prema unutra" (engl. *outside-in*) vezanje liganda za površinski receptor aktivira unutarstaničnu signalizaciju. Obrnuto, signalizacijom "iznutra prema van" (engl. *inside-out*) unutarstanična signalizacija regulira afinitet receptora za ligand (Wang 2012; Huse 2017). Mnogi su stanični receptori koji sudjeluju u aktivaciji limfocita mehanoosjetljivi (Basu i Huse 2017). U IS-u se ponovno ističu integrini, kao što je bio slučaj i u prethodno objašnjenom odgovoru tumorske stanice na povećanu krutost ECM-a (Huang i Ingber 2005; Basu i Huse 2017). Također je poznata mehanoosjetljivost TCR-a i više receptora NK stanica (Wang i ostali 2022). Prema utjecaju sile na njih, veze između receptora mogu se podijeliti na klizave (engl. *slip bonds*) i ulovne (engl. *catch bonds*). Sila smanjuje dugovječnost klizavih veza. S druge strane, ona može povećati dugovječnost ulovnih veza, sve dok ne premaši svoju optimalnu vrijednost. Ukoliko se to dogodi, dugovječnost veze se ponovno smanjuje (Huse 2017).

Kao i drugi integrini, LFA-1 ima nekoliko konformacija različitih afiniteta prema ligandima. Konformaciju regulira signalizacija "iznutra prema van" (Comrie i ostali 2015a). Savinuta konformacija (Slika 12, B, 1) ima slab afinitet za ligande, molekule međustanične adhezije (ICAM, engl. *intercellular adhesion molecules*). ICAM-ovi se nalaze, primjerice, na površini dendritičkih stanica, profesionalnih APC-ova koji aktiviraju limfocite T. Aktivirajući receptori, npr. TCR, signalizacijom dovode talin do β lanca LFA-1, što potiče konformacijsku promjenu nalik na izbacivanje oštrice automatskog noža (engl. *switchblade*) (Slika 12, B, 2). Ova konformacija ima srednje velik afinitet za ligand (Comrie i ostali

2015a; Wang i ostali 2022). Nadalje, aktin stvara vlak koji potiče stvaranje visokoafinitetne ulovne veze LFA-1 s ligandom (Slika 12, B, 3). Konformacija se mijenja i u procesu induciranog pristajanja ICAM-1 (Slika 12, B, 3' i 4), što dodatno pomiče ravnotežu prema visokoafinitetnom obliku (Comrie i ostali 2015a). Osim što je ostvarena snažna povezanost sa ciljnom stanicom, LFA-1 u isto vrijeme stvara kostimulatorne signale za aktivaciju limfocita (Wang i ostali 2022). Dakle, osim što je aktinski retrogradni tok potreban za lokalizaciju LFA-1 u IS-u, on održava konformacije visokog afiniteta prema ligandu (Comrie i ostali 2015a).

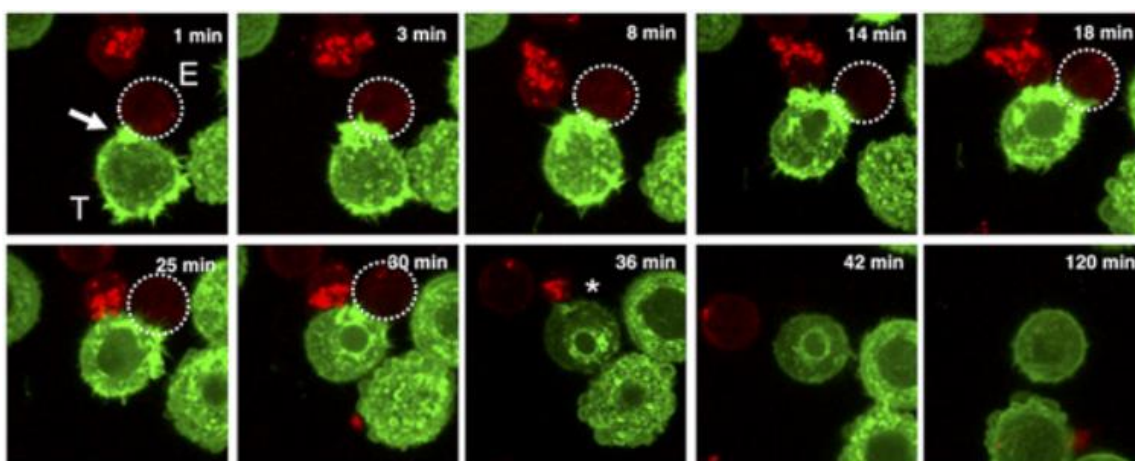


Slika 12. Model aktivacije integrina LFA-1 u IS-u. (A) Aktinski retrogradni tok (zelene strelice) u CTL-u potaknut polariziranim podražaj TCR-a dovodi LFA-1 u IS. U slučaju zaustavljanja retrogradnog toka, neaktivirani LFA-1 pasivno difundiraju dalje od IS-a (crvena strelica). (B) Neaktivirani LFA-1 ima savijenu konformaciju (1) koja se ispružuje vezanjem F-aktina preko talina (2). F-aktin povlači rep β podjedinice LFA-1, što inducira otvorenu konformaciju visokog afiniteta za ICAM-1 (3). Inducirano pristajanje ICAM-1 stabilizira njegovu interakciju s LFA-1 (4). Sazrijevanje LFA-1 može ići i preko intermedijarne konformacije vezane za ICAM-1 (3'). Preuzeto i prilagođeno prema Comrie i ostali (2015a).

Za prelazak u konformaciju visokog afiniteta, povlačne sile na β lancu integrina trebaju protusile na ligandu (Comrie i ostali 2015b). Poznato je da kortikalni aktinski citoskelet regulira lateralnu difuziju u staničnoj membrani, stoga je bilo potrebno promotriti što se s njime događa u APC-u - konkretno, može li od APC-a učiniti stator (Comrie i ostali 2015b; Basu i Huse 2017; Mierke 2018). Vezanje ICAM-1 za aktinski citoskelet smanjuje njegovu lateralnu difuziju na membrani dendritičkih stanica. Ono se ostvaruje preko aktin-vezujućih proteina: moezina i α -aktinina. Smanjenje mobilnosti ICAM-1 pruža povećani otpor silama β lanca LFA-1, što promovira otvorenu konformaciju i čvrsto vezanje ICAM-1 za LFA-1, dovodeći do pojačane aktivacije CTL-a (Comrie i ostali 2015b). Dakle, ova imobilizacija pojačava utjecaj retrogradnog toka aktina u CTL-u, stvarajući jaku protusilu za integrine koji su pod djelovanjem citoskeletnog vlaka (Huse 2017).

2.3.4 Aktinski citoskelet tumorske stanice i imunosti bijeg

Al Absi i ostali (2018) predstavili su prve dokaze aktin-ovisnog bijega tumorskih stanica od NK stanica. U tumorskoj je stanici otkriveno brzo nakupljanje velike količine aktinskih filamenata blizu IS-a koje je nazvano aktinskim odgovorom. Pokazalo se da je povezan sa smanjenim unutarstaničnim razinama granzima B i nižom stopom apoptoze. Korištene su dvije linije stanice raka dojke, od kojih jedna fenotipski nalikuje mezenhimskim stanicama, a druga epitelnim. Stanice nalik mezenhimskim imale su tendenciju aktinskog odgovora unutar prve dvije minute interakcije. Tada im je kortikalna regija u području IS-a sadržavala mnogo više aktinskih filamenata nego suprotni pol, sve do kraja tridesetak minuta duge interakcije s NK stanicom, nakon koje nije došlo do lize (Slika 13). Kod stanica nalik epitelima, aktinski je odgovor uočavan rjeđe i češće je dolazilo do njihove lize. Međutim, amplituda aktinskog odgovora, mjerena postotkom staničnih aktinskih filamenata akumuliranih u području sinapse, bila je relativno slična u svim proučavanim staničnim linijama, bez obzira na fenotip. Nadalje, indukcija EMT-a na jednoj od prethodno promatranih linija značajno je povećala aktinski odgovor i otpornost na NK stanice. Detalji aktinskog odgovora ostali su neistraženi.



Slika 13. Vremenski tijek imunosti sinapse u kojoj je zabilježen tzv. "aktinski odgovor" tumorske stanice (T). Slike su dobivene konfokalnom mikroskopijom. Aktin je u tumorskoj stanici označen zelenom fluorescencijom, dok je membrana efektorske NK stanice (E) obojana crveno. Strelica prikazuje početak aktinskog odgovora, a zvjezdica odvajanje NK stanice, nakon kojeg je uslijedio prestanak aktinskog odgovora. Preuzeto i prilagođeno prema Al Absi i ostali (2018).

Tello-Lafoz i ostali (2021) ispitali su kako aktinski povećana krutost tumorskih stanica utječe na njihovu podložnost eliminaciji od strane CTL-ova i NK stanica. Prostiranje po perivaskularnoj niši nužan je korak metastaze ovisan o MRTF-u. Njegove izoforme, MRTF-A i MRTF-B, vežu se za citoplazmatski G-aktin čija se koncentracija smanjuje pri citoskeletnom rastu. Nakon oslobađanja od G-aktina, ulaze u jezgru i stvaraju komplekse s DNA-vezujućim proteinima. Ovako se potiče ekspresija G-aktina i drugih sastavnica citoskeleta (Tello-Lafoz i ostali 2021). U istraživanju su korištene dvije stanične linije, stanice melanoma i raka dojke. U svakoj od njih promatrani su utjecaji promjena u ekspresiji MRTF-A ili MRTF-B. Očekivano, smanjena ekspresija MRTF-A ili MRTF-B negativno je

utjecala na stvaranje metastaza nakon što su stanice intravenozno injektirane u miševе. Međutim, prekomjerna ekspresija imala je sličan učinak, iako nije uočeno da MRTF-ovi smanjuju proliferaciju stanica. Dakle, rezultati su ukazivali na utjecaj metastatskog mikrookoliša, primjerice CTL-ova i NK stanica. Ubijanje navedenih staničnih linija promatrano je *in vitro*, gdje je u slučaju prekomjerne ekspresije uočena pojačana degranulacija CTL-ova i NK stanica. Također je povećana proizvodnja citokina IFN- γ i čimbenika nekroze tumora (TNF, engl. *tumor necrosis factor*) od strane CTL-ova. Ovo nije bio rezultat povećane ekspresije imunoreceptora. Naime, prekomjerna ekspresija MRTF-A ili MRTF-B povećava količinu F-aktina, a on može stvarati kruta stresna vlakna. AFM-om je izmjerena povećana krutost stanica. Dakle, povećanje krutosti stanice do određene granične vrijednosti povećava njezin metastatski potencijal, a prelaskom te vrijednosti on krene padati zbog ranjivosti prema imunosnim stanicama. Autori navode kako je ranjivost najvjerojatnije rezultat kombinacije biofizičkih i biokemijskih čimbenika (Tello-Lafoz i ostali 2021; Usmani i Mempel. 2021).

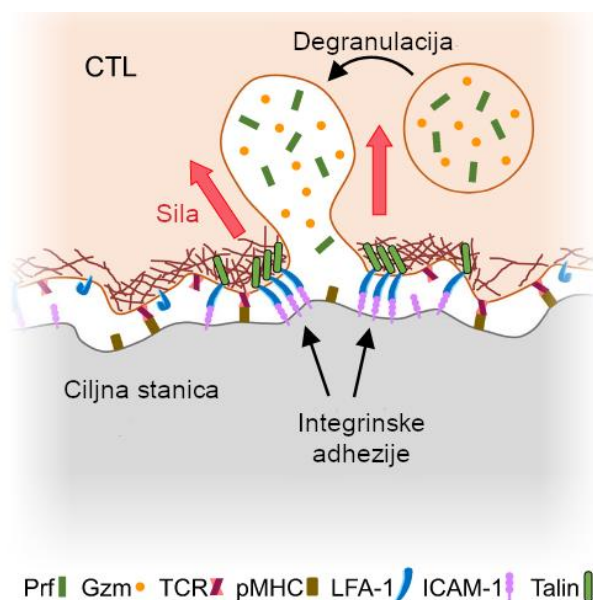
Promatrajući navedena dva istraživanja, moguće je uočiti kako se u oba slučaja radi o povećanoj količini aktinskih filamenata, samo što se u jednom od njih radi o njihovoj brznoj lokalizaciji u području IS-a, a u drugom o opsežnim citoskeletnim promjenama koje mijenjaju oblik cijele stanice. Proglasiti njihove rezultate kontradiktornima moglo bi biti preuranjeno zaključivanje, s obzirom na nepoznate biofizičke parametre područja membrane na kojem se događa aktinski odgovor. Ne zna se jesu li pojedinačni aktinski filamenti, inače malene duljine perzistencije, organizirani u strukture višeg reda koje bi lokalno povećale krutost tumorske stanice (Bray 2001; Alberts i ostali 2017). S obzirom na smanjenje razine granzima B u ciljnim stanicama kod kojih je uočen aktinski odgovor, Al Absi i ostali (2018) predlažu da se radilo o aktinski-posredovanom ometanju ulaska granzima B ili razgradnji granzima B. Kao što je prethodno spomenuto, poznato je da se neki enzimi vežu za aktinske filamente (Bray 2001), što dovodi do pitanja mogu li se na ovaj način novačiti enzimi koji razaraju granzim B. Točna uloga i mehanizam aktinskog odgovora u imunosnom bijegu od NK stanica, kao i reproducibilnost fenomena, ostaju pitanje za buduća istraživanja. Tello-Lafoz i ostali (2021) kao ograničenje svog rada navode mogućnost da MRTF pojačava aktivaciju limfocita promjenom u lateralnoj mobilnosti i/ili klasteriranju površinskih liganda imunosnih receptora. Ostaje i pitanje indukcije drugih gena od strane MRTF-a, koja bi mogla dati krivu sliku o tome što je zapravo uzrokovalo povećanje ranjivosti na citotoksičnost. Također se postavlja pitanje je li prekomjerna ekspresija MRTF-ova adekvatan model stvarnog povećanja u MRTF aktivnosti pri adaptaciji na perivaskularne niše (Usmani i Mempel 2021).

Količina kolesterola u staničnoj membrani još je jedan čimbenik krutosti staničnog korteksa. U membranama različitih tumorskih stanica opažena je povišena količina kolesterola. Smanjenje količine kolesterola rezultira povećanjem krutosti i, još jednom, pojačanim ubijanjem od strane CTL-ova. Unutar CTL-ova uočeno je aktinskih filamenata blizu IS-a, što je bilo povezano s pojačanim staničnim silama kojima CTL-ovi djeluju na ligand-predodnu podlogu. Međutim, pokazalo se da ovaj mehanizam

skrućivanja membrane ima zanemariv utjecaj na degranulaciju ili stvaranje citokina (IFN- γ i TNF- α), sugerirajući različite odgovore CTL-ova ovisno o metodi skrućivanja. Zanimljivo, nije povezan čak niti s Fas receptorom smrti (Lei i ostali 2021).

2.3.5 Mehanistička podloga imunskog bijega ovisnog o aktinu

Sinaptička mehanotransdukcija ne traži samo da efektorska stanica stvara silu, nego i da je ciljna stanica pritom dovoljno sposobna opirati se deformaciji. Drugim riječima, ciljna stanica mora biti dovoljno kruta. Pokazalo se da mehanotransdukcija od LFA-1 do kortikalnog aktinskog citoskeleta mjesno-vremenski kontrolira degranulaciju CTL-ova. Prema novom modelu degranulacije, položaj mehanoosjetljivih integrina određuje permissivna sekretorna mjesta unutar IS-a (tzv. "mehaničko licenciranje") (Slika 14). CTL-ovi integrinima "osjete" da im je ciljna stanica dovoljno blizu i da oslobađanjem litičkih granula ne ugrožavaju okolne stanice. Također, naprezanje membrane ciljne stanice moglo bi olakšati stvaranje perforinskih pora. Neovisno o tome ima li stanica ligande za LFA-1, smanjena ekspresija talina (koji je u fizičkoj vezi s integrinom i aktinom) ometa degranulaciju. To dovodi do pretpostavke da i drugi integrini doprinose ovom procesu. Autori ovog modela predlažu ga kao moguće objašnjenje za povećanu ranjivost krutih stanica raka prema CTL-ovima (Wang i ostali 2022).



Slika 14. Model degranulacije u kojem položaj integrina (LFA-1) određuje permissivna sekretorna mjesta unutar IS-a. TCR se veže za peptid srodan MHC-u (pMHC). Vezanjem LFA-1 za ligand (ICAM-1), CTL može "osjetiti" da mu je ciljna stanica blizu, što povećava preciznost degranulacije i tako štiti okolne stanice. Naprezanje membrane ciljne stanice moglo bi pojačati aktivnost perforina (Prf) koji stvara pore za ulazak granzima (Grz). Preuzeto i prilagođeno prema Wang i ostali (2022).

Tello-Lafoz i ostali (2021) pojasnili su i mogući doprinos aktinskog ograničavanja lateralne mobilnosti površinskih molekula, što su potkrijepili već spomenutim rezultatima koje su objavili Comrie i ostali (2015b). Nadalje, spominju moguću vezu s izvanstaničnim čimbenicima progresije tumora, kao

što je već dobro poznata krutost ECM-a. Ona bi potencijalno mogla povećati MRTF signalizaciju, budući da se to događa s jednim od funkcionalno srodnih mehanotransdukcijskih efektor (Er i ostali 2018; Tello-Lafoz i ostali 2021). Dosadašnje spoznaje ukazuju na to da MRTF signalizacija mora biti precizno regulirana kako bi se uravnotežili njezini oprečni učinci: poticanje metastatskog širenja i olakšana aktivacija imunskih stanica. Održavanje ove ravnoteže predstavljeno je kao mogući mehanizam imunskog bijega (Tello-Lafoz i ostali 2021)

3. ZAKLJUČAK

Stanice raka tijekom metastatske kaskade prolaze kroz opsežne morfološke promjene za koje je velikim dijelom zaslužan aktinski citoskelet. Pojedinačni aktinski filamenti nemaju posebno veliku duljinu perzistencije, ali mogu se povezati u krute strukture višeg reda, npr. stresna vlakna. Krutost stanica raka može biti smanjena remodeliranjem aktinskog citoskeleta, što im vjerojatno pomaže pri migraciji kroz uske prostore. Za prostiranje po perivaskularnoj niši potrebna je MRTF signalizacija koja pak povećava količinu stresnih vlakana u stanici, čineći ju krućom. Ovaj nužni stadij metastatske kaskade smatra se i slabom točkom stanica raka, budući da su krute površine stimulativnije za limfocite. Tijekom degranulacije, limfociti djeluju silom na ciljnu stanicu. Ciljna se stanica pritom treba odupirati deformaciji, tj. mora biti kruta. Ovaj model degranulacije temelji se na interakciji integrina LFA-1 s njegovim ligandom, ali bi i drugi integrini mogli imati sličnu funkciju. Slijedi da za uspješan imunski bijeg stanica raka mora održavati optimalnu razinu MRTF signalizacije kako ne bi postala prekruta. Iako postaje sve jasnije kako mehaničke sile utječu na citotoksično ubijanje, potrebno je još potvrditi širi fiziološki značaj ovog mehanizma u obrani od tumora. Ovo bi mogle komplicirati poteškoće u mehaničkoj karakterizaciji stanica raka i razlike među staničnim tipovima. Svejedno, mehanobiologija pruža zanimljivu perspektivu, podsjećajući na to da je život stanice puno više od mreže biokemijskih puteva.

4. LITERATURA

- Al Absi, Antoun, Hannah Wurzer, Coralie Guerin, Celine Hoffmann, Flora Moreau, Xianqing Mao, Joshua Brown-Clay i ostali. 2018. „Actin Cytoskeleton Remodeling Drives Breast Cancer Cell Escape from Natural Killer-Mediated Cytotoxicity“. *Cancer Research* 78 (19): 5631–43. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0441>.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. New York, NY: Garland Science.
- Alibert, Charlotte, Bruno Goud, Jean-Baptiste Manneville. 2017. „Are Cancer Cells Really Softer than Normal Cells?“ *Biology of the Cell* 109 (5): 167–89. <https://doi.org/10.1111/boc.201600078>.
- Andreis, Igor, Drago Batinić, Filip Čulo, Danka Grčević, Matko Marušić, Milan Taradi, Dora Višnjić. 2010. *Imunologija*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada.
- Aseervatham, Jaya. 2020. „Cytoskeletal Remodeling in Cancer“. *Biology* 9 (11): 385. <https://doi.org/10.3390/biology9110385>.
- Basu, Roshni, Morgan Huse. 2017. „Mechanical Communication at the Immunological Synapse“. *Trends in Cell Biology* 27 (4): 241–54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.10.005>.
- Basu, Roshni, Benjamin M. Whitlock, Julien Husson, Audrey Le Floc’h, Weiyang Jin, Alon Oyler-Yaniv, Farokh Dotiwala i ostali. 2016. „Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing“. *Cell* 165 (1): 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.021>.
- Bergman, Eden, Riki Goldbart, Tamar Traitel, Eliz Amar-Lewis, Jonathan Zorea, Ksenia Yegodayev, Irit Alon i ostali. 2021. „Cell Stiffness Predicts Cancer Cell Sensitivity to Ultrasound as a Selective Superficial Cancer Therapy“. *Bioengineering & Translational Medicine* 6 (3): e10226. <https://doi.org/10.1002/btm2.10226>.
- Bourgot, Isabelle, Irina Primac, Thomas Louis, Agnès Noël, Erik Maquoi. 2020. „Reciprocal Interplay Between Fibrillar Collagens and Collagen-Binding Integrins: Implications in Cancer Progression and Metastasis“. *Frontiers in Oncology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01488>.
- Bray, Dennis. 2001. *Cell Movements: From Molecules to Motility*. Garland Science.
- Canović, Elizabeth P., D. Thomas Seidl, Paul E. Barbone, Michael L. Smith, Dimitrije Stamenović. 2014. „Stiffness versus prestress relationship at subcellular length scale“. *Journal of biomechanics* 47 (12): 3222–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.08.004>.
- Carré, Thibault, Jerome Thiery, Bassam Janji, Stéphane Terry, Gwendoline Gros, Guillaume Meurice, Claudine Kieda, Daniel Olive, Salem Chouaib. 2021. „Selection of tumor-resistant variants following sustained natural killer cell-mediated immune stress“. *Oncology Reports* 45 (2): 582–94. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7872>.

- Chandler, Chelsea, Tianshi Liu, Ronald Buckanovich, Lan G. Coffman. 2019. „The Double Edge Sword of Fibrosis in Cancer“. *Translational Research*, Pathologic fibrosis: disease mechanisms and novel therapeutics, 209 (srpanj): 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.02.006>.
- Charette, Marie de, Aurélien Marabelle, Roch Houot. 2016. „Turning Tumour Cells into Antigen Presenting Cells: The next Step to Improve Cancer Immunotherapy?“ *European Journal of Cancer* 68 (studeni): 134–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.09.010>.
- Comrie, William A., Alexander Babich, Janis K. Burkhardt. 2015. „F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse“. *Journal of Cell Biology* 208 (4): 475–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406121>.
- Comrie, William A., Shuixing Li, Sarah Boyle, Janis K. Burkhardt. 2015. „The Dendritic Cell Cytoskeleton Promotes T Cell Adhesion and Activation by Constraining ICAM-1 Mobility“. *The Journal of Cell Biology* 208 (4): 457–73. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406120>.
- Cooper, Geoffrey M., 2019. *The Cell : A Molecular Approach*. 8. izd. New York: Sinauer Associates, an imprint of Oxford University Press.
- Davis, Daniel M. 2002. „Assembly of the Immunological Synapse for T Cells and NK Cells“. *Trends in Immunology* 23 (7): 356–63. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02243-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02243-3).
- Derynck, Rik, Robert A. Weinberg. 2019. „EMT and Cancer: More Than Meets the Eye“. *Developmental Cell* 49 (3): 313–16. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.026>.
- Diepenbruck, Maren, Gerhard Christofori. 2016. „Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) and Metastasis: Yes, No, Maybe?“ *Current Opinion in Cell Biology*, Differentiation and disease, 43 (prosinac): 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>.
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, Robert D. Schreiber. 2002. „Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape“. *Nature Immunology* 3 (11): 991–98. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
- Dustin, Michael L., Eric O. Long. 2010. „Cytotoxic immunological synapses“. *Immunological reviews* 235 (1): 24–34. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x>.
- Eble, Johannes A., Stephan Niland. 2019. „The Extracellular Matrix in Tumor Progression and Metastasis“. *Clinical & Experimental Metastasis* 36 (3): 171–98. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09966-1>.
- Er, Ekrem Emrah, Maria Tello-Lafoz, Morgan Huse. 2022. „Mechanoregulation of Metastasis Beyond The Matrix“. *Cancer Research*, srpanj, CAN-22-0419. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-22-0419>.
- Er, Ekrem Emrah, Manuel Valiente, Karuna Ganesh, Yilong Zou, Saloni Agrawal, Jing Hu, Bailey Griscom i ostali. 2018. „Pericyte-like Spreading by Disseminated Cancer Cells Activates YAP

- and MRTF for Metastatic Colonization“. *Nature Cell Biology* 20 (8): 966–78.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0138-8>.
- Finn, Olivera J. 2018. „A Believer’s Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy“. *The Journal of Immunology* 200 (2): 385–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701302>.
- Galbraith, Catherine G., Kenneth M. Yamada, Michael P. Sheetz. 2002. „The relationship between force and focal complex development“. *The Journal of Cell Biology* 159 (4): 695–705.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200204153>.
- Gkretsi, Vasiliki, Triantafyllos Stylianopoulos. 2018. „Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis“. *Frontiers in Oncology* 8.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00145>.
- Glyakina, Anna V., Oxana V. Galzitskaya. 2020. „Bioinformatics Analysis of Actin Molecules: Why Quantity Does Not Translate Into Quality?“ *Frontiers in Genetics* 11 (prosinac): 617763.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.617763>.
- Han, Yu Long, Adrian F. Pegoraro, Hui Li, Kaifu Li, Yuan Yuan, Guoqiang Xu, Zichen Gu i ostali. 2020. „Cell swelling, softening and invasion in a three-dimensional breast cancer model“. *Nature physics* 16 (1): 101–8. <https://doi.org/10.1038/s41567-019-0680-8>.
- Haynes, Jennifer, Jyoti Srivastava, Nikki Madson, Torsten Wittmann, Diane L. Barber. 2011. „Dynamic actin remodeling during epithelial–mesenchymal transition depends on increased moesin expression“. *Molecular Biology of the Cell* 22 (24): 4750–64.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e11-02-0119>.
- Huang, Sui, Donald E. Ingber. 2005. „Cell Tension, Matrix Mechanics, and Cancer Development“. *Cancer Cell* 8 (3): 175–76. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.009>.
- Huse, Morgan. 2017. „Mechanical Forces in the Immune System“. *Nature Reviews Immunology* 17 (11): 679–90. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.74>.
- Izdebska, Magdalena, Wioletta Zielińska, Marta Hałas-Wiśniewska, Alina Grzanka. 2020. „Involvement of Actin and Actin-Binding Proteins in Carcinogenesis“. *Cells* 9 (10): 2245.
<https://doi.org/10.3390/cells9102245>.
- Jacobs, C. R., Hayden Huang, Ronald Y. Kwon. 2013. *Introduction to Cell Mechanics and Mechanobiology*. New York: Garland Science.
- Jacquemet, Guillaume, Hellyeh Hamidi, Johanna Ivaska. 2015. „Filopodia in Cell Adhesion, 3D Migration and Cancer Cell Invasion“. *Current Opinion in Cell Biology, Cell adhesion and migration*, 36 (listopad): 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.007>.
- Janssen, Louise M.E., Emma E. Ramsay, Craig D. Logsdon, Willem W. Overwijk. 2017. „The Immune System in Cancer Metastasis: Friend or Foe?“ *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 5 (1): 79.
<https://doi.org/10.1186/s40425-017-0283-9>.

- Kanchanawong, Pakorn, Gleb Shtengel, Ana M. Pasapera, Ericka B. Ramko, Michael W. Davidson, Harald F. Hess, Clare M. Waterman. 2010. „Nanoscale Architecture of Integrin-Based Cell Adhesions“. *Nature* 468 (7323): 580–84. <https://doi.org/10.1038/nature09621>.
- Kitamura, Takanori, Bin-Zhi Qian, Jeffrey W. Pollard. 2015. „Immune Cell Promotion of Metastasis“. *Nature Reviews Immunology* 15 (2): 73–86. <https://doi.org/10.1038/nri3789>.
- Koch, Thorsten M., Stefan Münster, Navid Bonakdar, James P. Butler, Ben Fabry. 2012. „3D Traction Forces in Cancer Cell Invasion“. *PLOS ONE* 7 (3): e33476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033476>.
- Kurzawa, Laetitia, Benoit Vianay, Fabrice Senger, Timothée Vignaud, Laurent Blanchoin, Manuel Théry. 2017. „Dissipation of contractile forces: the missing piece in cell mechanics“. *Molecular Biology of the Cell* 28 (14): 1825–32. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-09-0672>.
- Langley, Robert R., Isaiah J. Fidler. 2011. „The Seed and Soil Hypothesis Revisited-The Role of Tumor-Stroma Interactions in Metastasis to Different Organs“. *International Journal of Cancer* 128 (11): 2527–35. <https://doi.org/10.1002/ijc.26031>.
- Lauffenburger, Douglas A., Alan F. Horwitz. 1996. „Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process“. *Cell* 84 (3): 359–69. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81280-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81280-5).
- Lei, Kewen, Armand Kurum, Murat Kaynak, Lucia Bonati, Yulong Han, Veronika Cencen, Min Gao i ostali. 2021. „Cancer-Cell Stiffening via Cholesterol Depletion Enhances Adoptive T-Cell Immunotherapy“. *Nature Biomedical Engineering* 5 (12): 1411–25. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00826-6>.
- Mariotti, Agnese, Antonella Perotti, Cristiana Sessa, Curzio Rüegg. 2007. „N-cadherin as a therapeutic target in cancer“. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16 (4): 451–65. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.4.451>.
- Martin, Tracey A., Lin Ye, Andrew J. Sanders, Jane Lane, Wen G. Jiang. 2013. „Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective“. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>.
- McDowell, Sheri A. C., Daniela F. Quail. 2019. „Immunological Regulation of Vascular Inflammation During Cancer Metastasis“. *Frontiers in Immunology* 10 (kolovoz): 1984. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01984>.
- Mierke, Claudia Tanja. 2018. *Physics of Cancer, Volume 1: Interplay between tumor biology, inflammation and cell mechanics*. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1753-5>.
- Mierke, Claudia Tanja. 2022. „Mechanical Properties and Architecture of the Extracellular Matrix Influence Cell Migration and Invasion“. *Biophysical Journal* 121 (3): 306a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.1224>.

- Mondal, Chandrani, Julie S. Di Martino, Jose Javier Bravo-Cordero. 2021. „Chapter Three - Actin Dynamics during Tumor Cell Dissemination“. U *International Review of Cell and Molecular Biology*, uredio Clément Thomas i Lorenzo Galluzzi, 360:65–98. Actin Cytoskeleton in Cancer Progression and Metastasis – Part C. Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.09.004>.
- Müller, Mirco, Ralph P. Diensthuber, Igor Chizhov, Peter Claus, Sarah M. Heissler, Matthias Preller, Manuel H. Taft, Dietmar J. Manstein. 2013. „Distinct Functional Interactions between Actin Isoforms and Nonsarcomeric Myosins“. *PLOS ONE* 8 (7): e70636.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070636>.
- Muz, Barbara, Pilar de la Puente, Feda Azab, Abdel K. Azab. 2015. „The Role of Hypoxia in Cancer Progression, Angiogenesis, Metastasis, and Resistance to Therapy“. *Hypoxia*, prosinac, 83.
<https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
- Najafi, Masoud, Bagher Farhood, Keywan Mortezaee. 2019. „Extracellular Matrix (ECM) Stiffness and Degradation as Cancer Drivers“. *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (3): 2782–90.
<https://doi.org/10.1002/jcb.27681>.
- Nelson, David L, Albert L Lehninger, Michael M Cox. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Ortega, Ángel L., Salvador Mena, José M. Estrela. 2010. „Oxidative and Nitrosative Stress in the Metastatic Microenvironment“. *Cancers* 2 (2): 274–304. <https://doi.org/10.3390/cancers2020274>.
- Paluch, Ewa K., Irene M. Aspalter, Michael Sixt. 2016. „Focal Adhesion-Independent Cell Migration“. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32 (listopad): 469–90.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125341>.
- Parsons, Sarah J., J. Thomas Parsons. 2004. „Src Family Kinases, Key Regulators of Signal Transduction“. *Oncogene* 23 (48): 7906–9. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>.
- Paszek, Matthew J., Nastaran Zahir, Kandice R. Johnson, Johnathon N. Lakins, Gabriela I. Rozenberg, Amit Gefen, Cynthia A. Reinhart-King i ostali. 2005. „Tensional Homeostasis and the Malignant Phenotype“. *Cancer Cell* 8 (3): 241–54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.010>.
- Pecorino, Lauren. 2012. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Third edition. Oxford: Oxford University Press.
- Petrie, Ryan J., Kenneth M. Yamada. 2012. „At the leading edge of three-dimensional cell migration“. *Journal of Cell Science* 125 (24): 5917–26. <https://doi.org/10.1242/jcs.093732>.
- Phan, Tri Giang, Peter I. Croucher. 2020. „The Dormant Cancer Cell Life Cycle“. *Nature Reviews Cancer* 20 (7): 398–411. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0>.

- Rheinlaender, Johannes, Hannes Wirbel, Tilman E. Schäffer. 2021. „Spatial Correlation of Cell Stiffness and Traction Forces in Cancer Cells Measured with Combined SICM and TFM“. *RSC Advances* 11 (23): 13951–56. <https://doi.org/10.1039/D1RA01277K>.
- Ritter, Alex T., Karen L. Angus, Gillian M. Griffiths. 2013. „The Role of the Cytoskeleton at the Immunological Synapse“. *Immunological Reviews* 256 (1): 107–17. <https://doi.org/10.1111/imr.12117>.
- Roy, Nathan H., Janis K. Burkhardt. 2018. „The Actin Cytoskeleton: A Mechanical Intermediate for Signal Integration at the Immunological Synapse“. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00116>.
- Schierbaum, Nicolas, Johannes Rheinlaender, Tilman E. Schäffer. 2019. „Combined Atomic Force Microscopy (AFM) and Traction Force Microscopy (TFM) Reveals a Correlation between Viscoelastic Material Properties and Contractile Prestress of Living Cells“. *Soft Matter* 15 (8): 1721–29. <https://doi.org/10.1039/C8SM01585F>.
- Schmalhofer, Otto, Simone Brabletz, Thomas Brabletz. 2009. „E-Cadherin, β -Catenin, and ZEB1 in Malignant Progression of Cancer“. *Cancer and Metastasis Reviews* 28 (1): 151–66. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9179-y>.
- Shankar, Jay, Ivan R. Nabi. 2015. „Actin Cytoskeleton Regulation of Epithelial Mesenchymal Transition in Metastatic Cancer Cells“. *PLoS ONE* 10 (3): e0119954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119954>.
- Stamenović, Dimitrije, Michael L. Smith. 2020. „Tensional Homeostasis at Different Length Scales“. *Soft Matter* 16 (30): 6946–63. <https://doi.org/10.1039/D0SM00763C>.
- Stroka, Kimberly M., Konstantinos Konstantopoulos. 2014. „Physical Biology in Cancer. 4. Physical cues guide tumor cell adhesion and migration“. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306 (2): C98–109. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00289.2013>.
- Tafazzoli-Shadpour, Mohammad, Ehsan Mohammadi, Elham Torkashvand. 2020. „Mechanics of Actin Filaments in Cancer Onset and Progress“. U *International Review of Cell and Molecular Biology*, 355:205–43. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.05.002>.
- Talmadge, James E., Isaiah J. Fidler. 2010. „AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective“. *Cancer Research* 70 (14): 5649–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>.
- Tello-Lafoz, Maria, Katja Sran, Elisa E. Sanchez, Jing Hu, Jan Remsik, Yevgeniy Romin, Annalisa Calò i ostali. 2021. „Cytotoxic Lymphocytes Target Characteristic Biophysical Vulnerabilities in Cancer“. *Immunity* 54 (5): 1037–1054.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.02.020>.
- Trepatt, Xavier, Mireia Grabulosa, Ferranda Puig, Geoffrey N. Maksym, Daniel Navajas, Ramon Farré. 2004. „Viscoelasticity of human alveolar epithelial cells subjected to stretch“. *American Journal*

- of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (5): L1025–34.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00077.2004>.
- Tuomela, Karoliina, Ashley R. Ambrose, Daniel M. Davis. 2022. „Escaping Death: How Cancer Cells and Infected Cells Resist Cell-Mediated Cytotoxicity“. *Frontiers in Immunology* 13 (ožujak): 867098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867098>.
- Usmani, Shariq M., Thorsten R. Mempel. 2021. „Cancer Cells Relax and Resist Cytotoxic Attack“. *Immunity* 54 (5): 853–55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.04.017>.
- Vedula, Pavan, Anna Kashina. 2018. „The makings of the ‘actin code’: regulation of actin’s biological function at the amino acid and nucleotide level“. *Journal of Cell Science* 131 (9): jcs215509. <https://doi.org/10.1242/jcs.215509>.
- Vesely, Matthew D., Robert D. Schreiber. 2013. „Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1284 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1111/nyas.12105>.
- Waelkens, Etienne, Jan Gettemans, Yvette De Ville, Joel Vandekerckhove. 1995. „The Actin-Binding Properties of the Physarum Actin-Fragmin Complex: Regulation by Calcium, Phospholipids, and Phosphorylation (*)“. *Journal of Biological Chemistry* 270 (6): 2644–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2644>.
- Wang, James H-C., Jeen-Shang Lin. 2007. „Cell Traction Force and Measurement Methods“. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 6 (6): 361. <https://doi.org/10.1007/s10237-006-0068-4>.
- Wang, Jia-huai. 2012. „Pull and Push: Talin Activation for Integrin Signaling“. *Cell Research* 22 (11): 1512–14. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.103>.
- Wang, Mitchell S., Yuesong Hu, Elisa E. Sanchez, Xihe Xie, Nathan H. Roy, Miguel de Jesus, Benjamin Y. Winer i ostali. 2022. „Mechanically Active Integrins Target Lytic Secretion at the Immune Synapse to Facilitate Cellular Cytotoxicity“. *Nature Communications* 13 (1): 3222. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30809-3>.
- Wurzer, Hannah, Céline Hoffmann, Antoun Al Absi, Clément Thomas. 2019. „Actin Cytoskeleton Straddling the Immunological Synapse between Cytotoxic Lymphocytes and Cancer Cells“. *Cells* 8 (5): E463. <https://doi.org/10.3390/cells8050463>.
- Xu, Wenwei, Roman Mezencev, Byungkyu Kim, Lijuan Wang, John McDonald, Todd Sulchek. 2012. „Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells“. *PLOS ONE* 7 (10): e46609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046609>.

5. ŽIVOTOPIS

Lana Semenić rođena je 2.6.2000. u Zaboku. Završila je Osnovnu školu Donja Stubica. Potaknuta interesom za prirodne znanosti, obrazovanje je nastavila u Zagrebu, pohađajući XV. gimnaziju. Tijekom školovanja, kontinuirano je postizala rezultate na Državnom natjecanju iz biologije, uključujući prvo i treće mjesto. 2019. upisuje Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sve tri godine studija stekla je STEM stipendiju Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. Sudjelovala je u popularizaciji znanosti u sklopu Noći muzeja 2020. Laboratorijsku stručnu praksu odradila je 2022. u Laboratoriju za staničnu dinamiku Instituta Ruđer Bošković.