

# Kombinirani utjecaj cilengitida i paklitaksela na stanične linije trostruko negativnog tumora dojke i melanoma

---

Supina, Christine

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:527433>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Christine Supina

**Kombinirani utjecaj cilengitida i paklitaksela na  
stanične linije trostruko negativnog tumora  
dojke i melanoma**

Diplomski rad

Zagreb, 2018. godina

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Andreji Ambriović Ristov na upoznavanju sa svijetom znanosti, stručnom vođenju diplomskog rada te na ukazanom povjerenju, strpljenju, motivaciji, riječima podrške i prenesenom znanju!*

*Od srca zahvaljujem i Ani Dekanić na pomoći tijekom izrade diplomskog rada, potpori i vječnom optimizmu koji su radnu atmosferu učinili ugodnom i motivirajućom. Također veliko hvala Dragomiri, Davoru, Mladenu i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala na pomoći, ugodnoj radnoj atmosferi i dobrom društvu.*

*Hvala prijateljima i kolegama na podršci i potpori, a posebno Sonji Valentić na svim savjetima, riješenim problemima i pomoći tijekom svih godina studiranja.*

*Zahvaljujem i svojoj obitelji, posebno mami, tati, sestri, Marti, Ivanu i Matiji na razumijevanju, potpori i bezuvjetnoj ljubavi.*

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **KOMBINIRANI UTJECAJ CILENGITIDA I PAKLITAKSELA NA STANIČNE LINIJE TROSTRUKO NEGATIVNOG TUMORA DOJKE I MELANOMA**

Christine Supina

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb

Integrini su heterodimerni membranski receptori sastavljeni od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice. Integrini  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  su prepoznati kao meta za terapiju tumora prvotno nakon što je otkriveno da su povećano eksprimirani u endotelnim stanicama u angiogenezi, a nakon toga što su eksprimirani na stanicama brojnih tumora. Jedan od dostupnih inhibitora integrina je cilengitid, ciklički Arg-Gly-Asp peptid. Integrini nemaju kinaznu aktivnost, signal u stanici prenose putem protein kinaza, a jedna od najvažnijih je kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK). Cilj ovog rada bio je istražiti kombinirani učinak cilengitida i protutumorskog lijeka paklitaksela na stanične linije trostruko negativnog tumora dojke i melanoma te rasvijetliti ulogu kinaze fokalne adhezije u signalnom putu integrina  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ . Pokazali smo da cilengitid povećava osjetljivost staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke MDA-MB-231 i MDA-MB-436 te melanoma A375, RPMI-7951 i MDA-MB-435S na paklitaksel, dok je u staničnoj liniji trostruko negativnog tumora dojke MDA-MB-468 i staničnoj liniji melanoma MeWo primijećen obrnuti učinak. Također smo pokazali da u stanicama melanoma postoji korelacija između povećanja osjetljivosti na paklitaksel i inhibicije fosforilacije proteina pFAK(Y397), dok u staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke korelacija nije uočena. S obzirom na neobjavljene rezultate grupe u kojoj je ovaj rad izrađen, u kojima je utišavanje integrina  $\alpha\beta$  povećalo osjetljivost pet staničnih linija, a nije smanjilo osjetljivost niti jedne stanične linije na paklitaksel, zaključujemo da je utišavanje integrina  $\alpha\beta$  u kombinaciji s paklitakselom bolja kombinacija koja bi mogla omogućiti bolji učinak terapije ovih tumora.

(55 stranica, 11 slika, 9 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: trostruko negativni tumor dojke, melanom, integrini  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ , cilengitid, paklitaksel, pFAK(Y397)

Voditelj: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica

Suvoditelj: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Inga Marijanović, doc. dr. sc. Ivana Šola, doc. dr. sc. Silvija Černi

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 1. veljače 2018.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

### **COMBINED EFFECT OF CILENGITID AND PACLITAXEL IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER AND MELANOMA CELL LINES**

Christine Supina

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Integrins are heterodimeric membrane receptors composed of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Integrins  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  are recognized as targets for tumor therapy, initially after it has been found to have increased expression in endothelial cells in angiogenesis and later because of increased expression in tumor cells. One of the available integrin inhibitors is cilengitide, a cyclic Arg-Gly-Asp peptide. Integrins do not have kinase activity, the signal in the cell is transmitted via protein kinases, and one of the most important is focal adhesion kinase (FAK). The aim of this graduation thesis was to investigate the combined effect of a specific inhibitor of integrins  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  cilengitide and antitumor drug paclitaxel in triple negative breast cancer and melanoma cell lines and to clarify the role of focal adhesion kinase in the signal pathway of  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  integrins. We have shown that cilengitide increased sensitivity of triple negative breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-436 and melanoma cell lines A375, RPMI-7951 and MDA-MB-435S to paclitaxel, while in triple negative breast cancer cell line MDA-MB-468 and melanoma cell line MeWo we observed the opposite effect. We demonstrated a correlation between increased paclitaxel sensitivity and pFAK(Y397) inhibition in the melanoma cells, while similar correlation was not observed in the triple negative breast cancer cell lines. Given the unpublished results of the group in which this work was performed, in which silencing of integrin  $\alpha v$  increased the sensitivity of five cell lines but did not decrease the sensitivity of any of them to paclitaxel, we conclude that silencing of integrin  $\alpha v$  in combination with paclitaxel is a better combination that could provide better effect in therapy of these tumors.

(55 pages, 11 figures, 9 tables, 55 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central biological library.

Key words: triple negative breast cancer, melanoma, integrins  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$ , cilengitide, paclitaxel, pFAK (Y397)

Supervisor: Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Scientist

Assistant supervisor: Inga Marijanović, PhD, Assistant Professor

Reviewers: Inga Marijanović, PhD, Assistant Professor, Ivana Šola, PhD, Assistant Professor, Silvija Černi, PhD, Assistant Professor

Replacement: Maja Matulić, PhD, Associate Professor

Thesis accepted: February 1<sup>st</sup>, 2018.

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Tumori .....	1
1.1.2. Tumori dojke .....	2
1.1.2.1. Trostruko negativni karcinomi dojke .....	3
1.1.2.2. Terapija trostruko negativnog karcinoma dojke .....	3
1.1.2.3. Stanične linije MDA-MB-231, MDA-MB-468 i MDA-MB-436 kao modeli u istraživanju trostruko negativnih karcinoma dojke .....	5
1.2. Melanomi .....	5
1.2.1. Liječenje melanoma .....	7
1.2.2. Stanične linije RPMI-7951, MeWo i A375 kao modeli u istraživanju melanoma .....	8
1.3. Stanična linija MDA-MB-435S: trostruko negativni karcinom dojke ili melanom? .....	8
1.4. Integrini .....	9
1.4.1. Građa integrina i signalni putevi posredovani integrinima .....	10
1.4.2. Uloga integrina u osjetljivosti stanica tumora na protutumorske lijekove .....	12
1.4.1. Integrin $\alpha\beta3$ .....	14
1.4.2. Integrin $\alpha\beta5$ .....	15
1.5. Inhibitori integrina $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$ .....	16
1.5.1. Cilengitid .....	16
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	18
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	19
3.1. Materijali .....	19
3.1.1. Osnovne kemikalije .....	19
3.1.2. Stanične linije .....	20
3.1.3. Protutijela .....	21
3.1.4. Priprema pufera i otopina .....	21
3.1.5. Uređaji i ostali materijali .....	22
3.2. Metode .....	23
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi .....	23

3.2.2. Presađivanje stanica .....	23
3.2.3. Zamrzavanje stanica .....	24
3.2.4. Odmrzavanje stanica .....	24
3.2.5. Određivanje preživljenja stanica testom MTT .....	24
3.2.6. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE i Western blot .....	26
3.2.7. Određivanje kombiniranog utjecaja cilengitida i protutumorskih lijekova pomoću izračunavanja kombinacijskog indeksa .....	28
3.2.8. Određivanje lokalizacije proteina pFAK (Y397) metodom imunofluorescencije .....	29
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>30</b>
4.1. Cilengitid smanjuje vijabilnost staničnih linija tumora dojke i melanoma .....	30
4.2. Kombinacija cilengitida i paklitaksela ima sinergistički učinak u stanicama MDA-MB-231, MDA-MB-436, RPMI-7951 i A375, antagonistički učinak u stanicama MDA-MB-468 i MeWo i aditivni učinak u stanicama MDA-MB-435S .....	31
4.3. Kombinacija cilengitida i cisplatine ima antagonistički učinak u stanicama MeWo i aditivni učinak u stanicama MDA-MB-435S .....	35
4.4. Kombinacija cilengitida i vinkristina ima antagonistički učinak u stanicama MDA-MB-468 .....	37
4.5. Određivanje aktivacije kinaze fokalne adhezije određivanjem ekspresije pFAK (Y397) u staničnim linijama tumora dojke i melanoma nakon izlaganja cilengitidu .....	39
4.6. Određivanje lokalizacije proteina pFAK (Y397) metodom imunofluorescencije u staničnoj liniji MDA-MB-231 .....	41
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>42</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>50</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>55</b>



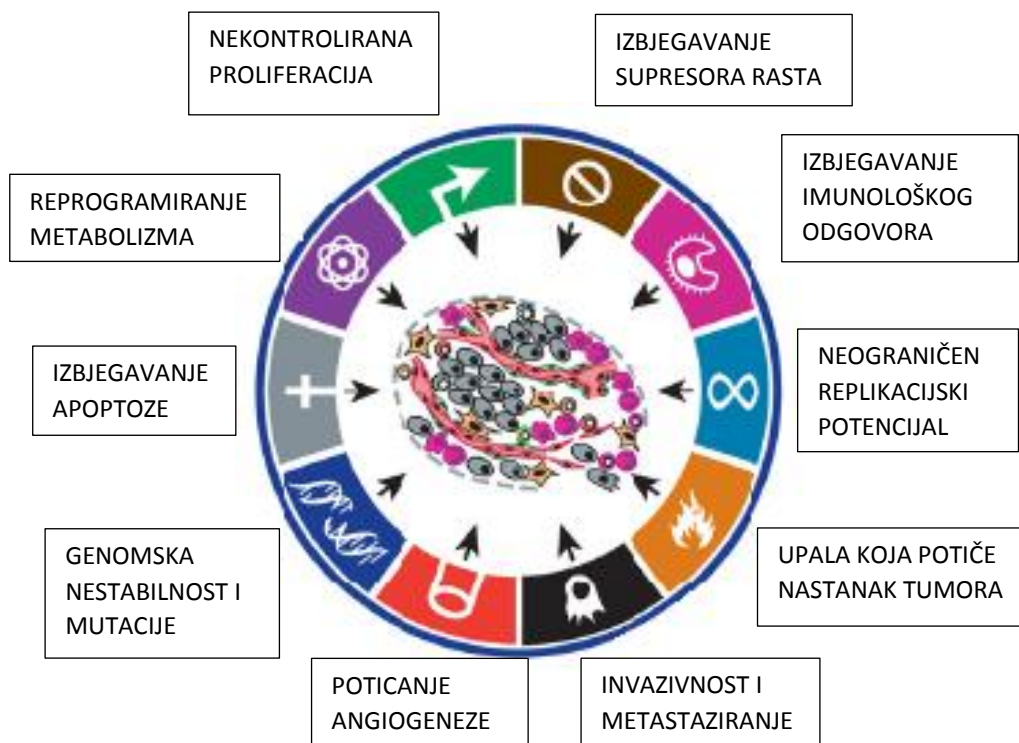
# 1. UVOD

## 1.1. Tumori

Tumor je nakupina stanica koje se nekontrolirano dijele i stvaraju tkivo koje nema fiziološku ulogu. Nastaje kada stanice prestanu obavljati svoju specifičnu ulogu i odgovarati na signale koje primaju iz okoliša. Unatoč tome što je tumor heterogena bolest, Hanahan i Weinberg predložili su 2000. godine model koji se sastoji od šest stečenih obilježja koje dijele sve tumorske stanice. Ova obilježja nazvana su *Hallmarks of Cancer* i uključuju nekontroliranu proliferaciju, izbjegavanje supresora rasta, sposobnost invazije i metastaziranja, neograničeni replikacijski potencijal, promicanje angiogeneze i izbjegavanje apoptoze. Konceptualni napredak u posljednjem desetljeću otkrio je još četiri prepoznatljiva obilježja: genomsku nestabilnost i mutacije, nastanak upale koju promovira tumor, reprogramiranje metabolizma i izbjegavanje imunološkog odgovora (slika 1). Također je dokazano da tumori sadrže repertoar regrutiranih normalnih stanica koje doprinose stjecanju osobina tumora stvaranjem tumorskog mikrookoliša (Hanahan i Weinberg, 2011).

Tumori mogu biti benigni i maligni. Benigni tumor ostaje lokaliziran na mjestu u kojem nastaje i ne metastazira. Maligni tumori pokazuju sposobnost metastaziranja tj. širenja po organizmu. Postoji više od 100 različitih vrsta tumora, koji se prema vrsti tkiva od kojeg su nastali, mogu podijeliti u četiri osnovne grupe: karcinomi (tumori koji nastaju od epitelnih stanica), sarkomi (tumori koji nastaju od mezenhimskih stanica), limfomi i leukemije (tumori koji nastaju od stanica krvi) i tumori koji nastaju od stanica živčanog sustava ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

Tumor nastaje kao rezultat promjena u DNA. Dokazano je da DNA tumorskih stanica sadrži različite promjene, od točkastih mutacija do velikih kromosomskih aberacija kao što su delecije i translokacije. Akumulacija mutacija unutar stanice u vremenu predstavlja jedan od procesa uključenih u tumorigenezu. Dvije su velike skupine mutiranih gena uključenih u proces tumorigeneze: onkogeni i tumor-supresori. Onkogen je mutirani gen čiji proteinski produkt nastaje u prevelikim količinama ili je pojačano aktivan i djeluje dominantno u inicijaciji stvaranja tumora. Tumor-supresor geni kodiraju proteine koji imaju ulogu u inhibiciji staničnog ciklusa. Gubitkom funkcije ovih gena dolazi do gubitka inhibicije rasta i stanica se nekontrolirano dijeli. Za razliku od onkogeni, mutacije u tumor supresorskim genima su recesivne (Pecorino, 2012).



Slika 1. Deset zajedničkih obilježja tumora. Preuzeto i prilagođeno prema Hanahan i Weinberg, 2011.

### 1.1.2. Tumori dojke

Tkivo dojke sastoji se od žlijezda zvanih lobuli, cjevčica ili duktusa, vezivnog tkiva, limfnih čvorova i krvnih žila. Najčešći tip tumora (tj. karcinoma zbog svog podrijetla iz epitelnih stanica) dojke je duktalni koji nastaje umnažanjem stanica duktusa. Karcinom također može nastati iz lobula ili drugih tipova tkiva dojke. Duktalni karcinom *in situ* je stanje u kojem se abnormalne stanice mogu naći na bazi duktusa bez prolaska kroz bazalnu membranu. Karcinom dojke koji se proširio izvan duktusa ili lobula, u kojima je nastao, u okolno tkivo naziva se invazivni karcinom dojke. Karcinom dojke je najučestaliji tip invazivnog karcinoma kod žena i drugi najčešći uzročnik smrtnosti odmah nakon karcinoma pluća. Može se javiti i kod muškaraca, iako je to rijetka pojava ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

Stanice karcinoma dojke imaju receptore na površini, u citoplazmi i jezgri. Kemijski glasnici poput hormona vežu se na receptore što uzrokuje promjene u stanici. Karcinomi dojke klasificiraju se ovisno o tome eksprimiraju li stanice tri važna receptora: estrogenski receptor (ER), progesteronski receptor (PR) i faktor rasta epiderme HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*). Stanice karcinoma dojke koje su pozitivne na estrogenski receptor ovise o estrogenu za rast, pa se mogu liječiti lijekovima koji blokiraju učinke estrogena (npr. tamoksifen) i općenito imaju bolju prognozu. HER2 pozitivni karcinom dojke agresivniji je od ostalih tipova karcinoma, a terapija je monoklonsko protutijelo trastuzumab (u kombinaciji s uobičajenom kemoterapijom), što je značajno poboljšalo prognozu pacijentica oboljelih od ovog tipa karcinoma. Stanice karcinoma dojke koje ne eksprimiraju nijedan od ova tri tipa receptora nazivaju se trostruko negativni karcinomi dojke (Akram i sur, 2017).

Karcinom dojke je heterogena bolest koja se može podijeliti na 5 molekularnih podtipova: luminal A, luminal B, HER2 pozitivni, bazalni i normalni. Podtipovi imaju karakterističan obrazac ekspresije gena, promjene broja kopija DNA (engl. *copy number alterations*, CNAs) i s time povezanim različite kliničke ishode. Podtipovi luminal A i B su ER pozitivni i dijele ekspresijske markere s luminalnim slojem epitelnih stanica u normalnim duktusima dojke. Luminal A tumori su genetski jednostavni i povezani s povoljnim ishodom, dok tumori luminal B pokazuju visoku stopu proliferacije, česte DNA amplifikacije (npr. *8q24/MYC*) i imaju manje povoljnu prognozu. Bazalni tumori dijele ekspresijske markere s bazalnim mioepitelnim slojem normalnih kanala dojke, ER su negativni, pokazuju česte rearanžmane segmenata kromosoma i povezani su s lošim ishodom u većini studija. Podtip HER2 povezan je s ekspresijom gena ko-amplificiranih s *ERBB2* (kodira HER2) na kromosomu 17q12, a normalni podtip dijeli ekspresijski obrazac s normalnim tkivom dojke (Kao i sur, 2009).

#### 1.1.2.1. Trostruko negativni karcinomi dojke

Trostruko negativni karcinom dojke (engl. *triple negative breast carcinoma*, TNBC) jedan je od podtipova karcinoma dojke kojeg karakterizira odsustvo receptora za estrogen, progesteron i HER2. Ne odgovaraju na hormonalnu terapiju (kao što je tamoksifen ili inhibitori aromataze) niti na terapije koje ciljaju HER2 receptore (trastuzumab). Čini oko 15-20% svih dijagnosticiranih karcinoma dojke i karakterizira ga agresivnost te visoka stopa smrtnosti u usporedbi s ostalim karcinomima dojke. Često pogađa žene mlađe od 40 godina s većom incidencijom kod Afroamerikanaca i Latinoamerikanaca u usporedbi s drugim podtipovima karcinoma dojke. Nedavna otkrića su otkrila da je TNBC heterogena bolest na kliničkoj, histološkoj i molekularnoj razini. Napredne tehnologije identificirale su nekoliko molekularnih karakteristika, uključujući inaktivaciju puta BRCA (engl. *breast cancer*), aktiviranje MAP/ERK (eng. *mitogen-activated protein/ extracellular signal-regulated kinase*) i puta PI3K (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*), visoke stope mutacija proteina p53 (engl. *tumor protein p53*), visoku aktivaciju MYC-a i gubitak retinoblastoma proteina (engl. *retinoblastoma protein*, RB), koje su omogućile razvoj novih terapijskih pristupa. Velika većina TNBC-a su invazivni duktalni karcinomi karakterizirani visokim histološkim gradusom, slabom diferencijacijom, središnjom nekrozom, mnogobrojnim limfocitnim infiltratima i visokim stupnjem proliferacije. Pokazuju prepoznatljivu karakteristiku recidiva bolesti s većim rizikom od razvoja metastaza i smrti u usporedbi s drugim podtipovima karcinoma dojke. Ovi tumori preferiraju metastaziranje u pluća i mozak u usporedbi s luminalnim karcinomom dojke koji favorizira metastaziranje u kosti i kožu (Oualla i sur, 2017).

#### 1.1.2.2. Terapija trostruko negativnog karcinoma dojke

Trostruko negativni karcinomi dojke pokazuju osjetljivost na antracikline (npr. doksorubicin), taksane (npr. paklitaksel) i soli platine (karboplatina i cisplatina) koji su dio standardne terapije. Iako generalno pokazuju osjetljivost na kemoterapiju, odgovor na terapiju ne korelira sa ukupnim preživljenjem pacijenata. Rizik od recidiva bolesti u prvih 3-5 godina je za pacijente oboljele od TNBC znatno veći nego za one oboljele od hormonalno pozitivnog karcinoma dojke. Pronalazak optimalne kemoterapije koja će spriječiti nastanak metastaza i poboljšati ukupno preživljenje predstavlja veliki izazov (O'Reilly i sur, 2015).

Nakon kirurškog odstranjenja kemoterapija je još uvijek glavna metoda za liječenje TNBC-a. Klinički pokusi u protekla dva desetljeća pokazuju značajnu korist kemoterapije u neoadjuvantnoj (kemoterapija koja se primijenjuje prije operativnog zahvata kako bi se smanjio tumor), adjuvantnoj (primijenjuje se postoperativno s ciljem uništenja mogućih mikrometastaza zaostalih nakon operativnog zahvata) i metastatskoj terapiji bolesti. Unatoč nedostatku biomarkera i ukupnoj lošoj prognozi, pacijentice s TNBC imaju bolji odgovor na kemoterapiju od pacijenata s drugim vrstama karcinoma dojke, što se naziva TNBC paradoksom zbog visokog rizika od recidiva bolesti u razdoblju kada se terapija ne koristi, ali i veće vjerojatnosti koristi primijenjene terapije (Bianchini i sur, 2017).

Lijekovi na bazi platine, poput cisplatine i karboplatine, formiraju kovalentne veze preko atoma platine i dovode do unakrsnog povezivanja lanaca DNA stvarajući adukte koji aktiviraju apoptozu specifično u stanicama koje ne mogu učinkovito popraviti ove lezije. Cisplatina je molekula topiva u vodi koja sadrži atom platine vezan na četiri funkcionalne skupine. Klinički dokazi povećane osjetljivosti TNBC na agense koji oštećuju DNA u usporedbi s drugim podtipovima utvrđeni su prije više od deset godina. *BRCA1* i *BRCA2* su tumor supresor geni koji su izravno uključeni u popravak dvostrukih lomova DNA homolognom rekombinacijom, a mutacije u ovim genima dovode do nepravilnog popravka DNA i posljedično genomskom nestabilnošću. Kao rezultat toga, žene s germinalnim mutacijama u tim genima predisponirane su za nasljedne sindrome karcinoma, uključujući karcinom dojke i jajnika. Karcinom dojke koji nastaje zbog nasljedne mutacije u *BRCA1* genu pokazuje trostruko negativni fenotip u više od 75% slučajeva. Razumijevanje nedostataka mehanizama popravka DNA omogućilo je razvoj novih terapijskih pristupa za TNBC zbog njihove povećane osjetljivosti na agense koji oštećuju DNA, uključujući soli platine i inhibitore poli-ADP-ribozne polimeraze (engl. *poly ADP-ribose polymerase*, PARP) (Oualla, 2017).

Zahvaljujući svom osebujnom mehanizmu djelovanja, taksani su među najučinkovitijim protutumorskim agensima koji se koriste u liječenju višestrukih solidnih tumora. Paklitaksel je odobren 1994. godine od strane FDA (*Food and Drug Administration*) za liječenje metastatskog karcinoma dojke u bolesnika kod kojih je bolest napredovala nakon kombinirane kemoterapije na bazi antraciklina ili onih koji su pokazali recidiv bolesti nakon adjuvantne terapije (Anampa i sur, 2015). Izoliran je iz biljke vrste *Taxus brevifolia*, a djeluje tako da se veže na mikrotubule i potiče njihovu stabilizaciju inhibicijom depolimerizacije, što dovodi do zaustavljanja mitoze i nepravilne segregacije kromosoma. Mnoge studije otkrivaju prednosti korištenja paklitaksela u kombinaciji s drugim kemoterapijskim sredstvima za liječenje uznapredovalog karcinoma dojke, a najveći broj studija proveden je za kombinaciju paklitaksela i doksorubicina kao terapije prvog reda. Dokazano je da su TNBC osjetljiviji na terapiju paklitakselom i doksorubicinom od luminalnih i normalnih podtipova karcinoma dojke (Rouzier i sur, 2005). U analizi gdje je paklitaksel dodan ciklofosfidu i doksorubicinu u pacijenata s metastatskim karcinomom dojke opaženo je povećanje ukupnog preživljenja pacijenata (Hayes i sur, 2007).

S obzirom na heterogenost TNBC-a, personalizirane strategije liječenja koje ciljaju molekularne tumor-specifične promjene bile bi najprikladnije za učinkovito liječenje 60-70% pacijenata s TNBC koji ne reagiraju potpuno na kemoterapiju. Čak 90% TNBC koji zaostaju nakon kemoterapije sadrže promjene u putevima koji su potencijalna meta agenasa koji su trenutno u fazi kliničkih ispitivanja, kao što su inhibitori PARP-a, PI3K, MEK kinaze (engl.

*mitogen-activated protein kinase*) i histonskih deacetilaza (engl. *histone deacetylases*, HDAC) (Bianchini i sur, 2017).

### 1.1.2.3. Stanične linije MDA-MB-231, MDA-MB-468 i MDA-MB-436 kao modeli u istraživanju trostruko negativnih karcinoma dojke

Stanična linija MDA-MB-231 je linija trostruko negativnog karcinoma dojke čovjeka koja je dobivena iz pleuralne tekućine 51-godišnje pacijentice s metastatskim adenokarcinomom i jedna je od najčešće korištenih staničnih linija u istraživanjima. Ključne karakteristike stanične linije MDA-MB-231 su visoka agresivnost, invazivnost i slaba diferenciranost. Slično kao i ostale invazivne stanične linije karcinoma, invazivnost stanične linije MDA-MB-231 posredovana je proteolitičkom degradacijom izvanstaničnog matriksa. U 3D kulturi pokazuje morfologiju nalik endotelu, a s obzirom na invazivni fenotip na krajevima sadrži zvjezdane projekcije koje često povezuju mnogobrojne stanične kolonije (ECACC catalogue 92020424). Analizom genske i proteinske ekspresije utvrđeno je da stanična linija MDA-MB-231 sadrži heterozigotnu mutaciju u genima *BRAF* i *KRAS* te homozigotnu mutaciju u genima *p14 ARF*, *p16* i *p53* (Hollestelle i sur, 2009).

Stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke čovjeka MDA-MB-468 izolirana je 1977. godine iz pleuralne tekućine 51-godišnje pacijentice. *In vitro* se ova stanična linija često koristi u istraživanjima signalnog puta EGF (engl. *epidermal growth factor*), s obzirom na to da pokazuje amplifikaciju gena *EGFR* (engl. *epidermal growth factor receptor*) i visoku ekspresiju proteina EGFR, što je rijedak slučaj koji se javlja u samo 1–6% svih karcinoma dojke. Ova stanična linija pokazuje iznimnu aktivnost u testovima invazije i kemotaksije. Sposobna je rasti na agarozu, što je pokazatelj transformacije i tumorigenosti te pokazuje relativno visoku učinkovitost stvaranja kolonija. U kulturi ove stanice imaju obrazac rasta nalik grozdastim klasterima (Chavez i sur, 2012). Osim amplifikacije EGFR-a, stanična linija sadrži homozigotnu mutaciju u genima *p53*, *PTEN* i *RB* (Hollestelle i sur, 2009).

Stanična linija MDA-MB-436 je linija trostruko negativnog karcinoma dojke čovjeka izolirana 1976. godine iz pleuralne tekućine 43-godišnje pacijentice. Stanična linija je pleomorfna i pokazuje iznimnu aktivnost u *in vitro* testovima invazije i kemotaksije. MDA-MB-436 stanična linija je, kao i MDA-MB-468, sposobna rasti na agarozu. Zanimljiva je za istraživanja jer ima homozigotnu deleciju *BRCA1* gena te homozigotnu mutaciju u genima *p53* i *RB* (Hollestelle i sur, 2009).

## 1.2. Melanomi

Melanom je maligni tumor melanocita, stanica koje proizvode pigment melanin te potječu iz neuralnog grebena. Iako se većina melanoma pojavljuje na koži, također mogu nastati na površini sluznica ili na drugim mjestima na koje migriraju stanice neuralnog grebena, uključujući i uvealni trakt. Uvealni melanomi značajno se razlikuju od kožnog melanoma u učestalosti, prognostičkim čimbenicima, molekularnim svojstvima i liječenju ([www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/)).

Rak kože, uključujući maligni melanom (engl. *malignant melanoma*, MM) i ne-melanomski rak kože (engl. *non-melanoma skin cancer*, NMSC) predstavlja najčešću malignu bolest bijele populacije. Učestalost oba tipa raka kože je u porastu, s godišnjim povećanjem od 0,6% kod odraslih osoba starijih od 50 godina. NMSC uključuje Bowenovu bolest, karcinom bazalnih stanica (engl. *basal cell carcinoma*, BCC) i karcinom pločastih stanica (engl. *squamous cell carcinoma*, SCC). Učestalost NMSC-a je kod bijelaca viša za čak 18-20 puta od MM-a. Epidemiologija NMSC-a vezana je za određena geografska područja i starost populacije koja je glavni rizični čimbenik za nastanak ovog tipa raka kože. Istraživanja su također otkrila važnu ulogu povećane profesionalne i rekreacijske izloženosti UV zračenju kao jednog od glavnih rizičnih faktora (Apalla i sur, 2016).

Određivanje kliničkog stadija tumora temelji se na određivanju proširenosti tumora na regionalne limfne čvorove i na udaljena mjesta. Za melanom koji je ograničen na primarno mjesto nastanka, rizik za nastanak metastaza u limfnom čvoru ili sistemskih metastaza povećava se kako debljina i dubina lokalne invazije raste, što pogoršava prognozu. Melanom se može širiti lokalnim ekstenzijama limfogeno ili hematogeno do udaljenih mjesta. Bilo koji organ može biti uključen u metastaziranje, a pluća i jetra su uobičajena mjesta. Stadij malignog melanoma određuje se histološkim mjerenjem vertikalne debljine tumora izražene u milimetrima (Breslow klasifikacija) i anatomskim mjerenjem razine lokalne invazije (Clarkova klasifikacija). Debljina tumora, tj. klasifikacija po Breslowu, više je reproducibilna i preciznije predviđa ponašanje malignog melanoma ([www.ncbi.nlm.gov/books/NBK66034/](http://www.ncbi.nlm.gov/books/NBK66034/)).

Molekularni mehanizmi uključeni u patogenezu malignih melanoma se intenzivno istražuju i u posljednjih desetak godina razvijeni su novi terapijski pristupi. Molekularne mete za terapiju uglavnom su prepoznate u signalnom putu RAS-RAF-MEK-ERK te u regulatornim molekulama imunskog odgovora uključenim u supresiju imunskog odgovora na tumore, kao što su T-limfocit-povezani antigen 4 (engl. *T-lymphocyte-associated antigen 4*, CTLA4), protein programirane stanične smrti (engl. *programed cell death protein 1*, PD-1) i njegov ligand (PD-L1). Ciklin-ovisni inhibitor kinaze 2A (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, CDKN2A) kodira dva proteina: p16<sup>CDKN2A</sup> i p14<sup>CDKN2A</sup>. CDKN2A je tumor supresorski gen, a mutacije u tom genu su 7-10 puta češće kod pacijenata s obiteljskom anamnezom melanoma, u usporedbi s velikom većinom pacijenata sa sporadično nastalim melanomom. U fiziološkim uvjetima, sustav p16<sup>CDKN2A</sup> inhibira kompleks ciklin-ovisne protein kinaze 4 (engl. *cyclin-dependent kinase 4*, CDK4) i ciklina D1 (kodiran genom *CCND1*), što utječe na napredovanje staničnog ciklusa ovisno o proteinu RB. Dvije glavne promjene u ovom signalnom putu opisane u melanomu su inaktivacija p16<sup>CDKN2A</sup> i amplifikacija *CCND1*. Inaktivacija proteina p16<sup>CDKN2A</sup> uzrokovana je genetskim ili epigenetskim mehanizmima, a amplifikacija gena *CCND1* se uglavnom pojavljuje u melanomima negativnim za mutacije u genima *BRAF* i *NRAS* (Palmieri i sur, 2015).

Proteini NRAS i BRAF pripadaju putu prijenosa signala putem mitogen-aktiviranih protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) koje posreduju u odgovoru stanica na izvanstanične mitotske signale i imaju glavnu ulogu u reguliranju rasta, preživljenja i proliferacije stanica. Produkti *RAS* genske obitelji mali su proteini vezani za membranu, s tri tkivno-specifične izoforme: HRAS, KRAS i NRAS. Među njima, mutacije NRAS su najčešće u melanomu. NRAS može aktivirati specifične citoplazmatske proteine nizvodno kao što su RAF i PI3K. Obitelj RAF kinaza sastoji se od tri proteina (ARAF, BRAF i CRAF), čija aktivacija ovisi o

stvaranju kompleksa između različitih izoformi. Sva tri proteina sudjeluju u prijenosu signala unutar puta MAPK. U melanocitima, BRAF potiče aktivaciju MEK kinaze, koja aktivira ERK, konačni efektor MAPK kaskadnog puta. Kod melanoma, gen BRAF je mutiran u 40-60% slučajeva. Najčešća mutacija prisutna u oko 90% slučajeva je zamjena glutaminske kiseline valinom na kodonu 600 (*BRAF V600E*). Mutacija *V600E*, kao i preostale mutacije u BRAF kinaznoj domeni, izazivaju stalnu stimulaciju proliferacije stanica i rast tumora aktivirajući fosforilaciju ERK-a (Palmieri i sur, 2015).

### 1.2.1. Liječenje melanoma

Kirurško odstranjivanje melanoma koji nije metastazirao vodi prema izlječenju. Stoga liječenje melanoma zapravo podrazumijeva liječenje metastatskog melanoma. Otkrivanje pametnih lijekova koji ciljaju specifične promjene u stanicama melanoma omogućilo je nove pristupe terapiji. U pacijenata s metastatskim BRAF-mutiranim melanomom inhibitori onkogenog BRAF-a, npr. Vemurafenib, odobren od strane FDA 2011. godine, imaju privremenu terapijsku učinkovitost zbog razvoja otpornosti na primijenjeni inhibitor. Stoga je kombinacija BRAF i MEK inhibitora, čija se ciljna molekula MEK nalazi nizvodno od BRAF, predložena kao novi terapijski standard pokazujući poboljšanje konačnog ishoda u odnosu na korištenje jednostrukog inhibitornog agensa.

Dokazano je da monoklonska protutijela usmjerena protiv kontrolnih točaka imunskog odgovora, kao što su CTLA-4 (ipilimumab), PD-1 (nivolumab i pembrolizumab) ili PD-L1, postižu trajne protutumorske odgovore s značajno produljenim ukupnim preživljenjem pacijenata s metastatskim melanomom ([www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/)).

Melanom koji sadrži mutaciju u proteinu NRAS trenutno nema odobrenu ciljanu terapiju, a pacijenti s metastatskom bolesti primaju terapije usmjerene protiv kontrolnih točaka imunskog odgovora kao početni tretman, nakon čega slijedi terapija protutumorskim lijekovima. Od dostupnih protutumorskih lijekova se za liječenje metastatskog melanoma koriste alkilirajući agensi (dakarbazin ili temozolomid), analozi platine (cisplatina i karboplatina) i otrovi mikrotubula (paklitaksel i vinkristin) (Bhatia i sur, 2009). Primarna svrha korištenja dakarbazina je uglavnom palijativna. Temozolomid, analog dakarbazina, prodire u CNS (engl. *central nervous system*) i može potencijalno spriječiti ili liječiti metastaze melanoma u mozgu.

Mikrotubuli, polimeri sastavljeni od ponavljajućih podjedinica  $\alpha$  i  $\beta$  tubulina te njihova dinamika nužni su za pravilno odvijanje mitoze i kao takvi predstavljaju metu za ciljanje protutumorskim lijekovima. Biljni alkaloidi, vinkristin i vinblastin, vežu se na tubulin i sprječavaju sastavljanje mikrotubula, za razliku od paklitaksela koji se veže na podjedinicu  $\beta$ -tubulina i stabilizira mikrotubule sprječavajući depolimerizaciju. Dakle, u liječenju melanoma mogu se koristiti dvije suprotstavljene strategije za narušavanje pravilnog funkcioniranja mitotskog vretena (Pecorino, 2012).

### 1.2.2. Stanične linije RPMI-7951, MeWo i A375 kao modeli u istraživanju melanoma

Stanična linija RPMI-7951 je linija malignog melanoma čovjeka, izolirana 1971. godine iz limfnog čvora 18-godišnje pacijentice. Stanice rastu prihvaćene na podlogu, morfološki nalikuju normalnim epitelnim stanicama te rastu u pojedinačnim slojevima. Stanična linija sadrži mutacije u genima *BRAF*, *CDKN2A*, *PTEN* i *TP53*.

Stanična linija melanoma MeWo izolirana je iz limfnog čvora 78-godišnjeg pacijenta s metastatskim melanomom. Stanice rastu pričvršćene na podlogu i imaju morfologiju nalik fibroblastima. Sadrži mutacije u genima *CDKN2A* i *TP53*.

Stanična linija A375 je najčešće korištena u istraživanju melanoma, a izolirana je iz kože 54-godišnje pacijentice. Stanice su nalik epitelnim stanicama i u kulturi rastu pričvršćene za podlogu. Stanice sadrže homozigotnu mutaciju gena *BRAF* i *CDKN2A*.

### 1.3. Stanična linija MDA-MB-435S: trostruko negativni karcinom dojke ili melanom?

MDA-MB-435S stanična linija izvorno je dobivena iz pleuralne tekućine pacijentice oboljele od tumora dojke 1976. godine i od tada je u upotrebi u laboratorijima širom svijeta kao model tumora dojke čovjeka. Međutim, studije genske ekspresije melanoma i karcinoma dojke pokazali su uočljive sličnosti MDA-MB-435S stanica s postojećim staničnim linijama melanoma. Dokazi da ekspimiraju različite gene specifične za melanocite, kao što su S100 i tirozinaza, koji su klinički markeri za dijagnosticiranje ljudskih melanocitnih tumora, potaknuli su kontroverzu o pravom podrijetlu MDA-MB-435S stanica i otkrile nekoliko mogućnosti (Prasad i Gopalan, 2015). Jedna mogućnost je da su stanice karcinoma dojke nediferencirane i ekspimiraju markere diferencijacije melanocita, a druga da je MDA-MB-435S stanična linija zapravo melanomska koja je nekako slučajno kontaminirana i koja je prerasla originalnu staničnu liniju (Chavez i sur, 2012). U skladu s tom mogućnosti, Rae i sur. su u iscrpnoj studiji, primjenjujući cijeli set molekularnih tehnika, pružili dokaz da su MDA-MB-435S stanice identične M14 melanomskoj staničnoj liniji, što implicira pogrešnu upotrebu stanične linije kao modela za karcinom dojke.

Nedavno je objavljen rad koji dokazuje da je stanična linija MDA-MB-435S zapravo pogrešno identificirana melanomska stanična linija M14. Istraživanje se provelo na originalnim uzorcima melanomske stanične linije M14, limfoblastoidnoj staničnoj liniji ML14 dobivenoj iz istog donora i serumu donora. Kroz niz molekularnih obilježja, uključujući STR i citogenetsku analizu, dokazano je da uzorci staničnih linija M14 i MDA-MB-435 odgovaraju krioprezerviranim uzorcima stanične linije M14 iz 1975. godine, limfoblastoidnoj staničnoj liniji ML14 te donorovom STR profilu, spolu i krvnoj grupi. Dokazano je da je stanična linija M14 bila u kulturi najmanje 6 mjeseci prije uspostavljanja kulture stanične linije MDA-MB-435. M14 stanična linija dobivena je 1975. godine od 33-godišnjeg pacijenta krvne grupe O s metastatskim melanomom, dok je stanična linija MDA-MB-435 dobivena od 31-godišnje pacijentice s metastatskim karcinomom dojke i kultura je uspostavljena 1976. godine. Napravljena je analiza izolirane DNA iz stanične linije M14 koja je pokazala deleciju jednog baznog para na nukleotidu 261, uobičajenu za osobe krvne grupe O, kao i mutaciju *BRAF* (V600E) koja je prisutna u 50-70% slučajeva melanoma. Analizirani su STR profili staničnih



linija M14 i ML14 te je usporedba 16 lokusa sa serumom donora rezultirala podudaranjem od 95% za ML14 i 93% za M14 staničnu liniju. Također usporedba 16 lokusa seruma donora pokazala je podudarnost od 87% za MDA-MB-435 i 85% za MDA-MB-435S staničnu liniju, što dokazuje da svi uzorci imaju zajedničko podrijetlo. Citogenetskom analizom dokazano je da M14 stanična linija sadrži Y/22 kromosomsku translokaciju, kao i stanična linija MDA-MB-435S koja je također pokazala pristunost dva X kromosoma. Za razliku od M14, stanična linija ML14 sadrži normalni Y kromosom. Ovaj rad definitivno pokazuje da je M14 autentična stanična linija i da je MDA-MB-435 pogrešno identificirana (Korch i sur, 2018).

Razlog zašto su stanice MDA-MB-435S uključene u istraživanje je specifičan profil  $\alpha$ v integrina, točnije snažna ekspresija samo integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 i  $\alpha$ v $\beta$ 5, bez ekspresije integrina  $\alpha$ v $\beta$ 1, što omogućuje jasnije zaključivanje o važnosti svakog od njih pojedinačno.

#### 1.4. Integrini

Integrini su heterodimerni membranski receptori građeni od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica koji posreduju interakciji između stanica i vezanju stanica na komponente izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM). Najmanje 24 različita heterodimera integrina nastaje kombinacijom 18 $\alpha$  i 8 $\beta$  podjedinica. Osim njihove uloge u adheziji, vezanje integrina s glikoproteinima izvanstaničnog matriksa pokreće niz unutarstaničnih signala i regulira veliki broj staničnih funkcija, uključujući migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (Srichai i Zent, 2010). Mnoge vrste normalnih stanica ovise o pravilnom vezanju ECM-a i integrina za preživljavanje. U eksperimentima stanične kulture, pokazalo se da nedostatak vezanja endotelnih i epitelnih stanica na odgovarajući protein ECM-a inducira oblik apoptoze nazvan anoikis (Aoudjit i Vuori, 2012). Različite vrste integrina mogu se razvrstati ovisno o tome na koju se komponentnu izvanstaničnog matriksa ili ligand vežu. Razlikuju se četiri skupine receptora: receptori laminina ( $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 7 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 6 $\beta$ 4), leukocitni specifični integrini ( $\beta$ 2 potporodica,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 i  $\alpha$ E $\beta$ 7), receptori kolagena ( $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 10 $\beta$ 1,  $\alpha$ 11 $\beta$ 1) i receptori RGD ( $\alpha$ v $\beta$ 1,  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5,  $\alpha$ v $\beta$ 6,  $\alpha$ v $\beta$ 8,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 11 $\beta$ 3) koji prepoznaju slijed arginin-glicin-aspartat (RGD), motiv pronađen u mnogim proteinima ECM-a kao što su fibronektin, kolagen, vitronektin, osteopontin i trombospondin. Članovi RGD-vezujuće podskupine vrlo su značajni u angiogenezi te se smatraju jednim od najvažnijih integrinskih meta za otkrivanje novih lijekova (Ahmedah i sur, 2017). Obitelj  $\beta$ 1 integrina ekspimirana je na velikom broju različitih tipova stanica i predstavlja glavnu skupinu integrina koji posreduju u interakciji stanica s proteinima ECM-a. Integrini  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 su glavni kolagenski receptori,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 vežu fibronektin, a  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 su receptori za laminine (Srichai i Zent, 2010).

Vezanjem integrina na proteine izvanstaničnog matriksa dolazi do nakupljanja proteina s unutrašnje strane stanične membrane i stvaranja visokoorganiziranih kompleksa proteina koji se nazivaju fokalne adhezije. Ti kompleksi ne djeluju samo kao strukturne veze između ECM-a i aktinskog citoskeleta, nego i kao mjesta prijenosa signala od ECM-a do unutarstaničnih signalnih putova. Iako integrinima nedostaje kinazna aktivnost, vezanjem za ligande i stvaranjem fokalnih adhezija regrutiraju i aktiviraju kinaze, kao što su kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK), kinaza povezana sa integrinima (engl. *integrin-linked kinase*, ILK) i Src kinaze. Također povezuju ECM s aktinskim citoskeletom regrutiranjem proteina, uključujući talin, paksilin,  $\alpha$ -aktinin, tenzin i vinkulin (Desgrosellier i

Cheresh, 2010). Sposobnost integrina da reguliraju apoptozu moguća je zbog njihove sposobnosti da aktiviraju signalne putove preživljenja, nizvodno od citoplazmatskih proteinskih kinaza, u koje su uključeni fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) i serin/treoninska kinaza AKT, kao i mitogen-aktivirana protein kinaza/izvanstanično regulirana kinaza MAPK/ERK (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase*). Signalni događaji kojima integrini aktiviraju ove puteve preživljenja složeni su i mogu biti tkivno-specifični, a pokazalo se da je dvojni kinazni kompleks FAK/Src uključen u njihovu aktivaciju (Aoudjit i Vuori, 2012).

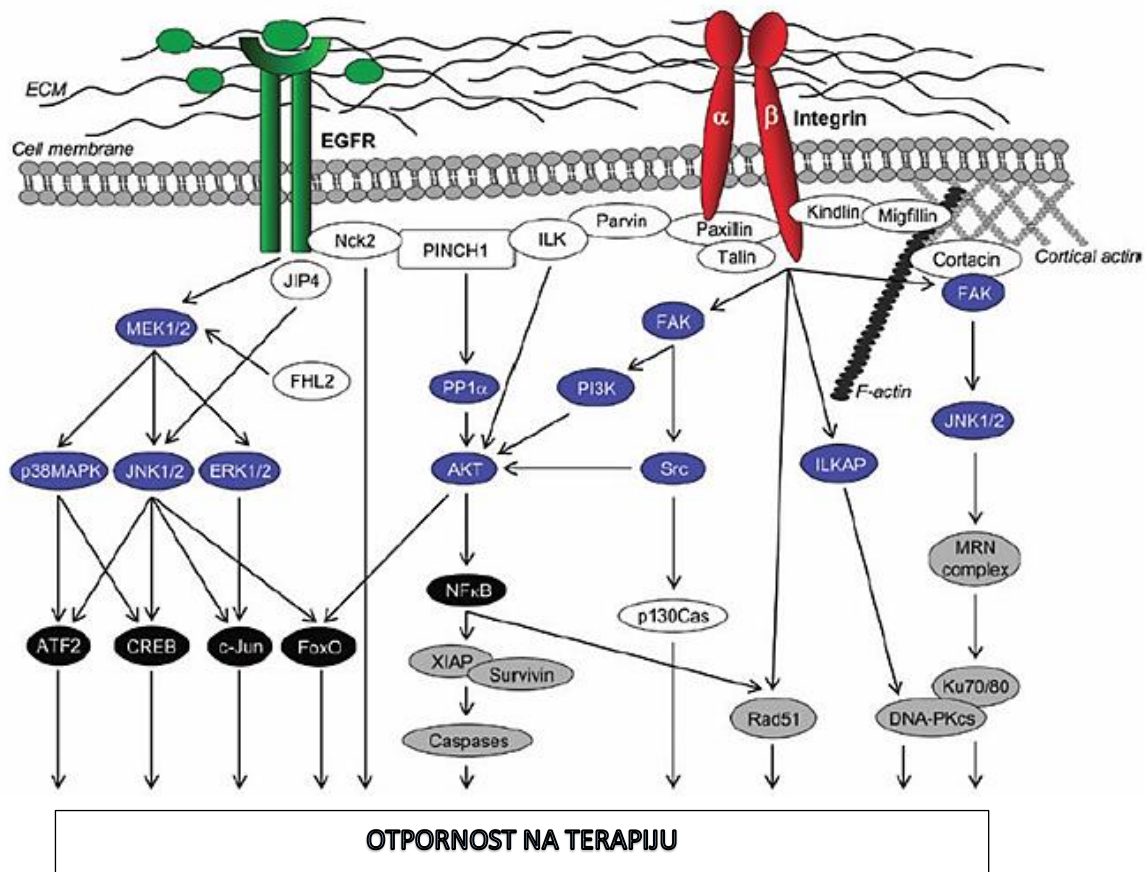
Integrini su dvosmjerne signalne molekule. Signalizacija iz izvanstaničnog okoliša u citoplazmu (engl. *outside-in signaling*) omogućuje prenošenje signala u stanicu, nakon vezanja liganda, kako bi modulirali stanične odgovore uključujući adheziju, širenje, migraciju, preživljavanje i invaziju. Vezanje integrina i liganda dovodi do stvaranja kompleksa koji utječu na intramolekularne interakcije unutar skupine proteina vezanih na integrinske citoplazmatske domene i povezivanje s citoskeletom. S druge strane, aktivno stanje integrina regulirano je signalima iz citoplazme (engl. *inside-out signaling*) tj. odnosi se na unutarstanične signalne putove koji reguliraju proteinske interakcije na citoplazmatskim domenama, koje mijenjaju konformaciju integrina i time afinitet. U normalnom neaktivnom stanju, izvanstanične domene integrina nisu vezane za ligande i nalaze se u zatvorenoj konformaciji. Aktivacijski signali unutar stanice potiču otvaranje izvanstaničnih domena i stabiliziraju aktivnu konformaciju koja izlaže vanjsko mjesto za vezanje liganda, omogućujući prijenos signala izvana prema unutra. Talini i kindlini su proteini koji imaju glavnu ulogu u tom procesu. Vežu se na citoplazmatske domene integrina svojim FERM domenama, zbog čega se domene integrina razdvajaju, što dovodi do promjene konformacije i aktivacije (Danen, 2013).

#### 1.4.1. Građa integrina i signalni putevi posredovani integrinima

Integrini su porodica transmembranskih heterodimernih glikoproteinskih receptora građenih od dvije nekovalentno povezane  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice. Obje polipeptidne podjedinice sastoje se od izvanstanične domene koja veže proteine u izvanstaničnoj okolini, transmembranske domene i kratke unutarstanične citoplazmatske domene veličine 20 - 50 aminokiselina, koja povezuje elemente citoskeleta putem citoplazmatskih adaptorskih proteina. Izuzetak ove visoko konzervirane strukture je integrin  $\beta 4$  koji ima izuzetno veliku citoplazmatsku domenu građenu od više od 1000 aminokiselina. Neke  $\alpha$  integrinske podjedinice ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha v$ ) proteolitički se cijepaju u blizini transmembranske domene i dva lanca se povezuju disulfidnom vezom.  $\beta$  podjedinica sadrži četiri ponavljanja segmenta bogatog cisteinom u blizini transmembranske regije koji su dugi oko 40 aminokiselina. Vezanje liganda na obje podjedinice omogućeno je dimerizacijom koja je uglavnom posredovana N-terminalnim područjima.

Integrinske podjedinice nisu kovalentno vezane i razlikuju se od drugih staničnih receptora po tome što imaju relativno slab afinitet vezanja liganda. Ova karakteristika omogućuje stanicama da se brzo pričvrste i odvoje od podloge čime osiguravaju molekularnu osnovu za pokretljivost stanica i invaziju (Kuphal i sur, 2005).

Jedan od ključnih kompleksa potrebnih za pokretanje signala ovisnom o integrinima je Src-FAK kompleks. FAK je citoplazmatska tirozinska kinaza koja igra važnu ulogu u prijenosu signala posredovanom integrinima (slika 2). Aktivira se autofosforilacijom na tirozinu 397 (Y397) prilikom adhezije stanica na komponente ECM-a i kolokalizira s integrinima i drugim citoskeletnim proteinima u fokalnim adhezijama. Iako mehanizam aktivacije FAK-a nije potpuno jasan, pretpostavlja se da fizička interakcija FAK-a s integrinskom citoplazmatskom domenom kao i citoskeletnim proteinima, talinom, paksilonom i tenzinom igra ključnu ulogu u aktivaciji. Glavni signalni put nizvodno od kompleksa Src-FAK je put Ras-MEK-MAPK koji je aktiviran integrinima i faktorima rasta. Fosforilacija nizvodnih kinaza, MAPK i ERK, modulira dinamiku fokalnih adhezija, kao i staničnu proliferaciju, napredovanje staničnog ciklusa i preživljenje. Nakon autofosforilacije na tirozinu Y397 i aktivacije, FAK se povezuje s drugom tirozin kinazom Src preko njene SH2 domene (engl. *src homology 2*). Src kinaza zatim fosforilira FAK na poziciji Y925 što regrutira Grb2 adaptorski protein, koji pokreće nizvodne signalne putove koji dovode do aktivacije ERK kinaze. Fosforilirani Y397 također služi kao glavno mjesto vezanja SH2 domene fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K) što dovodi do njezine aktivacije. Još jedna serin/treoninska kinaza koja se često aktivira nizvodno od integrina je AKT, a aktivacija je ovisna o PI3K. Aktivacija FAK dovodi do regrutiranja PI3K u fokalne adhezije, a aktivacija PI3K dovodi do inicijalne aktivacije AKT fosforilacijom Thr308 u aktivacijskoj petlji nakon čega se fosforilira na različitim treoninskim i serinskim ostacima pomoću drugih kinaza kao što je mTOR (engl. *mechanistic target of rapamycin*). Glavna uloga AKT kinaze je regulacija preživljenja stanica. Kinaza povezana sa integrinima (ILK) još je jedan važan protein koji povezuje integrine s aktinskim citoskeletom. ILK je adaptorski protein koji izravno veže  $\beta 1$  i  $\beta 3$  integrinsku citoplazmatsku domenu sa aktinom kroz glavni vezni protein, parvin. U fokalnim adhezijama djeluje kao središnja komponenta heterotrimernog kompleksa PINCH-ILK-parvin koji posreduje u interakciji s velikim brojem proteina i omogućuje lokalizaciju ILK-a na mjesta adhezije stanica na ECM. Dokazano je da ILK stupa u interakciju s mnogim proteinima direktnim vezanjem ili indirektno preko PINCH-a ili parvina za posredovanje u različitim biološkim procesima (Qin i Wu, 2012). Stanice deficitarne za ILK pokazuju defekte u formiranju fokalnih adhezija, što onemogućuje širenje i migraciju (Srichai i Zent, 2010). ILK ima nisku bazalnu kinaznu aktivnost koja je stimulirana koordiniranom signalizacijom receptora faktora rasta i interakcijom stanica i ECM-a. Nakon aktivacije, ILK kontrolira različite nizvodne efekte koji moduliraju osnovne stanične funkcije, uključujući AKT i kinazu glikogen sintaze 3 (engl. *glycogen synthase kinase 3*, GSK-3). Fosforilacija AKT-a na poziciji Ser473 potrebna je za njegovu potpunu aktivaciju. Poticanjem fosforilacije AKT-a, ILK stimulira signalne putove koji reguliraju preživljenje stanica, uključujući one posredovane stimulacijom nuklearnog faktora  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) (McDonald i sur, 2008). Fosforilacija GSK-3 dovodi do njezine inaktivacije i povećanja razine  $\beta$ -katenina koji se translocira u jezgru gdje se povezuje s Lef-1/Tcf transkripcijskim faktorima i aktivira ekspresiju ciljnih gena (Kuphal i sur, 2005).



Slika 2. Shematski prikaz fokalnih adhezija i signalnih puteva posredovanih integrinima. Preuzeto i prilagođeno prema Dickreuter i Cordes, 2016.

#### 1.4.2. Uloga integrina u osjetljivosti stanica tumora na protutumorske lijekove

Široki spektar integrina doprinosi progresiji tumora. Kako mnogi solidni tumori potječu iz epitelnih stanica, integrini eksprimirani na epitelnim stanicama (uključujući  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 2\beta 1$  i  $\alpha 3\beta 1$ ) općenito se zadržavaju u tumoru, iako se razine ekspresije mogu mijenjati. Ovi integrini uglavnom posreduju adheziji epitelnih stanica na bazalnu membranu, ali mogu također pridonijeti migraciji, proliferaciji i preživljavanju tumorskih stanica. Ekspresija integrina može znatno varirati između normalnog i tumorskog tkiva. Integrini  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  i  $\alpha v\beta 6$  obično su nisko eksprimirani u većini epitelnih stanica, ali mogu biti pojačano eksprimirani kod nekih tumora. Razine ekspresije nekih integrina, kao što je  $\alpha 2\beta 1$ , smanjuju se u tumorskim stanicama, potencijalno omogućujući im širenje. Studije koje koreliraju razinu ekspresije integrina u tumorima sa patološkim posljedicama, kao što su preživljenje pacijenata i metastaziranje, identificirali su nekoliko integrina koji bi mogli imati važnu ulogu u progresiji tumora. Ekspresija integrina  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 1$  i  $\alpha v\beta 6$  korelira s progresijom bolesti u različitim tipovima tumora, stoga su i najčešće istraživani (Desgrosellier i Cheresch, 2010).

Dokazano je da je vezanje stanica posredovano integrinima potrebno za invaziju i metastaziranje stanica tumora te preživljavanje pod različitim uvjetima inducirana smrti. Uloga interakcije integrina i ECM-a u preživljavanju stanica i otpornosti na protutumorske lijekove predstavlja fenomen koji se javlja u više tipova karcinoma uključujući karcinom dojke, pluća, prostate, jajnika, gušterače i debelog crijeva, kao i hematoloških malignih bolesti (Aoudjit i Vuori, 2012). S obzirom na to da obitelj  $\beta 1$  integrina predstavlja glavnu skupinu integrina koji posreduju u interakciji stanica s proteinima ECM-a, brojne studije su usmjerene na otkrivanje uloge ove skupine integrina u odgovoru stanica tumora na protutumorske lijekove. Dokazano je da je integrin  $\beta 1$  ključan u razvoju otpornosti na radioterapiju u karcinomu glave i vrata, rezistenciju na lapatinib i trastuzumab u karcinomu dojke i otpornost na erlotinib u karcinomu pluća (Seguin i sur, 2016).

U staničnim linijama MDA-MB-231 i MDA-MB-435S vezanje  $\beta 1$  integrina i liganda inhibira apoptozu induciranu paklitakselom i vinkristinom, kemoterapijskim sredstvima usmjerenim na mikrotubule koji se često koriste u terapiji karcinoma dojke. Vezanje stanica MDA-MB-231 na fibronektin i tip I kolagena preko integrina  $\alpha 5\beta 1$  i  $\alpha 2\beta 1$  te vezanje integrina  $\alpha 6\beta 1$  za laminin u MDA-MB-435S stanicama posreduje zaštitnom učinku protiv apoptoze izazvane lijekovima. Novije studije otkrile su da stanična linija MDA-MB-435S potječe od melanoma, a ne od tumora dojke (Korch i sur, 2018) što sugerira da  $\beta 1$  integrin također može zaštititi stanice melanoma od apoptoze uzrokovane lijekovima. Zaštitni učinak  $\beta 1$  integrina u ovim stanicama karcinoma posredovan je putem aktivacije PI3K/AKT puta, što je spriječilo smanjenje razine Bcl-2 proteina i inhibiralo oslobađanje citokroma c inducirano lijekovima. Ovi rezultati upućuju na to da integrini  $\beta 1$  inhibiraju apoptozu uzrokovanu kemoterapijom na razini mitohondrija (Aoudjit i Vuori, 2012). Interakcija vitronektina i integrina  $\alpha \beta 3$  i  $\alpha \beta 5$  štiti stanice glioma od kemoterapije, a protein CYR61 (engl. *cysteine-rich angiogenic inducer 61*) preko integrina  $\alpha \beta 3$  posreduje u otpornosti stanica karcinoma dojke na apoptozu induciranu paklitakselom kroz aktivaciju puta MAPK/ERK (Aoudjit i Vuori, 2012).

Grupa u kojoj je izrađen ovaj diplomski rad je pokazala da je mehanizam otpornosti posredovan integrinom  $\alpha \beta 3$  u stanicama karcinoma grkljana čovjeka HEP2 uzrokovan povećanom ekspresijom ukupnog glutationa koji može djelotvornije uklanjati reaktivne kisikove vrste nastale djelovanjem lijekova (Brozović i sur, 2008). Ista istraživačka grupa pokazala je da *de novo* ekspresija integrina  $\alpha \beta 3$  u Cal27 stanicama karcinoma jezika osigurava otpornost na četiri protutumorska lijeka, uključujući cisplatinu, mitomicin C, doksorubicin i 5-flurouracil kroz gubitak pSrc(Y418) (Stojanović i sur, 2016). Upotrebom obrnutog pristupa, tj. utišavanjem umjesto prekomjernom ekspresijom, stanice se mogu učiniti osjetljivijima na protutumorske lijekove. Tako je utišavanje nekoliko različitih integrina, posebice  $\alpha \beta 3$ , transfekcijom specifičnom siRNA, kao i izlaganje cikličkom RGD antagonistu integrina  $\alpha \beta 3/\alpha \beta 5$ , dovelo do povećanja osjetljivosti staničnih linija glioblastoma na temozolomid (TMZ). Najveći učinak opažen je u LN229 stanicama nakon utišavanja integrina  $\beta 3$ , što je dovelo do inhibicije signalnog puta FAK/Src/Akt/NF $\kappa$ B i povećanog nastanka  $\gamma$ H2AX fokusa, proteosomske degradacije proteina Rad51 i smanjivanja djelotvornosti homologne rekombinacije što dovodi do nepravilnog popravka dvostrukih lomova DNA induciranih TMZ-om (Christmann i sur, 2017).

#### 1.4.1. Integrin $\alpha\beta3$

Povećana ekspresija integrina povezana je s agresivnošću tumora, što je posebno značajno za integrin  $\alpha\beta3$  koji je slabo ekspimiran u normalnim epitelnim stanicama, a visoka ekspresija je dokazana u mnogim tipovima karcinoma, kao što su karcinom gušterače, prostate, dojke i melanom, u kojima njegova ekspresija korelira s progresijom bolesti. Opsežno je ekspimiran u aktiviranim endotelnim stanicama u procesu angiogeneze i različitim patološkim stanjima, sa statistički značajnim razlikama između tumora i normalnog tkiva (Ahmedah i sur, 2017). Integrin  $\alpha\beta3$  receptor je za osteopontin, fibronektin i vitronektin te je kao član skupine RGD-vezujućih integrina uključen u kontrolu angiogeneze inducirane osnovnim faktorom rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) ili faktorom nekroze tumora-  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor - $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) (Weis i Cheresh, 2011). U karcinomu dojke i gušterače, kao i stanicama glioma, integrin  $\alpha\beta3$  fizički i funkcionalno surađuje s receptorom epidermalnog faktora rasta (EGFR), HER2 i faktorom rasta trombocita (PDGFR) čija aktivacija potiče proliferaciju stanica. U stanicama karcinoma jajnika, ekspresija  $\alpha\beta3$  korelira s pojačanom ekspresijom i aktivnošću EGFR-a i predstavlja glavnog faktora u poticanju proliferacije stanica signalizacijom koja uključuje ILK kinazu (Nieberler i sur, 2017).

Pacijenti čiji tumori ekspimiraju visoke razine ovog integrina skloni su lošijoj prognozi od pacijenata s nižim razinama ekspresije. Povećana ekspresija integrina  $\alpha\beta3$  uočena je u invazivnim tumorima i udaljenim metastazama, što dokazuje ulogu ovog integrina u povećanju metastatskog potencijala i invazivnih osobina tumorskih stanica (Felding-Habermann i sur, 2001). Interakcija integrina  $\alpha\beta3$  i Src kinaze potiče rast stanica neovisan o adheziji, dok signalizacija posredovana FAK kinazom potiče opstanak matičnih stanica tumora. Inhibicija integrina  $\alpha\beta3$  povezana je sa smanjenim rastom tumorskih stanica u karcinomima dojke i prostate, melanomima i gliomima, dok inhibiranje ekspresije integrina  $\alpha\beta3$  *in vivo* u životinjskim modelima smanjuje sposobnost tumora da migrira i metastazira (Millard i sur, 2011).

Transfekcija pločastih stanica karcinoma jezika Cal27 s  $\beta3$  cDNA povećala je ekspresiju integrina  $\alpha\beta3$ , što je dovelo do pojačane stanične adhezije na fibronektin i vitronektin, migracije i invazije te otpornosti na citotoksične lijekove kroz smanjenje Src signalizacije (Stojanović i sur, 2016). Također je dokazano da prekomjerna ekspresija integrina  $\alpha\beta3$  potiče rast tumora i metastaziranje karcinoma dojke i prostate u kosti. Stanice karcinoma dojke i prostate koje su metastazirale u kosti pokazuju veću ekspresiju integrina  $\alpha\beta3$  od primarnog tumora, što potiče adheziju na koštani matriks vezanjem za osteopontin kojeg ekspimiraju koštane stromalne stanice (Nieberler i sur, 2017).

Integrin  $\alpha\beta3$  intenzivno je proučavan zbog uključenosti u adheziju i pokretljivost tumorskih stanica. Dokazano je da kemokinski receptor 7 (CCR7) i njegov ligand CCL19 potiču migraciju i adheziju stanica karcinoma glave i vrata aktiviranjem integrina  $\alpha\beta3$  (Li i sur, 2011). Također u stanicama karcinoma prostate, ekspresija integrina  $\alpha\beta3$  izazvala je povećanu ekspresiju kemokinskog receptora, što je dovelo do pojačane migracije i invazije tijekom metastaziranja tumorskih stanica u kosti (Nieberler i sur, 2017). Signalizacija integrinom  $\alpha\beta3$  potrebna je kako bi se potaknula migracija u mnogim tipovima stanica, uključujući glatke mišićne stanice, endotelne stanice i različite tumorske stanice. U stanicama karcinoma jajnika i dojke pokazalo se da je pojačana adhezija stanica, posredovana vezanjem integrina  $\alpha\beta3$  na

vitronektin, neophodna za vezanje stanica na ECM i promjene u organizaciji citoskeleta. Tumorske stanice koje pokazuju visoku razinu ekspresije integrina  $\alpha\beta3$  mogu stvoriti lamelipodije, povezane s smanjenom RhoA aktivnošću (Nieberler i sur, 2017).

#### 1.4.2. Integrin $\alpha\beta5$

Integrin  $\alpha\beta5$  je, uz integrin  $\alpha\beta3$ , najviše proučavan član  $\alpha\beta$  potporodice integrina. Ekspresija integrina  $\alpha\beta5$  značajno je veća u stanicama karcinoma grkljana i jezika nego u epitelnim stanicama normalnih tkiva, a povećana ekspresija također je uočena u glioblastomu (Desgrosellier i Cheresch, 2010). Kao i integrin  $\alpha\beta3$ , integrin  $\alpha\beta5$ , prekomjerno je eksprimiran na endotelnim stanicama tumora i služi kao receptor za vitronektin (Raab-Westphal i sur, 2017).

Ekspresija integrina  $\alpha\beta5$  povezana je s limfogenim metastaziranjem i angiogenezom induciranom vaskularnim endotelnim faktorom rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) ili transformirajućim faktorom rasta-  $\alpha$  (engl. *transforming growth factor-  $\alpha$* , TGF- $\alpha$ ). Signalizacija integrinom  $\alpha\beta5$  nizvodno od VEGF-a dovodi do aktivacije FAK i Src kinaze koje fosforiliraju Raf kinazu, što dovodi do translokacije Raf-1 u mitohondrij i zaštite endotelnih stanica od intrinzičnog puta apoptoze induciranog agensima koji oštećuju DNA (Weis i Cheresch, 2011).

Nekoliko članova obitelji integrina  $\alpha\beta$ , uključujući integrin  $\alpha\beta5$ , povezano je s invazijom, epitelno-mezenhimskom tranzicijom i poticanjem preživljenja matičnih stanica tumora. Integrinska podjedinica  $\beta5$  pridonosi epitelnoj-mezenhimskoj tranziciji posredovanoj transformirajućim faktorom rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ), tumorskoj angiogenezi i otpornosti na radio- i kemoterapiju (Bianchi-Smiraglia i sur, 2013). Izlaganjem epidermalnom faktoru rasta (EGF) stimulira se migracija i invazija tumorskih stanica putem integrina  $\alpha\beta5$ . Vezanje integrina  $\alpha\beta5$  za ligande i citokina za receptore potrebno je za metastaziranje višestrukih tipova tumora, ali ne i za primarni tumorski rast. Dokazano je *in vitro* i *in vivo* da aktivacija Src kinaze putem EGFR-a potiče migraciju stanica karcinoma gušterače posredovanu integrinom  $\alpha\beta5$ . Isto je primijećeno za stanice karcinoma dojke MCF-7, kao i druge tumorske stanične linije koje eksprimiraju integrin  $\alpha\beta5$  kao primarni receptor vitronektina. Kada se stimulira EGF-om, Src kinaza aktivira p130Cas i potiče metastatsku kaskadu. Protein p130Cas stvara kompleks s adapterskim proteinom Crk koji se lokalizira u membranu gdje potiče migraciju stanica. Fosforilacija p130Cas također aktivira malu GTPazu Rap1 koja je potrebna za aktivaciju integrina  $\alpha\beta5$ . Ovi rezultati pokazuju suradnju između tirozin kinaznih receptora i integrina  $\alpha\beta5$  koji je nužan za invaziju i metastaziranje tumorskih stanica, kao i na ulogu interakcije Src/ $\beta5$  u poticanju migracije tumorskih stanica (Weis i Cheresch, 2011).

## 1.5. Inhibitori integrina $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$

Prethodna poglavlja o integrinima i signalizaciji posredovanoj integrinima ukazuju na značajan učinak tih receptora u progresiji i razvoju brojnih tumora. Integrini  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  prvotno su prepoznati kao mete za inhibiciju angiogeneze, a tek onda kao mete na tumorskim stanicama čijom se inhibicijom može povećati osjetljivosti na protutumorske lijekove i spriječiti metastaziranje. Trenutno dostupni inhibitori ovih integrina su funkcionalno blokirajuća monoklonska protutijela, peptidni antagonisti i ciklički peptidi koji oponašaju sljedove izvanstaničnog matriksa. Monoklonska protutijela, kao što je IM609, bila su među prvim razvijenim antagonistima integrina i pokazala su značajnu anti-angiogenu aktivnost u pretkliničkim modelima. Kao rezultat ovih studija razvijen je vitaksin (etaracizumab), humanizirano monoklonsko IgG protutijelo usmjereno na izvanstaničnu domenu integrina  $\alpha\beta3$  (Maubant i sur, 2017). Vitaksin je inhibirao rast tumora izravnim učinkom na tumorske stanice te inhibirao angiogenezu induciranjem apoptoze angiogenih krvnih žila. Specifično monoklonsko antitijelo za integrine  $\alpha\beta$ , CnTo 95, koje cilja oba integrina  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ , također je imalo protutumorske i anti-angiogene učinke u tumorskim modelima (Desgrosellier i Cheresch, 2010).

Peptidni antagonisti predstavljaju drugu klasu lijekova koji su dizajnirani za ciljanje integrina. Ti lijekovi sadrže sljedove slične onima u proteinima ECM-a i time kompetiraju za mjesto vezanja unutar integrina. Peptidni lijekovi koji ciljaju integrine imaju umjereno visoki afinitet, ali može im nedostajati specifičnosti, jer različiti integrini imaju iste sljedove prepoznavanja. Prvi peptidni antagonisti integrina  $\alpha\beta3$  bili su linearni peptidni fragmenti bazirani na RGD slijedu. Nisu bili specifični za određene integrine i bili su podložni proteolitičkoj degradaciji *in vivo* što ih čini neprikladnim za korištenje u terapiji. Odnos strukture i aktivnosti lijeka temeljen na kemijskim modifikacijama pokazao se prilično informativnim u razvoju snažnijih, selektivnih i biološki stabilnih peptidnih lijekova.

Ciklizacija peptida RGD i dodavanje D-aminokiselina stvorili su sterička ograničenja kako bi inhibitori bolje oponašali prostornu orijentaciju prirodnog liganda, istodobno štiteći ih od enzimske hidrolize te povećavajući afinitet vezanja i biološku stabilnost. Utvrđeno je da varijacije u duljini peptida utječu na selektivnost inhibiranja određenih integrina. Uvođenje D-izoforme i N-metilacije u aminokiseline RGD povećalo je afinitet vezanja. Cilengitid, ciklički RGD peptid jasno ilustrira učinak ciklizacije i modifikacije aminokiselina koji pridonosi specifičnosti i stabilnosti peptida (Millard i sur, 2011).

### 1.5.1. Cilengitid

Cilengitid je ciklički pentapeptid RGD koji inhibira integrine  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ . Dokazano je da *in vitro* i *in vivo* inhibira adheziju i invaziju različitih tumorskih stanica, uključujući stanice glioma, karcinoma dojke, melanoma i stanične linije karcinoma pluća ne-malih stanica (Bianconi i sur, 2016). U eksperimentima u kulturi stanica dokazano je da smanjuje rast, proliferaciju i preživljenje endotelnih i tumorskih stanica, koje eksprimiraju integrine  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ , sprečavanjem interakcije integrina i proteina izvanstaničnog matriksa, što aktivira apoptozu. Nakon izlaganja cilengitidu, endotelne i tumorske stanice pokazuju poremećaj organizacije aktinskog citoskeleta. Cilengitid inhibira signalizaciju endotelnih i tumorskih



stanica kroz FAK-Src-Akt i Erk posredovane puteve i smanjuje učinak VEGF stimulacije (Millard i sur, 2011). Pokazao je anti-angiogene i protutumorske učinke te inhibiciju metastaziranja tumora u mnogim predkliničkim studijama. Nedavno je pokazano da integrin  $\alpha\beta 5$  posreduje u metastaziranju i da liječenje tumorskih stanica koje eksprimiraju integrin  $\alpha\beta 5$ , ali ne i  $\alpha\beta 3$ , cilengitidom učinkovito spriječava stvaranje metastaza. Također pokazalo se da cilengitid inhibira metastaziranje stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 u kosti te da kombinirano liječenje cilengitidom povećava osjetljivost stanične linije karcinoma pluća na radioterapiju (Lautenschlaeger i sur, 2013). Zračenje tumora smanjuje njegov lokalni rast, ali istodobno povećava ekspresiju  $\alpha\beta 3$  i pojačava lokalnu invaziju i metastaziranje. Stoga je uvjerljivo da cilengitid kao antagonist integrina može ublažiti neke od tih učinaka induciranih zračenjem (Mas-Moruno i sur, 2010).

Integrini  $\alpha\beta 3$  i  $\alpha\beta 5$  široko su eksprimirani na krvnim žilama u tumorima mozga (glioblastomi) i u tumorskim stanicama. Dokazano je da liječenje tumora s antagonistom integrina, cilengitidom, u životinjskom modelu tumora mozga *in vivo* smanjuje rast tumora. Ispitivanja kliničke faze II pokazala su da adjuvantno korištenje cilengitida uz standardnu kemoterapiju temozolomidom (TMZ) pokazuje obećavajuću aktivnost kod pacijenata oboljelih od glioblastoma s metilacijom promotora MGMT (engl. *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*), enzima koji popravlja oštećenja inducirana TMZ-om. Nažalost, u studiji faze III cilengitid nije pokazao napredak u usporedbi sa standardnim liječenjem. Jedan od razloga za ovaj neuspjeh može biti ciljanje uglavnom integrina  $\alpha\beta 3$  i  $\alpha\beta 5$  eksprimiranih na endotelnim stanicama, dok integrini eksprimirani na tumorskim stanicama nisu bili djelotvorno inhibirani. Drugi razlog neuspjeha može biti suprotno djelovanje radioterapije i cilengitida. Pokazano je da zračenje inducira ekspresiju integrina  $\alpha\beta 3$  u humanim endotelnim stanicama i stanicama glioma. U tom slučaju, korištenje antagonista integrina može se primjenjivati samo uz pojedinačnu terapiju TMZ-om. Kao što se očekivalo, inhibicija integrina  $\alpha\beta 3$  cilengitidom u kombinaciji s TMZ-om u mišjem modelu glioma dovela je do regresije tumora i pokazala pojačanu fosforilaciju  $\gamma$ H2AX i aktivaciju kaspaze 3 te je snažno smanjila ekspresiju proteina Rad51 i RIP1 u usporedbi s miševima koji su tretirani samo sa TMZ-om. Podaci dobiveni u kulturi stanica i *in vivo* otkrivaju vrlo sličan molekularni mehanizam, pokazujući da inhibicija integrina  $\alpha\beta 3$  smanjuje sposobnost popravka DNA i poboljšava citotoksični odgovor stanica glioma na TMZ. Dokazano je da integrin  $\alpha\beta 3$  prenosi signale preko pFAK/pSrc/pAkt puta, a inhibicija istog signalnog puta uočena je u stanicama glioma nakon tretmana sa cilengitidom (Christmann i sur, 2017).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovaj je rad dio većeg istraživanja uloge utišavanja integrina u povećanju osjetljivosti trostruko negativnog tumora dojke i melanoma na protutumorske lijekove. Rezultati dosadašnjih istraživanja otkrili su da utišavanje integrina  $\alpha v$  povećava osjetljivost većine staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke i melanoma na paklitaksel i vinkristin. Cilj ovog rada je u tri stanične linije trostruko negativnog karcinoma dojke i četiri stanične linije melanoma istražiti kombinirani učinak cilengitida, cikličkog pentapeptida RGD koji je specifični inhibitor integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  i protutumorskih lijekova, prvenstveno paklitaksela, te u pojedinim staničnim linijama vinkristina i cisplatine, s ciljem potvrđivanja rezultata dobivenih utišavanjem integrina  $\alpha v$ . Budući da je kinaza fokalne adhezije (FAK) jedna od glavnih molekula u signalnom putu nizvodno od integrina, cilj ovog rada bio je utvrditi promjene u količini fosforiliranog oblika kinaze fokalne adhezije pFAK(Y397) u odnosu na ukupnu količinu proteina FAK u stanicama prije i nakon izlaganja cilengitidu. Konačno, u stanicama MDA-MB-231 istražili smo lokalizaciju pFAK(Y397) prije i nakon izlaganja cilengitidu. Rezultati ovog istraživanja pomoći će u odgovoru na pitanje može li se kombinirani pristup, koji uključuje inhibiciju integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  cilengitidom i primjenu protutumorskih lijekova koji su dio standardne kemoterapije, koristiti za liječenje trostruko negativnih tumora dojke i melanoma.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3. 1. MATERIJALI

##### 3.1.1. OSNOVNE KEMIKALIJE

Osnovne kemikalije korištene u radu navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Osnovne kemikalije.

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
Cisplatina	Sigma-Aldrich, Njemačka
Vinkristin	Sigma, SAD
Paklitaksel	Sigma, SAD
Natrij-dodecil sulfat (SDS)	Serva, Njemačka
N,N,N,N - tetrametiletildiamin (TEMED)	Serva, Njemačka
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM</i> )	Invitrogen, SAD
Tween-20	Sigma, SAD
Serum fetusa goveda (engl. <i>fetal calf serum, FCS</i> )	Invitrogen, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Tripsin	Invitrogen, SAD
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer Life Science, SAD
3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5- difeniltetrazolijev bromid (MTT)	Chemicon International, SAD
Razvijač	Fotokemika, Hrvatska

<b>Fiksir</b>	Fotokemika, Hrvatska
<b>Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Cat.No. 161-0374)</b>	Bio-Rad, SAD
<b>Amonijev persulfat (APS)</b>	Serva, Njemačka
<b>Akrilamid</b>	Serva, Njemačka
<b>Tris-klorovodična kiselina (Tris-HCl)</b>	Serva, Njemačka
<b>Dimetilsulfoksid (DMSO)</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Medij za uklapanje</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka
<b>FITC-faloidin</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka
<b>Etanol</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Glicin</b>	Sigma, SAD
<b>Penicilin</b>	Sigma, SAD
<b>Streptomycin</b>	Sigma, SAD
<b>Triton-x</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka
<b>Cilengitid</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka
<b>Albumin seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumin</i>, BSA)</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka
<b>Amido Black</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Paraformaldehid (PFA)</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka

### 3.1.2. Stanične linije

U ovom radu korištene su stanične linije melanoma RPMI-7951 (ATCC HTB-66), MeWo (ATCC HTB-65), A375 (ATCC CRL-1619), karcinoma dojke MDA-MB-436 (ATCC HTB-130), MDA-MB-468 (ATCC HTB-132), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) te stanična linija MDA-MB-435S (ATCC HTB-129) za koju je nedavno utvrđeno da je dobivena iz melanoma (Korch i sur, 2018). Sve navedene stanične linije rastu pričvršćene za podlogu.

### 3.1.3. Protutijela

Korištena protutijela za Western blot navedena su u tablici 2.

Tablica 2. Korištena protutijela.

PRIMARNA PROTUTIJELA	PROIZVEDENO U ORGANIZMU	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
<b>pFAK (Y397)</b>	Zec	Abcam, UK	ab81298
<b>FAK</b>	Zec	Abcam, UK	ab40794
SEKUNDARNA PROTUTIJELA	PROIZVEDENO U ORGANIZMU	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
<b>Protu-zečji imunoglobulini</b>	Koza	Thermo Fisher, SAD	RL243150
<b>Anti-zečji IgG (H+L) Alexa Fluor 555</b>	Magarac	Abcam, UK	ab150074

### 3.1.4. Priprema pufera i otopina

Sastav korištenih pufera i otopina te njihova priprema opisani su u tablici 3.

Tablica 3. Otopine i njihova priprema.

OTOPINA (kratica)	PRIPREMA
<b>Dulbeccova modifikacija Eaglove tekuće hranjive podloge (DMEM-FCS-Pen/Strep)</b>	DMEM sa 10%-tnim serumom fetusa goveda (FCS) i 1% streptomycinom/penicilinom
<b>PBS fosfatni pufer (s Mg<sup>2+</sup> i Ca<sup>2+</sup>)</b>	136,8 mM NaCl + 2,6 mM KCl + 9,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,24 mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O + 0,16 mM MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
<b>10x TBS</b>	500 mL Tris-HCl(pH 7,5) + 300 mL 5 M NaCl + 200 mL diH <sub>2</sub> O
<b>TBST pufer</b>	100 mL pufera 10X TBS + 900 mL diH <sub>2</sub> O + 1 ml Tween-20 (1x TBS sa 0,1% Tween-20)

<b>Transfer pufer</b>	50 mL Tris-glicinski pufer + 350 mL H <sub>2</sub> O + 100 mL metanola
<b>100 mM glicin za uklanjanje vezanih protutijela s membrane</b>	7,51 g glicina otapa se u 1000 mL diH <sub>2</sub> O
<b>6X SB pufer (engl. <i>sample buffer</i> za SDS-PAGE)</b>	1,2 g SDS-a + 2 mL diH <sub>2</sub> O, + 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) + 30 mg bromfenol plavila + 3 mL glicerola + 1,2 mL 2-merkaptoetanol
<b>Tris-HCl (1,5 M) pH 8,8</b>	18,2 g Tris-a + 100 mL diH <sub>2</sub> O. pH se podesi dodatkom 6 M HCl-a.
<b>Tris-HCl (0,5 M) pH 6,8</b>	6 g Tris-a + 80 mL diH <sub>2</sub> O. pH se podesi dodatkom 6 M HCl-a.
<b>30% akrilamid/bisakrilamid</b>	29,2 g akrilamida + 0,8 g bisakrilamida + 100 mL diH <sub>2</sub> O
<b>10% SDS</b>	10 g SDS + 100 mL diH <sub>2</sub> O
<b>10% APS</b>	500 mg APS-a + 5 mL diH <sub>2</sub> O
<b>4% paraformaldehid</b>	40 g paraformaldehida + 100 µL NaOH + 1000 mL PBS
<b>Cilengitid (8 µg/mL)</b>	6 mg se otopi u 750 µL sterilne miliQ vode
<b>10X SDS Tris-glicinski elektroforetski pufer</b>	80 mL 10X SDS Tris-Gly pufer + 720 mL diH <sub>2</sub> O

### 3.1.5. Uređaji i ostali materijali

U tablici 4. navedeni su uređaji te ostali materijali i pomagala korišteni u svrhu izrade ovog rada.

Tablica 4. Korišteni uređaji i pomoćni materijali.

<b>UREĐAJI I POMOĆNI MATERIJALI</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>
<b>Automatski brojač stanica</b>	Coulter Counter Beckman Coulter, UK
<b>Tresilica</b>	Tehnica, Slovenija
<b>Inkubator za uzgoj stanica</b>	Heraeus, Njemačka
<b>Kabinet za rad u sterilnim uvjetima</b>	Klimaoprema, Hrvatska
<b>Magnetska miješalica</b>	Tehnica, Slovenija
<b>Spektrofotometar za mikrotitarske pločice</b>	StatFax 2100 Awareness Technology INC, SAD

<b>Svjetlosni mikroskop</b>	Zeiss, Njemačka
<b>Termoblok</b>	Thermomixer compact Eppendorf, Njemačka
<b>Sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN</b>	Cell Bio-Rad Laboratories, SAD
<b>Vodena kupelj</b>	Tehnica, Slovenija
<b>Uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom (sonikator)</b>	Cole Palmer, SAD
<b>Bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75</b>	Falcon Becton Dickinson, SAD
<b>Pločice za uzgoj stanica s 6 i 96 bunarića</b>	Falcon Becton Dickinson, SAD
<b>Gumena strugalica</b>	Falcon Becton Dickinson, SAD
<b>Plastične i staklene pipete</b>	Superior, Njemačka
<b>Mikropipete</b>	Eppendorf, Njemačka
<b>Nastavci za mikropipete</b>	Eppendorf, Njemačka
<b>Pipetboy</b>	Integra Biosciences, SAD
<b>Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm</b>	Sigma-Aldrich, Njemačka

### 3.2.METODE

#### 3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Sve korištene stanične linije rastu pričvršćene za podlogu. Stanice su uzgajane *in vitro* u bočicama za uzgoj stanica T-25 (površina 25 cm<sup>2</sup>) i T-75 (površina 75 cm<sup>2</sup>) u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Sve stanične linije uzgajane su u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM-FCS-Pen/Strep.

#### 3.2.2. Presađivanje stanica

Stanice rastu prihvaćene za podlogu te ih je potrebno presaditi dva puta tjedno kako ne bi potpuno iscrpile hranjivu podlogu ili je u potpunosti prekrile. Za odvajanje stanica od podloge koristi se tripsin, a za uzgoj hranjiva podloga DMEM-FCS-Pen/Strep te ih je potrebno prethodno zagrijati na sobnu temperaturu. Stanicama se prvo pipetom ukloni hranjiva podloga nakon čega se vrlo kratko isperu s 0,5-1 mL tripsina (ovisno o veličini T-boce u kojoj se stanice uzgajaju). Nakon toga se dodaje novih 1-2 mL tripsina, a odvajanje stanica od podloge prati se svjetlosnim mikroskopom. Kada se stanice odvoje, djelovanje tripsina se zaustavlja dodavanjem 5 -10 mL svježije hranjive podloge. Nakon dodavanja svježije hranjive podloge, stanice se nježno resuspendiraju višestrukim uvlačenjem i ispuštanjem suspenzije stanica iz pipete, pri čemu se istovremeno mehaničkom silom odvajaju eventualno zaostale

stanice pričvršćene za podlogu. Dobivena suspenzija stanica služi za novo nasađivanje ili izvođenje eksperimenata.

### 3.2.3. Zamrzavanje stanica

Stanice su najpogodnije za zamrzavanje kada su u eksponencijalnoj fazi rasta, a koncentracija stanica pri zamrzavanju bi trebala biti  $10^7$  st/mL, jer je u takvim uvjetima najbolje preživljenje stanica nakon odmrzavanja. Suspenzija stanica se prebaci u plastičnu epruvetu od 15 mL te centrifugira pri  $1000 \times g$  tijekom 10 min. Nakon centrifugiranja supernatant se odlije, a talog stanica resuspendira u  $900 \mu\text{L}$  hranjive podloge DMEM-FCS-Pen/Strep te prebaci u ampulu za zamrzavanje koja se sljedećih 30 min drži na ledu. Nakon 30 minuta, u suspenziju stanica se dodaje krioprezervans DMSO konačne koncentracije 10%. Ampule sa stanicama pohranjuju se na držač spremnika za tekući dušik ( $-80^\circ\text{C}$ ) te se idući dan pohranjuju u tekući dušik ( $-196^\circ\text{C}$ ).

### 3.2.4. Odmrzavanje stanica

Ampula sa zamrznutim stanicama izvadi se iz tekućeg dušika te se uroni u vodenu kupelj zagrijanu na  $37^\circ\text{C}$  sve dok se stanice potpuno ne odmrznu. Stanice se zatim prebace u T- 25 bočicu u koju je prethodno dodano 7 mL tekuće hranjive podloge zagrijane na  $37^\circ\text{C}$  u inkubatoru. Idući dan stanicama je potrebno zamijeniti hranjivu podlogu i dodati isti volumen svježe hranjive podloge kako bi se uklonio krioprezervans DMSO korišten prilikom zamrzavanja stanica koji može ometati rast stanica. Stanice se nekoliko dana kasnije prema potrebi presađuju i koriste za eksperimente.

### 3.2.5. Određivanje preživljenja stanica testom MTT

Test MTT je kolorimetrijska metoda koja služi za određivanje preživljenja stanica. Temelji se na metaboličkoj aktivnosti vijabilnih stanica da pomoću mitohondrijskih reduktaza reduciraju tetrazolijevu sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u ljubičaste kristale formazana. Preživljenje stanica mjeri se spektrofotometrijski prije čega je potrebno otopiti kristale formazana u dimetil-sulfoksidu (DMSO) koji se naknadno dodaje. Apsorbancija se mjeri pomoću čitača mikrotitarskih pločica, a preživljenje stanica proporcionalno je izmjerenoj apsorbanciji. Test se provodi tako da se stanice nasade u pločicu za uzgoj stanica s 96 bunarića. U svaki bunarić dodaje se  $180 \mu\text{L}$  suspenzije stanica koja sadrži točno određeni broj stanica za pojedinu staničnu liniju naveden u tablici 5, a jedan bunarić je potrebno ostaviti prazan za slijepu probu.



Tablica 5. Broj nasađenih stanica po bunariću za MTT test.

STANIČNA LINIJA	BROJ NasaĐENIH STANICA PO BUNARIĆU
MDA-MB-435S	10 000
MDA-MB-231	10 000
MDA-MB-468	8 000
MDA-MB-436	20 000
RPMI-7951	10 000
MeWo	12 000
A375	2 000

Stanicama se 24 sata nakon nasađivanja dodaje 20 µL otopine protutumorskog lijeka po bunariću te se pločica sa stanicama ostavlja u inkubatoru tijekom 72 sata. Za svaku koncentraciju spoja čija se citotoksičnost ispituje rade se triplicati ili kvadruplicati istovjetnog uzorka. Konačne koncentracije ispitivanih spojeva prikazane su u tablici 7. Nakon inkubacijskog perioda od 72 sata naglim okretanjem pločice ukloni se hranjiva podloga i višak tekućine se ukloni pritiskom na staničevinu. Radna otopina MTT-a (40 µL) se dodaje u svaki bunarić te se nakon inkubacije od 3 sata pri 37°C, pri čemu nastaju kristali formazana, oni otapaju dodatkom 170 µL DMSO-a po bunariću. Pločica se zatim stavlja na tresilicu kako bi se kristali u potpunosti otopili te se mjeri apsorbancija pri 600 nm i računa preživljenje prema sljedećoj formuli:

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

Tablica 6. Spojevi ispitivani MTT testom i koncentracije njihovih matičnih otopina.

SPOJ	MATIČNA OTOPINA
Cisplatina (CIS)	500 µg/mL
Paklitaksel (PTX)	6x10 <sup>3</sup> µg/mL
Vinkristin (VCR)	100 µg/mL
Cilengitid (CIL)	8x10 <sup>3</sup> µg/mL

Tablica 7. Konačne koncentracije spojeva ispitivanih na određenoj staničnoj liniji.

STANIČNA LINIJA	KONCENTRACIJA CILENGITIDA (µg/mL)	KONCENTRACIJA PAKLITAKSELA (ng/mL)	KONCENTRACIJA CISPLATINE (µg/mL)	KONCENTRACIJA VINKRISTINA (ng/mL)
MDA-MB-435S	9, 3, 1	10, 7.5, 5, 3.75, 2.5	7.5, 5, 3.75, 2.5, 1.25	-
MDA-MB-231	9, 3, 1	50, 25, 12.5, 6.25, 3.125	-	-
MDA-MB-468	30, 20, 10	10, 7.5, 5, 3.75, 2.5	-	1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625
MDA-MB-436	9, 3, 1	20, 15, 10, 7.5, 5	-	-
RPMI-7951	3, 1, 0.3	10, 7.5, 5, 3.75, 2.5	-	-
MeWo	2, 1, 0.5	10, 7.5, 5, 3.75, 2.5	8, 4, 2, 1, 0.5	-
A375	9, 3, 1	7.5, 5, 3.75, 2.5, 1.875	-	-

### 3.2.6. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE i Western blot

Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je metoda kojom je moguće razdvojiti proteine isključivo na temelju razlike u njihovoj molekularnoj masi. U elektroforezi se koristi natrij dodecil sulfat (SDS), anionski detergent koji denaturira proteine, razara njihovu terciarnu i kvartarnu strukturu i stvara linearne negativno nabijene polipeptidne lance. U tome sudjeluje i  $\beta$ -merkaptoetanol, jedan od sastojaka pufera za nanošenje, koji razara disulfidne veze između proteina i omogućuje njihovu denaturaciju. U električnom polju negativno nabijeni polipeptidni lanci putuju prema anodi različitom brzinom koja je obrnuto proporcionalna njihovoj molekularnoj masi.

U diskontinuiranoj elektroforezi koriste se dva gela, gel za sabijanje koji koncentrira proteine u usku prugu i gel za razdvajanje u kojem se proteini razdvajaju. Gelovi su puferirani kod različitog pH što je usko povezano s njihovom ulogom u metodi. Uzorci za SDS-PAGE se pripremaju tako da se stanice nasade u Petrijeve zdjelice promjera 3.5 cm i ostave 24 sata kako bi im sutradan, pri skupljanju uzoraka, popunjenost površine bila oko 80%. Broj nasađenih stanica po Petrijevoj zdjelici i koncentracija cilengitida kojom smo tretirali određenu staničnu liniju navedeni su u tablici 9. Koncentraciju cilengitida kojoj se izlažu određene stanične linije odredili smo iz pokusa u kojem je utvrđeno citotoksično djelovanje cilengitida, a odabrali smo onu koncentraciju cilengitida kod koje je preživljenje stanica bilo između 70 i 80%. Sljedeći dan sa stanica se ukloni hranjiva podloga koja se prebaci u plastičnu epruvetu i centrifugira pri 1000 x g tijekom 5 minuta, a na podlogu sa stanicama se doda 200 µL pufera za nanošenje uzoraka 1 x SB zagrijanog na 96°C. Stanice se sastružu gumenom strugalicom i prebace u mikroeprevete. Na talog stanica prikupljen nakon centrifugiranja dodaje se 1 x SB, resuspendira i sve prebaci u mikroeprevetu u kojoj je uzorak

ostruganih stanica. Dobivena smjesa vrlo je viskozna zbog prisutne DNA te se uzorci izlažu dvama ciklusima ultrazvuka amplitude 30% tijekom 15 sekundi kako bi se DNA pocijepala tj. kako uzorak više ne bi bio viskoznan. Tako se obrađeni uzorci mogu kuhati pri 95°C tijekom 3 minute i odmah nanositi na gel ili pohraniti pri -20°C. Gel za SDS-PAGE priprema se prema podacima u tablici 8. Prvo se izlijeva donji gel ili gel za razdvajanje koji polimerizira tijekom jednog sata nakon nadslojavanja sa 1-2 mL izopropanola. Nakon polimerizacije donjeg gela izlijeva se gornji gel, odnosno gel za sabijanje. Nakon što se gelovi izliju i polimeriziraju slaže se aparatura za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Cell. Pripremljeni gel se uranja u kadicu koja sadrži Tris-glicinski pufer za elektroforezu, nanose se standard za određivanje molekulske mase proteina (5 µL, prema uputama proizvođača) i uzorci (30 µL) te se pokreće elektroforeza uz konstantan napon od 100 V.

Tablica 8. Sastav 10% gela za razdvajanje i sabijanje.

SASTAV 10% GELA ZA RAZDVAJANJE	VOLUMEN
diH <sub>2</sub> O	4 mL
Tris-HCl 1.5M; pH 8.8	2,5 mL
30% akrilamid/bisakrilamid	3,3 mL
10% SDS	100 µL
10% APS	100 µL
TEMED	4 µL

SASTAV 10% GELA ZA SABIJANJE	VOLUMEN
diH <sub>2</sub> O	2,1 mL
Tris-HCl 0.5 M; pH 6.8	380 µL
30% akrilamid/bisakrilamid	500 µL
10% SDS	30 µL
10% APS	30 µL
TEMED	3 µL

Tablica 9. Broj nasađenih stanica po Petrijevoj zdjelici za Western blot analizu i koncentracija cilegentida za tretiranje određene stanične linije.

STANIČNA LINIJA	BROJ NASAĐENIH STANICA PO PETRIJEVKI	KONCENTRACIJA CILENGITIDA
MDA-MB-435S	5x10 <sup>5</sup>	9 µg/mL
MDA-MB-231	4,5x10 <sup>5</sup>	9 µg/mL
MDA-MB-468	4,5x10 <sup>5</sup>	15 µg/mL
MDA-MB-436	5x10 <sup>5</sup>	1 µg/mL
RPMI-7951	5x10 <sup>5</sup>	3 µg/mL
MeWo	5,3x10 <sup>5</sup>	1 µg/mL
A375	3,5x10 <sup>5</sup>	9 µg/mL

Western blot je metoda koja služi za identifikaciju i određivanje količine specifičnih proteina, a temelji se na ostvarivanju kompleksa između proteina (antigena) i specifičnog protutijela. Proteini se najprije razdvajaju SDS-PAGE elektroferezom i prenose s gela na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Za prijenos se koristi transfer pufer koji se stavlja u kadnicu uređaja Mini-PROTEAN Tetra Cell zajedno sa kazetama za prijenos, a elektroforeza se odvija pri konstantnoj jakosti struje od 400 mA, tijekom 90 minuta. Nakon prijenosa membrana se može obojiti bojom Amido black kako bi se provjerila uspješnost prijenosa proteina na membranu, slijedi odbojavanje ispiranjem u vodi i blokiranje membrane u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u TBST puferu u trajanju od jednog sata kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Membrana se ispiru u TBST puferu te inkubira s primarnim protutijelom koje se razrjeđuje u 10 mL 5% -tne otopine mlijeka i ostavlja pri 4°C preko noći. Sljedeći dan se membrana ponovno ispiru u TBST puferu i inkubira dva sata sa sekundarnim protutijelom koje je obilježeno enzimom peroksidazom hrena. Membrana se po završetku inkubacije ispiru u TBST puferu i inkubira u otopini Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus. Kemiluminiscentni signal vizualizira se izlaganjem membrane fotografskom filmu koji se zatim razvija u otopini razvijaa, ispiru u vodi i fiksira u otopini fiksativa. Nakon fiksacije film se ispiru diH<sub>2</sub>O i suši. Ista membrana može poslužiti za detekciju više različitih proteina, ali svaki se put moraju ukloniti stara i dodati nova protutijela. Uklanjanje protutijela s membrane (engl. *stripping*) je postupak koji uključuje kratko ispiranje membrane u TBST puferu, inkubaciju 40 minuta u 100 mM otopini glicina za uklanjanje vezanih protutijela s membrane i ponovno blokiranje u 10% nemasnom mlijeku tijekom jednog sata. Nakon toga membrana se može inkubirati sa sljedećim primarnim protutijelom.

### 3.2.7. Određivanje kombiniranog utjecaja cilengitida i protutumorskih lijekova pomoću izračunavanja kombinacijskog indeksa

Kombinacijski indeks (CI) je vrijednost koja opisuje interakciju dvaju ili više citotoksičnih spojeva i najjednostavniji je način za kvantifikaciju sinergističkog, aditivnog ili antagonističkog učinka između citotoksičnih spojeva. Izračun se bazira na Chou-Talalay metodi, a vrijednost kombinacijskog indeksa može biti manja od 1 (upućuje na sinergistički učinak), jednaka 1 (aditivni učinak) ili veća od 1 (antagonistički učinak). Sinergistički učinak imaju spojevi koji djeluju zajednički na takav način da je zbroj njihova djelovanja veći od zbroja njihovih pojedinačnih učinaka. Aditivan učinak jednak je zbroju učinaka svakog pojedinačnog spoja, dok antagonistički učinak znači da jedan spoj smanjuje učinak drugog zbog suprotnog djelovanja. Djelovanje citotoksičnih spojeva ispituje se MTT testom, nakon čega se dobiveni podaci obrađuju u programu CompuSyn kako bi se odredio citotoksični utjecaj svakog spoja pojedinačno i kombinacija dvaju spojeva.

### 3.2.8. Određivanje lokalizacije proteina pFAK (Y397) metodom imunofluorescencije

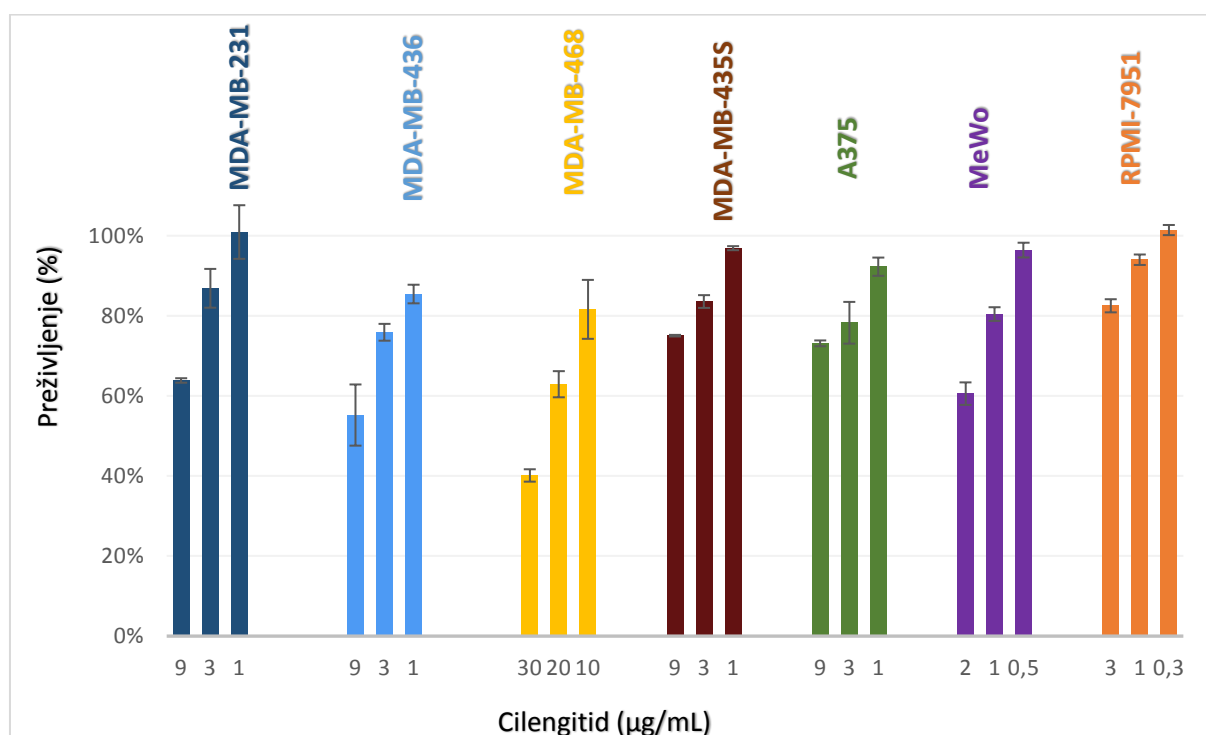
Metoda imunofluorescencije koristi se za prepoznavanje i lokalizaciju sastavnih dijelova stanice ili tkiva *in situ* putem specifične interakcije antigen-protutijelo, gdje je protutijelo, bilo primarno ili sekundarno, obilježeno fluorescentnom bojom tj. fluorokromom. Fluorokromi su molekule koje apsorbiraju svjetlost jedna valne duljine (ekscitacija), a emitiraju svjetlost druge valne duljine (emisija). Vizualizacija protutijela obilježenih fluorokromom vezanih za antigene na stanicama ili tkivnim preparatima vrši se pomoću fluorescencijskog ili konfokalnog mikroskopa. Prvi dan stanice se nasade na 12-mm pokrovna stakalca u pločicu za uzgoj stanica s 24 bunarića. Broj nasađenih stanica ovisi o pojedinoj staničnoj liniji, a određuje se s obzirom na popunjenost površine koja bi nakon 48 sati rasta stanica trebala biti 60-70%. Nakon sterilizacije u 70% etanolu, pokrovna stakalca se stavljaju u pločicu za uzgoj stanica sa 24 bunarića i inkubiraju s 400  $\mu$ L seruma fetusa goveda (FCS) kako bi se stanice kasnije bolje prihvatile za podlogu. Nakon inkubacije sat vremena pri 37°C u inkubatoru, serum se ukloni sa stakalca i nasađuju se stanice. Za svaku staničnu liniju potrebna su dva bunarića, jedan koji služi kao kontrola, a drugi služi za izlaganje istraživanom spoju, u ovom radu cilengitidu. U svaki bunarić dodaje se 900  $\mu$ L suspenzije stanica koja sadrži točno određeni broj stanica ( $4 \times 10^4$  stanica po bunariću). Pločica sa stanicama se ostavlja u inkubatoru tijekom 48 sati nakon čega se stanice izlažu određenoj koncentraciji cilengitida (9  $\mu$ g/mL). Nakon 48 sati stanice se ispiru dva puta sa PBS-om i fiksiraju sa 2% paraformaldehidom u PBS-u tijekom 12 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se očuvala morfologija samih stanica. Nakon fiksacije stanice se ponovno ispiru dva puta sa PBS-om i permeabiliziraju sa 0.1% triton-X u PBS-u tijekom 2 minute. Nakon ispiranja dva puta u PBS-u, slijedi blokiranje sa 3% BSA/PBS tijekom 30 minuta. Stanice se najprije inkubiraju sa primarnim protutijelom za fosforilirani oblik kinaze fokalne adhezije (pFAK(Y397)) koje se priprema u 5% otopini BSA/PBS, na sobnoj temperaturi tijekom 60 min. Stanice se zatim ispiru dva puta u PBS-u, nakon čega slijedi inkubacija sa sekundarnim antitijelom koje je obilježeno fluorokromom, na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta. Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, stanice se ispiru dva puta u PBS-u i inkubiraju sa fluorescentno obilježenim faloidinom koji se veže za F-aktin i omogućuje vizualizaciju aktinskog citoskeleta te se uklapaju u medij za uklapanje koji sadrži DAPI, fluorescentnu boju koja se specifično veže za DNA i boji jezgre stanica.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Cilengitid smanjuje vijabilnost staničnih linija tumora dojke i melanoma

Kako bismo utvrdili potencijal kombinirane terapije cilengitidom i protutumorskim lijekovima pristupili smo određivanju koncentracija cilengitida koje imaju citotoksični učinak na stanice. Stoga smo mjerili preživljenje stanica izloženih cilengitidu MTT testom. Rezultati MTT testa prikazani su kao postotak preživljenja stanica izloženih djelovanju citostatika u odnosu na kontrolne stanice.

Na Slici 1 prikazan je učinak cilengitida na preživljenje staničnih linija trostruko negativnog karcinoma dojke i melanoma iz kojih se može zaključiti da cilengitid pokazuje citotoksični učinak na stanice ovisno o primijenjenoj dozi. Od tri stanične linije trostruko negativnog karcinoma dojke, stanična linija MDA-MB-468 pokazuje nešto manju osjetljivost, tj. potrebne su veće koncentracije cilengitida da bi se izazvao jednak citotoksični učinak kao u ostalim staničnim linijama, dok stanična linija melanoma MeWo pokazuje osjetljivost već pri vrlo niskim koncentracijama cilengitida.

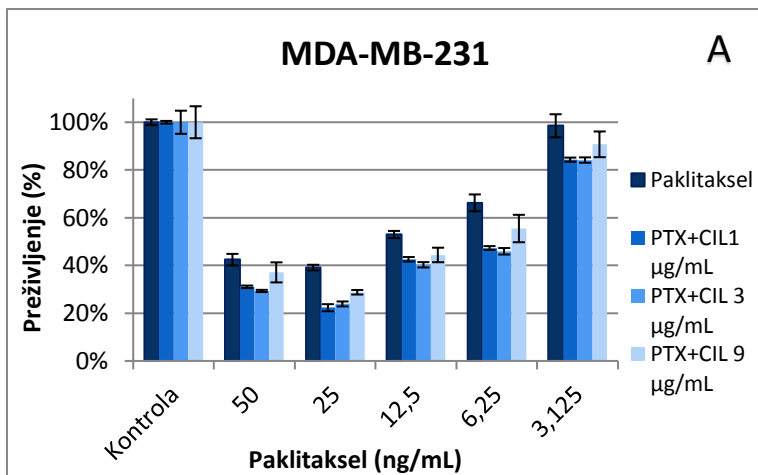


Slika 1. Utjecaj cilengitida na preživljenje staničnih linija trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 i melanoma MDA-MB-435S, A375, MeWo i RPMI-7951. Na slici je prikazan jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

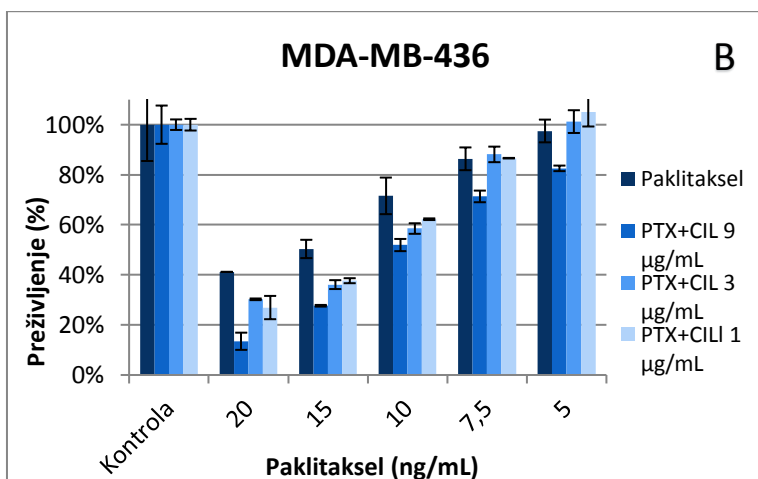
#### **4.2. Kombinacija cilengitida i paklitaksela ima sinergistički učinak u stanicama MDA-MB-231, MDA-MB-436, RPMI-7951 i A375, antagonistički učinak u stanicama MDA-MB-468 i MeWo i aditivni učinak u stanicama MDA-MB-435S**

Kako bismo utvrdili može li se inhibiranje integrina  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  cilengitidom koristiti za povećanje osjetljivosti staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke i melanoma na protutumorske lijekove, mjerili smo preživljenje nakon kombiniranog učinka testom MTT. Rezultati dosadašnjih neobjavljenih istraživanja u laboratoriju u kojem je ovaj rad napravljen otkrili su da utišavanje integrina  $\alpha v$  transfekcijom integrin  $\alpha v$  specifičnom siRNA povećava osjetljivost većine staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke (MDA-MB-231, MDA-MB-468) i melanoma (MDA-MB-435S, RPMI-7951 i MeWo) na paklitaksel. Osjetljivost staničnih linija MDA-MB-436 i A375 na paklitaksel nije se mijenjala nakon utišavanja integrina  $\alpha v$ .

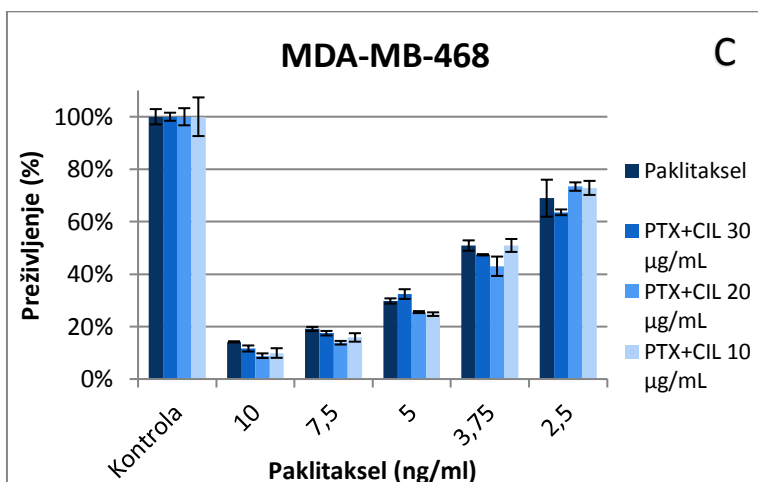
Na Slici 2 prikazano je preživljenje stanica nakon izlaganja kombinaciji citotoksičnih koncentracija paklitaksela i cilengitida. Na temelju dobivenih podataka u pokusu izračunat je kombinacijski indeks (slika 3) koji pokazuje da je u staničnim linijama MDA-MB-231, MDA-MB-436, RPMI-7951 i A375 učinak zajedničkog djelovanja dvaju citotoksičnih spojeva sinergistički, što znači da spojevi međusobno pojačavaju učinak djelovanja te je zbroj njihova djelovanja veći od zbroja njihovih pojedinačnih učinaka. U staničnoj liniji MDA-MB-435S učinak je aditivan, što znači da je zajednički učinak jednak zbroju učinaka svakog pojedinačnog spoja. U staničnim linijama MDA-MB-468 i MeWo vrijednost kombinacijskog indeksa ukazuje na antagonističko djelovanje, što znači da spojevi međusobno smanjuju pojedinačni učinak.



KONCENTRACIJA CILENGITIDA (µg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
9	64 %
3	87 %
1	100 %

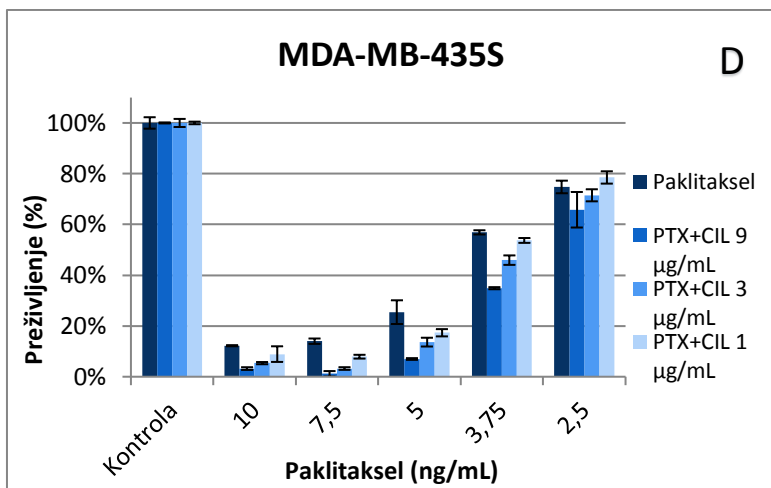


KONCENTRACIJA CILENGITIDA (µg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
9	55 %
3	76 %
1	85 %

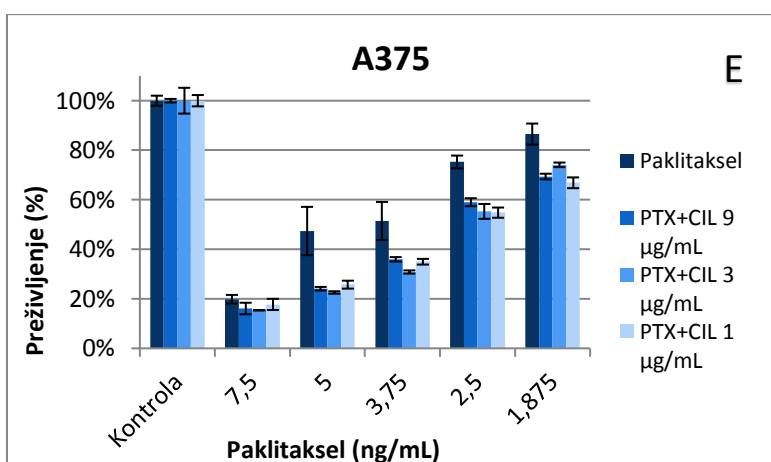


KONCENTRACIJA CILENGITIDA (µg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
30	40 %
20	63 %
10	82 %

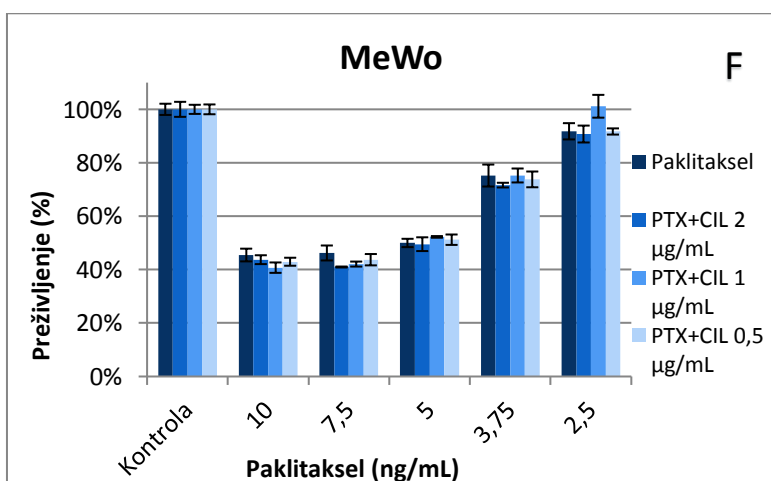




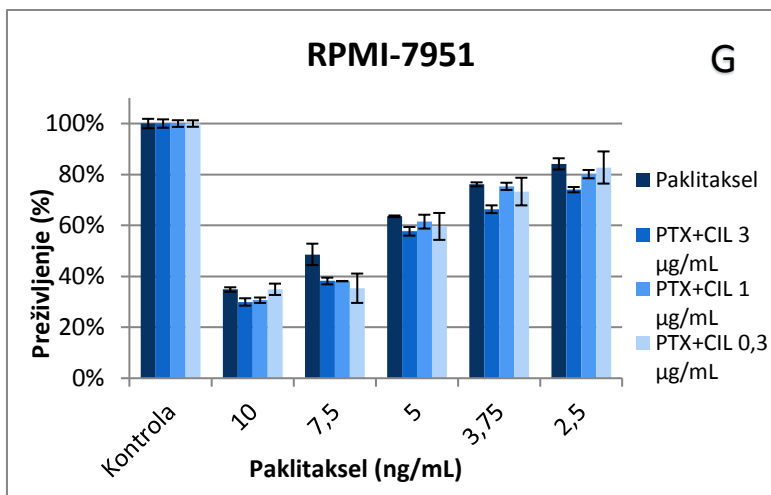
KONCENTRACIJA CILENGITIDA (μg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
9	75 %
3	84 %
1	97 %



KONCENTRACIJA CILENGITIDA (μg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
9	73 %
3	78 %
1	92 %

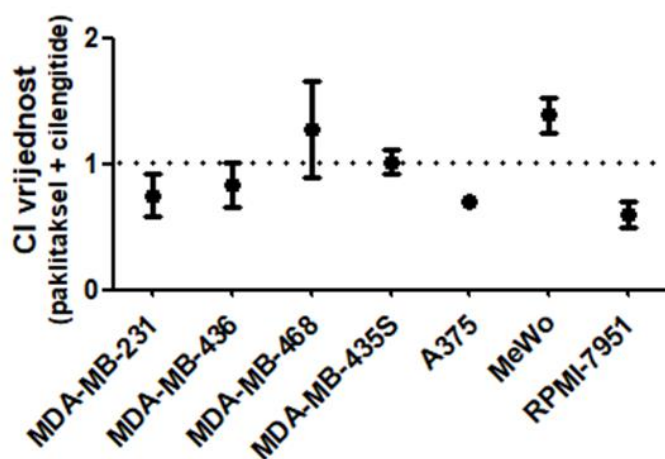


KONCENTRACIJA CILENGITIDA (μg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
2	61 %
1	80 %
0,5	96 %



KONCENTRACIJA CILENGITIDA (µg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
3	83 %
1	94 %
0,3	100 %

Slika 2. Kombinirani učinak cilengitida i paklitaksela na preživljenje staničnih linija trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 (A), MDA-MB-436 (B), MDA-MB-468 (C) i melanoma MDA-MB-435S (D), A375 (E), MeWo (F) i RPMI-7951 (G). Na slici je prikazan jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima. Rezultati su prikazani kao postotak preživljenja relativno prema vlastitoj kontroli djelovanja cilengitida koji ima citotoksični učinak (rezultati prikazani na slici 1). U tablici prikazanoj uz svaku sliku prikazano je preživljenje stanica prema kontroli za svaku od primijenjenih koncentracija cilengitida u pokusu.



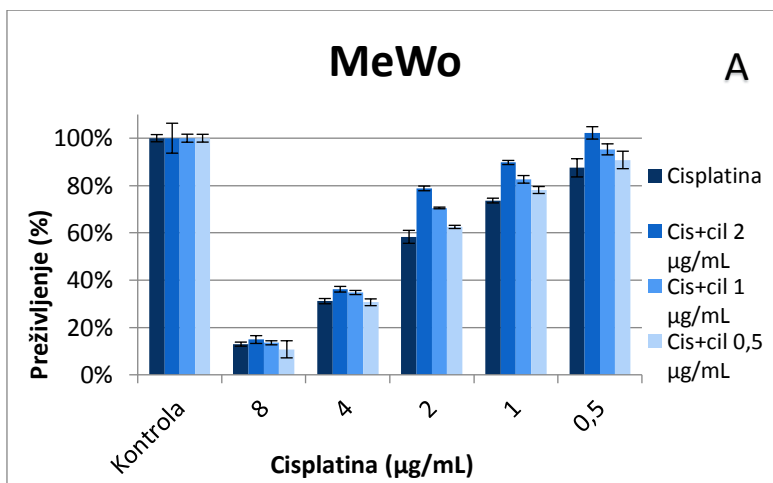
CI = kombinacijski indeks  
 CI < 1 = sinergistički učinak  
 CI = 1 = aditivni učinak  
 CI > 1 = antagonistički učinak

Slika 3. Vrijednosti kombinacijskog indeksa (CI) za zajednički učinak paklitaksela i cilengitida u staničnim linijama trostruko negativnog karcinoma dojke i melanoma.

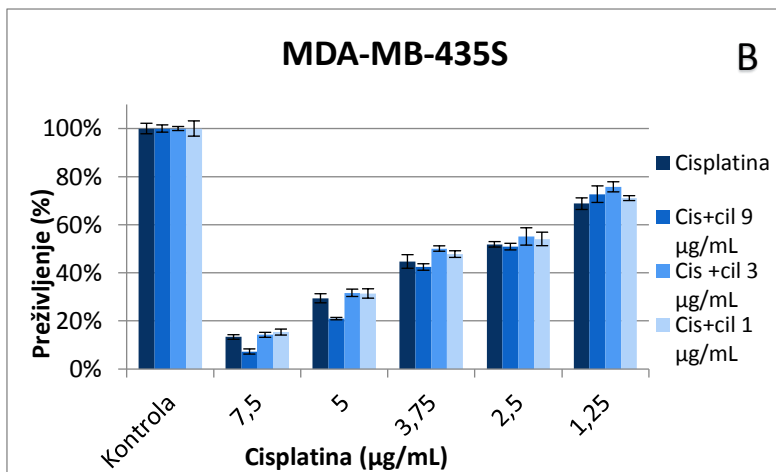
### 4.3. Kombinacija cilengitida i cisplatine ima antagonistički učinak u stanicama MeWo i aditivni učinak u stanicama MDA-MB-435S

S obzirom na neobjavljene rezultate grupe u kojem je izrađen ovaj rad smanjenja osjetljivosti staničnih linija MeWo i MDA-MB-435S na cisplatinu nakon utišavanja  $\alpha v$  podjedinice integrina transfekcijom sa specifičnom siRNA, htjeli smo provjeriti hoće li inhibicija integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  cilengitidom imati jednaki učinak na osjetljivost ovih staničnih linija na cisplatinu. Stanične linije MeWo i MDA-MB-435S izlagali smo različitim koncentracijama oba citostatika te smo preživljenje mjerili testom MTT.

Na Slici 4 prikazano je preživljenje stanica nakon izlaganja kombinaciji citotoksičnih koncentracija cisplatine i cilengitida. Na temelju dobivenih podataka u pokusu izračunat je kombinacijski indeks (slika 5) koji pokazuje da u staničnoj liniji MeWo spojevi djeluju antagonistički, odnosno cilengitid smanjuje osjetljivost stanica na cisplatinu. U staničnoj liniji MDA-MB-435S cilengitid je povećao osjetljivost stanica na cisplatinu i spojevi djeluju aditivno.

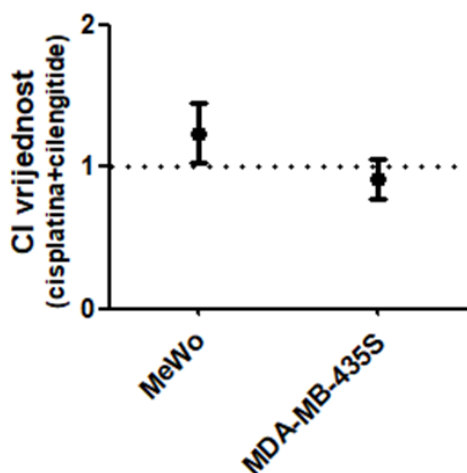


KONCENTRACIJA CILENGITIDA (µg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
2	64 %
1	77 %
0,5	91 %



KONCENTRACIJA CILENGITIDA (µg/mL)	PREŽIVLJENJE (%)
9	80 %
3	86 %
1	95 %

Slika 4. Kombinirani učinak cilengitida i cisplatine na preživljenje staničnih linija MeWo (A) i MDA-MB-435S (B). Na slici je prikazan jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima. Rezultati su prikazani kao postotak preživljenja relativno prema vlastitoj kontroli djelovanja cilengitida koji ima citotoksični učinak (rezultati prikazani na slici 1). U tablici prikazanoj uz svaku sliku prikazano je preživljenje stanica prema kontroli za svaku od primijenjenih koncentracija cilengitida u pokusu.



CI = kombinacijski indeks

CI < 1 = sinergistički učinak

CI =1 = aditivni učinak

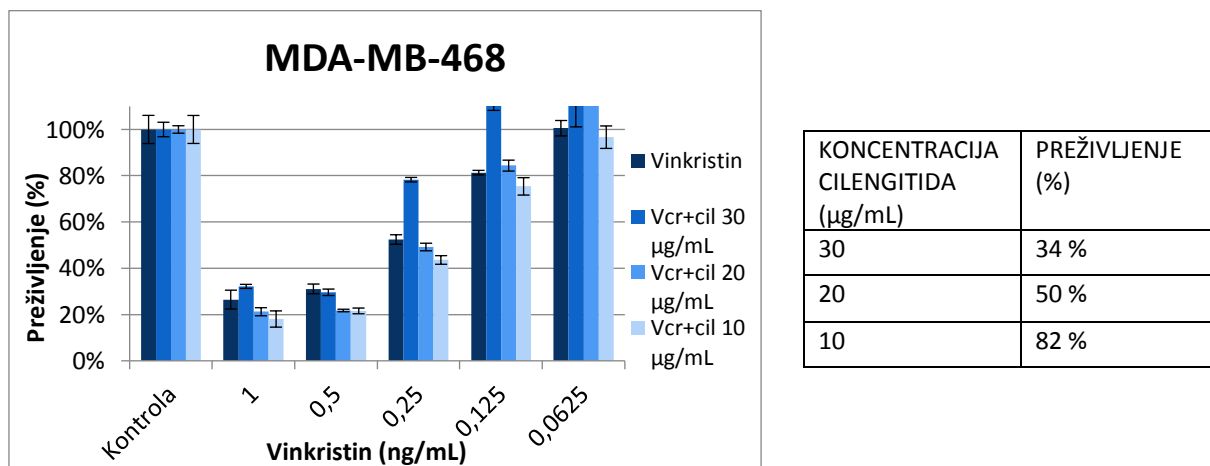
CI > 1 = antagonistički učinak

Slika 5. Vrijednosti kombinacijskog indeksa (CI) za zajednički učinak cisplatine i cilengitida u staničnim linijama MeWo i MDA-MB-435S.

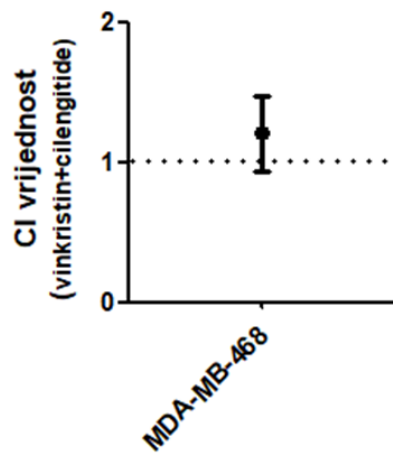
#### 4.4. Kombinacija cilengitida i vinkristina ima antagonistički učinak u stanicama MDA-MB-468

S obzirom na neobjavljene rezultate grupe u kojoj je izrađen ovaj rad dobivene utišavanjem integrina  $\alpha$  transfekcijom specifičnom siRNA, koji su pokazali povećanje osjetljivosti stanične linije MDA-MB-468 na vinkristin, htjeli smo provjeriti hoće li inhibiranje integrina  $\alpha$  $\beta$ 3 i  $\alpha$  $\beta$ 5 cilengitidom imati jednaki učinak na osjetljivost stanica na vinkristin. Kako bismo utvrdili učinak zajedničkog djelovanja cilengitida i vinkristina, stanice smo izlagali različitim koncentracijama oba citostatika te smo preživljenje mjerili MTT testom.

Na Slici 6 prikazano je preživljenje stanica nakon izlaganja kombinaciji citotoksičnih koncentracija vinkristina i cilengitida. Na temelju dobivenih podataka u pokusu izračunat je kombinacijski indeks (slika 7) koji pokazuje da cilengitid i vinkristin u staničnoj liniji MDA-MB-468 djeluju antagonistički.



Slika 6. Kombinirani učinak cilengitida i vinkristina na preživljenje stanične linije MDA-MB-468. Rezultati su prikazani kao postotak preživljenja relativno prema vlastitoj kontroli djelovanja cilengitida koji ima citotoksični učinak (rezultati prikazani na slici 1). U tablici prikazanoj uz svaku sliku prikazano je preživljenje stanica prema kontroli za svaku od primijenjenih koncentracija cilengitida u pokusu.



CI = kombinacijski indeks

CI < 1 = sinergistički učinak

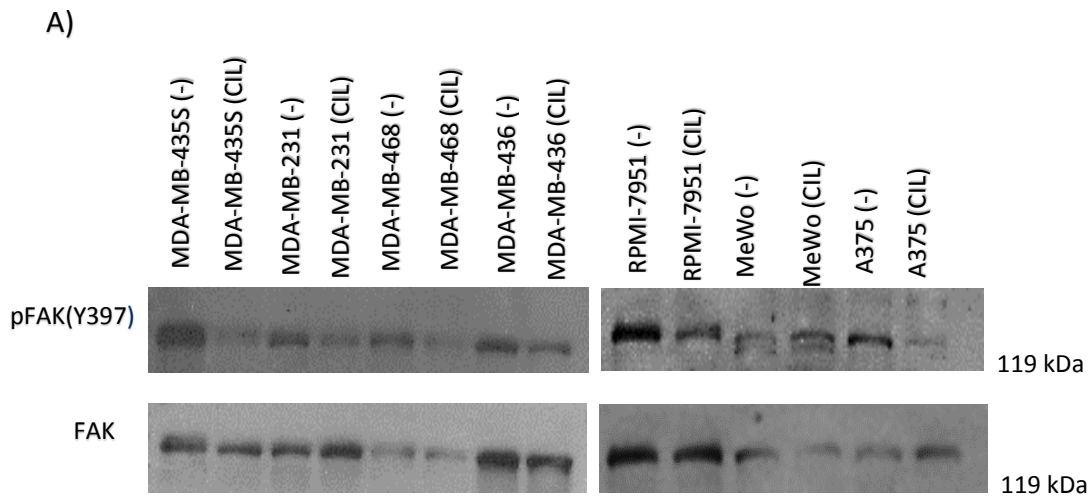
CI = 1 = aditivni učinak

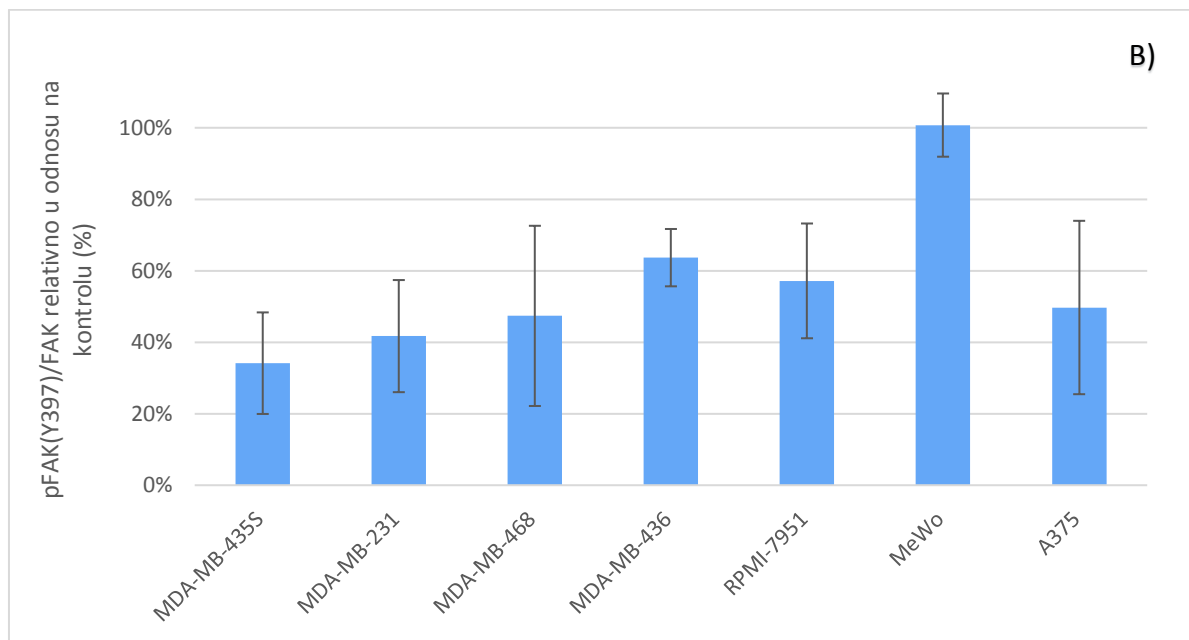
CI > 1 = antagonistički

Slika 7. Vrijednost kombinacijskog indeksa (CI) za zajednički učinak vinkristina i cilengitida u staničnoj liniji MDA-MB-468.

#### 4.5. Određivanje aktivacije kinaze fokalne adhezije određivanjem ekspresije pFAK (Y397) u staničnim linijama tumora dojke i melanoma nakon izlaganja cilengitidu

Na temelju prethodno prikazanih rezultata osjetljivosti staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke i melanoma na kombinirano izlaganje cilengitidu i paklitakselu, htjeli smo utvrditi postoji li korelacija između ekspresije fosforiliranog oblika proteina pFAK(Y397) i povećanja osjetljivosti na paklitaksel. Uzorci za određivanje ekspresije pFAK(Y397) metodom SDS-PAGE i Western blot uzimani su sat vremena nakon dodatka cilengitida. Koncentraciju cilengitida za određenu staničnu liniju odredili smo iz pokusa u kojem je utvrđeno citotoksično djelovanje cilengitida i rezultata prikazanih na slici 1. Odabrali smo onu koncentraciju cilengitida kod koje je preživljenje stanica bilo između 70 i 80%. Rezultati prikazani na Slici 8 (A i B) pokazuju da cilengitid smanjuje ukupnu količinu proteina pFAK(Y397) u svim staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke i melanoma, osim u staničnoj liniji MeWo u kojoj nema značajnije promjene u usporedbi sa kontrolnim stanicama.





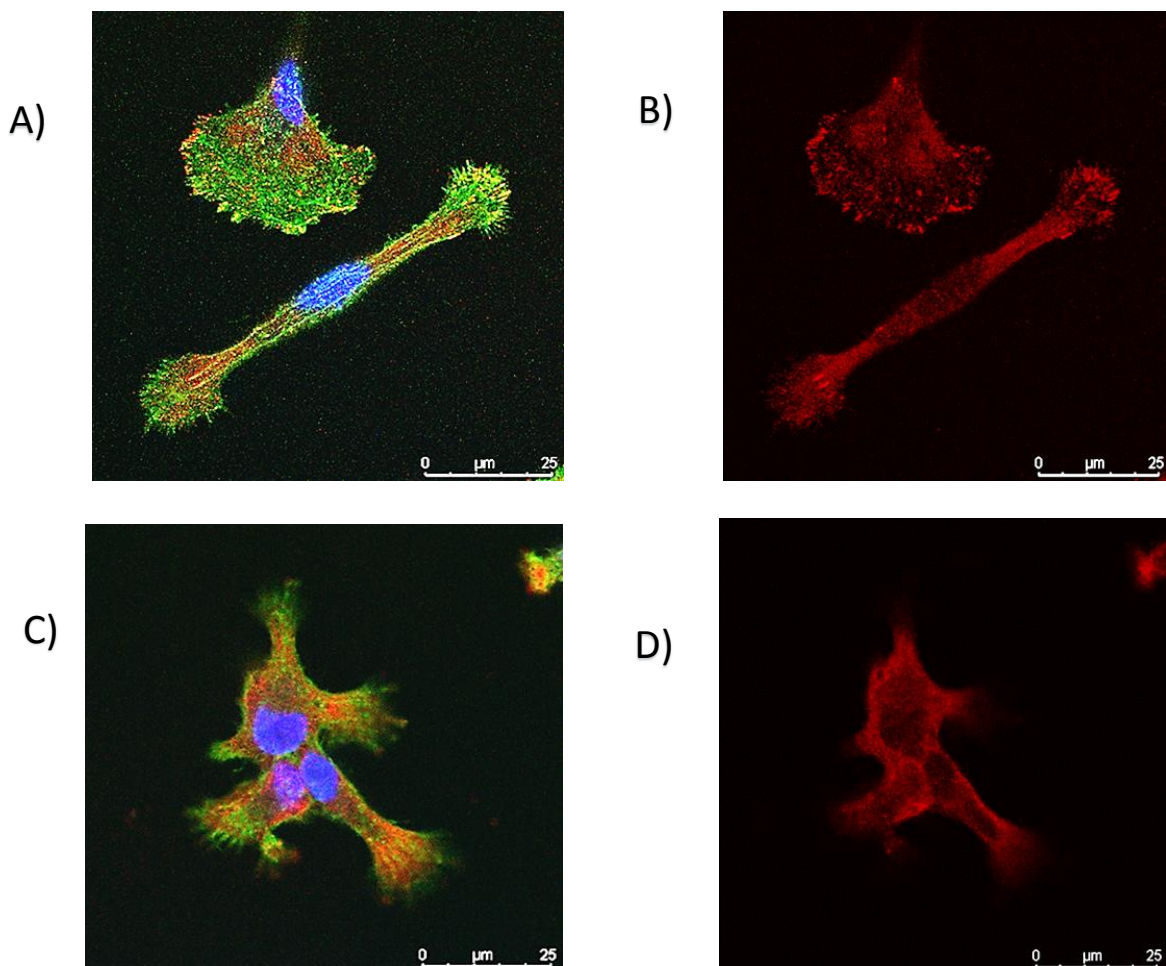
Slika 8. A) Ekspresija proteina pFAK(Y397) i FAK u staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke i melanoma. Stanice su izložene djelovanju cilengitida sat vremena nakon čega su skupljeni uzorci. Kao kontrola korištene su stanice iste stanične linije koje nisu izlagane cilengitidu. Ekspresija pFAK (Y397) i FAK utvrđena je metodom SDS-PAGE i Western blot pomoću protutijela specifičnih za FAK i pFAK (Y397) te odgovarajućih sekundarnih protutijela obilježenih enzimom peroksidaza. Detekcija je izvršena pomoću kemiluminiscentnog reagensa i izlaganjem membrane fotografskom filmu. Na slici je prikazan rezultat jednog od ukupno tri pokusa sa sličnim rezultatima. B) Denzitometrijska analiza količine proteina pFAK (Y397)/FAK u staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke i melanoma. Na slici je prikazana statistička analiza rezultata dobivenih metodom SDS-PAGE i Western blot koji se za objektivnu analizu denzitometriraju, a ekspresija pFAK(Y397) se normalizira za svaki uzorak prema ekspresiji ukupnog FAK te se uspoređuje sa svojom kontrolom. Kako bi se mogla izvršiti statistička obrada ovako dobivenih rezultata, pokus je za svaku staničnu liniju ponovljen najmanje tri puta.



#### 4.6. Određivanje lokalizacije proteina pFAK (Y397) metodom imunofluorescencije u staničnoj liniji MDA-MB-231

S obzirom na dobivene rezultate analize Western blot koji su pokazali smanjenje ukupne količine fosforiliranog oblika pFAK (Y397) u svim staničnim linijama trostruko negativnih tumora dojke, htjeli smo provjeriti utječe li inhibicija integrina  $\alpha\beta 3$  i  $\alpha\beta 5$  cilengitidom na promjenu lokalizacije proteina pFAK (Y397) u stanicama MDA-MB-231.

Slika 9. (A) i (B) prikazuje lokalizaciju proteina pFAK (Y397) u kontrolnim stanicama MDA-MB-231 u kojima je vidljivo da je protein najvećim dijelom lokaliziran na periferiji stanice, odnosno na mjestima fokalnih adhezija, dok je na slikama (C) i (D) vidljivo da je nakon izlaganja cilengitidu, većina pFAK(Y397) nestala iz mjesta fokalnih adhezija te se pojavila znatna količina proteina u citoplazmi.



Slika 9. Lokalizacija proteina pFAK (Y397) u kontrolnim stanicama MDA-MB-231 (A i B) i stanicama tretiranim sa cilengitidom (C i D). Stanice su inkubirane sa primarnim protutijelom za pFAK(Y397) i sekundarnim protutijelom koje je obilježeno fluorokromom (crveno obojenje). Nakon toga inkubirane su sa fluorescentno obilježenim FITC- faloidinom koji se veže za F-aktin (zeleno obojenje) te su uklopljene u medij za uklapanje koji sadrži DAPI, fluorescentnu boju koja boji jezgre stanica (plavo obojenje). Na slikama A) i C) prikazani su preklopljeni signali pFAK(Y397), FITC-faloidin i DAPI, dok je na slikama B) i D) prikazan signal samo pFAK(Y397).

## 5. RASPRAVA

Osim njihove uloge kao staničnih adhezijskih molekula, interakcija integrina s proteinima izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) pokreće niz unutarstaničnih signala i regulira mnoge stanične funkcije, uključujući migraciju, proliferaciju i apoptozu. Uloga integrina u reguliranju života i smrti stanice bila je fokus opsežnih istraživanja u posljednjem desetljeću, a posebno intenzivno područje istraživanja obuhvaća razumijevanje funkcije integrina u modulaciji odgovora stanica tumora na protutumorske lijekove (Aoudjit i Vuori, 2012). Kako bi postale otporne na lijekove, tumorske stanice moraju razviti mehanizam zaobilazanja citotoksičnih efekata protutumorskih lijekova. Razumijevanje molekularnih signala koji pridonose inhibiciji apoptoze inducirane protutumorskim lijekovima u tumorskim stanicama mogu pružiti razvoj boljih strategija za nove vrste terapija (Aoudjit i Vuori, 2001).

Poznato je da ekspresija integrina  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  na tumorskim stanicama korelira s progresijom bolesti u različitim vrstama tumora kao što su melanomi i karcinomi dojke, prostate, pankreasa i vrata maternice, sudjeluju u otpornosti na protutumorske lijekove i povećavaju metastatski potencijal (Desgrosellier i Cheresh, 2010). Integrini  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  prepoznaju RGD slijed (arginin-glicin-aspartat) u proteinima izvanstaničnog matriksa kao što su fibronektin, fibrinogen i vitronektin (Weis i Cheresh, 2011).

U laboratoriju u kojem je izrađen ovaj rad već se godinama istražuje integrin  $\alpha\beta3$ . Dokazano je da *de novo* ekspresija integrina  $\alpha\beta3$  posreduje otpornosti na cisplatinu u stanicama karcinoma grkljana čovjeka HEp2 te da je mehanizam otpornosti uzrokovan povećanom ekspresijom ukupnog glutationa koji eliminira reaktivne kisikove vrste (Brozović i sur, 2008). Također je dokazano da *de novo* ekspresija integrina  $\alpha\beta3$  u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 osigurava otpornost na četiri protutumorska lijeka, uključujući cisplatinu, mitomicin C, doksorubicin i 5-fluorouracil kroz gubitak pSrc (Y418) (Stojanović i sur, 2016). Dokazano je da utišavanje nekoliko različitih integrina, posebice  $\alpha\beta3$ , transfekcijom specifičnom siRNA, kao i izlaganje cikličkom RGD antagonistu integrina  $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ , povećava osjetljivost staničnih linija glioblastoma na temozolomid (TMZ). Najveći učinak opažen je u stanicama LN229 nakon utišavanja integrina  $\beta3$ , što je dovelo do inhibicije signalnog puta FAK/Src/Akt/NF $\kappa$ B, povećanog nastanka fokusa  $\gamma$ H2AX, proteosomske degradacije proteina Rad51 i smanjivanja djelotvornosti homologne rekombinacije što dovodi do nepravilnog popravka dvostrukih lomova DNA induciranih TMZ-om (Christmann i sur, 2017).

Inhibicija aktivacije integrina može imati protutumorski potencijal, osobito u prevenciji angiogeneze i metastaziranja. Trenutno dostupni inhibitori integrina su funkcionalno blokirajuća monoklonska protutijela, peptidni antagonisti i ciklički peptidi koji oponašaju izvanstanični matriks. Ti spojevi ne utječu samo na angiogenezu već također sprječavaju migraciju, invaziju i metastaziranje tumora i induciraju apoptozu (Weis i Cheresh, 2011). Nekoliko spojeva usmjerenih na inhibiranje integrina trenutno je u fazi kliničkih ispitivanja kao potencijalnih lijekova za liječenje brojnih vrsta tumora. Među njima, cilengitid je jedina molekula koja pokazuje visoki afinitet za integrine  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ , čak i u niskim koncentracijama. Cilengitid djeluje kao inhibitor angiogeneze i inducira apoptozu aktiviranih endotelnih stanica putem inhibicije interakcije integrina s proteinima ECM-a. Osim anti-angiogene aktivnosti, pokazao je značajnu protutumorsku aktivnost u različitim životinjskim modelima, kao i inhibiciju

metastaziranja tumora u mnogim predkliničkim studijama. Za brojne antagoniste integrina pokazan je sinergistički učinak u kombinaciji s radioterapijom i kemoterapijom, a jednako tako je u visoko prokrvljenim čvrstim tumorima pokazan koristan učinak cilengitida u kombinaciji s kemoterapijskim lijekovima (Mas-Moruno i sur, 2010).

Cilengitid inhibira migraciju endotelnih i tumorskih stanica, koje eksprimiraju integrine  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ , pri niskim mikromolarnim koncentracijama. Ovaj učinak dokazan je na stanicama glioma, karcinoma dojke, pluća ne-malih stanica i melanoma, koje su nakon izlaganja cilengitidu pokazale poremećaj organizacije aktina i formiranja adherentnih veza. Cilengitid inhibira signalizaciju kroz puteve posredovane s FAK-Src-Akt i Erk i smanjuje učinak stimulacije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). (Millard i sur, 2011). Unatoč brojnim uspjesima, pokazalo se da niske nanomolarne koncentracije cilengitida paradoksalno stimuliraju rast tumora *in vivo* poticanjem angiogeneze posredovane VEGF-om. Postoji mogućnost da niske koncentracije cilengitida oponašaju ulogu liganda u prvom koraku aktivacije integrina, nastanka fokalnih kontakata i konačno fokalnih adhezija (Mas-Moruno i sur, 2010).

Tijekom progresije melanoma, stanice tumora pokazuju povećanu adhezivnost i invazivnost te često stvaraju funkcionalne kanale slične krvnim žilama, procesom poznatim kao vaskularna mimikrija, koji može doprinijeti otpornosti na anti-angiogene terapije i objasniti klinički neuspjeh ovih terapija u liječenju melanoma. Cilengitid je kao pojedinačni agens pokazao minimalnu kliničku efikasnost u pacijenata s metastatskim melanomom, što upućuje na to da korištenje inhibitora integrina može biti djelotvornije u kombiniranim terapijama. Predkliničke studije su pokazale sinergističke antiproliferativne učinke cilengitida i temozolomida na stanicama melanoma i endotelnim stanicama *in vitro* i značajnu inhibiciju rasta melanoma *in vivo*, u usporedbi s liječenjem samo sa TMZ. Dokazano je da su integrini  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  odgovorni za agresivnost stanica melanoma koje eksprimiraju neuropilin 1 (NRP-1), koreptora vaskularnog endotelnog faktora rasta A (engl. *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A), čija ekspresija korelira s povećanjem agresivnosti zbog pojačane ekspresije VEGF-A i matriks metaloproteinaze-2 (engl. *matrix metalloproteinase-2*, MMP-2) (Ruffini i sur, 2014).

U visoko agresivnim i invazivnim staničnim linijama melanoma dokazano je da integrin  $\alpha\beta3$  potiče invaziju tumorskih stanica u prisustvu receptora endotelnog faktora rasta 2 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR-2), dok integrin  $\alpha\beta5$  potiče adheziju stanica na vitronektin i surađuje s NRP-1 u poticanju invazivnog fenotipa i vaskularne mimikrije. Inhibicija integrina  $\alpha\beta5$  cilengitidom rezultirala je smanjenjem adhezivnosti i invazivnosti, inhibicijom formiranja struktura nalik krvnim žilama, proizvodnju VEGF-A i izlučivanje MMP-9. Stoga se može zaključiti da melanomi koji eksprimiraju integrin  $\alpha\beta5$  i visoke razine NRP-1 pokazuju agresivniji fenotip i da cilengitid ima koristan učinak za barem djelomično smanjenje invazivnosti takvih tumora (Ruffini i sur, 2014).

U 10-16% pacijenata s metastatskim karcinom dojke tijekom napredovanja bolesti dolazi do metastaziranja u mozak, a integrin  $\alpha\beta3$  pokazao se posebno važnim u ovom procesu. Istraživanje provedeno na četiri stanične linije karcinoma dojke T-47D, MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468 pokazalo je da cilengitid u stanicama T-47D koje eksprimiraju visoke razine integrina  $\beta3$  i  $\beta5$  uzrokuje odvajanje stanica od podloge, dok stanice MDA-MB-468 koje

pokazuju još višu ekspresiju integrina  $\beta 3$  i nižu ekspresiju integrina  $\beta 5$  pokazuju minimalno odvajanje od podloge. U testu određivanja vijabilnosti i induciranja apoptoze, nakon izlaganja cilengitidu, stanice MDA-MB-468 ponovno nisu pokazale odgovor. Ispitavanje učinka cilengitida u odgovoru stanica na radioterapiju pokazalo je da sve stanične linije karcinoma dojke imaju smanjenu vijabilnost nakon kombiniranog tretmana cilengitida i radioterapije (IR) u usporedbi sa samim IR. Ovim pokusima je dokazano da stanične linije s višim razinama integrina  $\beta 3$  i nižim razinama integrina  $\beta 5$  (MDA-MB-231 i MDA-MB-468) imaju slabiji odgovor na cilengitid, dok su stanične linije s nižim razinama ekspresije integrina  $\beta 3$  (T-47D i MCF-7) imale značajno bolji odgovor. Jedno od mogućih objašnjenja ovih rezultata je da integrin  $\beta 3$  u staničnim linijama s njegovom visokom ekspresijom nije bio potpuno inhibiran primijenjenim dozama cilengitida (Lautenschlaeger i sur, 2013).

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada temelji se na rezultatima studija koje su pokazale sinergistički učinak cilengitida i protutumorskih lijekova u stanicama melanoma (Ruffini i sur, 2014) te inhibiciju rasta i induciranje apoptoze u staničnim linijama karcinoma dojke (Lautenschlaeger i sur, 2013) i na rezultatima dosadašnjih istraživanja u laboratoriju u kojem je rad izrađen, koji su pokazali da utišavanje podjedinice integrina  $\alpha v$  transfekcijom specifičnom siRNA može povećati osjetljivost stanica tumora na protutumorske lijekove. Osnovni cilj rada bio je istražiti može li inhibicija samo integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  biti odgovorna za povećanje osjetljivosti staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke i melanoma na paklitaksel i utvrditi može li se kombinacija dvaju spojeva koristiti kao potencijalna terapija. Pretpostavili smo da ćemo rezultatima dobivenim inhibiranjem integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  cilengitidom potvrditi rezultate dobivene utišavanjem  $\alpha v$  integrina, koji su pokazali povećavanje osjetljivosti staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke (MDA-MB-231, MDA-MB-468) i melanoma (MDA-MB-435S, RPMI-7951 i MeWo) na paklitaksel. Osjetljivost staničnih linija MDA-MB-436 i A375 na paklitaksel nije se mijenjala nakon utišavanja integrina  $\alpha v$ .

Neobjavljeni rezultati grupe u kojoj je izrađen ovaj diplomski rad, pokazali su ekspresiju integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$ , mjereno metodom protočne citometrije, u staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke i melanoma. Ustanovljeno je da je integrin  $\alpha v\beta 3$  visoko eksprimiran u staničnoj liniji A375 i MDA-MB-435S, umjereno eksprimiran u staničnoj liniji RPMI-7951, dok je ekspresija niska ili čak odsutna u staničnoj liniji MeWo. Za razliku od integrina  $\alpha v\beta 3$ , integrin  $\alpha v\beta 5$  visoko je eksprimiran u svim staničnim linijama melanoma. Mjerenjem ekspresije integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  protočnom citometrijom u staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke ustanovljeno je da je integrin  $\alpha v\beta 3$  umjereno eksprimiran u staničnoj liniji MDA-MB-231, dok je u staničnim linijama MDA-MB-468 i MDA-MB-436 njegova ekspresija niska ili čak odsutna. Integrin  $\alpha v\beta 5$  visoko je eksprimiran u staničnoj liniji MDA-MB-231, umjereno eksprimiran u staničnoj liniji MDA-MB-468, dok je u staničnoj liniji MDA-MB-436 ekspresija niska ili čak odsutna.

Cilengitid je pokazao citotoksični učinak i smanjenje vijabilnosti svih staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke i melanoma u odnosu na kontrolne stanice, iako stanične linije pokazuju različitu osjetljivost na cilengitid. Od tri ispitivane stanične linije trostruko negativnog tumora dojke, stanična linija MDA-MB-468 pokazuje najmanju osjetljivost, što je u skladu sa rezultatima istraživanja kojeg su proveli Lautenschlaeger i sur, u kojima je upravo stanična linija MDA-MB-468 pokazala najslabiji odgovor u smanjenju adhezivnosti,

vijabilnosti i induciranju apoptoze, vjerojatno zbog korištenja nedovoljne koncentracije cilengitida i nepotpune inhibicije integrina  $\alpha\beta3$ . Od četiri stanične linije melanoma, stanična linija MeWo pokazala je osjetljivost pri vrlo niskim koncentracijama cilengitida, vjerojatno zbog vrlo niske ekspresije integrina  $\alpha\beta3$ . Rezultati izračuna kombinacijskog indeksa (CI) pokazali su da cilengitid i paklitaksel u većini staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke i melanoma djeluju sinergistički (MDA-MB-231, MDA-MB-436, RPMI-7951, A375) što znači da spojevi međusobno pojačavaju učinak djelovanja. U svim navedenim staničnim linijama prisutna je ekspresija oba integrina, osim u staničnoj liniji MDA-MB-436 u kojoj je ekspresija oba integrina niska. U staničnoj liniji MDA-MB-435S cilengitid i paklitaksel djeluju aditivno, što znači da je zajednički učinak jednak zbroju učinaka svakog pojedinačnog spoja, a ova stanična linija također ekspresira oba integrina. U staničnim linijama MDA-MB-468 i MeWo uočeno je antagonističko djelovanje dvaju spojeva, a zajednička karakteristika obje stanične linije je niska ekspresija integrina  $\alpha\beta3$  te umjerena odnosno visoka ekspresija integrina  $\alpha\beta5$ .

Zanimljivo je da se rezultati dobiveni utišavanjem integrina  $\alpha\upsilon$  transfekcijom sa specifičnom siRNA i oni dobiveni inhibicijom integrina cilengitidom razlikuju u četiri stanične linije. Rezultati su jednaki u staničnim linijama MDA-MB-231, MDA-MB-435S i RPMI-7951 koje su pokazale povećanu osjetljivost na paklitaksel nakon utišavanja integrina  $\alpha\upsilon$  i nakon inhibiranja integrina  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  cilengitidom. Različiti rezultati dobiveni su za stanične linije MDA-MB-468 i MeWo. Naime, nakon utišavanja  $\alpha\upsilon$  integrina pokazale su pojačanu osjetljivost na paklitaksel, dok nakon tretmana sa cilengitidom pokazuju smanjenu osjetljivost na primijenjeni protutumorski lijek. Također, različiti rezultati dobiveni su za stanične linije MDA-MB-436 i A375, čija se osjetljivost na paklitaksel nije mijenjala nakon utišavanja integrina  $\alpha\upsilon$ , dok nakon inhibicije integrina cilengitidom pokazuju povećanu osjetljivost.

Moguće objašnjenje za neke od ovih odstupanja je činjenica da utišavanje integrina  $\alpha\upsilon$  utječe na sve  $\alpha\upsilon$  integrine, dok cilengitid inhibira signalizaciju samo integrina  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ . Utišavanje integrina  $\alpha\upsilon$  može osloboditi integrinsku  $\beta$  podjedinicu koja može formirati heterodimere s raspoloživim  $\alpha$  podjedinicama u stanici i poništiti učinak utišavanja integrina  $\alpha\beta3$  ili  $\alpha\beta5$ . Drugo moguće objašnjenje je da inaktivacija jednog integrina može uzrokovati kompenzacijsku ekspresiju drugih integrina. Oba ova procesa gdje promjena ekspresije jednog heterodimera integrina mijenja ekspresiju drugog heterodimera integrina poznati su pod pojmom „*integrin switching*“ (Ambriović i sur, 2004; Stojanović i sur, 2016; Parvani i sur, 2013; Truong i sur, 2014) čiji su mehanizmi još uvijek uvelike nepoznati, ali pokazuju postojanje ravnoteže između ekspresije integrina.

Osim kombinacijskog učinka cilengitida i paklitaksela, na staničnim linijama MeWo i MDA-MB-435S ispitali smo učinak zajedničkog djelovanja cilengitida i cisplatine. Neobjavljeni rezultati grupe u kojoj je izrađen ovaj rad pokazali su da nakon utišavanja  $\alpha\upsilon$  podjedinice integrina transfekcijom sa specifičnom siRNA, stanične linije MeWo i MDA-MB-435S pokazuju smanjenju osjetljivost na cisplatinu. Rezultati dobiveni nakon izlaganja stanica cilengitidu i cisplatinu podudaraju se s onima dobivenim nakon izlaganja cilengitidu i paklitakselu. Učinak zajedničkog djelovanja dvaju spojeva je u staničnoj liniji MeWo antagonistički, dok je u staničnoj liniji MDA-MB-435S aditivan.

I konačno, prethodno dobiveni neobjavljeni rezultati utišavanjem integrina  $\alpha v$  transfekcijom sa specifičnom siRNA pokazali su povećanje osjetljivosti stanične linije MDA-MB-468 na drugi mikrotubularni toksin, vinkristin. Kao i kod kombinacijskog tretmana sa cilengitidom i paklitakselom, stanična linija MDA-MB-468 pokazala je smanjenu osjetljivost na vinkristin nakon izlaganja cilengitidu, odnosno učinak zajedničkog djelovanja dvaju spojeva je antagonistički.

Općeniti mehanizmi otpornosti na lijekove, uključujući prekomjernu ekspresiju ABC/MDR obitelji transporterskih proteina, neispravne mitotske kontrolne točke i promjene u regulaciji apoptoze, mogu mijenjati osjetljivost stanica na paklitaksel. Promjene mikrotubula također mogu izazivati otpornost tumorskih stanica na taksane. Promjene uključuju mutacije  $\beta$ -tubulina koje mogu smanjiti vezanje paklitaksela na mikrotubule, ali također čimbenici koji povećavaju omjer nestabilnih i stabilnih mikrotubula, uključujući promjene izoformi tubulina, prekomjernu ekspresiju  $\beta$ -III tubulina i prekomjernu ekspresiju proteina statmina povezanog sa mikrotubulima, mogu izazvati pojavu otpornosti na taksane. Rezultati istraživanja provedeni na stanica karcinoma jajnika SKOV-3TR sugeriraju da protein izvanstaničnog matriksa TGFBI (engl. *transforming growth factor beta-induced*) modulira odgovor stanica na paklitaksel regulacijom stabilnosti mikrotubula. Kako paklitaksel prvenstveno cilja polimerizirane mikrotubule, povećanje udjela nepolimeriziranih mikrotubula, zbog gubitka proteina TGFBI, inducira otpornost na paklitaksel (Ahmed i sur, 2007). Budući da je pojava mutacija nakon utišavanja integrina ili inhibicije integrina cilengitidom isključena, u našem radu je povećana osjetljivost na paklitaksel najvjerojatnije posljedica promjena u stabilnosti tj. dinamici mikrotubula, ali pokusi koji bi to dokazali nisu učinjeni.

Jedna od glavnih molekula koja posreduje otpornosti na radioterapiju i kemoterapiju i ključni posrednik integrinske signalizacije je kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK). Protein FAK prekomjerno je ekspimiran u različitim vrstama tumora, uključujući melanom, karcinom jajnika, cerviksa, bubrega, pluća, gušterače, mozga, debelog crijeva i dojke, što je povezano s negativnim kliničkim ishodom (Yoon i sur, 2015). Različite studije pokazuju da FAK ima važnu ulogu u rastu i progresiji karcinoma dojke, čija je potencijalna veza otkrivena spoznajom da je ekspresija proteina FAK značajno povišena u invazivnim i metastatskim tumorima dojke u usporedbi s normalnim tkivom, što također upućuje na ulogu u invaziji i metastaziranju tumora dojke. Protein FAK također potiče nastanak i rast melanoma (Danen, 2013). Dokazano je da je kod melanoma FAK konstitutivno aktivan i neophodan za održavanje adhezivnosti stanica tumora, dok nedostatak njegove ekspresije uzrokuje gubitak stanične adhezije i smanjuje migraciju. S obzirom na ulogu proteina FAK u poticanju rasta i preživljenja stanica tumora, pretpostavka je da njegovo utišavanje povećava osjetljivost stanica tumora na terapiju. Međutim, rezultati istraživanja provedeni na stanica karcinoma jajnika SKOV-3TR pokazuju da gubitak FAK-a može također izazvati otpornost na paklitaksel. FAK je potreban za stabilizaciju mikrotubula induciranu proteinima izvanstaničnog matriksa, kao što je TGFBI, stoga je utišavanje FAK-a pomoću siRNA u staničnoj liniji karcinoma jajnika SKOV-3 i karcinoma dojke MDA-MB-231 izazvalo značajnu otpornost na apoptozu induciranu paklitakselom (Ahmed i sur, 2007).

Adhezija stanica na proteine izvanstaničnog matriksa jedan je od mehanizama otpornosti tumorskih stanica na terapiju, a u mnogim tipovima stanica vezanje integrina i proteina izvanstaničnog matriksa rezultira aktivacijom kinaze fokalne adhezije koja aktivira nizvodni

signalni put PI3K/Akt. U stanicama glioma nakon utišavanja  $\beta 3$  podjedinice integrina transfekcijom sa siRNA i tretmana sa temozolomidom smanjuje se ekspresija pFAK i pSrc te dolazi do defosforilacije Akt kinaze koja potiče preživljenje. U stanicama glioma integrin  $\alpha\beta 3$  prenosi signale kroz proteine pFAK, pSrc i pAkt, a inhibicija istog signalnog puta uočena je nakon tretmana sa cilengitidom (Christmann i sur, 2016). Prekomjerna ekspresija integrina  $\alpha\beta 3$  u stanicama melanoma potiče invazivni rast, metastaziranje *in vivo*, fosforilaciju proteina FAK i nastanak veće količine kompleksa FAK/Src, koji može biti važan za invaziju stanica melanoma posredovanu integrinom  $\beta 3$  (Li i sur, 2001). U stanicama karcinoma jajnika inhibicija integrina  $\alpha\beta 5$  antitijelom značajno smanjuje fosforaciju proteina Akt i FAK, dok aktivacija ovih proteina posredovana integrinom  $\alpha\beta 5$  potiče zaštitu od vanjskog puta apoptoze i inhibira aktivaciju kaspaza (Lane i sur, 2010).

S obzirom na rezultate studija koje pokazuju povezanost integrina  $\alpha\beta 3$  i  $\alpha\beta 5$  sa aktivacijom proteina pFAK (Christmann i sur, 2016; Li i sur, 2001; Lane i sur, 2010), htjeli smo provjeriti utječe li inhibicija integrina  $\alpha\beta 3$  i  $\alpha\beta 5$  cilengitidom na njegovu aktivaciju u staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke i melanoma. Aktivaciju smo pratili mjerenjem ekspresije pFAK (Y397) metodom Western blot nakon izlaganja cilengitidu. Rezultati su pokazali da je ukupna količina proteina pFAK (Y397) smanjena u svim staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke i melanoma nakon tretmana sa cilengitidom, osim u staničnoj liniji MeWo u kojoj nema značajnije promjene u usporedbi sa kontrolnim stanicama. Zanimljivo je da smo upravo u stanicama MeWo primijetili smanjenu osjetljivost na paklitaksel i cisplatinu nakon inhibicije integrina cilengitidom.

Rezultati pokazuju da u stanicama melanoma postoji korelacija smanjenja količine proteina pFAK(Y397) i povećanja osjetljivosti stanica na paklitaksel, dok u staničnim linijama trostruko negativnog tumora dojke ta korelacija nije uočena. U staničnim linijama melanoma koje pokazuju povećanu osjetljivost na paklitaksel (MDA-MB-435S, RPMI-7951 i A375) nakon inhibiranja integrina cilengitidom, primijećeno je smanjenje ukupne količine proteina pFAK(Y397), a u staničnoj liniji MeWo cilengitid ne mijenja količinu pFAK(Y397), ali izaziva smanjenu osjetljivost na paklitaksel. U slučaju staničnih linija trostruko negativnog tumora dojke, korelacije smanjenja pFAK(Y397) i povećanja osjetljivost na paklitaksel nema, jer sve stanične linije pokazuju smanjenje količine pFAK(Y397) nakon izlaganja cilengitidu, a učinci kombinacije s paklitakselom su sinergistički (MDA-MB-231 i MDA-MB-436) ili antagonistički (MDA-MB-468). Ipak, zbog relativno malog broja ispitanih staničnih linija ne možemo tvrditi da primijećena korelacija u stanicama melanoma upućuje na uključenost signalnog puta pFAK(Y397) u mehanizam osjetljivosti na protutumorske lijekove. Preostaje za istražiti može li direktna inhibicija pFAK(Y397) pomoću inhibitora povećati osjetljivost na paklitaksel.

Poznato je da se pFAK(Y397) regrutira u fokalne adhezije prilikom vezanja integrina na komponente izvanstaničnog matriksa. Dinamika fokalnih adhezija je kontinuirani proces potreban za migraciju stanica, a upravo pFAK(Y397) služi kao jedinstveni regulator njihovog sastavljanja i rastavljanja te reorganizacije citoskeleta. Fokalne adhezije se formiraju na staničnoj periferiji interakcijama integrina i izvanstaničnog matriksa. Na mjestima fokalnih adhezija aktivirani pFAK(397) regrutira c-Src, kako bi se formirao FAK-Src signalni kompleks, koji fosforilira druge signalne i adaptorske proteine kao što je paksilin, čime aktiviraju različite signalne puteve uključene u regulaciju stanične migracije. Prethodne studije konfokalne mikroskopije pokazale su da FAK lokalizira na krajevima aktinskih filamenata,

koje pokazuju formiranje stresnih niti, smještenih na staničnoj periferiji (Hu i sur, 2014). U normalnim uvjetima neznatna količina proteina FAK smještena je u jezgri stanice, međutim različiti stresni podražaji, kao što su oksidativni stres ili primjena FAK inhibitora, mogu potaknuti njegovu translokaciju u jezgru (Lim, 2013).

Promjenu lokalizacije proteina pFAK pratili smo u staničnoj liniji MDA-MB-231 u kojoj je prethodno pokazano smanjenje ukupne količine proteina pFAK (Y397) nakon inhibicije integrina  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  cilengitidom. U stanicama MDA-MB-231 vidljivo je da je pFAK(Y397) najvećim dijelom lokaliziran na periferiji stanice, a žuto obojenje ukazuje na kolokalizaciju aktina i pFAK(Y397) u fokalnim adhezijama. U stanicama izloženim djelovanju cilengitida, većina pFAK(Y397) je nestala iz mjesta fokalnih adhezija te se pojavila znatna količina proteina u citoplazmi.

Cilengitid povećava osjetljivost 5 od 7 istraživanih staničnih linija trostruko negativnog karcinoma dojke i melanoma na paklitaksel. Međutim, u jednoj staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-468 kao i u jednoj staničnoj liniji melanoma MeWo primijećen je obrnuti učinak, a uzrok tome nije poznat. Budući da je utišavanje integrina  $\alpha\upsilon$  također pokazalo povećanje osjetljivosti u 5 od 7 istraživanih staničnih linija, te da niti u jednoj staničnoj liniji nije pokazana smanjena osjetljivost na paklitaksel zaključujemo da je utišavanje integrina  $\alpha\upsilon$  u kombinaciji s paklitakselom bolja kombinacija koja bi mogla omogućiti bolji učinak terapije ovih tumora. Kako smo u stanicama melanoma pokazali korelaciju između povećanja osjetljivosti na paklitaksel i inhibicije pFAK(Y397) preostaje za istražiti hoće li inhibicija pFAK(Y397) rezultirati povećanom osjetljivosti na paklitaksel. Daljnja istraživanja trebala bi rasvijetliti signalne puteve potaknute integrinima, kao i molekularne promjene inducirane izlaganjem protutumorskim lijekovima, posebice paklitakselu, što bi omogućilo razvoj novih strategija za povećanje djelotvornosti terapija.



## 6. ZAKLJUČAK

Cilengitid je povećao osjetljivost staničnih linija trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 i MDA-MB-436 te staničnih linija melanoma A375, RPMI-7951 i MDA-MB-435S na paklitaksel, a smanjio je osjetljivost u staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-468 i u staničnoj liniji melanoma MeWo. U stanicama melanoma uočena je korelacija između smanjenja količine proteina pFAK(Y397) i povećanja osjetljivosti na paklitaksel. Prema tome, molekula pFAK(Y397) mogla bi biti uključena u mehanizam osjetljivosti na paklitaksel. U staničnim linijama trostruko negativnog karcinoma dojke korelacija između smanjenja količine proteina pFAK(Y397) i povećanja osjetljivosti na paklitaksel nije uočena. Cilengitid je u sve tri stanične linije smanjio količinu pFAK(Y397) i učinio dvije stanične linije više osjetljivima te jednu staničnu liniju manje osjetljivom na paklitaksel.

Prethodni pokusi grupe u kojoj je izrađen ovaj rad pokazali su, utišavanjem integrina  $\alpha_v$ , pri čemu se smanjuje ekspresija svih integrina  $\alpha_v$ , a ne blokira se odašiljanje signala samo od integrina  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  kao što je to pri izlaganju cilengitidu, povećanje osjetljivosti na paklitaksel u 5 od 7 staničnih linija pri čemu niti u jednoj staničnoj liniji nije pokazana smanjena osjetljivost na paklitaksel. Stoga zaključujemo da je utišavanje integrina  $\alpha_v$  u kombinaciji s paklitakselom bolja terapijska kombinacija za liječenje ovih tumora nego što je to kombinacija s cilengitidom.

## 7. LITERATURA

Ahmed A.A., Mills A.D., Ibrahim A.E., Temple J., Blenkiron C., Vias M., Massie C.E., Iyer N.G., McGeoch A., Crawford R., Nicke B., Downward J., Swanton C., Bell S.D., Earl H.M., Laskey R.A., Caldas C., Brenton J.D. (2007): *The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel*. *Cancer Cell* 514-27.

Akram M., Iqbal M., Daniyal M., Khan A.U. (2017): *Awareness and current knowledge of breast cancer*. *Biological Research* 50:33.

Ambriović-Ristov A., Gabrilovac J., Cimbora-Zovko T., Osmak M. (2004): *Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin  $\alpha\beta 3$  and coxsackie adenovirus receptor*. *Int J Cancer* 110: 660-667.

Anampa J., Makower D., Sparano J.A. (2015): *Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview*. *BMC Medicine* 13:195.

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

Aoudjit F., Vuori K. (2012): *Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance*. *Chemotherapy Research and Practice*.

Apalla Z., Nashan D., Weller R.B., Castellsague X. (2017): *Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches*. *Dermatol Ther (Heidelb)* 7 (Suppl 1):S5–S19.

Bhatia S., Tykodi S., Thompson J.A. (2009): *Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview*. *Oncology* 23: 488–496.

Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A., Sanders M.E., Gianni L. (2016): *Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease*. *Nat Rev Clin Oncol.* 13: 674–690.

Bianchi-Smiraglia A., Paesante S., Bakin A.V. (2013): *Integrin  $\beta 5$  contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways*. *Oncogene*, 32: 3049–3058.

Bianconi D., Unseld M., Prager G.W. (2016): *Integrins in the Spotlight of Cancer*. *International Journal Of Molecular Sciences*.

Brozović A., Majhen D., Roje V., Mikac N., Jakopec S., Fritz G., Osmak M., Ambriovic-Ristov A. (2008):  *$\alpha\beta 3$  integrin-mediated drug resistance in human laryngeal carcinoma cells is caused by glutathione-dependent elimination of drug-induced reactive oxidative species*. *Mol Pharmacol* 74: 298-306.

Chavez K.J., Garimella S.V., Lipkowitz S. (2010): *Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer*. Breast Dis. 32: 35–48.

Chou T.C., Talalay P. (1984): *Quantitative analysis of dose–effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv. Enzym. Regul. 22: 27–55.

Christmann M., Diesler K., Majhen D., Steigerwald C., Berte N., Freund H., Stojanović N., Kaina B., Osmak M., Ambriović-Ristov A., Tomičić M.T. (2017): *Integrin  $\alpha\beta3$  silencing sensitizes malignant glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair*. Oncotarget: 27754-27771.

Danen E. H. J. (2013): *Integrin Signaling as a Cancer Drug Target*. ISRN Cell Biology.

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

Dickreute E., Cordes, N. (2016): *The cancer cell adhesion resistome: mechanisms, targeting and translational approaches*. Biol. Chem, 398: 721–735.

Eke I., Cordes, N. (2014): *Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer*. Seminars in Cancer Biology.

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

Hanahan D., Weinberg R.A. (2011): *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell 144: 646-674.

Hayes D.F., Thor A.D., Dressler L.G., Weaver D., Edgerton S., Cowan D., Broadwater G., Goldstein L.J., Martino S., Ingle J.N., Henderson I.C., Norton L., Winer E.P., Hudis C.A., Ellis M.J., Berry D.A. (2007): *HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer*. N Engl J Med 357: 1496-1506.

Hollestelle A., Nagel J., Smid M., Lam S., Elstrodt F., Wasielewski M., Sue Ng S., French P.J., Peeters J.K., Rozendaal M.J., Riaz M., Koopman D.G., Hagen T., de Leeuw B., Zwarthoff E.C., Teunisse A., van der Spek P.J., Klijn J., Dinjens W., Ethier S.P., Clevers H., Jochemsen A.G., den Bakker M.A., Foekens J.A., Martens J., Schutt M. (2010): *Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines*. Breast Cancer Res Treat 121:53–64.

Hu Y.L., Lu S., Kai W., Szeto K.W., Sun J., Wang Y., Lasheras J.C., Chien S. (2014): *FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells*. Scientific reports 4:6024.

Kao J., Salari K., Bocanegra M., Choi J., Girard L., Gandhi J., Kwei K.A., Hernandez-Boussard T., Wang P., Gazdar A.F., Minna J.D., Pollack J.R. (2009): *Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery*. Plos one, e6146.

Korch C., Hall E.M., Dirks W.G., Ewing M., Faries M., Varella-Garcia M., Robinson S., Storts D., Turner J.A., Wang Y., Burnett E.C., Healy L., Kniss D., Neve R.M., Nims R.W., Reid Y.A., Robinson W.A., Capes-Davis A. (2018): *Authentication of M14 melanoma cell line proves misidentification of MDA-MB-435 breast cancer cell line*. Int J Cancer: 561-572.

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

Lane D., Goncharenko-Khaider L.N., Rancourt C., Piche' A. (2010): *Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through  $\alpha\beta 5$  integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation*. Oncogene 3519–3531.

Lautenschlaeger T., Perry J., Peereboom D., Li B., Ibrahim A., Huebner A., Meng W., White J., Chakravarti A. (2013): *In vitro study of combined cilengitid and radiation treatment in breast cancer cell lines*. Radiation Oncology, 8:246.

Li P., Liu F., Sun L., Zhao Z., Ding X., Shang D., Xu Z., Sun C. (2011): *Chemokine receptor 7 promotes cell migration and adhesion in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck by activating integrin  $\alpha\beta 3$* . Int. J. Mol. Med. 679–687.

Li X., Regezi J., Ross F.P., Blystone S., Ilić D., Leong S., Ramos D.M. (2001): *Integrin  $\alpha\beta 3$  mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro*. Journal of Cell Science 114, 2665-2672.

Lim S.T.S. (2013): *Nuclear FAK: a new mode of gene regulation from cellular adhesions*. Molecules and Cells.

Majhen D., Stojanović N., Špeljko T., Brozović A., De Zan T., Osmak M., Ambriović-Ristov A. (2011): *Increased expression of the coxsackie and adenovirus receptor downregulates  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  integrin expression and reduces cell adhesion and migration*. Life Sciences 241–249.

Mas-Moruno C., Rechenmacher F., Kessler, H. (2010): *Cilengitid: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 753-768.

Maubant S., Saint-Dizier D., Boutillon M., Perron-Sierra F., Casara P.J., Hickman J.A., Tucker G.C., Van Obberghen-Schilling E. (2017): *Blockade of  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  integrins by RGD mimetics induces anoikis and not integrin-mediated death in human endothelial cells*. Blood.

- McDonald P.C., Fielding A.B., Dedhar S. (2008): *Integrin-linked kinase – essential roles in physiology and cancer biology*. Journal of Cell Science.
- Millard M., Odde S., Neamati N. (2011): *Integrin targeted therapeutics*. Theranostics 1: 154-188.
- Nieberler M., Reuning U., Reichart F., Notni J., Wester H.J., Schwaiger M., Weinmüller M., Räder A., Steiger K., Kessler H. (2017): *Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer*. Cancers 116.
- O'Reilly E.A., Gubbins L., Sharma S., Tully R., Ho Zhing Guang M., Weiner-Gorzel K., McCaffrey J., Harrison M., Furlong F., Kell M., McCann A. (2015): *The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer*. BBA Clinical 257–275.
- Oualla K., El-Zawahry H.M., Arun B., Reuben J.M., Woodward W.A. , Gamal El-Din H., Lim B., Mellas N., Ueno N.T., Fouad T.M. (2017): *Novel therapeutic strategies in the treatment of triple-negative breast cancer*. Therapeutic Advances in Medical Oncology.
- Palmieri G., Ombra M., Colombino M., Casula M., Sini M., Manca A., Paliogiannis P., Ascierto P.A., Cossu A. (2015): *Multiple molecular pathways in melanomagenesis: characterization of therapeutic targets*. Frontiers in Oncology.
- Parvani J.G., Galliher-Beckley A.J., Schiemann B.J., Schiemann W.P. (2013): *Targeted inactivation of  $\beta 1$  integrin induces  $\beta 3$  integrin switching, which drives breast cancer metastasis by TGF- $\beta$* . MBoC.
- Pecorino L. (2012): *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press, Oxford.
- Prasad V., Gopalan R. (2015): *Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014*. Breast Cancer.
- Qin J., Wu C. (2012): *ILK: a pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling*. Curr Opin Cell Biol. 24(5): 607–613.
- Raab-Westphal S., Marshall J.F., Goodman S.L. (2017): *Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers*. Cancers 110.
- Rouzier R., Perou C.M., Symmans W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., Hess K.R., Stec J., Ayers M., Wagner P., Morandi P., Fan C., Rabiul I., Ross J.S., Hortobagyi G.N., Pusztai L. (2005): *Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy*. Clin Cancer Res; 11: 5678-5685.

Ruffini F., Graziani G., Levati L., Tentori L., D'Atri S., Lacial P.M. (2015): *Cilengitid downmodulates invasiveness and vasculogenic mimicry of neuropilin 1 expressing melanoma cells through the inhibition of  $\alpha v\beta 5$  integrin*. *Int. J. Cancer*: 136, E545–E558.

Seguin L., Desgrosellier J.S., Weis S.M., Cheresh D.A. (2016): *Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance*. *Trends Cell Biol.* 25: 234–240.

Srichai M.B., Zent R. (2010): *Integrin Structure and Function*. *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*.

Stojanović N., Brozović A., Majhen D., Herak Bosnar M., Fritz G., Osmak M., Ambriović-Ristov A. (2016): *Integrin  $\alpha v\beta 3$  expression in tongue squamous carcinoma cells Cal27 confers anticancer drug resistance through loss of pSrc(Y418)*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1969–1978.

Truong H.H., Xiong J., Ghotra V.P., Nirmala E., Haazen L., Le Devedec S.E., Balcioglu H.E., He S., Snaar-Jagalska B.E., Vreugdenhil E., Meerman J.H., van de Water B., Danen E.H. (2014):  *$\beta 1$  integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGF $\beta$ -miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer*. *Science signaling*.

Weis S.M., Cheresh D.A. (2011):  *$\alpha v$  Integrins in Angiogenesis and Cancer*. *Cold Spring Harb Perspect Med*.

Yadav B.S., Sharma S.C., Chanana P., Jhamb S. (2014): *Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer*. *World J Clin Oncol*; 5: 125-133.

Yoon H., Dehart J.P., Murphy J.M., Lim S.T.S. (2015): *Understanding the roles of FAK in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Vol. 63: 114–128.

Web izvori:

[www.cancer.gov](http://www.cancer.gov), pristupljeno 7.11.2017.

[www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/), pristupljeno 15.11.2017.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22. siječnja 1993. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila sam u istom gradu nakon čega nastavljam srednjoškolsko obrazovanje općeg smjera u III. gimnaziji. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja i položene državne mature, 2012. godine upisala sam preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Akademski stupanj sveučilišne prvostupnice Molekularne biologije stječem 2015. godine izradom završnog rada „Mikrookoliš B limfoma“ pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Korać na Zavodu za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Iste godine upisujem diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Tijekom studija, u sklopu kolegija laboratorijska stručna praksa, boravila sam na Hrvatskom veterinarskom institutu, u Laboratoriju za dijagnostiku klasične svinjske kuge, molekularnu virologiju i genetiku. Na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov u ožujku 2017. godine započinjem izradu diplomskog rada pod naslovom „Kombinirani utjecaj cilengitida i paklitaksela na stanične linije trostruko negativnog tumora dojke i melanoma“. Član sam Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) te sam sudjelovala na četvrtom kongresu koji se održao u Zagrebu 2016. godine. U slobodno vrijeme sudjelovala sam u prezentiranju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i biološkog odsjeka u sklopu manifestacije Smotra Sveučilišta te u organizaciji događanja „Noć biologije“ s ciljem popularizacije prirodnih znanosti.

Tijekom studija bila sam zaposlena na različitim studentskim poslovima, kao što su administrativni poslovi u poduzeću za obavljanje knjigovodstveno-računovodstvenih usluga, posao prodajnog agenta u HT-u te rad u službi naplate Erste Card Cluba, koji su unaprijedili poznavanje rada na računalu, izradu prezentacija te organizacijske i komunikacijske vještine. Aktivno se služim engleskim jezikom u govoru i pismu i posjedujem vozačku dozvolu B kategorije.