

Otpornost na citostatike posredovana integrinom $\alpha\beta3$ u stanicama pločastog epitela jezika

Stojanović, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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:217:243470>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikolina Stojanović

**OTPORNOST NA CITOSTATIKE POSREDOVANA
INTEGRINOM α_3 U STANICAMA PLOŠTASTOG EPITELA
JEZIKA**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad, izrađen je u Laboratoriju za genotoksične agense Instituta Ruđer Bošković, pod voditeljstvom dr. sc. Andreje Ambriovič Ristov, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**OTPORNOST NA CITOSTATIKE POSREDOVANA INTEGRINOM α_3 U
STANICAMA PLO ASTOG EPITELA JEZIKA**

Nikolina Stojanovi

Laboratorij za genotoksi ne agense, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ru er Boškovi ,
Bijeni ka 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Otpornost posredovana integrinom temelji se na prihva anju stanica za proteine izvanstani nog matriksa putem integrina. Na modelu ljudskih stanica karcinoma grkljana opisan je mehanizam otpornosti na citostatike posredovan α_3 integrinom. U ovom radu istražili smo postoji li sli an mehanizam i u modelu ljudskih stanica karcinoma plo astog epitela jezika (Cal27). U tu svrhu Cal27 stanice transficirali smo plazmidom koji sadrži α_3 podjedinicu i izdvojili smo stabilne transfektante koji ekspimiraju pove anu koli inu α_3 integrina u usporedbi s roditeljskim Cal27 stanicama. Kod jednog je stabilnog transfektanta ekspresija α_3 integrina bila pove ana dok je ekspresija α_5 integrina ostala jednaka u usporedbi s roditeljskim Cal27 stanicama. Kod drugog transfektanta je došlo do pove anja ekspresije α_3 integrina i umjerenog smanjenja ekspresije α_5 integrina zbog kompeticije α_3 podjedinice za raspoložive α_5 podjedinice. Osjetljivost roditeljskih Cal27 i odabranih Cal27- α_3 integrin stabilnih transfektanata na citostatike odre ena je MTT testom. Pokazali smo da su oba Cal27 klona otporna na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C. Ovaj rad pokazuje da pove ana ekspresija α_3 integrina može zaštititi stanice od djelovanja razli itih citostatika. Prema tome mjerenje ekspresije α_3 integrina u stanicama karcinoma glave i vrata bi mogao biti važan pokazatelj otpornosti tumora na citostatike.

(35 stranica, 11 slika, 2 tablice, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *karcinom plo astog epitela jezika, α_3 integrin, otpornost, cisplatin, mitomicin C, doksorubicin, citostatici*

Voditelj: Dr. sc. Andreja Ambriovi Ristov, viši znanstveni suradnik, Institut Ru er Boškovi

Ocjenitelji: Dr. sc. Andreja Ambriovi Ristov, viši znanstveni suradnik, Institut Ru er Boškovi

Doc. dr. sc. Maja Matuli , Prirodoslovno-matemati ki fakultet

Doc. dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek, Prirodoslovno-matemati ki fakultet

Doc. dr. sc. Dubravka Hranilovi , Prirodoslovno matemati ki fakultet

Rad prihva en: 11.03.2009.

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

**v₃ INTEGRIN MEDIATED DRUG RESISTANCE IN HUMAN TONGUE
SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

Nikolina Stojanovi

Laboratory for Genotoxic Agents, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute, Bijenička
54, 10000 Zagreb, Croatia

Integrin-mediated drug resistance is based on the adherence of cells to extracellular matrix proteins through integrins. In human laryngeal carcinoma cells a mechanism of multidrug resistance mediated by v₃ integrin have been described. In the present study we investigated whether similar mechanism exists in tongue squamous carcinoma cells (Cal27) which express a small amount of v₃ integrins, and Cal27-derived stable transfectants with increased expression of v₃ integrin. The cell clones were produced by stable transfection of Cal27 cells with a plasmid expressing the α_3 subunit. In one stable transfectant the expression of v₃ was increased but the expression of v₅ remained the same in comparison to parental cell line. The other stably transfected cell line showed an increase in v₃ expression and a moderate decrease in v₅ expression, due to the competition of α_3 for available v₃ in the cell. The sensitivity of Cal27 and Cal27-derived v₃ integrin expressing clones to anti cancer drugs was determined using MTT assay. Our results showed that both Cal27-derived v₃ integrin expressing cell lines were resistant to cisplatin, doxorubicin and mitomycin C. This thesis shows that increased v₃ integrin expression can protect cells from various cytostatics. Thus measuring the expression of v₃ integrin in head and neck cancer cells could be an important indicator of tumor resistance to anti-cancer drugs.

(35 pages, 11 figures, 2 tables, 45 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Keywords: *human tongue squamous cell carcinoma, v₃ integrin, otpornost, cisplatin, mitomicin C, doxorubicin, citostatics*

Supervisor: Dr. sc. Andreja Ambriovi Ristov,

Reviewers: Dr. sc. Andreja Ambriovi Ristov, senior research associate, Ruđer Bošković Institute

Doc. dr. sc. Maja Matuli ,

Doc. dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek,

Doc. dr. sc. Dubravka Hranilovi ,

Thesis accepted: 11.03.2009.

SADRŽAJ:

1.Uvod	1
1.1. Tumori	1
1.1.1. Liječenje tumora	1
1.2. Citostatici	2
1.2.1. Cisplatina	2
1.2.2. Mitomicin C	3
1.2.3. Doksorubicin	4
1.3. Otpornost tumora na citostatike	5
1.4. Integrini	6
1.4.1. Integrin α_3	8
2.Cilj istraživanja	9
3. Materijali i metode.....	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Osnovne kemikalije	10
3.1.2. Ostali materijal i pomagala	10
3.1.3. Stanice	11
3.1.4. Plazmidi i bakterije	11
3.1.5. Kompleti	11
3.1.6. Protutijela	12
3.1.7. Pripremanje pufera i hranjivih podloga	12
3.1.8. Uređaji	13

3.2. Metode	14
3.2.1. Izdvajanje plazmida i mjerenje koncentracije	14
3.2.2. Uzgoj stanica u kulturi	14
3.2.2.1. Odmrzavanje stanica	15
3.2.2.2. Zamrzavanje stanica	15
3.2.2.3. Izrada krivulje rasta	15
3.2.3. Transfekcija i izdvajanje stabilnih transfektanata	16
3.2.3.1. Transfekcija	16
3.2.3.2. Izdvajanje stabilnih transfektanata	16
3.2.4. Proto na citometrija	17
3.2.5. Određivanje preživljenja stanica (MTT-test)	18
3.2.6. Statistička obrada podataka	19
4. Rezultati	20
4.1. Izdvajanje klonova 2B3 i 2B1 sa povećanom ekspresijom ν_3 integrina stabilnom transfekcijom Cal27 stanica plazmidom koji sadrži gen za 3 podjedinicu integrina	20
4.2. Povećana ekspresija ν_3 integrina utječe na ekspresiju ν_5 integrina	21
4.3. Stabilni transfektanti 2B3 i 2B1 rastu jednako brzo kao i stanice Cal27	22
4.4. Povećana ekspresija ν_3 integrina u klonovima 2B3 i 2B1 osigurava otpornost (bolje preživljenje) na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C	23
5. Rasprava	25
6. Zaključci	30
7. Literatura	31
8. Životopis	35

Zahvaljujem se mojoj voditeljici dr.sc. Andreji Ambriovi Ristov na pruženoj prilici, velikom strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog rada. Svojim znanjem, iskustvom i entuzijazmom obogatila je moj pogled na znanstveni život i usmjerila me na put mladog znanstvenika.

Zahvaljujem se i dr.Maji Osmak, koja me velikodušno primila u laboratorij i omogućila mi izradu ovog rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Maji Matuli, doc. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek i doc. dr. sc. Dubravki Hranilović na pažljivom čitanju rukopisa i korisnim savjetima.

Hvala Dragomiri, Anamarii i Tamari, koje su mi svojim savjetima, prijateljstvom i velikom podrškom pomogle da se snažem u radu u laboratoriju i eksperimentalni dio rada napravim najbolje što mogu, te gosp. Ljiljani Krajar, na nesebičnoj pomoći kad god mi je trebalo.

Mojim prijateljima i dečki, koji uz mene hrabro preskaču svakodnevne zapreke i pri tome pokazuju neizmjernu i nesebičnu podršku, velika hvala.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima, na njihovoj beskrajnoj ljubavi, podršci i razumjevanju, posebno mojoj majci koja me je svojim savjetima ljubavljivo oblikovala u osobu koja sam danas.

Nikolina Stojanović

1. Uvod

1.1. Tumori

Kada se stanica po ne nekontrolirano dijeliti stvara se tumor. Sve dok se ta nakupina stanica drži zajedno zovemo ju dobro udnim tumorom i potpuno izlje enje se može posti i kirurškim uklanjanjem. Me utim, kada stanice steknu sposobnost prodiranja u druga tkiva, stvaraju i tako metastaze u udaljenim tkivima, tumor smatramo zlo udnim. Što je tumor sposobniji metastazirati to ga je teže izlije iti (Alberts i sur., 2002).

Tumori se razlikuju prema tkivu odnosno tipu stanice iz kojeg su nastali. Tumori nastali iz epitelnih stanica se nazivaju karcinomi, dok se oni koji su nastali od vezivnog ili miši nog tkiva nazivaju sarkomi. Treba još spomenuti leukemije koje nastaju od hematopoetskih stanica te tumore nastale iz stanica živ anog sustava. Oko 90% ljudskih tumora su karcinomi, najvjerojatnije zato jer se ve ina proliferacijske aktivnosti u ljudskom organizmu odvija upravo u epitelnom tkivu, no vjerojatno i zato što je epitelno tkivo naj eš e izloženo štetnom fizi kom i kemijskom utjecaju okoline (Alberts i sur., 2002).

1.1.1. Lije enje tumora

Tri su standardne metode lije enja tumora; kirurško uklanjanje, zra enje i kemoterapija. Uspješnost svake od metoda ovisi o smještaju tumora u organizmu, tipu tumora i stadiju njegovog razvitka.

Kemoterapija je lije enje tumora kemijskim spojevima. Ti se lijekovi esto nazivaju citostatici, citotoksi ni, antitumorski ili antineoplasti ni lijekovi. Citostatici uništavaju tumorske stanice koje i njihov rast i diobu. Ti lijekovi ne djeluju selektivno, dakle isklju ivo na stanice tumora, nego mogu oštetiti i zdrave stanice u tijelu, naro ito one koje se brzo dijele: krvne stanice, sluznicu probavnoga trakta, spolne stanice, folikul kose. Upravo ošte enje zdravih stanica uzrokuje popratne neželjene pojave kemoterapije.

Prema mehanizmu djelovanja citostatici naj eš e ometaju sintezu i/ili funkciju makromolekula (DNA, RNA, proteina) ili funkciju stani nih organela. Kao posljedica ovih u inaka dolazi do smrti stanica. Budu i da citostatici djeluju na razli ite na ine, radi boljeg

protutumorskog u inka esto se istovremeno daju dvije ili više vrsta lijekova (polikemoterapija ili kombinirana kemoterapija).

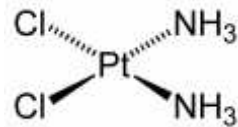
Idealni protutumorski lijekovi koji bi uništili samo tumorske stanice bez štetnog djelovanja na normalna tkiva za sada ne postoje. Zato se prou avaju dodatne metode lije enja tumora kao što su imunoterapija i genska terapija (Pizzo i Poplack, 2005). Cilj imunoterapije je identifikacija antigena specifi nih za tumor kako bi se poja anjem imunološkog odgovora na te antigene poboljšao i imunološki odgovor protiv tumora. U zadnje vrijeme pojavili su se lijekovi temeljeni na monoklonskim protutijelima usmjereni protiv takvih proteina. Protutijelo se specifi no veže na protein koji se nalazi na površini tumorske stanice (npr. HER2/neu ili CD20; lijekovi Herceptin ili Rituximab), time se zaustavlja prijenos signala s površine stanice u jezgru što zaustavlja rast tumora (Los i Gibson, 2005). Princip lije enja genskom terapijom je relativno jednostavan: unijeti u ciljnu stanicu genski materijal koji e ili dovesti do izlje enja ili e usporiti razvoj bolesti (Verma i Weitzman, 2005). Iako se dvije tre ine istraživanja u genskoj terapiji odnosi upravo na gensku terapiju tumora (Majhen i Ambriovi - Ristov, 2006) genska terapija još uvijek nije postigla zadovoljavaju u u inkovitost i nije, s iznimkom dva odobrena lijeka temeljena na adenovirusu tip 5 u Kini, rutinski postupak. Glavni problem svih pristupa terapiji tumora još je uvijek nedovoljna selektivnost djelovanja na tumorske stanice, kao i odabir prave ciljne molekule klju ne za razvoj i rast tumora.

1.2. Citostatici

1.2.1. Cisplatina

Cisplatina ili cis-diaminodikloroplatina (II) (engl. *cis-diamminedichloroplatinum (II)*, DDP) je planarna anorganska molekula topiva u vodi (Slika 1). Sadrži dvije kloridne skupine u cis položaju i dvije amonijeve skupine. Cisplatina je citostatik sa snažnim citotoksi nim u inkom koji djeluje kao bivalentan elektrofil, stvaraju i unutarlan ane i me ulan ane križne veze u DNA, koje inhibiraju replikaciju DNA i transkripciju, dovode do zastoja u diobi stanica te do smrti stanice apoptozom. Molekula cisplatine, nakon ulaska u stanicu u kojoj je koncentracija iona klora niska, prolazi proces «akvatacije», odnosno dolazi do zamjene jednog ili dva klorida sa vodom. Tako nastala pozitivno nabijena molekula reagira sa DNA, RNA i proteinima. Cisplatina se brzo veže na peptide i proteine koji sadrže tiolne grupe,

poput glutationa (GSH) i metalotioneina, koji imaju važnu detoksifikacijsku ulogu u stanici (Siddik, 2003). Pokazana je i važnost stvaranja reaktivnih oksidativnih radikala cisplatinom (Miyajima i sur. 1997).



Slika 1. Struktura cisplatine

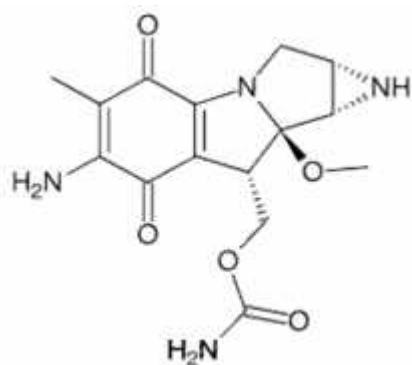
Manje od 10% cisplatine se veže na DNA (Fuertes i sur., 2003), a ostatak djeluje na ostale molekule u stanici. Unato tome što se dugo smatralo da je DNA glavna ciljna molekula za cisplatinu, noviji podaci su pokazali da cisplatin aktivira kaspaze u stanicama koje nemaju jezgru (citoplastima). Apoptoza u ovim stanicama neovisna je o oštećenju DNA i povezana je s brzom indukcijom reaktivnih oksidativnih radikala i povećanjem količine Ca^{2+} . Također je pokazano da cisplatin može izazvati i nakupljanje Fas/CD95 u membrani stanice (Mandić Havelka i sur., 2007).

Cisplatin se koristi intravenozno za liječenje raznih oblika tumora glave i vrata te karcinoma pluća, jajnika, testisa, dojki i mokraćnog mjehura (Boulikas i Vougiouka, 2004).

1.2.2. Mitomicin C

Mitomicin C, pripadnik obitelji spojeva koji sadrže arizidin, izdvojen je iz vrste *Streptomyces caespitosus* (Dorr i Von Hoff, 1993). Mitomicin C (Slika 2) je bifunkcionalni agens koji prolazi kroz kemijske i enzimске redukcije kako bi tvorio kovalentne adukte sa DNA, prvenstveno na N^2 poziciji gvanina, tvoreći i monofunkcionalno i bifunkcionalno aktivirane G-MMC monoadukte i G-MMC-G unutarlančane i međulančane križne veze na CpG i GpG mjestima u DNA. Mitomicin C djeluje i stvaranjem reaktivnih oksidativnih radikala u stanici (Warren i sur., 1998; Shuhendler i sur., 2009).

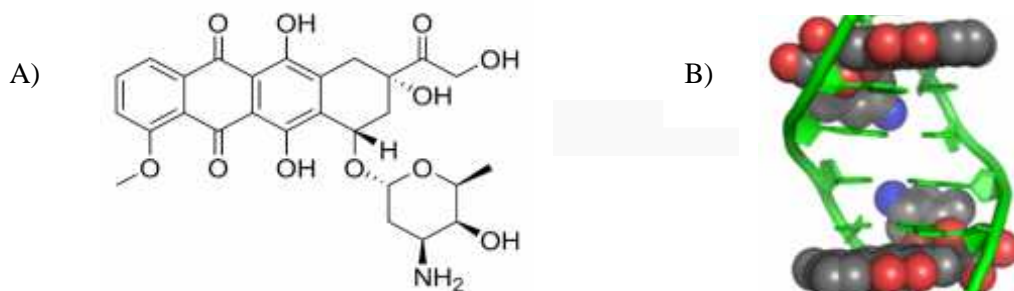
Mitomicin C se primjenjuje intravenozno za liječenje adenokarcinoma želuca, gušterače, debelog crijeva i dojke (Dorr i Von Hoff, 1993). Osim toga koristi se i za liječenje tumora glave i vrata u kombinaciji sa radioterapijom (Haffty i sur., 1997).



Slika 2. Struktura mitomicina C

1.2.3. Doksorubicin

Doksorubicin (Slika 3) je antraciklinski antibiotik, bliski srodnik prirodnog produkta bakterija *Streptomyces peucetius*, daunomicina. Ovaj citostatik izoliran je iz vrste *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (Minotti i sur., 2004).



Slika 3. A) Struktura doksorubicina; B) Prikaz ugradnje dviju molekula doksorubicina u molekulu DNA.

Doksorubicin je spoj koji stvara reaktivne oksidativne radikale koji zatim ošte uju različite strukture u stanicama. Najvažnije je djelovanje na membrane (djeluje na metabolizam Ca^{2+}) i nukleinske kiseline. Doksorubicin se ugra uje između baza DNA i inhibira replikaciju te ko i enzim topoisomerasu II, odnosno njenu funkciju povezivanja pocijepanih molekula DNA, a to uzrokuje nakupljanje jednolananih i dvolananih lomova na DNA i apoptozu (Minotti i sur., 2004). Doksorubicin u pacijenata pokazuje toksičnost za srce i miši (kardiotoksičnost), a koja se povezuje s indukcijom nastanka reaktivnih

oksidativnih radikala i time nastalim oštećenjima na mitohondrijskoj DNA (Huang i sur., 2007).

Doksorubicin se primjenjuje intravenozno, u liječenju raznih oblika tumora dojke, leukemija, limfoma te karcinoma štitnjače, tumora pluća, jajnika i mokraćnog mjehura (Weiss 1992; Minotti i sur., 2004; Shuhendler i sur., 2009).

1.3. Otpornost tumora na citostatike

Citostatici djeluju neselektivno što znači da osim tumorskih stanica oštećuju i okolno, zdravo tkivo. Nažalost to nije jedini problem u liječenju tumora citostaticima. Glavni problem uspješnom liječenju je razvoj otpornosti tumorskih stanica na citostatike. Otpornost može biti primarna, tj. tumorske stanice od početka terapije ne reagiraju na citostatike, ili sekundarna, gdje tumorske stanice tijekom terapije razvijaju otpornost (Osmak, 1998).

Do sada je otkriveno mnogo mehanizama kako tumorske stanice postaju otporne na citostatike. Oni se razlikuju ovisno o vrsti stanica i citostatiku. Najčešće spominjani mehanizmi otpornosti tumorskih stanica na citostatike posljedica su smanjenog unošenja citostatika u stanicu, što ima za posljedicu smanjenu akumulaciju. Smanjena akumulacija može biti i posljedica povećane aktivnosti transportnih proteina koji izbacuju citostatike iz stanice (npr. P-glikoprotein). Osim toga otpornost može izazvati povećana inaktivacija citostatika kao posljedica povećane koncentracije i/ili aktivnosti zaštitnih molekula (glutation, glutation transferaza ili glutation peroksidaza) kao i povećana sposobnost popravka i/ili tolerancija DNA oštećenja. Jedan od najvažnijih mehanizama razvoja otpornosti tumorskih stanica na citostatike je inhibicija apoptoze. Otpornost je često rezultat istovremenog djelovanja više ovakvih mehanizama (Stavrovskaya, 2000).

Nedavno je otkriven novi mehanizam otpornosti tumorskih stanica na citostatike koji je posljedica interakcije stanica sa izvanstaničnim matriksom, odnosno adhezije dviju stanica, nazvan otpornost na lijekove posredovana adhezijom. U ovom mehanizmu otpornosti adhezijom se aktiviraju signalni putevi koji imaju zaštitnu ulogu, odnosno smanjuju osjetljivost različitih tipova stanica na različite citotoksične agense. Budući da su integrini vrlo važne adhezivne molekule razvilo se posebno područje istraživanja otpornosti na citostatike posredovano integrinima (Ambriovič-Ristov i Osmak, 2006).

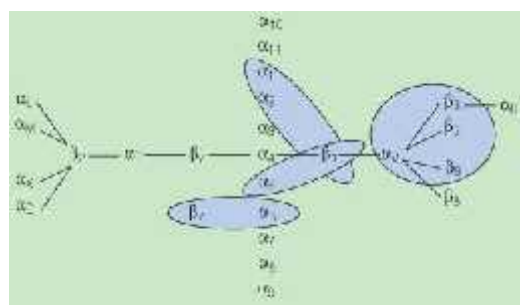
Na inih kako stanica razvija otpornost na cisplatinu uključujući inhibiciju unosa u stanicu, povećano izbacivanje iz stanice i povećanje sinteze stanin tiola (npr. glutation). Osim toga stanica može razviti otpornost na cisplatinu uspješnijim popravkom DNA, povećanom tolerancijom na preostala oštećenja DNA te inhibicijom apoptoze (Siddik, 2003).

Stanica može postati otporna na mitomicin C povećanim izbacivanjem iz stanice posredstvom P-glikoproteina, povećanom sposobnošću u popravku lezija u DNA ili smanjivanjem aktivnosti bioaktivacijskog enzima kao što je DT-diaforaza (Baumann i sur., 2001).

Otpornost na doxorubicin moguće je putem nekoliko mehanizama kao što su prekomjerna ekspresija P glikoproteina, povećana detoksifikacija glutation transferazom i glutation peroksidazom, povećani popravak oštećenja molekule DNA te promjena ekspresije topoizomerase II (Huang i sur., 2007).

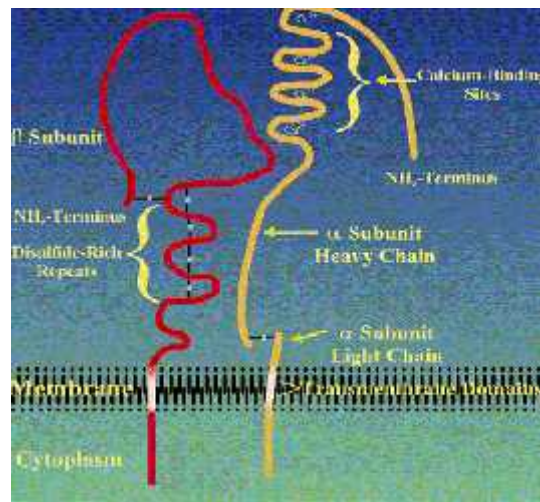
1.4. Integrini

Integrini su adhezijske molekule na površini stanice koje se vežu na proteine izvanstaničnog matriksa, ali i na proteine na drugim stanicama. Vežanjem potiču niz signala koji reguliraju mnoge procese u stanici kao što su rast, dioba, diferencijacija, pokretljivost i preživljenje. Integrini također prepoznaju i neke otopljene proteine plazme, neke viruse i bakterije. Integrini su heterodimeri sastavljeni od dvije podjedinice: α (alpha) i β (beta). Molekularna masa podjedinica može varirati od 90 kDa do 160 kDa. Uloga α podjedinice je još uglavnom nepoznata, iako se smatra da igra ulogu u stabilizaciji smatanja proteina. Podjedinica β je direktno uključena u vezanje liganda na koje se veže pojedini integrin (Hynes, 2002). Do sada je otkriveno ukupno 18 α i 8 β podjedinica što daje 24 kombinacije integrinskih heterodimera (Slika 4).



Slika 4: Shema poznatih kombinacija heterodimera integrina

Hynes (1987) je primjetio da fibronektin izaziva reorganizaciju aktinskog citoskeleta, da kortikalni aktinski filamenti kolokaliziraju s ekstracelularnim fibronektinom te da aktinska stresna vlakna završavaju u fokalnim adhezijama. Tu obitelj proteina koji vežu citoskelet sa izvanstani nim matriksom nazvao je integrini.



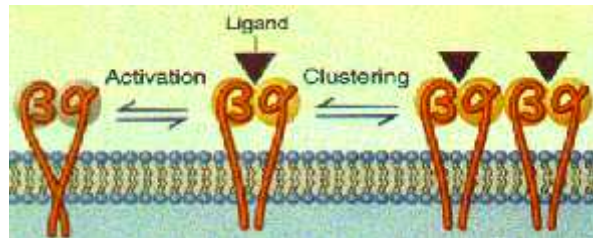
Slika 5. Prikaz osnovne strukture integrina.

Integrini imaju veliku izvanstani nu domenu za vezanje na ligand. Unutarstani na domena je vrlo mala, 13 do 70 aminokiselina (Slika 5). Proteini koji se vežu na citoplazmatsku domenu integrina uklju uju proteine citoskeleta, signalne molekule i adaptorske molekule. Integrini se preko talina, -aktinina i filamina vežu direktno na aktinski citoskelet. Signalne molekule FAK (engl. *focal adhesion kinase*), ILK (engl. *integrin linked kinase*), Shc (engl. *Src homology and collagen*) i Grb2 (engl. *growth factor receptor bound-2*) se mogu vezati na citoplazmatsku domenu kao adaptorske molekule (Gilcrease, 2006).

Citoplazmatski repovi integrina nemaju enzimsku aktivnost, integrini djeluju nakupljanjem (engl. *clustering*) na stani noj površini nakon ega slijedi asocijacija sa unutarstani nim (enzimatski aktivnim) adapter proteinima što dalje dovodi do okidanja signalne kaskade (Gilcrease, 2006).

Integrini prenose signal promjenom konformacije integrinskih heterodimera i to u oba smjera. Ligandi se vežu za mjesta na integrinu sastavljena od obje podjedinice. Nakon vezanja ligand otvara džep i razdvaja integrinske lance, što se prenosi uzduž integrina i dovodi do promjene konformacije na unutrašnjoj, citoplazmatskoj strani prenose i signal iz okoline u stanicu (engl. *outside-in signaling*). Neki regulatorni proteini prenose signal u suprotnom

smjeru, tako da se vežu za integrin na citoplazmatskoj strani što se prenosi uzduž integrina do vanjske strane prenose i signal iz stanice u okolinu (engl. *inside-out signaling*). Tako npr. kalretikulin i talin mogu održavati integrin u otvorenoj aktivnoj konfiguraciji što znači da su citoplazmatski dijelovi razdvojeni i integrin ima jaku afinitet za ligand (Gilcrease, 2006).



Slika 6. Prikaz nakupljanja i aktivacije integrina na površini stanice

1.4.1. Integrin α_3

Član obitelji integrina α_3 potiče signale preživljenja bitne za angiogenezu, zacjeljivanje rana, osteoporozi i metastazu tumora (Brassard i sur., 1999). Za razliku od ostatka članova integrinske obitelji, α_3 integrin prepoznaje i veže se na puno proteina izvanstaničnog matriksa i ostalih liganada koji sadrže Arg-Gly-Asp (RGD) peptidni slijed. To su između ostalih vitronektin, fibronektin, trombospondin, trombin, osteospondin, laminin i kolagen tipa I i IV (Hynes, 2002).

Povećana ekspresija integrina α_3 pronađena je u invazivnim stanicama tumora jajnika u usporedbi sa tumorima niskog malignog potencijala (Liapis i sur., 1997). Povećanje ekspresije integrina α_3 povećava i invazivnost tumora dojke (Gasparini i sur., 1998) i malignog melanoma (Marshall i sur., 1996). Važnost ovog integrina je i u tome što je internalizacijski receptor za ljudske adenoviruse koji se vrlo često koriste kao vektori u genskoj terapiji tumora (Majhen i Ambriović-Ristov, 2006).

2. Cilj istraživanja

Nedavno objavljeni rezultati laboratorija, u kojemu je ovaj rad izrađen, su pokazali na modelu stanica ljudskog karcinoma grkljana (HEp2) novi mehanizam kojim stanice postaju otporne na tri različita citostatika (Brozović i sur., 2008). Povećanjem ekspresije α_3 integrina u HEp2 stanicama došlo je do povećanja ukupne koncentracije glutationa koja je omogućila stanicama bolje preživljenje (otpornost, u usporedbi s HEp2 stanicama bez ekspresije α_3 integrina). Pokazano je da glutation uspješno uklanja reaktivne oksidativne radikale izazvane citostaticima i na taj način omogućuje bolje preživljenje stanica.

Ovaj rad ima za cilj odgovoriti postoji li sličan mehanizam u drugom modelu stanica ploščastog epitela jezika (Cal 27).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

- NaCl, EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina), KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , MgCl_2 , Dimetil-sulfoksid (DMSO) (Kemika, Hrvatska)
- Tris-HCl (Serva, Njema ka)
- Lipofectamine (Invitrogen, SAD)
- Cisplatina , mitomicin C i doksorubicin (Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Njema ka)
- MTT (Chemicon International Inc., Temecula, SAD)
- Tripsin (Invitrogen, SAD)
- Teku a hranjiva podloga pogodna za rast kulture stanica DMEM (engl., *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (Invitrogen, SAD)
- Serum fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Invitrogen, SAD)
- Albumin iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA) (Sigma, Njema ka)
- Geneticin (G418) (Invitrogen, SAD)
- Opti MEM (Invitrogen, SAD)
- Ampicilin (Serva, Njema ka)
- Deionizirana voda (diH_2O)

3.1.2. Ostali materijal i pomagala

- Petrijeve zdjelice za uzgoj kultura stanica promjera 100 mm (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Ampule za smrzavanje stanica (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Staklene pipete (Superior, Njemačka)
- Mikropipete (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za mikropipete (Eppendorf, Njemačka)
- Mikroeprovete (Eppendorf, Njemačka)
- Plastične eprovete od 15 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Plastične eprovete od 50 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Filtar papir
- Propipeta
- Filtar veličina pora 0,22 μm
- Spremnik ispunjen tekućim dušikom

3.1.3. Stanice

U ovom radu korištene su ljudske stanice karcinoma pločastog epitela jezika (Cal 27). Uzgajane su u Petrijevim zdjelicama kao jednoslojna kultura u DMEM-FBS, pri 37°C u vlagom zasićenoj atmosferi s 5% CO₂.

3.1.4. Plazmidi i bakterije

- Plazmid pcDNA₃ koji eksplicira β podjedinicu integrina je dobiven ljubaznošću E.H. Danena (Amsterdam, The Netherlands). Plazmid je dobiven ugradnjom gena za podjedinicu β pod CMV promotor (engl. *human cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer*) plazmida pcDNA31.
- Bakterijske stanice (DH5 α , Invitrogen, SAD)

3.1.5. Kompleti

- Komplet za lipofekciju *Lipofectamine* (Invitrogene, SAD)
- Komplet "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen, Njemačka)

3.1.6. Protutijela

- Mišja monoklonska protutijela usmjerena protiv α_3 integrina (23C6, Pharmingen, SAD) 0,1 mg/mL
- Mišja monoklonska protutijela usmjerena protiv α_5 integrina (P1F6, Chemicon, SAD) 1 mg/mL
- Mišja IgG1 protutijela (Sigma, Njemačka) 0,5 mg/mL
- Zečja protutijela usmjerena protiv mišjih imunoglobulina obilježena fikoeritriinom (PE) (DAKO, SAD) 0,5 mg/mL

3.1.7. Pripremanje pufera i hranjivih podloga

- Otopina T : 0,017 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; 0,134 M KCl; 0,0055 M glukoza
- Tripsin (0,25%): 2,5 g tripsina; 0,01 g streptomicina; 0,006 g penicilina; 0,02 g fenol crvenog. Navedeni sastojci se otope u otopini T, nadopuni se do 1L i podesi pH na 7 do 7,2, te se sterilizira filtriranjem kroz filter veličine pora 0,22 μm .
- LB tekuća hranjiva podloga: 5 g ekstrakt kvasca; 10 g bakto tripton; 10 g NaCl. Navedeni sastojci se otope u dH_2O , nadopuni se s dH_2O do 1 L i podesi se pH na 7,0. Sterilizira se autoklaviranjem.
- LB kruta hranjiva podloga: 5 g ekstrakt kvasca; 10 g bakto tripton; 10 g NaCl; 12 g agara. Navedeni sastojci se otope u dH_2O , nadopuniti se s dH_2O do 1 L i podesi se pH na 7,0. Sterilizira se autoklaviranjem.
- Ampicilin (100 mg/mL). Otapa se u sterilnoj dH_2O i čuva se pri -20°C .
- Tekuća hranjiva podloga pogodna za rast kulture stanica DMEM-FBS. Pomiješati 900 mL Dulbeccove modifikacije Eagleove hranjive podloge pH 7 (DMEM) (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Invitrogen, SAD), sa 100 mL (konačno

koncentracija 10%) seruma fetusa goveda (FBS) (engl. *fetal bovine serum*, Invitrogen, SAD).

- Podloga za zamrzavanje : 450 μ L DMEM; 450 μ L FBS; 100 μ L DMSO
- Geneticin: Priprema se mati na otopina 10 mg/mL. Odvaže se 50 mg geneticina, otopi se u 5 mL DMEM i filtrira kroz filter veličine pora 0,22 μ m.
- Albumin iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA) u PBS (PBS-BSA) 1% BSA u PBS
- Fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS): 1,37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄
- Mati na otopina MTT (12,1 mM): 5 mg MTT-a se otapa u 1 mL PBS-a, filtrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci pri 4°C.
- Cisplatina (500 μ g/mL) otapa se u vodi, čuva se pri -20°C.
- Doksorubicin (2,2 mg/mL) otapa se u vodi, čuva se pri -20°C.
- Mitomicin C (10 mg/mL) otapa se u vodi, čuva se pri -20°C.

3.1.8. Uređaji

- Svjetlosni mikroskop
- Ependorf centrifuga (Ependorf, Njemačka)
- Centrifuga za stanice (Heraeus, Njemačka)
- Brojač stanica
- Tresilica (Vibromix 301EVT, Tehnika, Slovenija)
- Spektrofotometar za mikrotitrarske pločice StatFax 2100 (Awareness Technology INC, SAD)
- Protocitometar (FACSCalibur, Becton-Dickinson, SAD)
- Inkubator za uzgoj stanica (Heraeus, Njemačka)
- Drmalica (Tehnika, Slovenija)
- Vodena kupelj (Tehnika, Slovenija)
- Vibracijska miješalica (Tehnika, Slovenija)

3.2. Metode

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

3.2.1. Izdvajanje plazmida i mjerenje koncentracije

Bakterijske stanice DH5 u koje je prethodno postupkom transformacije uba en plazmid pCDNA₃ su do upotrebe uvane pri -80°C. Otapaju se kratko u ledu te se mala količina odmrznutih bakterija mikrobiološkom ušicom razmazuje po površini Petrijeve zdjelice napunjene krutom LB hranjivom podlogom sa ampicilinom (100 µg/mL). Petrijeva zdjelica se okreće i naopako (tako da dno zdjelice s agarom bude okrenuto prema gore) time se sprječava nakupljanje kondenzata na površini hranjive podloge) i inkubira preko noći pri 37°C. Jedna izrasla kolonija (dobro odvojena od drugih) se prenosi u 5 mL sterilne LB tekućine hranjive podloge s ampicilinom (100 µg/mL) te se inkubira preko noći u tresilici pri 37°C.

Za izdvajanje i pročišćavanje plazmidne DNA iz bakterija korišten je komplet reagensija *QIAprep Spin Miniprep Kit*.

Koncentracija plazmidne DNA određena je spektrofotometrijski. Uzorak plazmidne DNA razrjeđuje se 10x s diH₂O i pipetira se u kivetu. U kontrolnu kivetu priprema se jednaki volumen diH₂O. Kontrolnom kivetom namještamo vrijednost očitavanja spektrofotometrom pri 260 nm na nulu. Zatim mjerimo apsorbanciju uzorka. Isti postupak ponavljamo i pri valnoj duljini 280 nm. Mjerenje apsorbancije pri 260 nm omogućuje određivanje koncentracije DNA. Apsorbancija 1 odgovara približno 50 µg/mL dvostrane DNA. Omjer apsorbancija pri 260 i 280 nm ukazuje na istu izdvojenu DNA.

3.2.2. Uzgoj stanica u kulturi

S obzirom da su Cal 27 stanice adherentne, tj. rastu prihvaćene za podlogu, rastu sve do trenutka kada popune površinu na kojoj rastu ili dok ne iscrpe hranjivu podlogu DMEM-FBS u kojoj rastu. Zbog toga je potrebno stanice presaditi prije nego što uimirati zbog loših uvjeta. Prilikom presađivanja stanice se odvajaju od hranjive podloge dodatkom proteolitickog enzima tripsina. Stanice su uzgajane u Petrijevim zdjelicama za uzgoj kulture

stanica promjera 10 cm. Nakon uklanjanja hranjive podloge sa stanica, dodaje se tripsin (1-2 mL) i ostavi da djeluje 2-3 minute. Tripsin cijepa veze između stanica i podloge. Njegovo djelovanje zaustavlja se dodatkom DMEM-FBS u kojem su inhibitori proteaza, među njima i tripsina.

3.2.2.1. Odmrzavanje stanica

Tekuća hranjiva podloga DMEM-FBS zagrije se u vodenoj kupelji pri 37°C i pipetira se 12 mL DMEM-FBS u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm. U vodenu kupelj zagrijanu pri 37°C uranja se (odmah nakon uklanjanja iz spremnika sa tekućim dušikom) ampula sa smrznutim stanicama. Ampula se drži u vodenoj kupelji 1 do 2 min. Pipetom se nježno prenose stanice u Petrijevu zdjelicu sa zagrijanom hranjivom podlogom. Posude se pohranjuju u inkubator pri 37°C s 5% CO₂. Nakon 24 sata kulture se pregledaju pod svjetlosnim mikroskopom i po potrebi presađuju.

3.2.2.2. Zamrzavanje stanica

Zbog osjetljivosti stanica korišten je nešto izmijenjeni postupak zamrzavanja nego što je to uobičajeno. Nakon uklanjanja hranjive podloge sa stanica, dodaje se tripsin (1-2 mL) koji odvaja stanice od podloge tijekom 2-3 minute. Dodaje se po 6 mL hranjive podloge DMEM-FBS u Petrijeve zdjelice, stanice se dobro resuspendiraju i zajedno sa hranjivom podlogom prebacuju u epruvete volumena 50 mL. Centrifugira se pri 1000 x g tijekom 10 min i uklanja supernatant. Stanice se resuspendiraju u prethodno pripremljenoj i ohlađenoj (iz leda) podlozi za zamrzavanje. Stanice se odmah stavljaju u ampule za zamrzavanje (900 µL po ampuli), a ampule u hladnjak pri -80°C. Nakon par sati ili sutradan ampule se, za duže vrijeme, pohranjuju u spremnik sa tekućim dušikom.

3.2.2.3. Izrada krivulje rasta

Stanice su nasadene u ploču sa 24 bunara (5x10⁴ stanica/bunara) u 1 mL DMEM-FBS-a i svakih 24 sata, tripsinizirane su i brojane automatskim brojačem stanica.

3.2.3. Transfekcija i izdvajanje stabilnih transfektanata

3.2.3.1. Transfekcija

Transfekcija je metoda unosa strane molekule DNA u stanicu eukariota. Postoji nekoliko načina unosa DNA u stanicu, a najčešće se koriste transfekcija pomoću kalcijevog fosfata i lipofekcija (pomoću liposoma). U ovom radu koristili smo komercijalno dostupan komplet za transfekciju liposomima *Lipofectamine*. Stanice Cal 27 nasade su u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm (2×10^6 stanica/mL). Plazmidna DNA (ukupno 28 µg) otopljena je u mikroepreveti 1 u 526 µL Opti MEM-a. U mikroepreveti 2 pomiješano je 60 µL Lipofectamina sa 600 µL Opti MEM-a. Sadržaj dviju mikroepreveta se pomiješa i ostavlja 30 min pri sobnoj temperaturi. Sa stanica se uklanja hranjiva podloga u kojoj su stanice rasle DMEM-FBS, stanice se ispiru hranjivom podlogom bez seruma DMEM, te se stvoreni precipitat dodaje na stanice i ostavlja se 4 sata u inkubatoru pri 37°C. Nakon uklanjanja hranjive podloge i precipitata, na stanice se dodaje DMEM-FBS i ostavlja 24 sata u inkubatoru.

3.2.3.2. Izdvajanje stabilnih transfektanata

Da bi se mogli izdvojiti klonovi stanica koje sadrže stabilno ugrađeni transficirani plazmid, plazmidni vektor s odabranim genom mora sadržavati i gen za otpornost na neki antibiotik. Uzgojem stanica u prisutnosti tog antibiotika izrast će samo oni klonovi stanica koji su stekli otpornost zahvaljujući stabilnoj ugradnji plazmida.

Geneticin (G418, Gibco BRL Life Technologies, Inc) je aminoglikozidni antibiotik topiv u vodi. Dobiven je iz vrste *Micromonospora rhodorangea*, strukture slične gentamicinu B1. G418 blokira sintezu polipeptida inhibicijom koraka elongacije i u prokariotskim i eukariotskim stanicama. U plazmidu pcDNA₃ nalazi se gen za otpornost na geneticin te se stoga geneticin koristi za odabir stabilnih transfektanata.

Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije, stanice se odvajaju od podloge uz pomoć tripsina te se razdjeljuju u Petrijeve zdjelice promjera 3,5 cm s tim da je ukupna površina na koju se stanice nasade 20 puta veća od početne površine Petrijeve zdjelice u kojoj je izvršena transfekcija. U svrhu odabira klonova stabilno transficiranim plazmidom koji u sebi sadrži odabrani gen, u hranjivu podlogu dodaje se geneticin (600 µg/mL). Koncentracija

geneticina se mora eksperimentalno odrediti za svaku liniju stanica. Za stanice Cal 27 to je već bilo poznato (Maja Herak Bosnar, osobno priopćenje). Tekuća hranjiva podloga s geneticinom mijenja se svakih četiri do pet dana do pojave otpornih kolonija.

Nakon deset dana kolonije su izrasle te su identificirane svjetlosnim mikroskopom. Posebna pažnja se posvećuje izgledu kolonije (okrugla, dakle nastala od pojedinačne stanice) i odvojenosti od drugih kolonija (da je dovoljno udaljena od drugih kolonija kako se pri njihovom izdvajanju nebi pomiješale stanice dviju različitih kolonija). Pojedinačne kolonije (klonovi stanica) izdvojene su struganjem sterilnim plastičnim nastavkom za mikropipetu i prenesene u bunariće ploče sa 96 bunarića u koje je prethodno dodano 200 µL hranjive podloge DMEM-FBS sa geneticinom. Rast tako izdvojenih klonova prati se svaki dan do trenutka kada stanice ispune bunarić. Tada se tripsinom odvajaju od podloge i prenose u ploče sa 24 bunarića, zatim ploče sa 6 bunarića (svake ploče površina za rast), sve dok se ne dostigne dovoljan broj stanica za površinu od 25 cm² iz koje se, nakon analize ekspresije, može smrznuti prva ampula pojedinačnog klona. Cijelo vrijeme klonovi se uzgajaju u DMEM-FBS uz dodatak geneticina.

3.2.4. Protokol na citometrija

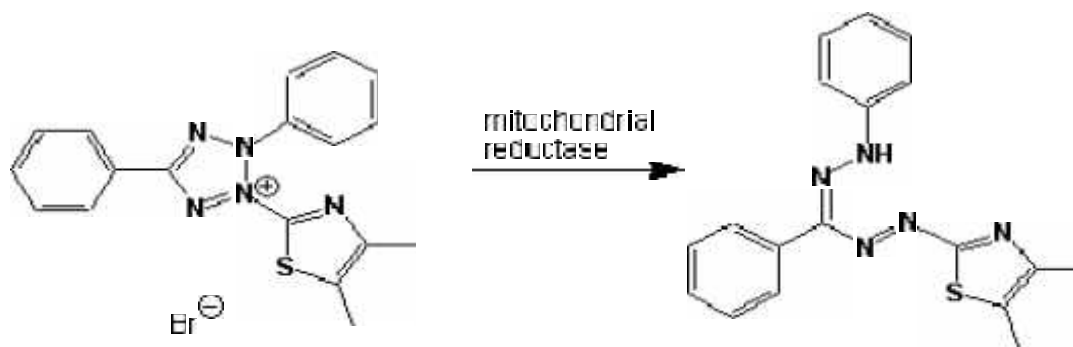
Protokol na citometrija (engl. *flow cytometry*) je metoda koja mjeri i analizira različite proteine u stanici ako oni sami fluoresciraju ili ih se prethodno obilježi fluorescencijskom bojom. Omogućuju istovremenu multiparametarsku analizu pojedinačne stanice ili čestica koje prolaze pored optičkog i/ili elektroničkog detektora, u tekućini, pomoću snopa laserske svjetlosti. Obilježavanje staničnih proteina može biti izravno ili neizravno. Kod izravnog obilježavanja protutijelo na određeni protein je vezano za fluorokrom, dok je kod neizravnog obilježavanja karakteristično prvo vezanje neobilježenog protutijela 1 za specifični protein, koje slijedi vezanje fluorokromom obilježenog protutijela 2 koje prepoznaje protutijelo 1.

Metoda neizravne prototitracije citometrije korištena je za određivanje ekspresije $\alpha_5\beta_1$ integrina na površini Cal 27 stanica i odabir stabilnih transfektanata. Stanice su uzgajane kao jednoslojna kultura do 80% popunjenosti Petrijeve zdjelice, odvojene s podloge pomoću tripsina i resuspendirane u hranjivoj podlozi DMEM-FBS. Uobičajeni postupak nalaže da se stanice odvajaju od podloge korištenjem EDTA (0,2% u PBS), a ne enzimski tripsinom.

Me utim na temelju iskustava s protutijelima protiv ν_3 i ν_5 (Andreja Ambriovi Ristov, osobno priop enje), u potpunosti jednaki rezultati dobivaju se nakon odvajanja stanica s EDTA i tripsinom, no sa tripsinom stanice se manje nakupljaju u grozdove što je iznimno bitno za analizu u proto nom citometru. Broj stanica odre en je brojanjem automatskim broja em stanica te je za u postupak obilježavanja odvojeno po 5×10^5 stanica po uzorku. Stanice se ispiru dva puta sa po 10 mL hladnog PBS-a. Nakon drugog centrifugiranja pri 1000 x g, stanice se resuspendiraju u 50 μ L PBS-a i dodaju se primarna protutijela (mišja monoklonska protutijela usmjerena protiv ν_3 integrina (5 μ L/uzorku) i protiv ν_5 integrina (0,5 μ L/uzorku). U kontrolne uzorke za svaku ispitivanu stani nu liniju dodavano je protutijelo istog izotipa kao i ono kojim se mjeri ekspresija nekog proteina, tzv. izotipsko protutijelo. Za kontrolne uzorke za mjerenje sa oba protutijela protiv ν_3 i ν_5 integrina korišten je mišji IgG (2,5 μ L/uzorku). Koli ina svih korištenih protutijela prethodno je iskustveno odre ena (Andreja Ambriovi Ristov, osobno priop enje). Tijekom inkubacije od 60 minuta pri 4°C, uzorke treba par puta promiješati laganim udaranjem u stijenku mikroeprevete. Stanice su zatim isprane hladnim PBS-om, na na in da se u svaki uzorak dodaje 450 μ L hladnog PBS-a, promiješa na vibracijskoj miješalici i centrifugira pri 1000 x g tijekom 4 minute. Nakon drugog ispiranja stanice se resuspendiraju u 50 μ L PBS-a i dodaju se sekundarna protutijela (protutijela protiv mišjih protutijela obilježena s fikoeritinom). Koli ina ovog protutijela tako er je prethodno iskustveno odre ena (2,5 μ L po uzorku; Andreja Ambriovi Ristov, osobno priop enje). Nakon inkubacije tijekom 25 minuta, pri 4°C u mraku, stanice se ponovno ispiru tri puta na prethodno opisani na in. Nakon zadnjeg ispiranja stanice se resuspendiraju u 350 μ L PBS-1% BSA i analiziraju proto nim citometrom.

3.2.5. Odre ivanje preživljenja stanica (MTT-test)

MTT-test je kolorimetrijska metoda koja mjeri preživljenje stanica. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju žutu topljivu tetrazolijevu sol (MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u ljubi aste kristale formazana. Ova se reakcija dešava u mitohondrijima djelovanjem enzima sukcinat dehidrogenaze.



Slika 7. Reakcija pretvorbe žutog MTT u ljubi asti formazan

Kristali formazana otope se u organskom otapalu (dimetil-sulfoksidu). Apsorbancija se mjeri na 600 nm i proporcionalna je preživljenju stanica. Ovom metodom određuje se citotoksičnost spojeva.

Stanice su nasajene u ploču sa 96 bunarića ($3,7 \times 10^3$ stanica po bunariću). Drugog dana dodavane su različite koncentracije citostatika u ukupnom volumenu od 20 μ L/bunariću. Za svaku koncentraciju istovremeno su rađena 4 paralelna uzorka (kvadrilikat).

Raspon konačnih koncentracija citostatika u bunarićima je bio:

cisplatina: 0,125 – 2 μ g/mL

doksorubicin: 0,04 – 4 μ g/mL

mitomicin C: 0,4 – 7,5 μ g/mL

Nakon 72 sata inkubacije sa stanica je uklonjena hranjiva podloga, a u svaki bunarić je dodano 0,04 mL matične otopine MTT + DMEM (omjer 1:10). Nakon 3 sata inkubacije pri 37°C u stanicama su pod mikroskopom vidljivi kristali formazana koji se zatim otapaju dodatkom dimetil-sulfoksida (0,17 mL po bunariću). Ploča je mehanički protresena da bi se kristali u potpunosti otopili i da bi se dobila izjednačena boja. Apsorbancija je mjerena pri 600 nm na spektrofotometrijskom štita u ploču StatFax 2100.

Preživljenje je izračunato prema formuli:

$$\text{preživljenje (\%)} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica - slijepa proba}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica - slijepa proba}} \times 100$$

3.2.6. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

4. Rezultati

4.1. Izdvajanje klonova 2B3 i 2B1 sa povećanom ekspresijom ν_3 integrina stabilnom transfekcijom Cal 27 stanica plazmidom koji sadrži gen za ν_3 podjedinicu integrina

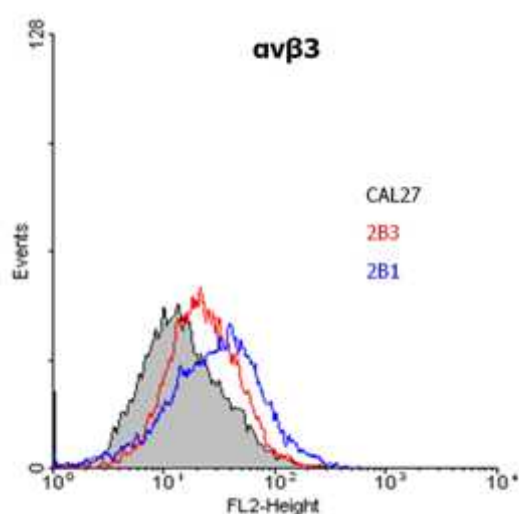
Nakon transfekcije Cal 27 stanica plazmidom koji sadrži gen za ν_3 podjedinicu integrina, klonovi 2B1 i 2B3 koji ekspimiraju povećanu količinu ν_3 integrina odabrani su na temelju sposobnosti rasta u prisutnosti 600 $\mu\text{g/mL}$ geneticina (G418) i na temelju izmjerene ekspresije ν_3 integrina.

Koncentracija geneticina za uzgoj transfektanata Cal 27 stanica određena je prethodno u laboratoriju Maje Herak Bosnar (Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković). Kontrolni klon stanica Cal 27 dobiven stabilnom transfekcijom vektora koji ne sadrži gen za ν_3 podjedinicu integrina, dobiven je također ljubaznošću u Maje Herak Bosnar (Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković). Budući da je osjetljivost ovog kontrolnog klona na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C bila jednaka osjetljivosti roditeljskih Cal 27 stanica (rezultati nisu prikazani) u daljnjem radu svi pokusi izvođeni su samo sa Cal 27 stanicama. Vrlo je važno naglasiti da stanice stabilno transficirane kontrolnim plazmidom (plazmid bez gena imaju stabilnu ekspresiju transfekcijom želimo postići) nisu najbolja kontrola izdvajanja stabilnih transfektanata. Naime plazmidna DNA se nasumično ugrađuje u nepoznatom broju kopija. Stoga smo odlučili izdvojiti najmanje dva stabilna transfektanta sa povećanom ekspresijom ν_3 integrina kako bi na temelju toga bili sigurni da je primijećeni u inak na otpornost uistinu posljedica ekspresije ν_3 integrina.

Za određivanje ekspresije ν_3 integrina na površini Cal 27 stanica korištena je metoda obilježavanja specifičnim protutijelima protiv ν_3 integrina, čije vezanje se mjeri prototom citometrijom. Na temelju mjerenja ekspresije ν_3 integrina odabrani su klonovi 2B3 i 2B1, od kojih klon 2B3 ima povećanu ekspresiju ν_3 integrina u odnosu na roditeljsku staničnu linju Cal 27. Izmjerena srednja vrijednost fluorescencije, MFI (engl. *mean fluorescence intensity*) za Cal 27 je 15,3, dok je za klon 2B3 izmjerena vrijednost 25,4. Klon 2B1 ima ekspresiju ν_3 integrina još veću od one izmjerene za 2B3 što se zaključuje iz srednje vrijednosti fluorescencije 39,7 (Tablica 1; Slika 8).

Tablica 1. Srednja vrijednost fluorescencije dobivena vezanjem protutijela koja prepoznaju $\alpha_v\beta_3$ integrin za Cal 27 stanice i stabilne transfektante 2B3 i 2B1.

Stanice/ stabilni transfektanti	Srednja vrijednost fluorescencije
Cal 27	15,3
2B3	25,4
2B1	39,7



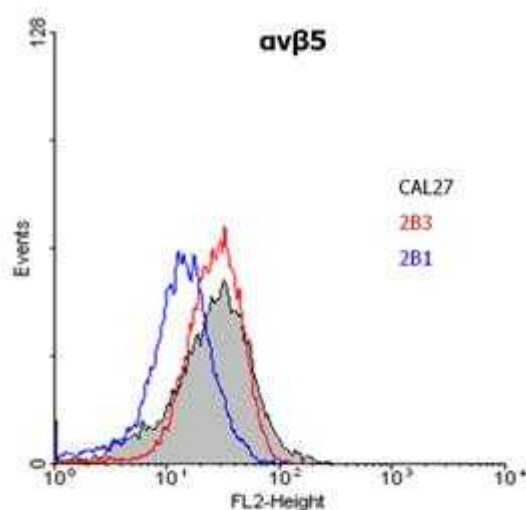
Slika 8 Ekspresija $\alpha_v\beta_3$ integrina na površini Cal 27 stanica i $\alpha_v\beta_3$ -stabilnih transfektanata 2B3 i 2B1. etrdeset i osam sati nakon nasa ivanja stanice su djelovanjem tripsina odvojene od podloge i ekspresija $\alpha_v\beta_3$ integrina je određena obilježavanjem specifičnim protutijelima i mjerenjem prototim citometrom. Histogrami dobiveni u kontrolnim uzorcima u kojima se mjeri vezanje izotipskih protutijela se preklapaju te stoga nisu prikazani. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

4.2. Povećana ekspresija α_3 integrina utječe na ekspresiju α_5 integrina

Budući da su stabilni transfektanti dobiveni transfekcijom plazmidom u kojemu se nalazi samo α_3 podjedinica integrina, zaključuje se da je kod transfektanata sa jakom ekspresijom α_3 došlo i do smanjenja ekspresije α_5 zbog natjecanja α_3 i α_5 podjedinica integrina za raspoloživ α u stanici. U transfektantu 2B3 koji pokazuje umjereno povećanu ekspresiju α_3 integrina nije došlo do promjene ekspresije α_5 integrina; srednja vrijednost fluorescencije za Cal 27 je 25,8 dok je za 2B3 26,4 (Slika 9; Tablica 2). Međutim u transfektantu 2B1 koji eksprimira veću količinu α_3 integrina nego 2B3 i Cal 27 (Slika 8) došlo je upravo do smanjenja ekspresije α_5 integrina. Srednja vrijednost fluorescencije za 2B1 transfektant iznosi 11,7, što je značajno manje od 25,8 koliko je izmjereno za roditeljske stanice Cal27 (Slika 9; Tablica 2).

Tablica 2. Srednja vrijednost fluorescencije dobivena vezanjem protutijela koja prepoznaju α_5 integrin za Cal 27 stanica i stabilne transfektante 2B3 i 2B1 za ekspresiju α_5 integrina na površini stanica.

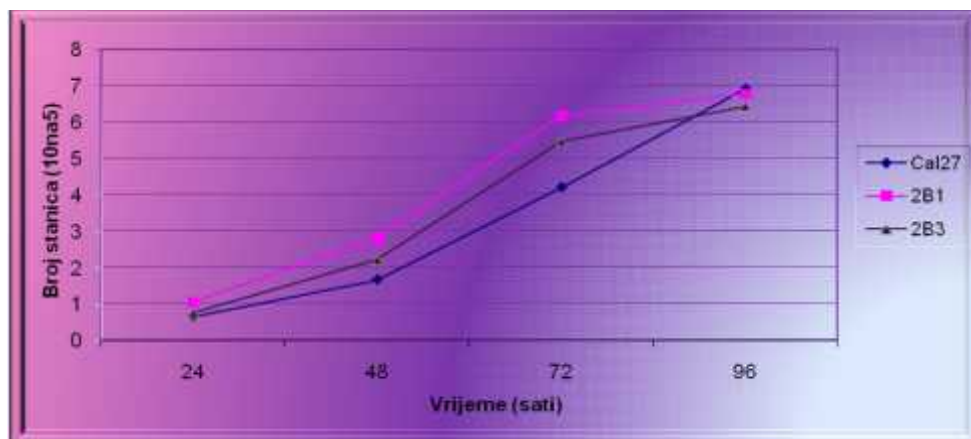
Stanice/ stabilni transfektanti	Srednja vrijednost fluorescencije
Cal 27	25,8
2B3	26,4
2B1	11,7



Slika 9. Ekspresija α_5 integrina na površini Cal 27 stanica i α_3 -stabilnih transfektanata 2B3 i 2B1. etrdeset i osam sati nakon nasa ivanja stanice su djelovanjem tripsina odvojene od podloge i ekspresija α_5 integrina je odre ena obilježavanjem specifi nim protutijelima i mjerenjem proto nim citometrom. Histogrami dobiveni u kontrolnim uzorcima u kojima se mjeri vezanje izotipskih protutijela se preklapaju te stoga nisu prikazani..Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sli nim rezultatima.

4.3. Stabilni transfektanti 2B3 i 2B1 rastu jednako brzo kao i stanice Cal 27

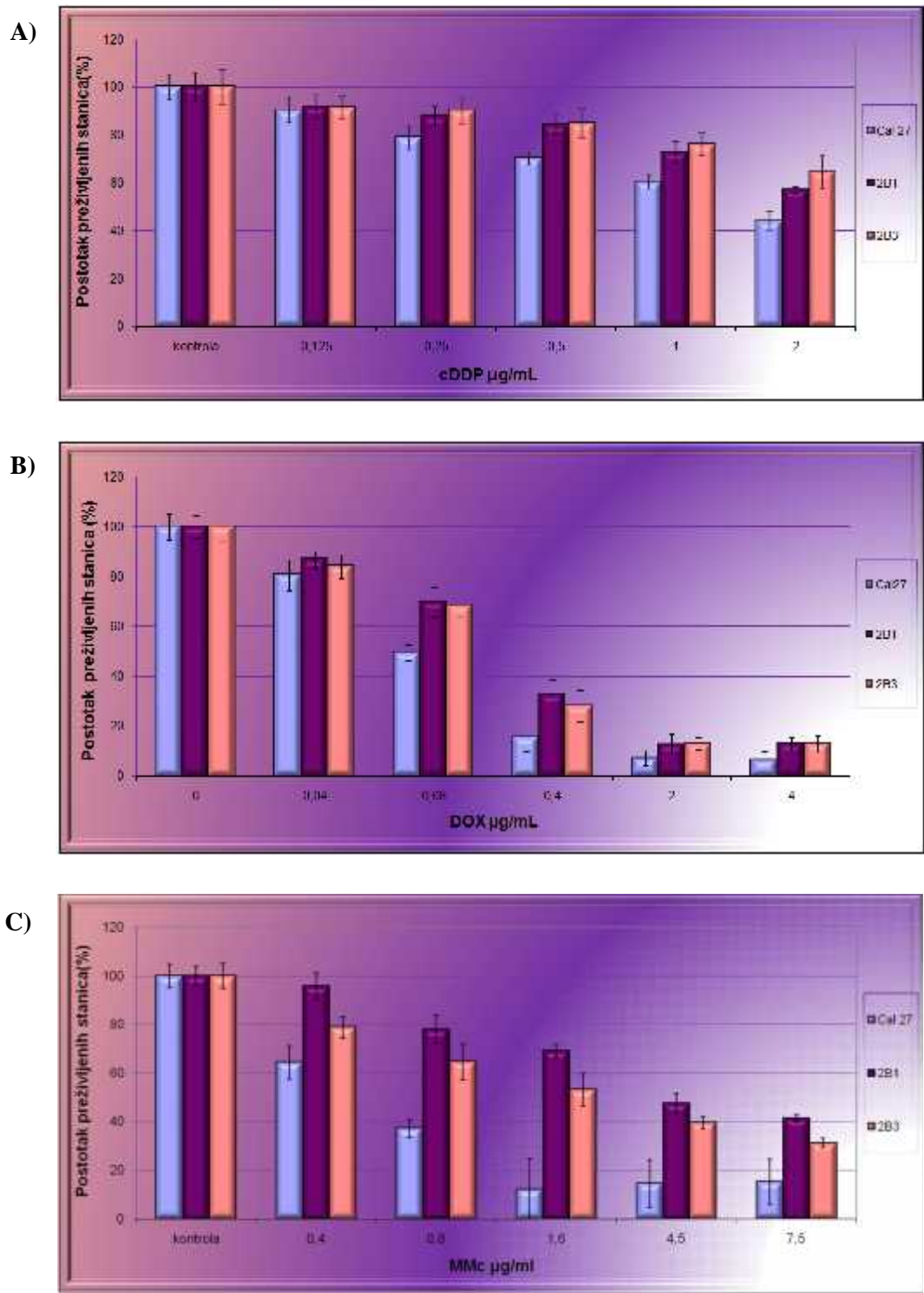
Cilj ovog istraživanja je odrediti osigurava li pove ana ekspresija α_3 integrina stanicama Cal 27 otpornost na citostatike cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C. Za mjerenje preživljenja naj eš e se koristi MTT metoda opisana u poglavlju Materijali i metode. Poznato je da brzina rasta stanica može utjecati na rezultate dobivene ovom metodom. Stoga je bilo potrebno provjeriti je li ekspresija α_3 integrina utjecala na brzinu rasta α_3 -transfektanata. Odre ivanjem broja stanica Cal 27 i α_3 -transfektanata 2B3 i 2B1, tijekom 4 dana, ustanovljeno je da se ne razlikuju po brzina rasta u kulturi (Slika 10).



Slika 10. Krivulja rasta Cal 27 stanica i stabilnih transfektanata 2B1 i 2B3. Stanice su nasajene u ploicu sa 24 bunari a (po 4 bunari a za Cal 27, odnosno po 4 za svaki stabilni transfektant) u jednakoj koncentraciji. Svakih 24 sata stanice su, iz jednog od bunari a, tripsinom odvajane od podloge i izbrojen je ukupni broj stanica u bunari u. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sli nim rezultatima.

4.4. Pove ana ekspresija ν_3 integrina u klonovima 2B3 i 2B1 osigurava otpornost (bolje preživljenje) na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C

Stanice Cal 27 i dva stabilna ν_3 -transfektanta Cal 27 stanica 2B3 i 2B1 su 24 sata nakon nasajivanja izlagani razli itim koncentracijma cisplatine, doksorubicina i mitomicina C te je 72 sata nakon toga mjereno preživljenje metodom MTT. Na slici 11 prikazani su rezultati koji pokazuju da obje stani ne linije sa pove anom ekspresijom ν_3 pokazuju bolje preživljenje nakon izlaganja citostaticima cisplatinu (Slika 11A), doksorubicinu (Slika 11B) i mitomicinu C (Slika 11C).



Slika 11. Preživljenje Cal 27 stanica i ν 3-stabilnih transfektanata 2B3 i 2B1 na A) cisplatinu (cDDP), B) doksorubicin (DOX) i C) mitomicin C. Stanice su nasane u ploču s 96 bunara, 24 sata nakon nasativanja dodavane su različite koncentracije citostatika. Sedamdeset i dva sata nakon, preživljenje stanica određivano je metodom MTT. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

5. Rasprava

Glavni razlog neuspjeha terapije tumora citostaticima je razvoj otpornosti. Kako bi se poboljšala terapija tumora, u klinici se koristi i kombinirana terapija citostaticima. Mehanizam otpornosti tumora na citostatike ovisi prvenstveno o vrsti citostatika tj. o njegovom mehanizmu djelovanja. Međutim postoje mehanizmi otpornosti koji istovremeno osiguravaju otpornost na više različitih citostatika. Primjer za to je povećanje ekspresije P-glikoproteina koji izbacuje toksične tvari iz stanice pa tako i citostatike (Stavrovskaya, 2000). Prema tome važno je poznavati mehanizme nastanka otpornosti u oba tipa terapije, jednim citostatikom ili kombinacijom više njih, i to zato da bi se izbjeglo nastajanje križne otpornosti (kada razvoj otpornosti na jedan citostatik osigurava otpornost i na drugi). Istraživanja grupe u kojoj je ovaj rad izrađen (Brozović i sur., 2008) i ovaj diplomski rad upravo ukazuju na važnost poznavanja zajedničkih mehanizama otpornosti tumorskih stanica na citostatike koji primarno ne djeluju na jednak način.

Ambriović-Ristović i suradnici (2004) su pronašli povezanu ekspresiju α_3 integrina u ljudskim stanicama karcinoma grkljana (HEp2) otpornim na cisplatinu te su pretpostavili da bi povezanost ekspresija ovog integrina mogla biti povezana s otpornosti. U tu svrhu, ista grupa je izdvojila stabilne transfektante na način da su HEp2 stanice transficirane plazmidom koji eksprimira α_3 podjedinicu integrina. Pokazano je da ti klonovi stanica pokazuju otpornost (manju osjetljivost) na tri antitumorska lijeka: cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C. Pronađen je i mehanizam koji dovodi do pojave otpornosti. Naime, povezanost ekspresija α_3 integrina dovodi do povećanja ukupne količine glutationa u stanici. Glutation ne djeluje na način da detoksificira protutumorske lijekove, npr. da detoksificira cisplatinu (to je dokazano jednakom platinacijom DNA u HEp2 stanicama i transfektantima s povezanom ekspresijom α_3 integrina). Pokazano je da povezanost količina glutationa u stanici pomaže djelotvornijem uklanjanju reaktivnih oksidativnih radikala u stanici, koji se stvaraju vrlo brzo nakon izlaganja protutumorskom lijeku, i na taj način štiti stanicu od smrti (Brozović i sur., 2008).

Cilj ovog rada bio je pokazati postoji li sličan mehanizam otpornosti posredovan α_3 integrinom u drugom tipu stanica. Odabran je tumor iz skupine tumora glave i vrata, karcinom ploščastog epitela jezika Cal 27. Stabilnom transfekcijom Cal 27 stanica plazmidom koji sadrži gen za α_3 podjedinicu integrina (na jednak način kao što je opisano u radu Brozović i sur.,

2008), dobiveni su klonovi 2B1 i 2B3 koji ekspimiraju poveanu količinu ν_3 integrina. Mjerena je ekspresija ν_3 i ν_5 integrina u tim stanićima da bi se provjerilo je li ekspresija ν_3 smanjila ekspresiju ν_5 integrina zbog kompeticije ν_3 podjedinice za raspoložive ν_5 podjedinice. Kod jednog je stabilnog transfektanta ekspresija ν_3 integrina bila poveana, dok je ekspresija ν_5 integrina bila jednaka onoj u roditeljskim stanicama. Drugi ν_3 -transfektant ekspimirao još veću količinu ν_3 integrina te je zbog toga došlo do blagog smanjenja ekspresije ν_5 integrina. Konačno, određivanjem preživljenja roditeljskih Cal 27 stanica i izdvojenih klonova Cal 27 koji ekspimiraju ν_3 integrin (2B3 i 2B1) nakon izlaganja trima citostaticima pokazali smo pojavu otpornosti na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C.

Fenomen kompeticije transfekcijom unesene podjedinice ν_3 integrina sa ν_5 podjedinicom za raspoloživu ν_5 podjedinicu primijenjen je i u ν_3 integrin transfektantima izdvojenim iz HEp2 stanica. Naime iz HEp2 stanica izdvojeno je 6 stabilnih transfektanata koji ekspimiraju sve veću i veću količinu ν_3 integrina (Ambriović-Ristović i sur., 2004). Pokazano je da tri transfektanta, u kojima porast ekspresije ν_3 integrina nije utjecao ili je vrlo malo utjecao na ekspresiju ν_5 integrina pokazuju otpornost na citostatike. Među tim tri transfektanta u kojima je primijećeno snažno smanjenje ν_5 zbog porasta ν_3 integrina pokazuju jednaku osjetljivost na citostatike kao i roditeljska stanica na liniji (Brozović i sur., 2008; Ambriović-Ristović, usmeno priopćenje). U tri ν_3 integrin stabilna transfektanta izdvojena iz HEp2 stanica nije zabilježena korelacija između stupnja otpornosti stanica i ekspresije ν_3 integrina. Moguće objašnjenje je da može postojati nivo ν_3 integrina potreban za otpornost ili otpornost posredovana ν_3 integrinom može imati kinetiku koja vrlo brzo dovodi do zasićenja, što znači da daljnje povećanje ekspresije ν_3 integrina ne može povećati otpornost (Brozović i sur., 2008). U stanićima sustavu Cal 27 stanica opisanom u ovom radu zapažen je sličan fenomen da klon stanica sa većom ekspresijom ν_3 integrina nema statistički veću otpornost od klona s manjom ekspresijom ν_3 integrina. U odabiru Cal 27- ν_3 integrin stabilnih transfektanata nismo našli takav transfektant koji bi imao iznimno veliku ekspresiju ν_3 integrina. To može biti razlog zašto nismo našli klon u kojem bi došlo do tako jakog smanjenja ν_5 integrina da se poništi djelovanje poveane ekspresije ν_3 integrina na otpornost. U HEp2 stanicama dobivena je itava paleta stabilnih transfektanata i daljnjim istraživanjima je na klonu broj 19, koji ima najveću ekspresiju ν_3 integrina i posljednju najveće smanjenje ekspresije ν_5 integrina, pokazano da je čak došlo do snažnog poticanja ekspresije ν_5 integrina nepoznatim mehanizmom (Majhen i sur., 2009). No postoji još jedna bitna razlika između HEp2 i Cal 27 stanica. HEp2 stanice na svojoj

površini neamju ekspresiju α_3 integrina, pa je transfekcija lako mogla omogućiti izdvajanje klonova s rastu om ekspresijom α_3 integrina. Me utim Cal 27 stanice prirodno na svojoj površini ekspimiraju α_3 integrin te je za povećanje ve postoje e ekspresije potrebno u stanicu transfekcijom ugraditi puno više plazmida da bi se kona no dobila ve a ekspresija, što je naravno manje vjerojatan doga aj.

Najvažniji je rezultat ovog rada da je na modelu ljudskih stanica karcinoma plo astog epitela pokazano da ekspresija α_3 integrina osigurava otpornost na tri citostatika razli itog mehanizma djelovanja: cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C. Ipak, postoji zajedni ki mehnizam djelovanja sva tri citostatika, a to je stvaranje reaktivnih oksidativnih radikala. Vrlo je vjerojatno da u ovim stanicama postoji isti mehanizam razvoja otpornosti podređovan glutationom kao i onaj opisan u radu Brozovi i suradnici (2008). Najve a otpornost zabilježena je za mitomicin C i iznosi oko 2 puta, dok su vrijednosti preživljenja za cisplatinu i doksorubicin, α_3 integrin ekspimiraju ih stanica, bile 1,5 puta ve e od vrijednosti za Cal 27. Ako se to usporedi sa vrijednostima dobivenima u sustavu HEP2- α_3 integrin transfektanata (2-2,3 puta za cisplatinu, 2 do 2,8 puta za mitomicin C, 2-2,5 puta za doksorubicin) (Brozovi i sur., 2008) primje uju se razlike. Uzrok tome može se potražiti u gore spomenutim argumentima da Cal 27 stanice, za razliku od HEP2 stanica, ekspimiraju α_3 integrin na svojoj površini. Stoga ove stanice uvijek imaju prisutan signal za preživljenje kojeg okida α_3 integrin te pove anje ekspresije tog istog integrina ne utje e tako drasti no na preživljenje kao što je to kod HEP2 stanica. Drugim rije ima, ako je naša pretpostavka da postoji odre eni nivo ekspresije α_3 integrina koji dovodi do zasi enja (vidi prethodni odjeljak) to na, onda se time može objasniti zašto pove anje ekspresije α_3 integrina u ovom sustavu izaziva tako male promjene.

Usprkos malim razlikama u otpornosti vrlo je važno da je u ovom radu potvr eno postojanje otpornosti posredovane α_3 integrinom. Za α_3 integrin objavljeni su kontradiktorni rezultati o tome da li ima proapoptotsku ili antiapoptotsku ulogu u razli itim tipovima stanica. Matter i Ruoslahti (2001) su opisali antiapoptotsku ulogu α_3 integrina u stanicama kineskog hr ka. Sli no je pokazano i za stanice melanoma da ekspresija α_3 integrina štiti stanice od apoptoze (Montgomery i sur., 1994). Integrin α_3 tako er štiti embrionalne stanice bubrega od apoptoze izazvane niskim koncentracijama seruma (Brassard et al., 1999). Signal potaknut integrinom α_3 poticao je preživljenje u endotelnim stanicama (Brooks i sur., 1994). Kona no, Gladson i sur. (1995) su pokazali da je ekspresija vitronektinskih receptora α_3 i α_5 integrina osigurala preživljenje ljudskim stanicama glioma nakon izlaganja topoektanu. Me utim, Kozlova i suradnici (2001) su pokazali da

integrin α_3 stvara stimuliraju i signal za apoptozu u intestinalnim epitelnim stanicama karcinoma (Caco-2). Ove stanice su odlazile u apoptozu kada nisu primale signal od izvanstani nog matriksa (anoikis). Ista je grupa pokazala da je otpornost na kolhicin (i križna otpornost na vinblastin i farmorubicin) povezana s smanjenjem ekspresije α_3 integrina, podržavaju i proapoptotsku ulogu ovog integrina (Kozlova i sur., 2004). Rezultati dobiveni u ovom radu doprinose tvrdnji da α_3 integrin može djelovati proapoptotski ili antiapoptotski i da to najvjerojatnije ovisi o tipu stanice. Ipak na temelju rezultata na HEP2 (Brozovi i sur., 2008) i Cal 27 stanicama (ovaj rad) može se pretpostaviti da α_3 integrin ima antiapoptotsku ulogu u tumorima glave i vrata.

Mehanizam otpornosti stanica ljudskog karcinoma grkljana (HEP2) s poveanom ekspresijom α_3 integrina je posredovan glutationom koji sprječava nagli porast reaktivnih oksidativnih radikala u stanici nakon izlaganja citostaticima cisplatinu, doksorubicinu i mitomicinu C. U ovom radu utvrđeno je samo smanjenje ekspresije α_3 integrina na preživljenju Cal 27 stanica. Cilj je u budućnosti pokazati radi li se o istom mehanizmu kod Cal 27 stanica. Osim toga, bilo bi zanimljivo saznati možemo li u klonovima stanica otpornim na bilo koji od spomenutih citostatika, a dobivenim višestrukim izlaganjem citostatiku i izdvajanjem preživjelih klonova, pronaći poveaniju ekspresiju α_3 integrina. Naime, u CA3_{ST} stanicama otpornim na cisplatinu, dobivenim višestrukim izlaganjem HEP2 stanica cisplatinu, pronađena je poveanija ekspresija α_3 integrina (Ambriović-Ristov i sur., 2004). Iako je dokazano da poveanija ekspresija α_3 integrina u HEP2 stanicama osigurava otpornost na citostatike (Brozovi i sur., 2008), do danas još nije utvrđeno ima li α_3 integrin u CA3_{ST} stanicama uistinu ulogu u otpornosti na cisplatinu (Ambriović-Ristov, osobno priopćenje).

Pokazano je da je α_3 integrin biljeg za metastatski potencijal (Felding-Habermann, 2003) što zajedno s podacima da može osiguravati otpornost na citostatike različitih tipova stanica, može imati važnost u terapiji tumora i genskoj terapiji tumora. Integrin α_3 je već duže vrijeme meta za razvoj lijekova koji bi svojim vezanjem inhibirali njegovu funkciju. Osim toga integrin α_3 je internalizacijski receptor za adenovirus tip 5 koji se najčešće koristi u genskoj terapiji tumora (Majhen i Ambriović-Ristov, 2006). Prema tome moguće je da stanice s poveanim metastatskim potencijalom i/ili stanice koje su postale otporne na citostatike zbog poveanije ekspresije α_3 integrina se mogu inficirati manjim dozama adenovirusa nego normalne stanice. To također vrijedi i za onkolitičke adenoviruse koji se u zadnje vrijeme sve više istražuju (Majhen i sur., 2009).

6. Zaključci

Na temelju rezultata ovog rada zaključujemo:

1. Transficirali smo stanice ljudskog karcinoma ploštastog epitela jezika plazmidom koji sadrži gen za β podjedinicu integrina. Izdvojili smo stabilno transficirane klonove 2B3 i 2B1 na temelju sposobnosti rasta u prisutnosti genotoksicita i na temelju povećane ekspresije β integrina na staničnoj površini s obzirom na roditeljske Cal 27 stanice.
2. Povećana ekspresija β integrina u klonu 2B3 nije dovela do promjene ekspresije α integrina, međutim kod klona 2B1, koji pokazuje veću ekspresiju β integrina nego Cal 27 i klon 2B3, došlo je do smanjenja ekspresije α integrina. To je posljedica kompeticije transficirane podjedinice β sa α za dostupan α u stanici.
3. Transfektanti 2B3 i 2B1 sa povećanom ekspresijom β integrina ne pokazuju razliku u brzini rasta s obzirom na roditeljske Cal 27 stanice.
4. Transfektanti 2B3 i 2B1 sa povećanom ekspresijom β integrina pokazuju otpornost (povećano preživljenje) izlaganju cisplatinu, doksorubicinu i mitomicinu C u usporedbi s roditeljskim Cal 27 stanicama.
5. Rezultati ovog rada su pokazali da postoji sličan mehanizam otpornosti posredovan β integrinom u Cal 27 staničnom modelu, kao što je prethodno opisano u modelu ljudskih stanica karcinoma grkljana (HEp2) (Brozović i sur., 2008). Prema tome mjerenje ekspresije β integrina u stanicama karcinoma glave i vrata bi mogao biti važan pokazatelj otpornosti tumora na citostatike.

7. Literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Taylor & Francis Group.

Ambriovi Ristov A. (ur.) (2007): *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

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

Ambriovi Ristov A., Osmak M. (2006): Integrin-mediated drug resistance. *Curr. Signal Transd. Ther.* **1**: 227–237.

Baumann R.P., Hodnick W.F., Seow H.A., Belcourt M.F., Rockwell S., Sherman D.H., Sartorelli A.C. (2001): Reversal of Mitomycin C Resistance by Overexpression of Bioreductive Enzymes in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Research* **61**: 7770–7776

Boulikas T., Vougiouka M. (2004): Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs. *Oncol. Rep.* **11**: 559.

Brooks P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G., Cheresch D.A. (1994): Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**: 1157-1164.

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

Brassard D. L., Maxwell E., Malkowski M., Nagabhushan T. L., Kumar C.C., Armstrong L. (1999): Integrin $\alpha v \beta 3$ -Mediated Activation of Apoptosis. *Exp. Cell Res.* **251**: 33–45.

Dorr R., Von Hoff D. (1993): *Cancer Chemotherapy Handbook*. Appleton & Lange Norwalk, Connecticut.

Falkson C.I., Cohen G.L. (1998): Mitomycin C, Epirubicin and Cisplatin versus Mitomycin C Alone as Therapy for Carcinoma of Unknown Primary Origin. *Oncology* **55**:116-121.

Felding-Habermann B. (2003): Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **20**:203-213.

Gasparini G., Brooks P.C., Biganzoli E., Vermeulen P.B., Bonoldi E., Dirix L.Y., Ranieri G., Miceli R., Cheresch D.A. (1998): Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **4**(11): 2625-2634.

Gazet J.-C., Ford H.T., Gray R., McConkey C., Sutcliffe R., Quilliam J., Makinde V., Lowndes S., Coombes R.C. (2001): Estrogen-receptor-directed neoadjuvant therapy for breast cancer: Results of a randomised trial using formestane and methotrexate, mitozantrone and mitomycin C (MMM) chemotherapy. *Annals of Oncology* **12**(5): 685-691.

Gewirtz D.A. (1999): A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **57**:727-741.

Gladson C.L., Wilcox J.N., Sanders L., Gillespie G.Y., Cheresch D.A.(1995): Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *Journal of Cell Science* **108**:947-956

Haffty B.G., Son Y.H., Papac R., Sasaki C.T., Weissberg J.B., Fischer D., Rockwell S., Sartorelli A.C., Fischer J.J. (1997): Chemotherapy as an adjunct to radiation in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the Yale Mitomycin Randomized Trials. *J. Clin. Oncol.* **15**(1):268-276.

Huang R.-Y., Kowalski D., Minderman H., Gandhi N., Johnson E.S. (2007): Small Ubiquitin-Related Modifier Pathway Is a Major Determinant of Doxorubicin Cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* **67** (2):765-772..

Hynes R.O. (1987): Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**: 549-554.

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

Kozlova N.I., Morozovich G.E., Chubukina A.N., Berman A.E. (2001): Integrin alphavbeta3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells. *Oncogene* **20**: 4710-4717.

- Kozlova N.I., Morozevich G.E., Shtil A.A., Berman A.E. (2004): Multidrug-resistant tumor cells with decreased malignancy: a role for integrin $\alpha v \beta 3$. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 1173-1177.
- Liapis H., Adler L.M., Wick M.R., Rader J.S. (1997): Expression of $\alpha v \beta 3$ integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum. Pathol.* **28**(4): 443-449.
- Los M., Gibson S.B. (2005): *Apoptotic Pathways as Targets for Novel Therapies in Cancer and Other Diseases*. Springer Science.
- Marshall J.F., Hart I.R. (1996): The role of αv -integrins in tumor progression and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **7**(3): 129-138.
- Majhen D., Ambriovi -Ristov A. (2006): Adenoviral vectors—How to use them in cancer gene therapy? *Virus Res.* **119**:121–133.
- Majhen D., Nemet J., Richardson J., Gabrilovac J., Hajsig M., Osmak M, Eloit M., Ambriovi -Ristov A. (2009): Differential role of $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins in internalization and transduction efficacies of wild type and RGD4C fiber-modified adenoviruses. *Virus Res.* **139**: 64–73.
- Mandic Havelka A., Berndtsson M., Olofsson M., Shoshan M.C., Linder S. (2007): Mechanisms of Action of DNA-Damaging Anticancer Drugs in Treatment of Carcinomas: Is Acute Apoptosis an “Off-Target” Effect? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **7**(10): 1035-1039.
- Mao Y., Varoglu M., Sherman D.H. (1999): Molecular characterization and analysis of the biosynthetic cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chemistry & Biology* **6**: 251-263.
- Matter M.L., Ruoslahti E. (2001): A signaling pathway from the $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription. *J. Biol. Chem.* **276**:27757-27763.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004): Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **56**(2): 185–229.
- Miyajima A., Nakashima J., Yoshioka K., Tachibana M., Tazaki H., Murai M. (1997): Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br. J. Cancer* **76**: 206-210.

Montgomery A.M., Reisfeld R.A., Cheresch D.A. (1994): Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:8856-8860.

Osmak M. (1998): Molecular alterations induced in drug-resistant cells. *Radiol. Oncol.* **32**: 19-33.

Pizzo P.A., Poplack D.G. (2005): *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (Fifth edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Rudin C.M., Yang Z., Schumaker L.M., VanderWeele D.J., Newkirk K., Egorin M.J., Zuhowski E.G., Cullen K.J. (2003): Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance. *Cancer Res.* **63**: 312-318.

Shuhendler A.J., Cheung R.Y., Manias J., Connor A., Rauth A.M., Wu X.Y. (2009): A novel doxorubicin-mitomycin C co-encapsulated nanoparticle formulation exhibits anti-cancer synergy in multidrug resistant human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*

Siddik Z.H. (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**: 7265-7279.

Stavrovskaya A.A. (2000): Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)*, **65**(1): 95-106.

Tomasz M. (1995): Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry and Biology* **2**(9): 575-579.

Tomasz M., Palom Y. (1997): The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol. Therap.* **76**: 73-87.

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

Verma I. M., Weitzman M.D. (2005): *GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine*. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 711-738.

Warren A.J., Maccubbin A.E, and Joshua W. Hamilton J.W. (1998): Detection of Mitomycin C-DNA Adducts in Vivo by ³²P-Postlabeling: Time Course for Formation and Removal of Adducts and Biochemical Modulation. *Cancer Res.* **58**: 453-461.

Weiss R.B. (1992): The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Semin. Oncol.* **19**: 670-686.

8. Životopis

Rođena sam 15. studenog 1984. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila sam 1999. godine, a Prirodoslovno-matematičku gimnaziju 2003. godine. Iste sam godine upisala Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Tijekom školovanja sudjelovala sam 7 puta na natjecanjima iz područja matematike, biologije i engleskog jezika. Od 1991. godine do 2001. godine pohađala sam Školu za strane jezike Varšavska, u sklopu koje sam 2001. godine položila Certificate in Advanced English.

Do sada sam sudjelovala na dva znanstvena skupa:

Stojanović N., Brozović A., Majhen D., Osmak M., Ambriović-Ristov A. α_3 integrin mediated drug resistance in human tongue squamous cell carcinoma, Adenoviruses Basic biology to gene therapy, Zadar, 2008.

Stojanović N., Brozović A., Majhen D., Osmak M., Ambriović-Ristov A. α_3 integrinom posredovana otpornost na citostatike u ljudskim stanicama karcinoma pločastog epitela jezika, 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zagreb, 2008.