

Otpornost na citostatike posredovana integrinom αvβ3 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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:243470>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



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 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 Ambriović Ristov, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

OTPORNOST NA CITOSTATIKE POSREDOVANA INTEGRINOM $\alpha_3\beta_1$ U STANICAMA PLO ASTOG EPITELA JEZIKA

Nikolina Stojanovi

Laboratorij za genotoksi ne agense, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković,
Bijeni ka 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Otpornost posredovana integrinom temelji se na prihvatanju stanica za proteine izvanstani nog matriksa putem integrina. Na modelu ljudskih stanica karcinoma grkljana opisan je mehanizam otpornosti na citostatike posredovanju integrinom. U ovom radu istražili smo postoji li sličan mehanizam i u modelu ljudskih stanica karcinoma plo astog epitela jezika (Cal27). U tu svrhu Cal27 stanice transficirali smo plazmidom koji sadrži $\alpha_3\beta_1$ podjedinicu i izdvojili smo stabilne transfektante koji eksprimiraju povezanu količinu integrina u usporedbi s roditeljskim Cal27 stanicama. Kod jednog je stabilnog transfektanta ekspresija integrina bila povećana dok je ekspresija integrina ostala jednaka u usporedbi s roditeljskim Cal27 stanicama. Kod drugog transfektanta je došlo do povećanja ekspresije integrina i umjerenog smanjenja ekspresije integrina zbog kompeticije podjedinice za raspoložive podjedinice. Osjetljivost roditeljskih Cal27 i odabranih Cal27- $\alpha_3\beta_1$ integrin stabilnih transfektanata na citostatike određena je MTT testom. Pokazali smo da su oba Cal27 klena otporna na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C. Ovaj rad pokazuje da povećana ekspresija integrina može zaštititi stanice od djelovanja različitih citostatika. Prema tome mjereno ekspresije 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, $\alpha_3\beta_1$ integrin, otpornost, cisplatin, mitomicin C, doksorubicin, citostatici*

Voditelj: Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković

Ocjenitelji: Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković

Doc. dr. sc. Maja Matulić, Prirodoslovno-matematički fakultet

Doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Prirodoslovno-matematički fakultet

Doc. dr. sc. Dubravka Hranilović, Prirodoslovno-matematički fakultet

Rad prihvoren: 11.03.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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 v₃ 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 v₃ for available v₅ 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 citostatics. 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 Ambriović Ristov,

Reviewers: Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, senior research associate, Ruđer Bošković Institute
Doc. dr. sc. Maja Matulić,
Doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek,
Doc. dr. sc. Dubravka Hranilović,

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. Doktorubicin	4
1.3. Otpornost tumora na citostatike	5
1.4. Integrini	6
1.4.1. Integrin _{v3}	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 mjerjenje 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 preživljjenja stanica (MTT-test)	18
3.2.6. Statistička obrada podataka	19
 4. Rezultati	20
4.1. Izdvajanje klonova 2B3 i 2B1 sa povećanom ekspresijom β_3 integrina stabilnom transfekcijom Cal27 stanica plazmidom koji sadrži gen za 3 podjedinicu integrina	20
4.2. Povećana ekspresija β_3 integrina utječe na ekspresiju β_5 integrina	21
4.3. Stabilni transfektanti 2B3 i 2B1 rastu jednako brzo kao i stanice Cal27	22
4.4. Povećana ekspresija β_3 integrina u klonovima 2B3 i 2B1 osigurava otpornost (bolje preživljjenje) na cisplatinu, dokosorubicin i mitomicin C	23
 5. Rasprava	25
6. Zaključci	30
7. Literatura	31
8. Životopis	35

Zahvalujem 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.

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

Zahvalujem doc. dr. sc. Maji Matuli , doc. dr. sc. Željki Vidakovi -Cifrek i doc. dr. sc. Dubravki Hranilovi na pažljivom čitanju rukopisa i korisnim savjetima.

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

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

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

Nikolina Stojanovi

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 udnjim tumorom i potpuno izlje enje se može posti i kirurškim uklanjanjem. Međutim, kada stanice steknu sposobnost prodiranja u druga tkiva, stvaraju i tako metastaze u udaljenim tkivima, tumor smatramo zlo udnjim. Što je tumor sposobniji metastazirati to ga je teže izlje 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 većina proliferacijske aktivnosti u ljudskom organizmu odvija upravo u epitelnom tkivu, no vjerojatno i zato što je epitelno tkivo najčešće izloženo štetnom fizičkom i kemijskom utjecaju okoline (Alberts i sur., 2002).

1.1.1. Lije enje tumora

Tri su standardne metode lijeenja tumora; kirurško uklanjanje, zrajenje i kemoterapija. Uspješnost svake od metoda ovisi o smještaju tumora u organizmu, tipu tumora i stadiju njegovog razvijanja.

Kemoterapija je lijeenje tumora kemijskim spojevima. Ti se lijekovi esteriziraju nazivaju citostatici, citotoksični, antitumorski ili antineoplastični lijekovi. Citostatici uništavaju tumorske stanice kako i njihov rast i diobu. Ti lijekovi ne djeluju selektivno, dakle isključivo na stanice tumora, nego mogu oštetići i zdrave stanice u tijelu, narođeno one koje se brzo dijele: krvne stanice, sluznicu probavnoga trakta, spolne stanice, folikul kose. Upravo oštete enje zdravih stanica uzrokuje popratne neželjene pojave kemoterapije.

Prema mehanizmu djelovanja citostatici najčešće ometaju sintezu i/ili funkciju makromolekula (DNA, RNA, proteina) ili funkciju stanicanih organeli. Kao posljedica ovih u inaka dolazi do smrti stanica. Budući da citostatici djeluju na različite načine, radi boljeg

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

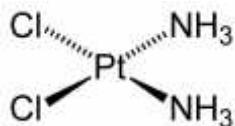
Idealni protutumorski lijekovi koji bi uništili samo tumorske stanice bez štetnog djelovanja na normalna tkiva za sada ne postoje. Zato se prouavaju dodatne metode lijeenja tumora kao što su imunoterapija i genska terapija (Pizzo i Poplack, 2005). Cilj imunoterapije je identifikacija antigena specifičnih za tumor kako bi se pojašnjao imunološkog odgovora na te antogene poboljšao i imunološki odgovor protiv tumora. U zadnje vrijeme pojavili su se lijekovi temeljeni na monoklonskim protutijelima usmjereni protiv takvih proteina. Protutijelo se specifično 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 lijeenja genskom terapijom je relativno jednostavan: unijeti u ciljnu stanicu genski materijal koji će ili dovesti do izljeenja ili će usporiti razvoj bolesti (Verma i Weitzman, 2005). Iako se dvije trećine istraživanja u genskoj terapiji odnosi upravo na gensku terapiju tumora (Majhen i Ambriović - Ristov, 2006) genska terapija još uvek nije postigla zadovoljavajuću inkovitost i nije, sa iznimkom dva odobrena lijeka temeljena na adenovirusu tip 5 u Kini, rutinski postupak. Glavni problem svih pristupa terapiji tumora još je uvek nedovoljna selektivnost djelovanja na tumorske stanice, kao i odabir prave ciljne molekule ključne 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 citotoksimnim učinkom koji djeluje kao bivalentan elektrofil, stvarajući unutarlanjene i međuljane križne veze u DNA, koje inhibiraju replikaciju DNA i transkripciju, dovodeći 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

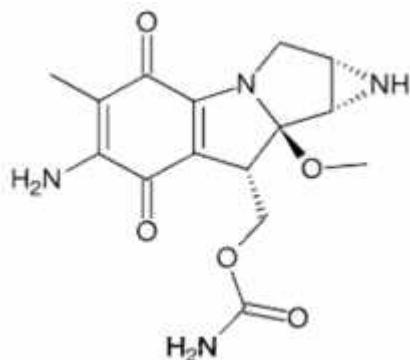
Manje od 10% cisplatine se veže na DNA (Fuentes i sur., 2003), a ostatak djeluje na ostale molekule u stanici. Unato tome što se dugo smatralo da je DNA glavna ciljna molekula za cisplatinu, noviji podaci su pokazali da cisplatin aktivira kaspaze u stanicama koje nemaju jezgru (citoplastima). Apoptoza u ovim stanicama neovisna je o ošte enju DNA i povezana je s brzom indukcijom reaktivnih oksidativnih radikala i pove anjem koli ine Ca²⁺. Tako er je pokazano da cisplatin može izazvati i nakupljanje Fas/CD95 u membrani stanice (Mandic Havelka i sur., 2007).

Cisplatin se koristi intravenozno za lije enje raznih oblika tumora glave i vrata te karcinoma plu a, jajnika, testisa, dojki i mokra nog mjejhura (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 kemijске i enzimske redukcije kako bi tvorio kovalentne adukte sa DNA, prvenstveno na N² poziciji gvanina, tvore i monofunkcionalno i bifunkcionalno aktivirane G-MMC monoaddukte i G-MMC-G unutarlan ane i me ulan ane križne veze na CpG i GpG mjestima u DNA. Mitomicin C djeluje i stvaranjem reaktivnih oskidativnih radikala u stanici (Warren i sur., 1998; Shuhendler i sur., 2009).

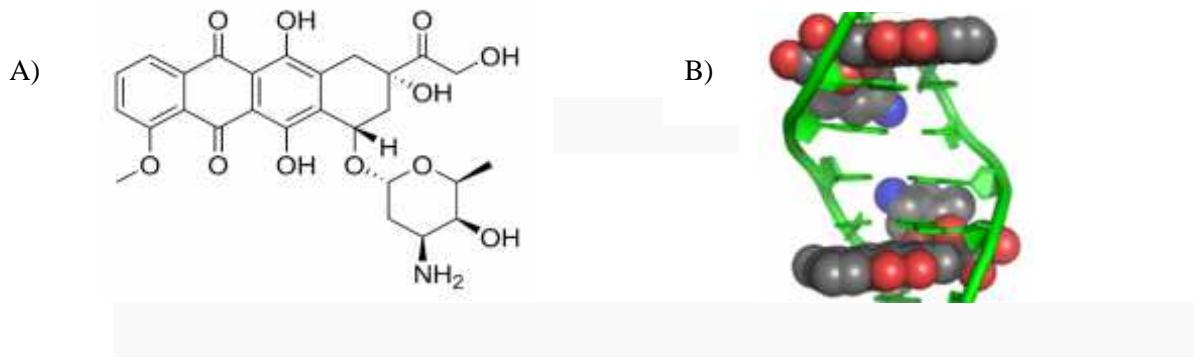
Mitomicin C se primjenjuje intravenozno za lije enje adenokarcinoma želuca, guštera e, debelog crijeva i dojke (Dorr i Von Hoff, 1993). Osim toga koristi se i za lije enje tumora glave i vrata u kombinaciji sa radioterapijom (Haffty i sur., 1997).



Slika 2. Struktura mitomicina C

1.2.3. Dokсорубицин

Dokсорубицин (Slika 3) је антрациклинички антибиотик, сродник природног производа бактерија *Streptomyces peucetius*, дауномицина. Овај цитостатик изолиран је из врсте *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (Minotti i sur., 2004).



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

Dokсорубицин је спој који ствара реактивне оксидативне радикале који затим оштечују разлиичите структуре у станицима. Најважније је djelovanje на мембрane (djeluje на метаболизам Ca^{2+}) и нуклеинске кисeline. Dokсорубицин се угради у једну базу ДНК и инхибира репликацију те који и ензим топоизомеразу II, односно њену функцију повезивања посредованог молекулом ДНК, а то узрокује накупљање једноланских и дводланских ломова на ДНК и апоптоzu (Minotti i sur., 2004). Dokсорубицин у пацијената показује токсичност за срце и мишићи (кардиотоксичност), а која се повезује са индукцијом nastanka реактивних

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

Doksorubicin se primjenjuje intravenozno, u lije enju raznih oblika tumora dojke, leukemija, limfoma te karcinoma štitnja e, tumora plu a, jajnika i mokra nog mjehura (Weiss 1992; Minotti i sur., 2004; Shuhendler i sur., 2009).

1.3. Otpornost tumora na citostatike

Citostatici djeluju neselektivno što zna i da osim tumorskih stanica ošte uju i okolno, zdravo tkivo. Nažalost to nije jedini problem u lije enju tumora citostaticima. Glavni problem uspješnom lije enju je razvoj otpornosti tumorskih stanica na citostatike. Otpornost može biti primarna, tj. tumorske stanice od po etka 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. Naj eš e 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 pove ane aktivnosti transportnih proteina koji izbacuju citostatike iz stanice (npr. P-glikoprotein). Osim toga otpornost može izazvati pove ana inaktivacija citostatika kao posljedica pove ane koncentracije i/ili aktivnosti zaštitnih molekula (glutation, glutation transferaza ili glutation peroksidaza) kao i pove ana sposobnost popravka i/ili tolerancija DNA ošte enja. Jedan od najvažnijih mehanizama razvoja otpornosti tumorskih stanica na citostatike je inhibicija apoptoze. Otpornost je esto rezultat istovremenog djelovanja više ovakvih mehanizama (Stavrovskaya, 2000).

Nedavno je otkriven novi mehanizam otpornosti tumorskih stanica na citostatike koji je posljedica interakcije stanica sa izvanstani nim 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 razli itih tipova stanica na razli ite citotoksi ne agense. Budu i da su integrini vrlo važne adhezivne molekule razvilo se posebno podru je istraživanja otpornosti na citostatike posredovano integrinima (Ambriovi -Ristov i Osmak, 2006).

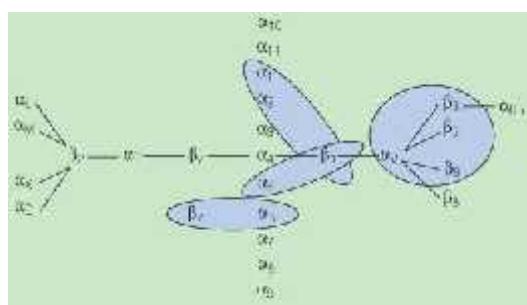
Naini kako stanica razvija otpornost na cisplatinu uklju uju inhibiciju unošenja u stanicu, poveano izbacivanje iz stanica i poveanje sinteze stani nih tiola (npr. glutation). Osim toga stanica može razviti otpornost na cisplatinu uspješnijim popravkom DNA, poveanim tolerancijom na preostala ošte enja DNA te inhibicijom apoptoze (Siddik, 2003).

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

Otpornost na doksorubicin mogu a je putem nekoliko mehanizama kao što su prekomjerna ekspresija P glikoproteina, poveana detoksifikacija glutation transferazom i glutation peroskidazom, poveani popravak ošte enja molekule DNA te promjena ekspresije topoizomeraze II (Huang i sur., 2007).

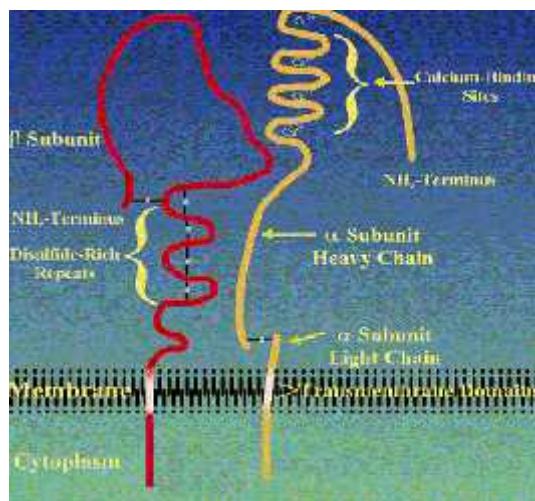
1.4. Integrini

Integrini su adhezijske molekule na površini stanice koje se vežu na proteine izvanstani nog matriksa, ali i na proteine na drugim stanicama. Vezanjem poti u niz signala koji reguliraju mnoge procese u stanci kao što su rast, dioba, diferencijacija, pokretljivost i preživljjenje. Integrini također prepoznaju i neke otopljene proteine plazme, neke virusne 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 podjedinice je još uglavnom nepoznata, iako se smatra da igra ulogu u stabilizaciji smatanja proteina. Podjedinica α 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 pronađenih 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.



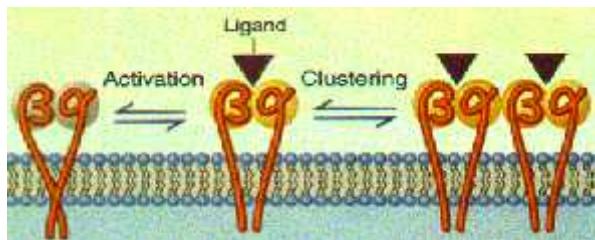
Slika 5. Prikaz osnovne strukture integrina.

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 sastavljenu 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 zna i da su citoplazmatski dijelovi razdvojeni i integrin ima jaki finitet za ligand (Gilcrease, 2006).



Slika 6. Prikaz nakupljanja i aktivacije integrina na površini stanice

1.4.1. Integrin $\alpha_v \beta_3$

Ilan obitelji integrina $\alpha_v \beta_3$ potiče signale preživljivanja bitne za angiogenezu, zacjeljivanje rana, osteoporozu i metastazu tumora (Brassard i sur., 1999). Za razliku od ostatka lana integrinske obitelji, $\alpha_v \beta_3$ integrin prepozna i veže se na puno proteina izvanstanih 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 $\alpha_v \beta_3$ pronađena je u invazivnim stanicama tumora jajnika u usporedbi sa tumorima niskog malignog potencijala (Liapis i sur., 1997). Povećanje ekspresije integrina $\alpha_v \beta_3$ 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 laboratorijskih istraživanja, 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 preživljavanje (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 preživljavanje stanica.

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

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

- NaCl, EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina), KCl, Na₂HPO₄ x 7 H₂O, KH₂PO₄, MgCl₂, Dimetil-sulfoksid (DMSO) (Kemika, Hrvatska)
- Tris-HCl (Serva, Njema ka)
- Lipofectamine (Invitrogen, SAD)
- Cisplatina , mitomicin C i dokosorubicin (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 (diH₂O)

3.1.2. Ostali materijal i pomagala

- Petrijeve zdjelice za uzgoj kultura stanica promjera 100 mm (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Plo ice za uzgoj kulture stanica s 96 bunari a (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Ampule za smrzavanje stanica (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Staklene pipete (Superior, Njema ka)
- Mikropipete (Eppendorf, Njema ka)
- Nastavci za mikropipete (Eppendorf, Njema ka)
- Mikropruvete (Eppendorf, Njema ka)
- Plasti ne epruvete od 15 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Plasti ne epruvete od 50 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Filter papir
- Propipeta
- Filter veli ina pora 0,22 μm
- Spremnik ispunjen teku im dušikom

3.1.3. Stanice

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

3.1.4. Plazmidi i bakterije

- Plazmid pcDNA 3 koji eksprimira 3 podjedinicu integrina je dobiven ljubaznoš u E.H. Danena (Amsterdam, The Netherlands). Plazmid je dobiven ugradnjom gena za podjedinicu 3 pod CMV promotor (engl. *human cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer*) plazmida pcDNA31.
- Bakterijske stanice (DH5⁺, Invitrogen, SAD)

3.1.5. Kompleti

- Komplet za lipofekciju *Lipofectamine* (Invitrogen, SAD)
- Komplet "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen, Njema ka)

3.1.6. Protutijela

- Mišja monoklonska protutijela usmjereni protiv α_3 integrina (23C6, Pharmingen, SAD) 0,1 mg/mL
- Mišja monoklonska protutijela usmjereni protiv α_5 integrina (P1F6, Chemicon, SAD) 1 mg/mL
- Mišja IgG1 protutijela (Sigma, Njema ka) 0,5 mg/mL
- Ze ja protutijela usmjereni protiv mišjih imunoglobulina obilježena fikoeritrinom (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 veli ine pora 0,22 μm .
- LB teku a hranjiva podloga: 5 g ekstrakt kvasca; 10 g bakto tripton; 10 g NaCl. Navedeni sastojci se otope u di H_2O , nadopuni se s di H_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 agar. Navedeni sastojci se otope u di H_2O , nadopuniti se s di H_2O do 1 L i podesi se pH na 7,0. Sterilizira se autoklaviranjem.
- Ampicilin (100 mg/mL). Otapa se u sterilnoj di H_2O i uva se pri -20°C.
- Teku a 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 (kona na

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

- Podloga za zamrzavanje : 450 µL DMEM; 450 µL FBS; 100 µL 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 veliine pora 0,22 µm.
- 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 uva u tamnoj boci pri 4°C.
- Cisplatina (500 µg/mL) otapa se u vodi, uva se pri -20°C.
- Doksurubicin (2,2 mg/mL) otapa se u vodi, uva se pri -20°C.
- Mitomicin C (10 mg/mL) otapa se u vodi, uva se pri -20°C.

3.1.8. Ure aji

- Svjetlosni mikroskop
- Ependorf centrifuga (Ependorf, Njemačka)
- Centrifuga za stanice (Heraeus, Njemačka)
- Broja stanica
- Tresilica (Vibromix 301EVT, Tehnica, Slovenija)
- Spektrofotometar za mikrotitarske ploice StatFax 2100 (Awareness Technology INC, SAD)
- Prototni citometar (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 priru niku "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriovi -Ristov i sur., 2007).

3.2.1. Izdvajanje plazmida i mjerjenje 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 koli ina odmrznutih bakterija mikrobiološkom ušicom razmazuje po površini Petrijeve zdjelice napunjene krutom LB hranjivom podlogom sa ampicilinom (100 µg/mL). Petrijeva zdjelica se okreće naopako (tako da dno zdjelice s agarom bude okrenuto prema gore) ime se sprjeava nakupljanje kondenzata na površini hranjive podloge) i inkubira preko no i pri 37°C. Jedna izrasla kolonija (dobro odvojena od drugih) se prenosi u 5 mL sterilne LB tekuće hranjive podloge s ampicilinom (100 µg/mL) te se inkubira preko no i u tresilici pri 37°C.

Za izdvajanje i pročišćavanje plazmidne DNA iz bakterija korišten je komplet reagencija *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 jednak volumen diH₂O. Kontrolnom kivetom namještamo vrijednost oitanja spektrofotometrom pri 260 nm na nulu. Zatim mjerimo apsorbanciju uzorka. Isti postupak ponavljamo i pri valnoj duljini 280 nm. Mjerjenje apsorbancije pri 260 nm omogućuje određivanje koncentracije DNA. Apsorbancija 1 odgovara približno 50 µg/mL dvokratne DNA. Omjer apsorbancija pri 260 i 280 nm ukazuje na isto u izdvojene DNA.

3.2.2. Uzgoj stanica u kulturi

S obzirom da su Cal 27 stanice adherentne, tj. rastu prihvataju 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 počnu umirati zbog loših uvjeta. Prilikom presaivanja stanice se odvajaju od hranjive podloge dodatkom proteolitičkog 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 uranju se (odmah nakon vanjske 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 presušuju.

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 uvanje, pohranjuju u spremnik sa tekućim dušikom.

3.2.2.3. Izrada krivulje rasta

Stanice su naseljene u plastične icu sa 24 bunari a (5×10^4 stanica/bunari) 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 (pomoć u liposoma). U ovom radu koristili smo komercijalno dostupan komplet za transfekciju liposomima *Lipofectamine*. Stotine Cal 27 nasele su u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm (2×10^6 stanica/mL). Plazmidna DNA (ukupno 28 µg) otopljena je u mikropruveti 1 u 526 µL Opti MEM-a. U mikropruveti 2 pomiješano je 60 µL Lipofectamina sa 600 µL Opti MEM-a. Sadržaj dviju mikropruveta 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 ugrađen transficirani plazmid, plazmidni vektor sa odabranim genom mora sadržavati i gen za otpornost na neki antibiotik. Uzgojem stanica u prisutnosti tog antibiotika izrastaju 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 pcDNA 3 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 razdjeluju u Petrijeve zdjelice promjera 3,5 cm s tim da je ukupna površina na koju se stanice nasele užu 20 puta veća od potrebne 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). Tekući a hranjiva podloga s genetinom 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 izdvajaju ne bi pomiješale stanice dviju različitih kolonija). Pojedinačne kolonije (klonovi stanica) izdvojene su struganjem sterilnim plastičnim nastavkom za mikropipetu i prenesene u bunariće ploće sa 96 bunarića u koje je prethodno dodano 200 µL hranjive podloge DMEM-FBS sa genetinom. Rast tako izdvojenih klonova prati se svaki dan do trenutka kada stanice ispunju bunariće. Tada se tripsinom odvajaju od podloge i prenose u ploće sa 24 bunarića, zatim ploće sa 6 bunarića (sve veća površina za rast), sve dok se ne dostigne dovoljan broj stanica za bočicu površine 25 cm² iz koje se, nakon analize ekspresije, može smrznuti prva ampula pojedinačnog klonova. Cijelo vrijeme klonovi se uzgajaju u DMEM-FBS uz dodatak genetina.

3.2.4. Proto na citometrija

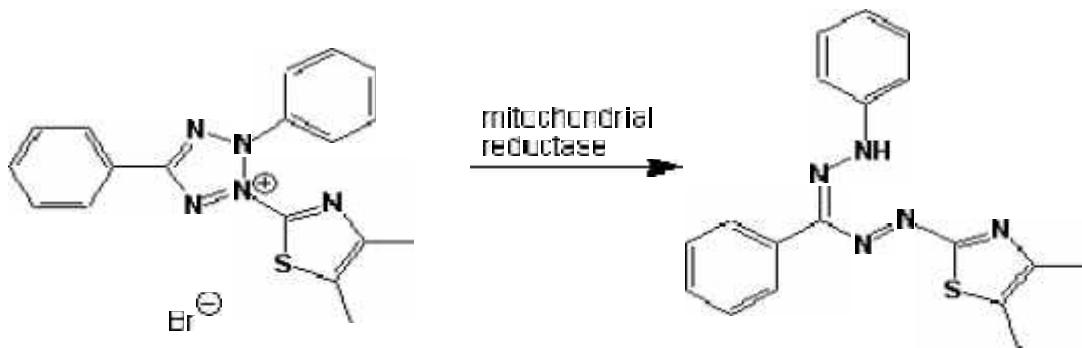
Proto na citometrija (engl. *flow cytometry*) je metoda koja mjeri i analizira različite proteine u stanici ako oni sami fluorescenciraju ili ih se prethodno obilježi fluorescencijskom bojom. Omogućuju istovremenu multiparametarsku analizu pojedinačne stanice ili celica koje prolaze pored optičkih i/ili elektroničkih detektora, u tekućini, pomoću snopa laserske svjetlosti. Obilježavanje stanica nih 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 prepozna je protutijelo 1.

Metoda neizravne proto na citometrije korištena je za određivanje ekspresije v₃ i v₅ integrina na površini Cal 27 stanica i odabir stabilnih transfektanata. Stanice su uzgajane kao jednoslojna kultura do 80% popunjenoštve 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.

Metod utim na temelju iskustava s protutijelima protiv v_3 i v_5 (Andreja Ambriović 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 prototom citometru. Broj stanica određen je brojanjem automatskim brojačem 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 μL PBS-a i dodaju se primarna protutijela (mišja monoklonska protutijela usmjerena protiv v_3 integrina (5 $\mu\text{L}/\text{uzorku}$) i protiv v_5 integrina (0,5 $\mu\text{L}/\text{uzorku}$). U kontrolne uzorke za svaku ispitivanu stanicu liniju dodavano je protutijelo istog izotipa kao i ono kojim se mjeri ekspresija nekog proteina, tzv. izotipsko protutijelo. Za kontrolne uzorke za mjerjenje sa oba protutijela protiv v_3 i v_5 integrina korišten je mišji IgG (2,5 $\mu\text{L}/\text{uzorku}$). Količina svih korištenih protutijela prethodno je iskustveno određena (Andreja Ambriović Ristov, osobno priop enje). Tijekom inkubacije od 60 minuta pri 4°C, uzorke treba par puta promiješati laganim udaranjem u stijenu mikropruvete. Stanice su zatim isprane hladnim PBS-om, na način da se u svaki uzorak dodaje 450 μL hladnog PBS-a, promiješa na vibracijskoj miješalici i centrifugira pri 1000 x g tijekom 4 minute. Nakon drugog ispiranja stanice se resuspendiraju u 50 μL PBS-a i dodaju se sekundarna protutijela (protutijela protiv mišjih protutijela obilježena s fikoeritinom). Količina ovog protutijela takođe je prethodno iskustveno određena (2,5 μL po uzorku; Andreja Ambriović Ristov, osobno priop enje). Nakon inkubacije tijekom 25 minuta, pri 4°C u mraku, stanice se ponovno ispiru tri puta na prethodno opisani način. Nakon zadnjeg ispiranja stanice se resuspendiraju u 350 μL PBS-1% BSA i analiziraju prototom citometrom.

3.2.5. Određivanje preživljjenja stanica (MTT-test)

MTT-test je kolorimetrijska metoda koja mjeri preživljjenje 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 ljubiaste 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 preživljjenju stanica. Ovom metodom odre uje se citotoksi nost spojeva.

Stanice su nasa ene u plo icu sa 96 bunari a ($3,7 \times 10^3$ stanica po bunari u). Drugog dana dodavane su razli ite koncentracije citostatika u ukupnom volumenu od $20 \mu\text{L}/\text{bunari}$ u. Za svaku koncentraciju istovremeno su ra ena 4 paralelna uzorka (kvadriplikat).

Raspon kona nih koncentracija citostatika u bunari ima je bio:

cisplatina: $0,125 - 2 \mu\text{g/mL}$

doksorubicin: $0,04 - 4 \mu\text{g/mL}$

mitomicin C: $0,4 - 7,5 \mu\text{g/mL}$

Nakon 72 sata inkubacije sa stanica je uklonjena hranjiva podloga, a u svaki bunari je dodano $0,04 \text{ mL}$ mati ne 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 ($0,17 \text{ mL}$ po bunari u). Plo ica je mehani ki protresena da bi se kristali u potpunosti otoplili i da bi se dobila izjedna ena boja. Apsorbancija je mjerena pri 600 nm na spektrofotometrijskom ita u plo ica StatFax 2100.

Preživljjenje je izra unato prema formuli:

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

3.2.6. Statisti ka 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 α_3 integrina stabilnom transfekcijom Cal 27 stanica plazmidom koji sadrži gen za α_3 podjedinicu integrina

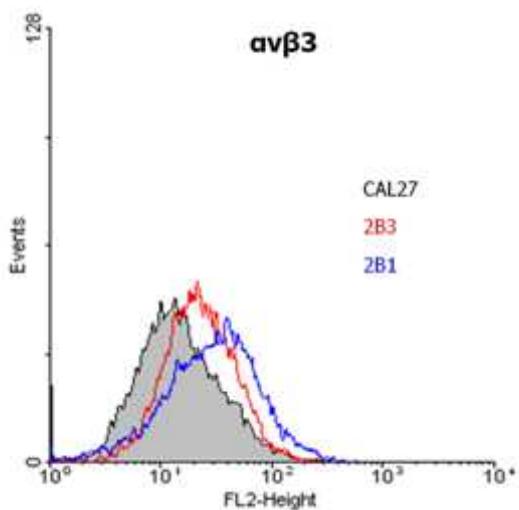
Nakon transfekcije Cal 27 stanica plazmidom koji sadrži gen za α_3 podjedinicu integrina, klonovi 2B1 i 2B3 koji eksprimiraju povećanu količinu α_3 integrina odabrani su na temelju sposobnosti rasta u prisutnosti 600 µg/mL geneticina (G418) i na temelju izmjerene ekspresije α_3 integrina.

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 α_3 podjedinicu integrina, dobiven je također ljubaznošću Maje Herak Bosnar (Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković). Budući da je osjetljivost ovog kontrolnog klena na cisplatinu, dokosorubicin i mitomicin C bila jednaka osjetljivosti roditeljskih Cal 27 stanica (rezultati nisu prikazani) u dalnjem radu svi pokusi izvedeni su samo sa Cal 27 stanicama. Vrlo je važno naglasiti da stanice stabilno transficirane kontrolnim plazmidom (plazmid bez gena koji 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 α_3 integrina kako bi na temelju toga bili sigurni da je primijeđeni u inak na otpornost uistinu posljedica ekspresije α_3 integrina.

Za određivanje ekspresije α_3 integrina na površini Cal 27 stanica korištena je metoda obilježavanja specifičnim protutijelima protiv α_3 integrina, čije vezanje se mjeri pomocno citometrijom. Na temelju mjerjenja ekspresije α_3 integrina odabrani su klonovi 2B3 i 2B1, od kojih klen 2B3 ima povećanu ekspresiju α_3 integrina u odnosu na roditeljsku stanicu liniju Cal 27. Izmjerena srednja vrijednost fluorescencije, MFI (engl. *mean fluorescence intensity*) za Cal 27 je 15,3, dok je za klen 2B3 izmjerena vrijednost 25,4. Klen 2B1 ima ekspresiju α_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 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



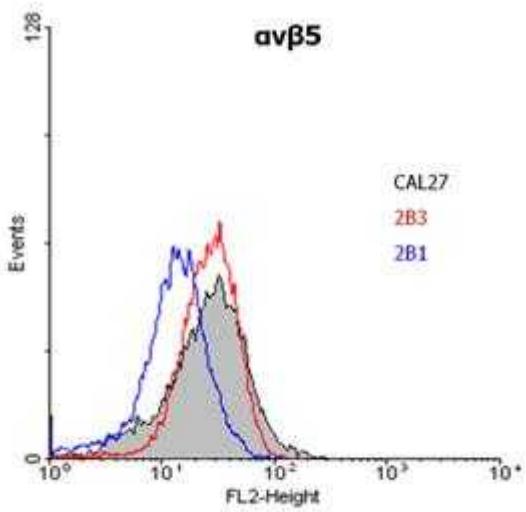
Slika 8 Ekspresija $\alpha_v\beta_3$ integrina na površini Cal 27 stanica i $\alpha_v\beta_3$ -stabilnih transfektanata 2B3 i 2B1.etrdeset i osam sati nakon nasa ivanja stanice su djelovanjem tripsina odvojene od podloge i ekspresija $\alpha_v\beta_3$ integrina je određena obilježavanjem specifičnim protutijelima i mjerjenjem prototitom 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. Pove ana ekspresija α_3 integrina utje e na ekspresiju α_5 integrina

Budu i da su stabilni transfektanti dobiveni transfekcijom plazmidom u kojemu se nalazi samo α_3 podjedinica integrina, za o ekivati je da e kod transfektanata sa jakom ekspresijom α_3 do i do smanjenja ekspresije α_5 zbog natjecanja α_3 i α_5 podjedinica integrina za raspoloživ u stanici. U transfektantu 2B3 koji pokazuje umjereno pove anu 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). Me utim u transfektantu 2B1 koji eksprimira ve u koli inu 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 zna ajno 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.

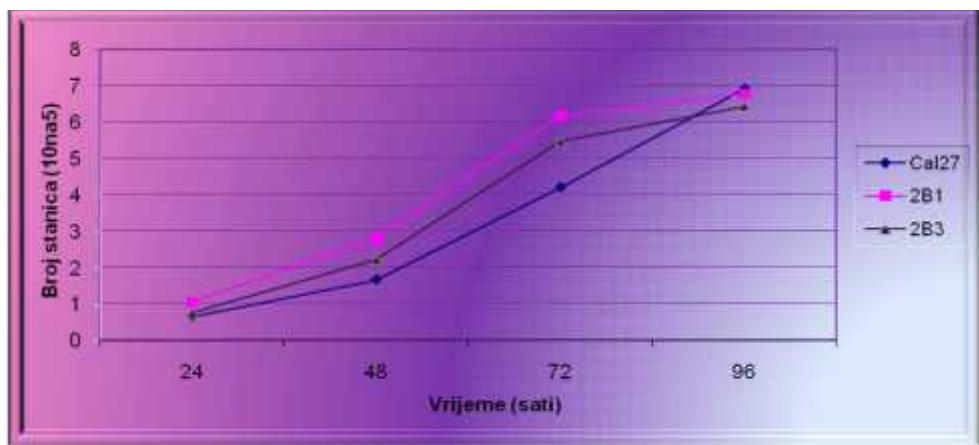
Stanice/ stabilni transfektanti	Srednja vrijednost fluorescencije
Cal 27	25,8
2B3	26,4
2B1	11,7



Slika 9. Ekspresija $\alpha v\beta 5$ integrina na površini Cal 27 stanica i $\alpha v 3$ -stabilnih transfektanata 2B3 i 2B1.etrdeset i osam sati nakon nasa ivanja stanice su djelovanjem tripsina odvojene od podloge i ekspresija $\alpha v\beta 5$ integrina je određena obilježavanjem specifičnim protutijelima i mjerjenjem prototipnim citometrom. Histogrami dobiveni u kontrolnim uzorcima u kojima se mjeri vezanje izotopskih protutijela se preklapaju te stoga nisu prikazani..Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa slijednim rezultatima.

4.3. Stabilni transfektanti 2B3 i 2B1 rastu jednakom brzom kao i stanice Cal 27

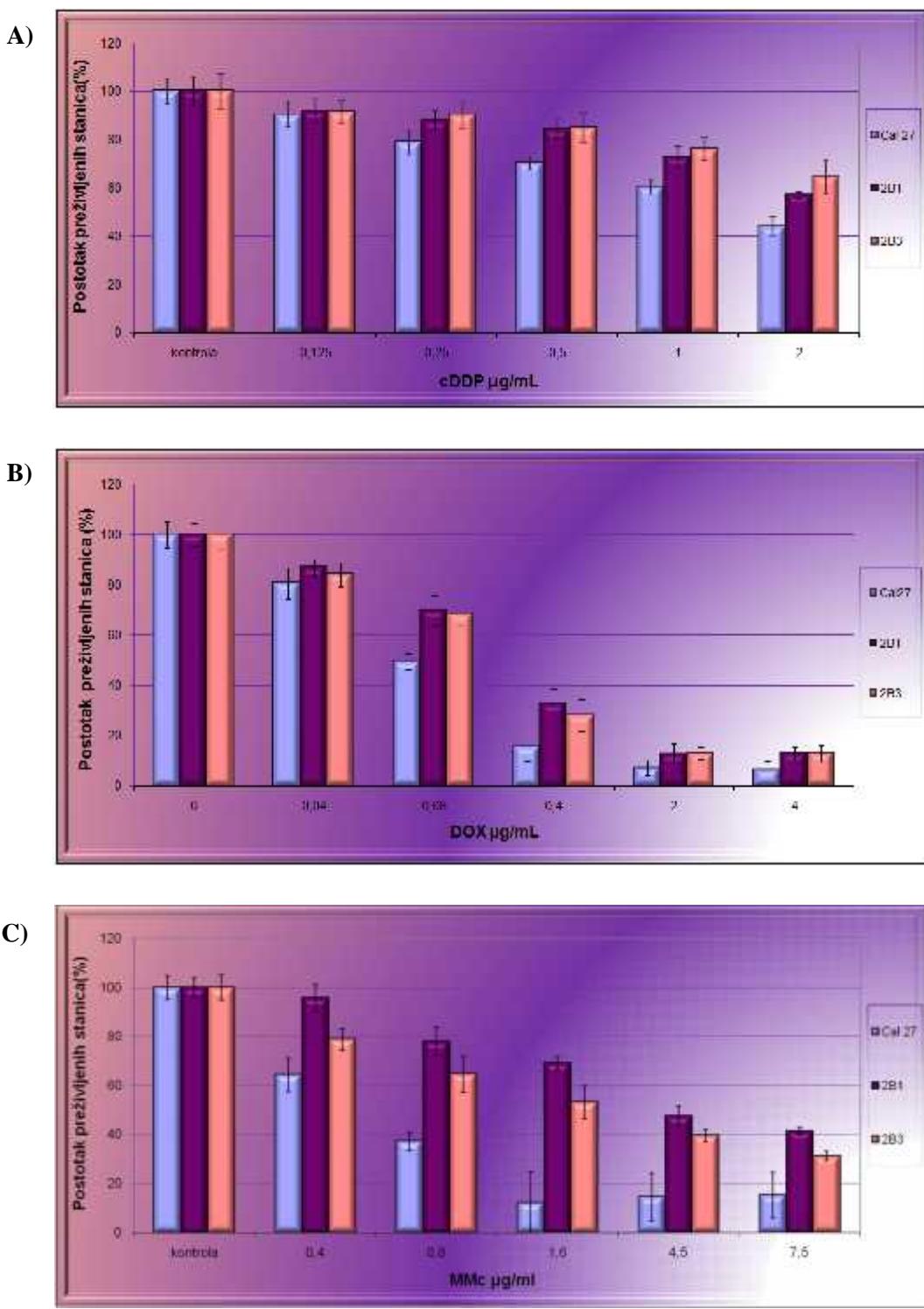
Cilj ovog istraživanja je odrediti osigurava li povećana ekspresija $\alpha v 3$ integrina stanicama Cal 27 otpornost na citostatike cisplatinu, dokosorubicin i mitomicin C. Za mjerjenje preživljjenja najčešće se koristi MTT metoda opisana u poglavlju Materijali i metode. Poznato je da brzina rasta stanica može utjecati na rezultate dobivene ovom metodom. Stoga je bilo potrebno provjeriti je li ekspresija $\alpha v 3$ integrina utjecala na brzinu rasta $\alpha v 3$ -transfektanata. Određivanjem broja stanica Cal 27 i $\alpha v 3$ -transfektanata 2B3 i 2B1, tijekom 4 dana, ustanovljeno je da se ne razlikuju po brzini rasta u kulturi (Slika 10).



Slika 10. Krivulja rasta Cal 27 stanica i stabilnih transfektanata 2B1 i 2B3. Stanice su nasa ene u plu icu 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 β -integrina u klonovima 2B3 i 2B1 osigurava otpornost (bolje preživljjenje) na cisplatinu, doktorubicin i mitomicin C

Stanice Cal 27 i dva stabilna β -transfektanta Cal 27 stanica 2B3 i 2B1 su 24 sata nakon nasa ivanja izlagani razli itim koncentracijama cisplatine, doktorubicina i mitomicina C te je 72 sata nakon toga mjereno preživljjenje metodom MTT. Na slici 11 prikazani su rezultati koji pokazuju da obje stani ne linije sa pove anom ekspresijom β -integrina pokazuju bolje preživljjenje nakon izlaganja citostaticima cisplatinu (Slika 11A), doktorubicinu (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) doksxorubicin (DOX) i C) mitomicin C. Stanice su nasa ene u plo icu s 96 bunari a, 24 sata nakon nasa ivanja dodavane su razli ite koncentracije citostatika. Sedamdeset i dva sata nakon, preživljenje stanica odre ivano je metodom MTT. Na slici je prikazan rezultat jednog od dva pokusa sa sli nim 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 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-Ristov i suradnici (2004) su pronašli povećanje ekspresije $\alpha_v \beta_3$ integrina u ljudskim stanicama karcinoma grkljana (HEp2) otpornim na cisplatinu te su pretpostavili da bi povećanje ekspresije ovog integrina moglo biti povezano 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, dokosorubicin i mitomicin C. Pronađen je i mehanizam koji dovodi do pojave otpornosti. Naime, povećanje ekspresije $\alpha_v \beta_3$ integrina dovodi do povećanja ukupne količine glutationa u stanci. Glutation ne djeluje na način da detoksificira protutumorske lijekove, npr. da detoksificira cisplatinu (to je dokazano jednakom platinacijom DNA u HEp2 stanicama i transfektantima sa povećanim ekspresijom $\alpha_v \beta_3$ integrina). Pokazano je da povećanje količine glutationa u stanci pomaže djelotvornijem uklanjanju reaktivnih oksidativnih radikala u stanci, koji se stvaraju vrlo brzo nakon izlaganja protutumorskog lijeka, i na taj način štiti stanicu od smrti (Brozović i sur., 2008).

Cilj ovog rada bio je pokazati postoji li sličan mehanizam otpornosti posredovanjem integrinom u drugom tipu stanica. Odabran je tumor iz skupine tumora glave i vrata, karcinom glavnog astog epitelialnog 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 eksprimiraju pove anu koli inu α_3 integrina. Mjerena je ekspresija α_3 i α_5 integrina u tim stani nim linijama da bi se provjerilo je li ekspresija α_3 smanjila ekspresiju α_5 integrina zbog kompeticije α_3 podjedinice za raspoložive α_5 podjedinice. Kod jednog je stabilnog transfektanta ekspresija α_3 integrina bila pove ana, dok je ekspresija α_5 integrina bila jednakna onoj u roditeljskim stanicama. Drugi α_3 -transfektant eksprimira još ve u koli inu α_3 integrina te je zbog toga došlo do blagog smanjenja ekspresije α_5 integrina. Kona no, odre ivanjem preživljjenja roditeljskih Cal 27 stanica i izdvojenih klonova Cal 27 koji eksprimiraju α_3 integrin (2B3 i 2B1) nakon izlaganja trima citostaticima pokazali smo pojavu otpornosti na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C.

Fenomen kompeticije transfekcijom unesene podjedinice α_3 integrina sa α_5 podjedinicom za raspoloživu α_5 podjedinicu primije en je i u α_3 integrin transfektantima izdvojenim iz HEp2 stanica. Naime iz HEp2 stanica izdvojeno je 6 stabilnih transfektanata koji eksprimiraju sve ve u i ve u koli inu α_3 integrina (Ambriovi -Ristov i sur., 2004). Pokazano je da tri transfektanta, u kojima porast ekspresije α_3 integrina nije utjecao ili je vrlo malo utjecao na ekspresiju α_5 integrina pokazuju otpornost na citostatike. Me utim tri transfektanta u kojima je primije eno snažno smanjenje α_5 zbog porasta α_3 integrina pokazuju jednaku osjetljivost na citostatike kao i roditeljska stani na linija (Brozovi i sur., 2008; Ambriovi -Ristov, usmeno priop enje). U tri α_3 integrin stabilna transfektanta izdvojena iz HEp2 stanica nije zabilježena korelacija izme u stupnja otpornosti stanica i ekspresije α_3 integrina. Mogu e objašnjenje je da može postojati nivo α_3 integrina potreban za otpornost ili otpornost posredovana α_3 integrinom može imati kinetiku koja vrlo brzo dovodi do zasi enja, što zna i da daljnje pove anje ekspresije α_3 integrina ne može pove ati otpornost (Brozovi i sur., 2008). I u stani nom sustavu Cal 27 stanica opisanom u ovom radu zapažen je sli an fenomen da klon stanica sa ve om ekspresijom α_3 integrina nema statisti ki ve u otpornost od klona s manjom ekspresijom α_3 integrina. U odabiru Cal 27- α_3 integrin stabilnih transfektanata nismo naišli na takav transfektant koji bi imao iznimno veliku ekspresiju α_3 integrina. To može biti razlog zašto nismo našli klon u kojem bi došlo do tako jakog smanjenja α_5 integrina da se poništi djelovanje pove ane ekspresije α_3 integrina na otpornost. U HEp2 stanicama dobivena je itava paleta stabilnih transfektanata i dalnjim istraživanjima je na klonu broj 19, koji ima najve u ekspresiju α_3 integrina i posljedi no najve e smanjenje ekspresije α_5 integrina, pokazano da je ak došlo do snažnog poticanja ekspresije α_5 integrina nepoznatim mehanizmom (Majhen i sur., 2009). No postoji još jedna bitna razlika izme u HEp2 i Cal 27 stanica. HEp2 stanice na svojoj

površini neamju ekspresiju α_3 integrina, pa je transfekcija lako mogla omoguiti izdvajanje klonova s rastuom ekspresijom α_3 integrina. Međutim Cal 27 stanice prirodno na svojoj površini eksprimiraju α_3 integrin te je za povezanje već postojeće ekspresije potrebno u stanicu transfekcijom ugraditi puno više plazmida da bi se konačno dobila veća ekspresija, što je naravno manje vjerojatan događaj.

Najvažniji je rezultat ovog rada da je na modelu ljudskih stanica karcinoma plodastog epitelia pokazano da ekspresija α_3 integrina osigurava otpornost na tri citostatika različitog mehanizma djelovanja: cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C. Ipak, postoji zajednički mehanizam djelovanja sva tri citostatika, a to je stvaranje reaktivnih oksidativnih radikala. Vrlo je vjerojatno da u ovim stanicama postoji isti mehanizam razvoja otpornosti podredovan glutationom kao i onaj opisan u radu Brozović i suradnici (2008). Najveća otpornost zabilježena je za mitomicin C i iznosi oko 2 puta, dok su vrijednosti preživljjenja za cisplatinu i doksorubicin, α_3 integrin eksprimiraju ih stanica, bile 1,5 puta veće 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 dokosorubicin) (Brozović i sur., 2008) primjeđuju se razlike. Uzrok tome može se potražiti u gore spomenutim argumentima da Cal 27 stanice, za razliku od HEp2 stanica, eksprimiraju α_3 integrin na svojoj površini. Stoga ove stanice uvijek imaju prisutan signal za preživljjenje kojeg okida α_3 integrin te povezanje ekspresije tog istog integrina ne utječe tako drastično na preživljjenje kao što je to kod HEp2 stanica. Drugim riječima, ako je naša pretpostavka da postoji određeni nivo ekspresije α_3 integrina koji dovodi do zasićenja (vidi prethodni odjeljak) to nije, onda se time može objasniti zašto povezanje ekspresije α_3 integrina u ovom sustavu izaziva tako male promjene.

Usprkos malim razlikama u otpornosti vrlo je važno da je u ovom radu potvrđeno postojanje otpornosti posredovane α_3 integrinom. Za α_3 integrin objavljeni su kontradiktorni rezultati o tome da li ima proapoptotsku ili antiapoptotsku ulogu u različitim tipovima stanica. Matter i Ruoslahti (2001) su opisali antiapoptotsku ulogu α_3 integrina u stanicama kineskog hraka. Slično je pokazano i za stanice melanoma da ekspresija α_3 integrina štiti stanice od apoptoze (Montgomery i sur., 1994). Integrin α_3 takođe štiti embrionalne stanice bubrega od apoptoze izazvane niskim koncentracijama seruma (Brassard et al., 1999). Signal potaknut integrinom α_3 potičao je preživljjenje u endotelnim stanicama (Brooks i sur., 1994). Konačno, Gladson i sur. (1995) su pokazali da je ekspresija vitronektinskih receptora α_3 i α_5 integrina osigurala preživljjenje ljudskim stanicama glioma nakon izlaganja topoektanu. Međutim, Kozlova i suradnici (2001) su pokazali da

integrin α_3 stvara stimulirajući signal za apoptozu u intestinalnim epitelnim stanicama karcinoma (Caco-2). Ove stanice su odlazile u apoptozu kada nisu primale signal od izvanstanih 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, podržavajući 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 (Brozović 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 povećanom ekspresijom α_3 integrina je posredovan glutationom koji sprječava nagli porast reaktivnih oksidativnih radikala u stanici nakon izlaganja citostaticima cisplatini, doksorubicinu i mitomicinu C. U ovom radu utvrđeno je samo sličan u inak povećane ekspresije α_3 integrina na preživljenje 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 povećanje ekspresije α_3 integrina. Naime, u CA3_{ST} stanicama otpornim na cisplatinu, dobivenim višestrukim izlaganjem HEp2 stanica cisplatini, pronađena je povećana ekspresija α_3 integrina (Ambriović-Ristov i sur., 2004). Iako je dokazano da povećana ekspresija α_3 integrina u HEp2 stanicama osigurava otpornost na citostatike (Brozović i sur., 2008), do danas još nije utvrđeno da 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 Ambriovic-Ristov, 2006). Prema tome moguće je da stanice s povećanim metastatskim potencijalom i/ili stanice koje su postale otporne na citostatike zbog povećanja ekspresije α_3 integrina se mogu inficirati manjim dozama adenovirusa nego normalne stanice. To takođe vrijedi i za onkolitičke adenoviruse koji se u zadnje vrijeme sve više istražuju (Majhen i sur., 2009).

6. Zaklju ci

Na temelju rezultata ovog rada zaklju ujemo:

1. Transficirali smo stanice ljudskog karcinoma plo astog epitela jezika plazmidom koji sadrži gen za β_3 podjedinicu intergrina. Izdvojili smo stabilno transficirane klonove 2B3 i 2B1 na temelju sposobnosti rasta u prisutnosti geneticina i na temelju pove ane ekspresije $\alpha_5\beta_3$ integrina na stani noj površini s obzirom na roditeljske Cal 27 stanice.
2. Pove ana ekspresija $\alpha_5\beta_3$ integrina u klonu 2B3 nije dovela do promjene ekspresije $\alpha_5\beta_5$ integrina, me utim kod klena 2B1, koji pokazuje ve u ekspresiju $\alpha_5\beta_3$ integrina nego Cal 27 i klon 2B3, došlo je do smanjenja ekspresije $\alpha_5\beta_5$ integrina. To je posljedica kompeticije transficirane podjedinice β_3 sa β_5 za dostupan α_5 u stanici.
3. Transfektanti 2B3 i 2B1 sa pove anom ekspresijom $\alpha_5\beta_3$ integrina ne pokazuju razliku u brzini rasta s obzirom na roditeljske Cal 27 stanice.
4. Transfektanti 2B3 i 2B1 sa pove anom ekspresijom $\alpha_5\beta_3$ integrina pokazuju otpornost (pove ano preživljjenje) izlaganju cisplatini, doksurubicinu i mitomicinu C u usporedbi s roditeljskim Cal 27 stanicama.
5. Rezultati ovog rada su pokazali da postoji sli an mehanizam otpornosti posredovan $\alpha_5\beta_3$ integrinom u Cal 27 stani nom modelu, kao što je prethodno opisano u modelu ljudskih stanica karcinoma grkljana (HEp2) (Brozovi i sur., 2008). Prema tome mjerjenje ekspresije $\alpha_5\beta_3$ 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.

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

Ambriović-Ristov A., Gabrilovac J., Šimbara-Zovko T., Osmak M. (2004): Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin alphavbeta3 and coxsackie adenovirus receptor. *Int. J. Cancer* **110**: 660–667.

Ambriović-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., Cheresh 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., Jakopčić S., Fritz G., Osmak M., Ambriović-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 avb3-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., Cheresh 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., Cheresh 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 alphavbeta3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 1173-1177.

Liapis H., Adler L.M., Wick M.R., Rader J.S. (1997): Expression of alpha(v)beta3 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 alpha v-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 α_3 and α_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 alpha5beta1 and alpha(v)beta3 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., Cheresh 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), **651**(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 poхаљala sam Školu za strane jezike Varšavsku, 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 ploštog epitelia jezika, 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zagreb, 2008.