Diferencijalna analiza proteoma staničnih linija karcinoma pločastih stanica jezika Cal27 i Cal27-2B1

Faraho, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:878567

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivan Faraho

Diferencijalna analiza proteoma staničnih linija karcinoma pločastih stanica jezika Cal27 i Cal27-2B1

Diplomski rad

Zagreb, 2015. godina

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za genotoksične agense i Laboratoriju za sistemsku biomedicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Andreje Ambriović-Ristov i doc. dr. sc. Maria Cindrića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Zahvaljujem se voditeljima, dr. sc. Andreji Ambriović-Ristov i doc. dr. sc. Mariju Cindriću na strpljenju, podršci i stručnom vodstvu tokom izrade diplomskog rada. Također se želim zahvaliti svim djelatnicima laboratorija, a posebno Nikolini Stojanović, Kristini Perici i Ani Butorac na pomoći u radu, te ugodnome druženju i produktivnoj atmosferi.

Naročito se zahvaljujem roditeljima, bez čije bezuvjetne potpore i poticaja ne bih došao na korak do ostvarenja snova.

I za kraj velika zahvala svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene proteklih nekoliko godina i učinili mi ovo razdoblje života nezaboravnim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

DIFERENCIJALNA ANALIZA PROTEOMA STANIČNIH LINIJA KARCINOMA PLOČASTIH STANICA JEZIKA ČOVJEKA Cal27 i Cal27-2B1

Ivan Faraho

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Integrin αvβ3 je transmembranski heterodimerni receptor koji posreduje u komunikaciji stanica s izvanstaničnim matriksom. Ima važnu ulogu u adheziji, proliferaciji, migraciji i preživljenju stanica, kao i otpornosti na citostatike. U radu je korištena stanična linija karcinoma pločastih stanica jezika čovjeka Cal27, te integrin β3-stabilno transficirani klon Cal27-2B1, koji *de novo* eksprimira integrin αvβ3 na površini, te pokazuje povećanu ekspresiju integrina αvβ5, smanjenu migraciju i povećanu otpornost na citostatike. Kako bi se dobio uvid u stanične mehanizme odgovorne za nastale promjene, diferencijalno su analizirani proteomi navedenih staničnih linija i identificirani su proteini kojima se razlikuju ekspresije u ovisnosti o ekspresiji integrina αvβ3.

(59 stranica, 13 slika, 5 tablica, 82 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: integrini, otpornost na citostatike, 2D-PAGE, spektrometrija masa, karcinom jezika

Voditelji: doc. dr. sc. Mario Cindrić

dr. sc. Andreja Ambriović-Ristov, znanstveni savjetnik

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

izv. prof. dr. sc. Vesna Benković

prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Rad prihvaćen: 18. veljače 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of biology Graduation Thesis

DIFFERENTIAL PROTEOME ANALYSIS OF Cal27 AND Cal27-2B1 HUMAN TONGUE SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINES

Ivan Faraho

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

αvβ3 integrin is a transmembrane heterodimeric receptor that mediate cell to cell and cell to ECM communication. It has an important role in adhesion, proliferation, migration and cell survival, as well as drug resistance. Focus of this research were human tongue squamous cell carcinoma cell line Cal27 and integrin β3 stably transfected clone Cal27-2B1, with *de novo* expression of integrin αvβ3, overexpression of integrin αvβ5, decreased cell migration and increased drug resistance. Proteomes of these cell lines were differentialy analized to get an insight into mechanisms responsible for observed changes, and proteins with different expressions depending on integrin αvβ3 expression were identified.

(59 pages, 13 figures, 5 tabels, 82 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: integrins, drug resistance, 2D-PAGE, mass spectrometry, tongue cancer

Supervisors: Asst. Prof. dr.sc. Mario Cindrić

dr.sc. Andreja Ambriović-Ristov

Reviewers: Assoc. Prof. dr. sc. Biljana Balen

Assoc. Prof. dr. sc. Vesna Benković

Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Thesis accepted: 18th February 2015

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Tumori 1

1.1.1. Što su tumori? 1

1.1.2. Klasifikacija tumora 3

1.1.3. Karcinomi pločastog epitela glave i vrata 4

1.1.3.1. Karcinom jezika 5

1.1.4. Liječenje tumora 5

1.1.5. Mehanizmi otpornosti tumora na kemoterapeutike 7

1.2. INTEGRINI 9

1.2.1. Okidanje signala posredovano integrinima 10

1.2.2. Kinaze vezane uz integrine 10

1.2.3. α_v obitelj integrina 13

1.2.3.1. Integrin $\alpha v\beta 3$ 14

1.2.3.2. Integrin $\alpha v\beta 5$ 15

1.3. INTEGRINI KAO CILJNE MOLEKULE ZA TERAPIJU TUMORA 15

1.4. PROTEOMSKA ANALIZA 17

1.4.1. Dvodimenzionalna gel – elektroforeza (2D-PAGE) 17

1.4.2. Spektrometrija masa 18

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 21

3. MATERIJALI I METODE 22

3.1. MATERIJALI 22

3.1.1. Stanične linije 22

3.1.2. Osnovne kemikalije 22

3.1.3. Puferi i otopine 23

3.1.4. Uređaji i programska podrška za obradu podataka 23

3.2. METODE 24

3.2.1. RAD SA STANICAMA 24

3.2.1.1. Uzgoj stanica u kulturi 24

3.2.1.2. MTT test 25

3.2.2. ANALIZA PROTEINA 25

3.2.2.1. Izolacija proteina 25

3.2.2.2. Određivanje koncentracije proteina 26

3.2.3. DVODIMENZIONALNA GEL ELEKTROFOREZA 26

3.2.3.1. Izoelektrično fokusiranje i ekvilibracija IPG traka 26

3.2.3.2. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza 27

3.2.3.3. Bojanje i analiza gelova 28

3.2.3.4. Izrezivanje i odbojavanje proteinskih mrlja 29

3.2.3.5. Digestija proteina u gelu i derivatizacija uzoraka 29

3.2.3.6. Pročišćavanje peptida tehnikom Zip-Tip 30

3.2.3.7. Spektrometrija masa i bioinformatička analiza 30

4. REZULTATI 32

4.1. Opis modela 32

4.2. Integrin β3-stabilno transficirani klon Cal27-2B1 pokazuje povećanu otpornost na cisplatinu 32

4.3. 2D-PAGE analiza pokazala je da postoje razlike u ekspresiji proteina u stanicama Cal27 i klonu Cal27-2B1 33

4.4. Proteini kojima je otkrivena razlika u ekspresiji identificirani su spektrometrijom masa 35

5. RASPRAVA 41

6. ZAKLJUČAK 52

7. LITERATURA 53

8. ŽIVOTOPIS 59

1. UVOD

1.1. Tumori

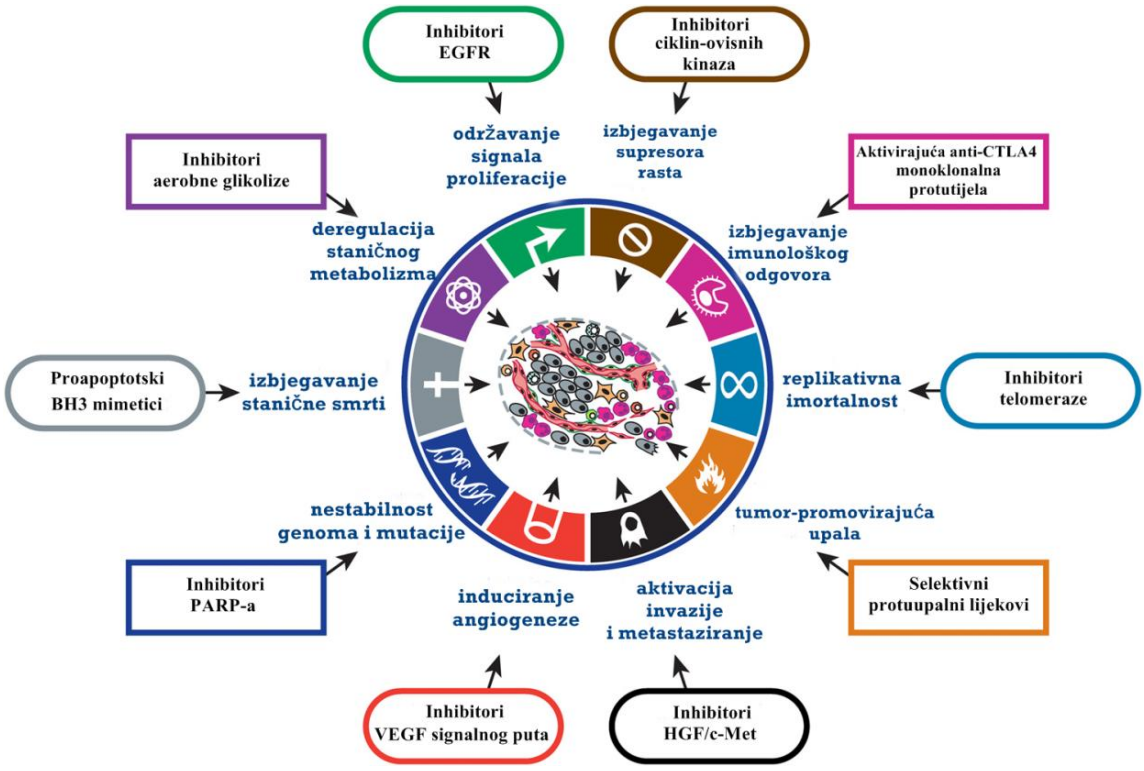
1.1.1. Što su tumori?

Tumori (lat. *tumor* – oteklina) su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije stanica. Nazivaju se još i neoplazmama (grč. *neos* – nov, *plasia* – rast, tj. novi rast). Za zloćudne tumore, koji mogu biti opasni za život, rabi se i izraz rak (lat. *cancer*). Tumore je teško definirati u jednoj sveobuhvatnoj rečenici, pa se i danas najviše rabi definicija koju je prije 70 godina predložio australsko–engleski patolog Rupert Willis: "Tumori su abnormalne nakupine tkiva, čiji rast nadmašuje i nije usklađen s rastom normalnih tkiva, a nastavlja rasti u prekomjernom obliku i nakon što je uklonjen uzrok te promjene." Ovoj definiciji možemo još dodati da je rast tumora nesvrhovit, autonoman, parazitski, nepravilan i neorganiziran (Damjanov i sur. 2011).

Tumor je bolest koja uključuje dinamične promjene u genomu, te su genomi tumorskih stanica promijenjeni na mnogim mjestima na više načina, od suptilnih točkastih mutacija do očiglednih kromosomskih rearanžmana. Tumorigeneza u ljudi je proces koji se očituje u genetičkim promjenama koje vode progresivnu transformaciju normalnih stanica u visoko maligne (Miyata i sur. 2013).

U posljednja dva desetljeća svjedočili smo ogromnom napretku u razumijevanju patogeneze tumora. Sada je jasno da tumor potječe iz kompleksnog mutagenog procesa kroz koji tumorske stanice poprimaju zajednički set svojstava, uključujući neograničeni potencijal proliferacije, samodostatnost u signalizaciji faktorima rasta i neosjetljivost na antiproliferativne i apoptotske signale. Nadalje, tumori evoluiraju kako bi dobili dodatnu potporu od stromalnih stanica koje ih okružuju, poticali stvaranje novih krvnih žile za opskrbu kisikom i nutrijentima, izbjegavali imunološki odgovor organizma, te u konačnici

metastazirali u udaljene organe (Slika 1). Mnoge od ovih fenotipskih značajki mogu nastati zbog preinaka genoma, uključujući mutacije koje vode novim funkcijama (engl. *gain-of-function*), amplifikacije i/ili prekomjernu ekspresiju ključnih onkogena s istodobnim mutacijama koje dovode do gubitka funkcije (engl. *loss-of-function*), delecijama i/ili epigenetičkim utišavanjem ključnih tumor-supresorskih gena (Luo i sur. 2009).



Slika 1. Osobine tumorskih stanica i terapijski pristupi za liječenje prema Hanahanu i Weinbergu. Lijekovi koji interferiraju s navedenim osobinama neophodnima za rast tumora su razvijeni, te su u kliničkim studijama, dok su neki i prihvaćeni za liječenje nekih vrsta tumora. Navedeni lijekovi su ilustrativni primjeri, postoji velik broj potencijalnih lijekova s drugim molekularnim metama i načinima djelovanja za navedene osobine. (Preuzeto i prilagođeno iz Hanahan i Weinberg, 2011)

Tumori se ne pojavljuju samo u čovjeka i viših sisavaca, već pogađaju gotovo sve višestanične organizme, uključujući biljke i životinje. Budući da tumor uključuje promjene u proliferaciji stanica, diferencijaciji i razvoju, razumijevanje procesa u podlozi nastanka bolesti može nam pomoći razumjeti osnovne mehanizme života (Knowles i Selby, 2006).

1.1.2. Klasifikacija tumora

Za kliničke i terapijske potrebe većina tumora može se svrstati u dvije skupine: dobroćudne i zloćudne.

Dobroćudni ili benigni tumori ne ugrožavaju bitno zdravlje i imaju povoljni klinički ishod i, ako se ne liječe, mogu djelovati pogubno i uzrokovati smrt bolesnika u kojeg su nastali. Takvi tumori rastu polagano, a rast im je ograničen na organ u kojem je tumor nastao. Rast im je ekspanzivan, pri čemu tumori pritišću okolno tkivo izazivajući vezivnu reakciju koja dovodi do stvaranja čahure. Benigni tumori su makroskopski, zbog toga, oštro ograničeni od okolnog tkiva i dobro opskrbljeni krvlju tako da u njima nema područja nekroze ili površinske ulceracije. Benigni tumori ostaju ograničeni na organ u kojemu su nastali. Mikroskopski, benigni tumori građeni su od dobro diferenciranih stanica, koje nalikuju na stanice normalnih tkiva ili organa u kojem je tumor nastao. Stanice benignog tumora imaju relativno male jezgre, pravilnog oblika. Kromatin je unutar jezgara ravnomjerno raspršen, nukleoidi nisu uočljivi, a mitoze su rijetkost (Damjanov i sur. 2011).

Zloćudni ili maligni tumori rastu mnogo brže od benignih tumora. Makroskopski su nepravilnih oblika i nedefiniranih rubova. Rast im je nekontroliran, pri čemu razaraju normalno tkivo organa u kojem je tumor nastao. Zloćudni se tumori šire u okolna tkiva, a mogu se krvlju ili limfom proširiti i u druge dijelove tijela. Takav način širenja naziva se metastaziranje. Mikroskopski su maligni tumori građeni od atipičnih stanica, koje često ne nalikuju na stanice tkiva ili organa iz kojih je tumor nastao. Jezgre su malignih tumorskih stanica pleomorfne, razlikuju se jedna od druge po obliku i veličini. Unutar jezgara kromatin je nepravilno raspoređen i tamnoplavo obojen hemalaunom. Omjer između jezgre i citoplazme povećan je u korist jezgre, a mitoze su brojne (Damjanov i sur. 2011).

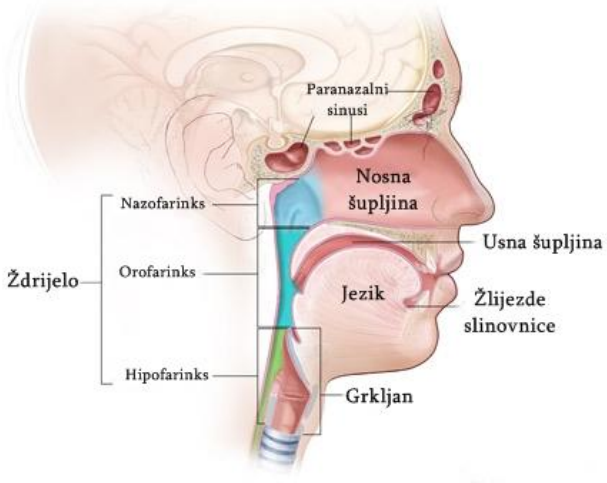
Maligni tumori se mogu podijeliti u nekoliko kategorija, od kojih su glavne:

- Karcinom – tumor koji potječe iz kože ili tkiva koje oblaže ili prekriva unutarnje organe (epitelno tkivo). Postoji nekoliko subtipova karcinoma, uključujući adenokarcinom, karcinom bazalnih stanica, karcinom pločastih stanica i karcinom prijelaznih stanica.
- Sarkom – tumor koji potječe od stanica kosti, hrskavice, masnog tkiva, mišića, krvnih žila ili nekog drugog potpornog ili vezivnog tkiva.

- Leukemija – tumor koji se razvija u koštanoj srži i uzrokuje stvaranje velikog broja abnormalnih krvnih stanica koje se zatim otpuštaju u krvotok.
- Limfomi i mijelomi – tumori koji potječu od stanica imunološkog sustava.
- Tumori središnjeg živčanog sustava – tumori koji nastaju od tkiva mozga i leđne moždine (http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer)

1.1.3. Karcinomi pločastog epitela glave i vrata

Karcinomi pločastog epitela glave i vrata (engl. *head and neck squamous cell carcinoma,* HNSCC) predstavljaju šesti najčešći tumor u svijetu, s više od pola milijuna novih dijagnosticiranih slučajeva godišnje. Zbog svoje kritične lokacije u gornjem dišnom i probavnom putu (Slika 2.), ovi tumori i njihovo liječenje značajno umanjuju kvalitetu života pacijenta, otežavajući disanje, gutanje, govor, te narušavajući i vanjski izgled pacijenta. Unatoč napretku u tehnikama vizualizacije tumora, kirurškim tehnikama i poboljšanjem liječenja s povećanom upotrebom kemoterapije i radioterapije, stopa preživljenja pacijenata koji boluju od ovih karcinoma se nije značajnije mijenjala u posljednja 3 desetljeća s 50% preživljenja u 5 godina nakon dijagnoze bolesti. Razumijevanje biologije tumora nudi mogućnost razvoja individualiziranog tretmana i razvijanja ciljanih terapija za povećanje stope izlječenja i smanjivanje smrtnosti (Loyo i sur. 2013).



Slika 2. Najčešća mjesta pojavljivanja karcinoma pločastog epitela glave i vrata. (Preuzeto i prilagođeno s www.cancer.gov)

1.1.3.1. Karcinom jezika

Najčešće mjesto pojavljivanje karcinoma u usnoj šupljini je jezik, na kojega otpada oko 40% svih slučajeva. Karcinomi jezika se najčešće pojavljuju na posteriorno – lateralnoj granici i ventralnoj površini jezika. Dno usne šupljine je druga najčešća lokacija, dok su manje česta mjesta desni, bukalna i usna sluznica, te tvrdo nepce (Tanaka i sur. 2011).

U istraživanju provedenome na uzorcima pacijenata oboljelima od karcinoma usne šupljine pokazano je kako je jedan od važnih koraka u progresiji tumora gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity,* LOH) na kratkim krakovima kromosoma 3 i 9 (3p i 9p). Nadalje, kod ovih pacijenata, uz navedene, pronađen je LOH i na kromosomima 4, 8, 11 ili 17. Kromosomska regija 3p je među najkrhkijim kromosomskim regijama u genomu, a u njoj se nalazi tumor-supresor gen FHIT (engl. *Fragile Histidine Triad*), koji kodira protein uključen u zaštitu stanice od nakupljanja oštećenja DNA molekule putem regulacije kontrolnih točaka staničnog ciklusa. Regulatorne gene sadrži i regija 9p, u kojoj se nalazi INK4a/ARF lokus, a kodira 2 vrlo važna tumor-supresorska proteina koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, $p16^{INK4a}$ i $p14^{ARF}$. Protein $p16^{INK4a}$ inhibira CDK4/6-ciklin D kompleks, te na taj način inhibira fosforilaciju pRb i time zaustavlja stanični ciklus, dok je $p14^{ARF}$ u interakciji s proteinom mdm2, preko kojega stabilizira protein p53. Što se tiče dodatnih regija u kojima je primijećen LOH, najvažnije su 17p, u kojoj se nalazi gen za protein p53, koji se zbog svoje uloge u stanici naziva i „čuvarem genoma“, te 11q, koja je umnožena u 30-50% svih slučajeva HNSCC, u kojoj se nalazi gen za protoonkogen ciklin D1 (tvori komplekse s CDK4/6), čija prekomjerna ekspresija dovodi do preranog ulaska u S-fazu staničnog ciklusa i nakupljanja oštećenja u DNA (Walsh i sur. 2007; Pai i Westra 2009).

1.1.4. Liječenje tumora

Postoji nekoliko različitih načina liječenja tumora, koji se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji, bilo istovremeno ili odvojeno, a to su kirurško odstranjivanje, radioterapija i terapija lijekovima. Kirurško odstranjivanje je najčešće prvi oblik terapije, te se tumori u ranim stadijima mogu u potpunosti izliječiti na ovaj način. Radioterapija se najčešće koristi lokalizirano i to u sprezi s kirurškim zahvatima. Upotreba lijekova uključuje kemoterapiju, koja podrazumijeva veliku grupu kemoterapeutika s citotoksičnim učinkom koja

preferencijalno, ali ne isključivo, cilja stanice tumora koje se brzo dijele. Endokrina terapija je specifičniji oblik liječenja, a koristi se primjerice za liječenje tumora dojke. Moguća je kod stanica čija je proliferacija potaknuta hormonima i koje eksprimiraju za njih odgovarajuće receptore, sprječavajući vezanje hormona na receptor ili signalni put koji okidaju. Primjeri ovakve terapije su Tamoksifen, antagonist receptora za estrogen i Herceptin, koji se veže za erbB2/HER2/neu receptor. Metabolički inhibitori se istražuju, a trebali bi biti usmjereni protiv specifičnih proteina i metaboličkih puteva koji se odvijaju većinom u tumorskim stanicama, a mnogi su povezani sa regulacijom staničnog ciklusa. Modifikatori biološkog odgovora su spojevi koji mogu biti promijenjeni na način da izazivaju imunološki odgovor usmjeren protiv stanica tumora. Cjepiva nude idealno rješenje, no istraživanja zasada nisu uspješna zbog nedostatka tumor-specifičnih proteina. Od navedenih vrsta terapija lijekovima, trenutno se koriste kemoterapija i endokrina terapija, dok su drugi oblici još uvijek u eksperimentalnoj fazi istraživanja (Luqmani, 2005).

Kemoterapeutici se mogu klasificirati na dva načina, prema toksičnosti ovisnoj o fazi staničnog ciklusa i prema mehanizmu djelovanja. U klinici se kemoterapeutici dijele prema mehanizmu djelovanja:

- Alkilirajući agensi – visoko reaktivne molekule koje djeluju na način da na molekulu DNA ili proteine kovalentno dodaju alkilne skupine ($R\text{-}CH_2$), te se stvaraju unakrsne veze koje blokiraju normalne funkcije tih molekula;

Primjeri takvih molekula su ciklofosfamid, ifosfamid, prokarbazin, tiopeta, mitomicin C.

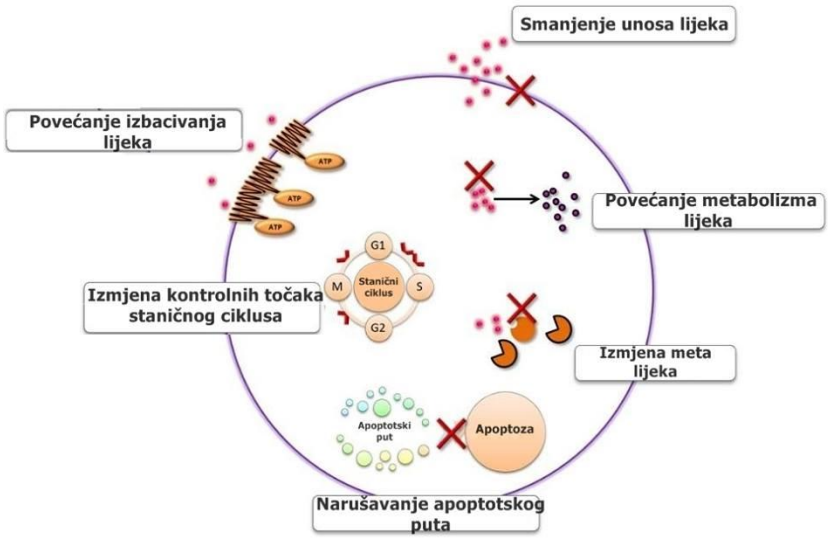
- Spojevi platine – uključuju cisplatinu, karboplatinu i oksaliplatinu. Cisplatina je organski kompleks s teškim metalom. Kloridni ioni se otpuštaju iz molekule nakon ulaska u stanicu, što omogućuje ostatku spoja da se veže na molekulu DNA, te stvori unutarlančane i međulančane veze u molekuli DNA, čime se inhibira sinteza DNA, RNA i proteina.
- Antimetaboliti – spojevi čija je struktura slična onima koji se nalaze prirodno u stanici, kao što su vitamini, nukeozidi i aminokiseline, te se natječu s njima za vezno mjesto na receptoru ili enzimu. Dijele se na antagoniste folne kiseline (npr. metotreksat), analoge purina (npr. 6-merkaptopurin, tiogvanin) i analoge pirimidina (npr. 5-fluorouracil).
- Citotoksični antibiotici – većina ovih spojeva je proizvedena u kulturama bakterija i gljivica, a utječu na funkciju i sintezu nukleinskih kiselina. Najpoznatiji su antraciklini

(npr. doksorubicin, epirubicin), aktinomicin D, bleomicin i mitomicin C (ponaša se kao alkilirajući agens).

- Toksini koji djeluju na diobeno vreteno – u ovu skupinu ubrajamo vinka alkaloide (vinkristin i vinblastin, inhibiraju polimerizaciju tubulina, što dovodi do inhibicije formiranja diobenog vretena) i taksane (paklitaksel i docetaksel, sprječava depolimerizaciju tubulina).
- Inhibitori topoizomeraze – stabiliziraju vezu između molekule DNA i topoizomeraze I (kamptotecin, irinotekan, topotekan) ili topoizomeraze II (etopozid i vespid), što dovodi do inhibicije replikacije DNA (Payne i Miles, 2008).

1.1.5. Mehanizmi otpornosti tumora na kemoterapeutike

Otpornost tumora na lijekove glavni je razlog neuspješne terapije tumora. Može biti urođena, što znači da je tumor pri nastanku otporan na kemoterapiju, ili stečena, što znači da je tumor tijekom terapije razvio otpornost na kemoterapeutik. Mehanizmi otpornosti tumora prikazani su na Slici 3. (Housman i sur. 2014).



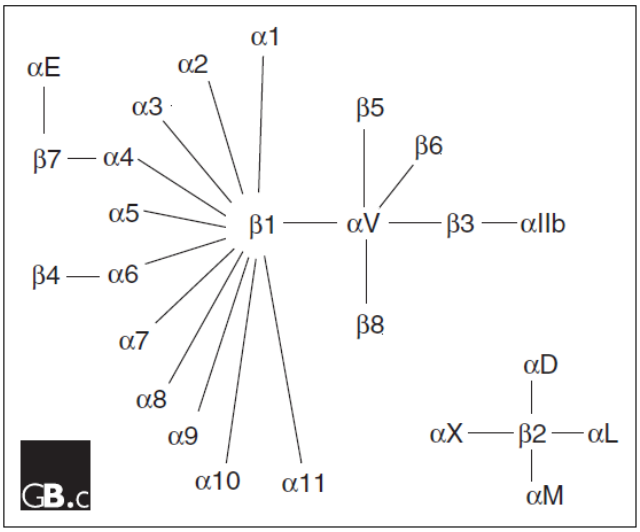
Slika 3. Mehanizmi razvoja otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove. Prikazani mehanizmi uključuju promjene transportera na staničnoj membrani koje dovode do povećanog izbacivanja lijeka iz stanice, smanjenje unosa lijeka u stanicu, izmjenu kontrolnih točaka staničnog ciklusa (engl. *checkpoints*), izmjenu metabolizma kako bi se lijek razgradio ili promijenila meta lijeka, i narušavanje apoptotskog puta kako djelovanjem lijeka ne bi došlo do apoptoze. (Preuzeto i prilagođeno iz Chai i sur. 2010)

Izmjena membranskog transporta je jedan od najznačajnijih mehanizama za razvoj otpornosti na protutumorske lijekove, a posredovana je membranskim proteinima koji izlučuju citotoksične molekule iz stanice. Ti proteini pripadaju obitelji proteina ABC (engl. *ATP-binding cassette*), a uključeni su i u otpornost na bolesti, primjerice AIDS i malarija. Oni moduliraju apsorpciju, distribuciju i izlučivanje mnogih lijekova (Luqmani, 2005). Među 48 poznatih ABC transportera u ljudi, otpornost na protutumorske lijekove se veže uz povećanu ekspresiju P-glikoproteina (Pgp), MRP1 (engl. *multidrug-resistance-associated protein 1*) i MXR (engl. *mitoxantron-resistance protein,* također se naziva i BCRP od engl. *breast cancer resistance protein*). Protein Pgp uključen je u transport hidrofobnih protutumorskih lijekova, kao što su doksorubicin, vinbastin i vinkristin, te se otpornost na te lijekove povezuje upravo uz njega. S druge strane, MRP1 prenosi negativno nabijene lijekove i lijekove koji su modificirani glutationom, dok se prekomjerna ekspresija MRX povezuje uz otpornost na inhibitore topoizomeraze (irinotekan, etopozid) i antracikline, primjerice doksorubicin (Zahreddine i Borden, 2013). Jedan od mehanizama razvoja otpornosti tumora na protutumorske lijekove uključuje promjenu mete lijeka u stanici, što uključuje modifikaciju ciljanog proteina ili smanjenje ekspresije tog proteina do razine da djelovanje lijeka više nema utjecaj na stanice. Česti primjer ovakve otpornosti je antiestrogenska terapija Tamoksifenom, kada dolazi do gubitka estrogenskih receptora na tumorskim stanicama, te one postaju otporne na ovaj oblik terapije. Nadalje, stanični metabolizam može biti izmijenjen na način da se prekomjerno eksprimiraju enzimi uključeni u eliminaciju lijeka (npr. glutation-S transferaza, ubikvitinske ligaze), ili pak da se smanji ekspresija enzima u slučajevima kada se lijek treba po ulasku u stanicu katalitički aktivirati (npr. citarabin za aktivaciju treba deoksicitidin kinazu) (Luqmani, 2005). Otpornost može nastati i kroz inhibiciju apoptoze, što je rezultat inaktivacijskih mutacija u genima koji kodiraju za apoptotske proteine, kao što je p53, ili aktivacijskih mutacija u genima čiji su produkt antiapoptotski proteini, primjerice Bcl-2 (engl. *B cell lymphoma 2*). U pacijenata s naprednim stadijem tumora dojke pokazan je odnos mutacija p53 i *de novo* otpornosti na doksorubicin, dok je ista mutacija u mišjem modelu sarkoma dovela do razvoja otpornosti na antracikline (Zahreddine i Borden, 2013). Poremećaji u funkciji proteina p53 utvrđeni su u više od 50% tumora u čovjeka, među kojima je i HNSCC, s učestalosti mutacija od 40%. Inaktivacija se može dogoditi putem nekoliko mehanizama, uključujući mutaciju gena za p53, prekomjernu ekspresiju negativnog regulatora p53, inaktivaciju inhibitora negativnog regulatora, te izmjenu posttranslacijske obrade p53, npr. fosforilacije (Nemunaitis i Nemunaitis, 2011). U pacijenata s HNSCC mutacije proteina

p53 dovode se u vezu s povećanim rizikom od recidiva bolesti nakon kirurškog odstranjivanja, te s razvojem otpornosti na kemoterapeutike cisplatinu i 5-fluorouracil (Loyo i sur. 2013).

1.2. INTEGRINI

Integrini su heterodimerni receptori na površini gotovo svih životinjskih stanica, sastavljeni od nekovalentno vezanih α i β podjedinica. U sisavaca je do danas identificirano 18 α-podjedinica i 8 β-podjedinica, koje *in vivo* tvore 24 različita heterodimera (Slika 4.) koji sudjeluju u specifičnom povezivanju između stanica, te stanica i okoliša, što je važno u prijenosu signala između stanica i okoliša. Interakcije posredovane integrinima sa izvanstaničnim matriksom (engl. *extracellular matrix*, ECM) su nužne za prihvaćanje, organizaciju citoskeleta, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica u mnogim biološkim procesima, uključujući oplodnju, implantaciju i embrionalni razvoj, imunološki odgovor, resorpciju kosti i agregaciju trombocita. Integrini također sudjeluju i u patološkim procesima, kao što su upala, zacjeljivanje rana, angiogeneza i metastaziranje tumora. Nadalje, integrini služe kao receptori za više različitih tipova virusa (Millard i sur. 2011.).



Slika 4. Prikaz poznatih podjedinica integrina i 24 različita heterodimera koje tvore. (Preuzeto iz Takada i sur. 2007)

1.2.1. Okidanje signala posredovano integrinima

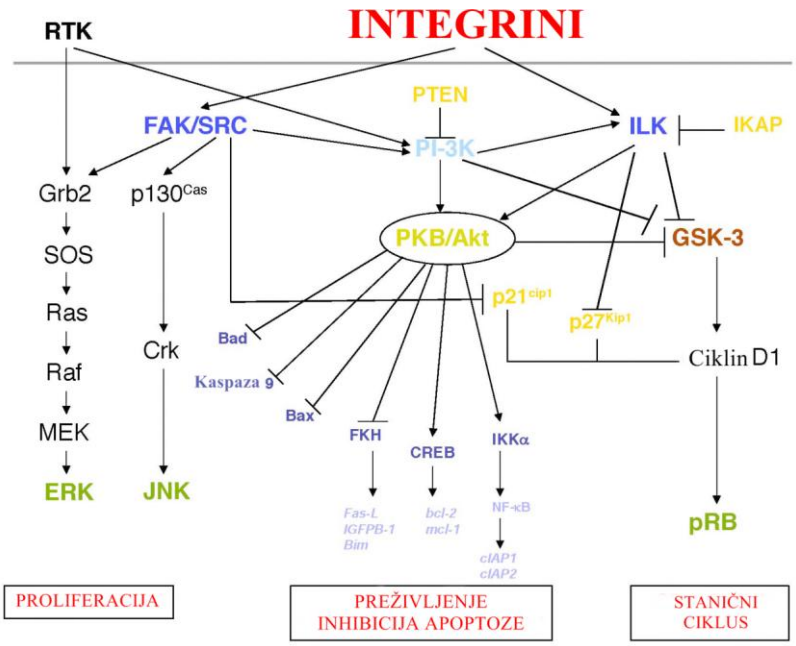
Integrini se sastoje od velike ligand-vezujuće izvanstanične domene, transmembranske domene, te relativno male citoplazmatske domene (repovi integrina) koja je povezana s citoplazmatskim strukturnim i signalnim proteinima. Izvanstanična domena funkcionira kao receptor za proteine ECM (npr. fibronektin, kolagen, vitronektin), različite ligande povezane s fiziologijom krvožilnog sustava (npr. trombospondin, Von Willebrandov faktor) i s drugim molekulama odgovornim za adheziju stanica (engl. *Cell Adhesion Molecules*, CAM) ili unutarstaničnim molekulama za adheziju (engl. *Intercellular Adhesion Molecules*, ICAMs). Nadalje, integrini mogu imati više različitih liganda, ili se pak nekoliko integrina može vezati za isti ligand, primjerice integrini αvβ3, α5β1 i αIIbβ3 prepoznaju RDG motiv (slijed aminokiselina Arg-Gly-Asp) na ligandima. Također i proteini ECM mogu potaknuti različite signale unutar stanice putem interakcije s različitim integrinima (Makrilia i sur. 2009).

Integrini prenose signale dvosmjerno preko stanične membrane. Na površini stanica nalaze se u stanju niskog afiniteta, te mogu biti aktivirani putem signalizacije iz stanice u okolinu (engl. *„inside-out" signaling*). Primjer za to je receptor za trombin PAR1 (engl. *Protease-Activated Receptor 1*) koji se nalazi na staničnoj površini, a prenosi aktivirajući signal izvanstaničnih agonista preko stanične membrane, te pokreće signalnu kaskadu koja vodi do prelaska integrina u visokoafinitetno stanje. Tokom ovog procesa važnu ulogu imaju talin i kindlin (Hu i Luo, 2013). Vezanje talina na aktivirane repove integrina β promiče organizaciju citoskeleta kroz povezivanje s vinkulinom i aktinom. Veza talina i vinkulina promiče rast fokalne adhezije, dok veza vinkulina i aktina putem talina omogućava stabilnu adheziju. Produljena inhibicija integrina u stanicama ovisnima o adheziji dovodi do anoikisa, stanične smrti apoptozom uslijed gubitka kontakta s ECM. (Millard i sur. 2011). Vezanje izvanstaničnih liganada na integrine prenosi signal unutar stanice, u procesu koji se naziva signalizacija iz okoline u stanicu (engl. *„outside-in" signaling*), što ima utjecaj na proliferaciju, diferencijaciju i pokretljivost stanica (Hu i Luo, 2013).

1.2.2. Kinaze vezane uz integrine

Integrini nemaju kinaznu aktivnost. Za prijenos signala iz okoline u stanicu moraju se povezivati s adaptornim proteinima koji povezuju integrine sa citoskeletom, citoplazmatskim

kinazama i transmembranskim receptorima faktora rasta (Slika 5.). Strukture koje nastaju kao rezultat nakupljanja (engl. *clustering*) integrina na membrani uzrokovanog vezanjem integrina za ECM nazivaju se fokalne adhezije. Vezanje liganda na integrine aktivira različite protein kinaze, kao što kinaza fokalnih adhezija (engl. *focal-adhesion kinase*, FAK), Src obitelj nereceptorskih protein tirozin kinaza, te β1/β2/β3-integrin vezana protein kinaza ILK (engl. *integrin-linked kinase*) (Ambriović-Ristov i Osmak, 2006).



Slika 5. Signalni putevi ovisni o integrinima (Preuzeto i prilagođeno iz Ambriović-Ristov i Osmak, 2006).

FAK je multifunkcionalan regulator signalnih puteva unutar tumorskog mikrookoliša. Tijekom razvoja, te u brojnim tumorima FAK promiče pokretljivost, diferencijaciju i preživljenje stanice kroz mehanizme ovisne i neovisne o kinazama. Iako su tijekom proteklih nekoliko godina započele faze 1 i 2 kliničkih istraživanja s inhibitorima FAK-a, neke funkcije u procesu tumorigeneze i dalje se istražuju (Sulzmaier i sur. 2014). Kurio i suradnici (2012) istražili su ulogu FAK u progresiji karcinoma pločastih stanica usne šupljine, te protutumorski učinak TAE226 (Novartis, Švicarska). TAE226 je mala molekula koja inhibira kinaznu aktivnost FAK putem kompeticije za ATP-vezno mjesto. Njihovi rezultati pokazuju kako je tretman navedenim inhibitorom FAK inhibirao proliferaciju, adheziju invaziju, migraciju i preživljenje stanica, te angiogenezu *in vivo* i *in vitro*. Ovi podaci govore o mnogim ulogama

ove kinaze u karcinomu pločastih stanica usne šupljine, kao i o potencijalu za liječenje ciljanjem FAK.

Najbolje opisani mehanizam koji promiče aktivaciju FAK uključuje nakupljanje integrinskih receptora po vezanju stanice za proteine ECM, kada prvo dolazi do dimerizacije FAK, što vodi do autofosforilacije na mjestu Y319, vezanja kinaze iz Src-obitelji kinaza na fosforilirano mjesto, fosforilaciju posredovanu Src u aktivacijskoj regiji FAK (Y576 i Y577) i formaciju FAK-Src kompleksa (Sulzmaier i sur. 2014). Ulogu FAK u staničnoj migraciji može se najbolje prikazati kroz dva primjera, odnosno signalna puta. Prvi signalni put uključuje povezivanje FAK-Src kompleksa s proteinom $p130^{Cas}$ i njegovu fosforilaciju. Ukoliko se naruši vezanje FAK za Src ili $p130^{Cas}$, ne dolazi do fosforilacije $p130^{Cas}$, čime je stanična migracija smanjena. Na ovaj način se može prikazati i interakcija s citoskeletnim i adaptornim proteinom paksilinom, koji je također supstrat FAK-Src kompleksa, a za aktivnost potrebne su mu fosforilacije Y31 i Y118. Drugi signalni put kojim FAK utječe na migraciju uključuje interakciju s fosfatidil inozitol 3-kinazom (PI-3K) i adaptornom molekulom Grb7, gdje aktivacija PI3K potiče migraciju putem nizvodnog proteina Rac, koji je ključni regulator kortikalnog aktina (kortaktina) i lamelopodija u procesu migracije stanice (Zhao i Guan, 2011). Vezanje adaptora koji sadrži SH2-veznu domenu Grb2/SOS (engl. *Growth factor receptor bound 2/ homologue of „Son of Sevenless"*) na mjesto Y925 FAK ima ulogu u aktivaciji signalnog puta za preživljenje Ras/Raf/MEK/MAPK. Fosforilacija ERK2 (engl. *extracellular signal-activated kinase 2*) koju obavlja FAK nakon vezanja Grb2/SOS aktivira kinazu lakog lanca miozina, koja promovira preživljenje i proliferaciju stanice (Hehlgans i sur. 2007.)

ILK je citoplazmatska serin/treonin kinaza mase 59 kDa koja je prvi put otkrivena kao integrin-vezujući protein. Može direktno aktivirati nekoliko signalnih puteva nizvodno od integrina i sudjelovati u signaliziranju potaknutom vezom integrina s faktorima rasta i hormonima. Supstrati ILK uključuju integrin β1, laki lanac miozina, protein kinazu B/Akt (PKB/Akt) i glikogen sintazu kinazu 3 (GSK-3). Jedinstvena je kinaza jer također funkcionira i kao unutarstanični adaptorni protein, udružujući mnogobrojne signalne proteine s integrinima i signalima potaknutim faktorima rasta. Neki od proteina s kojima je ILK u interakciji je Pinch, paksilin, p21 aktivirana kinaza 1 (Pak1), te estrogenski receptor (ER). Aktivirati ga mogu i fiziološki signali od faktora rasta, citokina, estrogena i signalnog puta

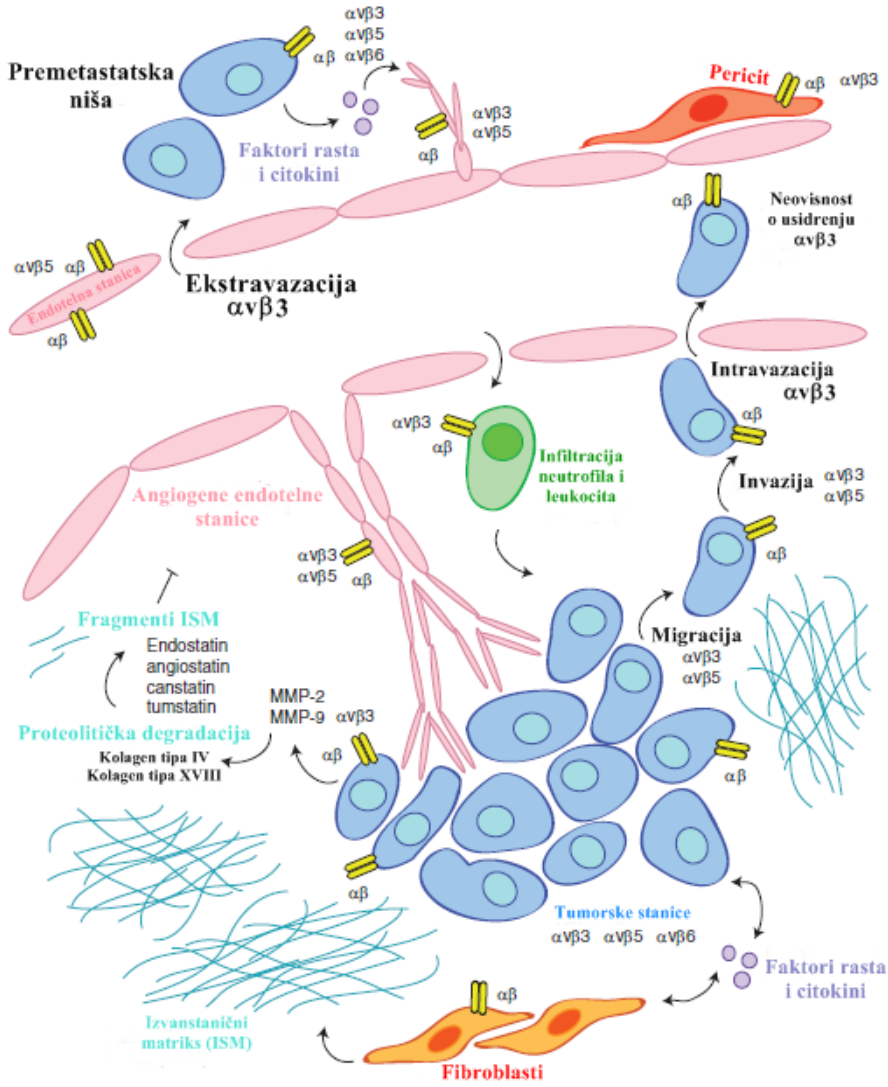
Wnt. Direktni regulatori ILK su PI-3K i homolog fosfataze i tenzina (engl. *phosphatase and tensin homolog,* PTEN). Sve je više pokazatelja kako je ILK potencijalni onkogen koji modulira nekoliko signalnih puteva za preživljenje stanica i progresiju tumora (Cortez i sur. 2011).

1.2.3. α_v obitelj integrina

Istraživanja koja povezuju integrinski profil malignih tumora čovjeka sa stopama preživljenja i učestalosti metastaziranja, pokazala su da neki integrini mogu imati važnu ulogu u razvoju tumora. Ekspresija integrina αvβ3, αvβ5, α5β1, α6β4, α4β1 i αvβ6 dovodi se u direktnu vezu s progresijom nekih vrsta tumora, zbog čega ih to čini jednima od najistraživanijih integrina u malignim tumorima (Desgrosellier i Cheresh, 2010).

Integrine αvβ3 i αvβ5 nalazimo snažno eksprimiranima na površini osteoklasta, endotelnih stanica u angiogenezi i nekih solidnih (čvrsto formiranih) tumora (Slika 6.). Blokiranje njima potaknutim signala istraživano je u svrhu prevencije osteoporoze, inhibicije angiogeneze i regresije tumora. Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila koje izviru iz postojećih. Poticanje angiogeneze prvi je korak pri napredovanju tumora. U početku je rast tumora potaknut nutrijentima i kisikom iz postojećih udaljenih krvnih žila. Kako se tumorska masa povećava, lokalna opskrba krvlju postaje nedostatna, što rezultira hipoksičnim uvjetima u stromi tumora. Inducibilni transkripcijski faktor HIF-1a (engl. *Hipoxia-inducible factor 1a*) aktivira se kao odgovor na hipoksiju, što dovodi do otpuštanja vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor,* VEGF) (Millard i sur. 2011).

Integrini αvβ3 i αvβ5 diferencijalno su eksprimirani na površini tumorskih stanica, obzirom na stanice od kojih je tumor nastao i ECM. U melanomu i glioblastomu su pronađene povišene ekspresije integrina αvβ3, što ide u prilog njihovom naglašenom metastatskom potencijalu. Stanice karcinoma, za razliku od prethodnih primjera, preferentno eksprimiraju αvβ5 kao receptor za vitronektin. Istraživanja su pokazala kako je integrin αvβ5 srednje do jako eksprimiran na većini stanica karcinoma, dok je slabo eksprimiran na stanicama mijeloma i odsutan na stanicama limfoma (Zannetti i sur. 2009; Mizejewski, 1999).



Slika 6. Uloga integrina αv eksprimiranih na različitim stanicama u angiogenezi i progresiji tumora. (Preuzeto i prilagođeno iz Weis i Cheresh, 2011.)

1.2.3.1. Integrin αvβ3

Integrin αvβ3 eksprimiran je na površini stanica različitih tumora, a pacijenti čiji tumori eksprimiraju više ovog integrina na površini stanica češće imaju lošiju prognozu nego pacijenti s nižom ekspresijom. Interakcija stanice s integrinom αvβ3 i aktiviranog trombocita s integrinom αIIbβ3 na površini olakšava hvatanje cirkulirajuće tumorske stanice, ključni korak u procesu metastaziranja. Smanjenje ekspresije integrina αvβ3 na površini tumorskih stanica u životinjskim modelima smanjuje migratornu sposobnost i mestastaziranje tih tumora (Millard i sur. 2011). Ambriović-Ristov i suradnici (2004) istraživali su stanice karcinoma

grkljana čovjeka HEp2, te su razvili staničnu liniju $CA3_{ST}$ koja je bila otporna na cisplatinu, a pokazala je *de novo* ekspresiju integrina αvβ3. Istraživanje je nastavljeno u smjeru da su od stanične linije HEp2 stvoreni klonovi koji pokazuju ekspresiju integrina αvβ3, te su otporni na 3 kemoterapeutika, cisplatinu, mitomicin C i doksorubicin. U otpornim stanicama je pronađena povišena ekspresija glutationa, te je zaključeno kako integrin αvβ3 štiti stanicu od lijekova putem glutationa, koji eliminira reaktivne kisikove radikale nastale djelovanjem kemoterapeutika (Brozović i sur. 2008).

1.2.3.2. Integrin αvβ5

Za razliku od signala potaknutim integrinom αvβ3, koji promiču rast primarnog tumora i metastaziranje, signali potaknuti integrinom αvβ5 pridonose invazivnim i metastatskim svojstvima tumorske stanice. Izlaganje, bilo EGF-u ili IGF-u stimulira migraciju i invaziju tumorskih stanica putem integrina αvβ5 (Weis i Cheresh, 2011). U mišjem modelu je pokazano i kako integrin αvβ5 stvara signalni kompleks s FAK u ovisnosti o Src, koji je ključan u angiogenezi (Zhao i Guan, 2011).

1.3. INTEGRINI KAO CILJNE MOLEKULE ZA TERAPIJU TUMORA

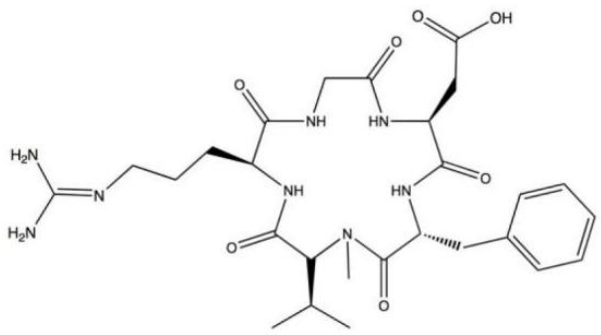
Ekspresija integrina u različitim tipovima stanica koji su uključeni u progresiju tumora i njihova sposobnost „komunikacije“ s receptorima faktora rasta učinila ih je atraktivnim metama za terapiju. Pretklinička istraživanja pokazala su da antagonisti integrina inhibiraju rast tumorske mase djelujući i na tumorske stanice i stanice domaćina povezane s tumorom, ponajviše endotelne stanice. Antagonisti integrina koji su trenutno u kliničkim studijama uključuju monoklonska protutijela i RGD mimetike (Desgrosellier i Cheresh, 2010).

Monoklonska protutijela koja blokiraju funkciju integrina αvβ3, kao IM609, su među prvim razvijenim antagonistima integrina, te su pokazala značajnu inhibiciju angiogeneze u pretkliničkim modelima. Kao rezultat ovih istraživanja razvijeno je humanizirano monoklonsko protutijelo IM609, etaracizumab (MEDI-522), koji uz učinak inhibicije

angiogeneze inhibira i rast stanica tumora, te inhibicijom prihvaćanja osteoklasta smanjuje resorpciju kostiju i time smanjuje metastaziranje u kostima. Zbog svoje učinkovitosti etaracizumab je bio jedan od prvih antagonista integrina koji je uveden u klinička ispitivanja (Desgrosellier i Cheresh, 2010).

Cilengitid je ciklički RGD peptid (Slika 7.) koji inhibira integrine αvβ3 i αvβ5, ali ne i αIIβ3. Trenutno se nalazi u drugoj fazi kliničkih ispitivanja na pacijentima koji boluju od karcinoma pluća i prostate. Iako se u početku cilengitid pokazao iznimno zanimljivim u pacijenata s glioblastomom u odmaklom stadiju produžavajući preživljenje pacijenata uz minimalne nuspojave (Stupp i sur. 2010), rezultati nedavno završenog kliničkog pokusa u kojemu su kombinirani cilengitid s temozolomidom i radioterapijom, nije pokazao poboljšanje u pacijenata s glioblastomom (Stupp i sur. 2014). Ovi rezultati isključili su cilengitid u razvoju terapije za glioblastom, ali nisu isključili integrine kao ciljne molekule za njegovo liječenje.

U staničnim modelima cilengitid smanjuje rast, proliferaciju i preživljenje endotelnih i tumorskih stanica koje eksprimiraju integrine αvβ3 i αvβ5 tako što sprječava interakcije integrina i ECM. Inhibira migraciju, prihvaćanje i širenje endotelnih stanica na vitronektinu već pri mikromolarnim koncentracijama. Slični učinci su zabilježeni u tretmanu αvβ3, αvβ5 pozitivnih staničnih linija glioma, melanoma, te karcinoma dojke i nemalih stanica pluća. Nakon tretmana cilengitidom endotelne stanice i stanice glioma pokazuju poremećaj organizacije aktina i čvrstih spojeva među stanicama, što je u skladu s inhibicijom organizacije staničnog citoskeleta. Cilengitid inhibira i staničnu signalizaciju u FAK-Src-Akt i Erk putevima u endotelnim i tumorskim stanicama, te smanjuje efekt stimulacije VEGF u signalnim putevima potaknutim faktorima rasta (Millard i sur. 2011).



Slika 7. Struktura antagonista integrina cilengitida. (Preuzeto i prilagođeno iz Millard i sur. 2011)

1.4. PROTEOMSKA ANALIZA

Proteomika (istraživanje proteinskih produkata koje eksprimira genom) je postala jedna od vodećih tehnologija dostupnih istraživačima u postgenomskoj eri zahvaljujući centralnoj ulozi proteina i njihovih interakcija u staničnim funkcijama. Sam termin koji označava globalno proučavanje proteina skovao je u ranim 1990.-im godina Marc Wilkins, a može se upotrebljavati na razini cijelog organizma, tkiva, biološke tekućine, stanice, pa čak i organela. Proteomika je uistinu interdisciplinarna znanost jer je moguća samo kroz koordiniranu integraciju mnogih polja znanosti. Najvažnije, ali ne isključivo, to uključuje sekvenciranje genoma, razdvajanje proteina (generalno biokemija proteina), spektrometriju masa i bioinformatiku, te su ova područja opisana kao 4 stupa proteomske tehnologije (Brewis i Brennan, 2010).

1.4.1. Dvodimenzionalna gel – elektroforeza (2D-PAGE)

O'Farrellovo uvođenje dvodimenzionalne gel elektroforeze (engl. *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis,* 2D-PAGE) 1975. godine za razdvajanje staničnih proteina u denaturirajućim uvjetima omogućilo je razlučivanje stotine proteina. Princip metode vrlo je jednostavan: proteini se razdvajaju na gelu u izoelektričnom fokusiranju (engl. *isoelectric focusing,* IEF), što ih razdvaja u prvoj dimenziji prema njihovim izoelektričnim točkama, nakon čega slijedi razdvajanje u drugoj dimenziji elektroforezom uz prisustvo natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate,* SDS), kada se proteini razdvajaju prema molekularnim masama (Isaaq i Veenstra, 2008).

Kao što je spomenuto iznad, 2D-PAGE se sastoji od IEF u prvoj dimenziji i SDS-PAGE u drugoj dimenziji. Otkako ga je Kolin uveo 1954. godine, IEF se značajno unaprijedilo. Prva dimenzija se odvijala na štapićima poliakrilamidnog gela na staklenim ili plastičnim nosačima koji sadrže amfolite koji formiraju pH gradijent u električnom polju. Ovi štapići su bili nestabilni, nereproducibilni i nepraktični za rad. Veliki napredak u području IEF dogodio se kada su Bjellqvist i sur. 1982. godine uveli imobilizirane pH gradijente (engl. *immobilized pH gradient,* IPG), što je dovelo do razdvajanja kompleksnih smjesa proteina na širokom pH rasponu. IPG trake su omogućile stvaranje stabilnog i reproducibilnog pH

gradijenta na kojem se mogu fokusirati i kiseli i bazični proteini na istome gelu. U IPG trakama amfolitni nosači su vezani na molekule akrilamida i izliveni u gel kako bi se formirao fiksni pH gradijent. Fiksiranje gradijenta sprječava pomicanje u gelu i osigurava da su izliveni učinkovito i reproducibilno. Korištenje IPG traka uskog raspona omogućilo je razdvajanje većeg broja proteina nego standardna 2D-PAGE metoda zbog toga što je uži pH raspon raspodijeljen na veću fizičku udaljenost. Ovakvom raspodjelom proteina sličnih pI vrijednosti postiže se razdvajanje veće rezolucije (Isaaq i Veentra, 2008).

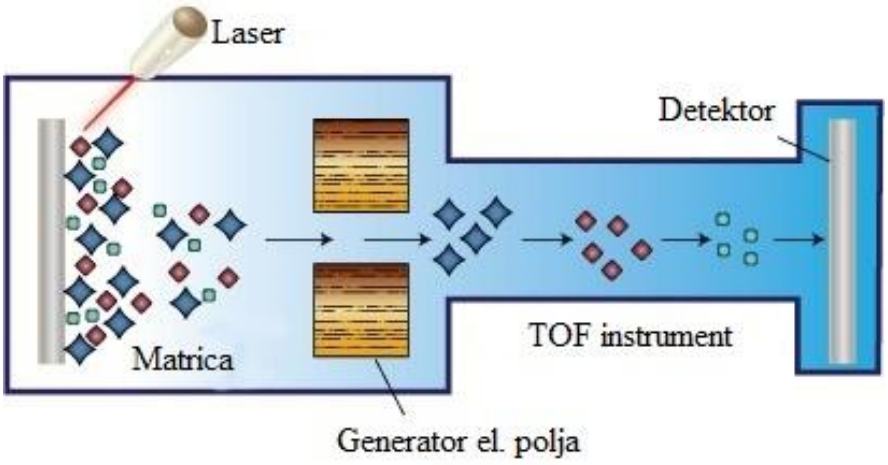
Točke na gelu koje odgovaraju (nadajmo se) pojedinačnim proteinima izrezuju se iz gela u obliku komadića i najčešće razgrađuju (digestiraju) tripsinom kako bi se dobili dekamerni peptidi (tipične mase oko 1100 Da), iako peptidi mogu varirati u veličini ovisno o pozicijama arginina i lizina u primarnoj sekvenci. Digestija tripsinom može se raditi ručno, ali također postoje i automatizirane platforme. Dobiveni peptidi zatim difuzijom izlaze iz komadića gela i skupljaju se za tandemnu MS analizu. Oni su idealne veličine za MS i to je jedan od razloga zašto se tripsin široko upotrebljava u proteomskim analizama. Nadalje, ovaj enzim je vrlo stabilan i specifičan, iako postoje slučajevi kada se koriste proteaze s drugim specifičnostima (primjerice kimotripsin, Lys-C, Asp-N i Glu-C) (Brewis i Brennan, 2010).

1.4.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry,* MS) je analitička metoda koja u plinskoj fazi razdvaja ione pod utjecajem električnog i/ili magnetskog polja. Razdvojeni ioni se tada detektiraju prema omjeru mase i naboja (*m/z)*. Metoda se počela koristi početkom četrdesetih godina 20. stoljeća, a procvat je doživjela povezivanjem s plinskom kromatografijom, čime je unaprijeđena analiza hlapljivih spojeva, te tekućinskom kromatografijom, čime se omogućila analiza nehlapljivih bioloških spojeva. Iako je spektrometrija masa prvobitno imala primjenu u kemiji, dugo se nije mogla primijeniti na makromolekule (proteini i nukleinske kiseline) zbog primjene termoionizacijskih tehnika u ionskom izvoru, što je rezultiralo brzim raspadom makromolekula u plinskoj fazi. Otkrićem elektroraspršenja (engl. *electrospray ionisation,* ESI) i matricom pomognute desorpcije i ionizacije laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionisation,* MALDI), analiza se proširila i na spojeve s molekulskom masom od nekoliko stotina tisuća daltona (Nelson i Cox, 2005).

MALDI su kao metodu za analizu velikih biomolekula predstavili Karas i Hillenkamp 1988. godine. Ukratko, u MALDI-MS analizi uzorak je uklopljen u kristalnu strukturu male organske molekule (matrice) i postavljen na provodljivu pločicu. Kokristali se zatim ozrače s laserskom zrakom u trajanju od nanosekunde, primjerice UV-laserom (valne duljine 266 ili 337 nm), ili pak IR-laserom (valne duljine 294 ili 337 nm; Galić, 2004). Postignuta energija se kreće između $1 \cdot 10^7$ do $5 \cdot 10^7$ W/cm^2, te uzrokuje raspad strukture ozračenog kristala i stvara se oblak čestica (engl. *the plume*), iz kojeg se zatim izvlače ioni djelovanjem električnog polja. Mehanizam na kojem počiva proces desorpcije još nije razjašnjen do kraja, ali pretpostavka je da dolazi do pretvorbe laserske energije u vibracijske oscilacije molekule kristala, što dovodi do raspada kristalne strukture. Nakon desorpcije slijedi ubrzanje kroz električno polje, u kojem se ioni pravocrtno kreću i dolaze do detektora. Ionske mase (omjeri mase i naboja, m/z) se računaju mjerenjem „vremena leta“ (TOF), koje je duže za veće molekule nego za manje, a obično iznosi nekoliko mikrosekundi (pod pretpostavkom da im je početna energija jednaka) (Slika 8.). Kako se stvaraju većinom jednostruko nabijeni nefragmentirani ioni, njihove mase se mogu jednostavno odrediti iz nastalog spektra (Jurinke i sur. 2004).

Tandemna spektrometrija masa uz TOF nastaje povezivanjem linearnog i reflektronskog TOF instrumenta (TOF/TOF-MS). Ion prekursor odabire se tako da se primjenom potencijala uklanjaju svi ioni osim onih sa specifičnim omjerom *m/z*. Taj ion zatim ulazi u koliziju s inertnim plinom. Ulaskom iona u drugi analizator, ion prekursor se ubrzava i fragmentira. Ukoliko fragment nastaje nakon ubrzavanja i prije dolaska na detektor, imat će istu brzinu kao i ion prekursor, a time isto vrijeme leta. U zasebnom linearnom načinu snimanja ion prekursor i ion potomak bi stigli na detektor u isto vrijeme. Međutim uvođenjem reflektrona (ionskog zrcala) ioni imaju različitu energiju pa se mogu razlikovati. Usporedbom dobivenih spektara masa ioni koji se vide samo u reflektronskom načinu snimanja su oni nastali upravo poslijeionizacijskom fragmentacijom (engl. *post-source decay fragmentation*) (Galić, 2004).



Slika 8. Pojednostavljeni prikaz principa MALDI-TOF analize. Uzorak uklopljen u matricu se desorbira s MALDI pločice djelovanjem lasera, te nastaju ioni na koje djeluje električno polje, pod čijim utjecajem ulaze u TOF instrument (cijev), gdje se razdvajaju prema veličini (brzini kretanja) i stižu do detektora koji ih detektira tijekom vremena. (Preuzeto i prilagođeno iz http://www.sigmaaldrich.com/)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U modelu stanica karcinoma grkljana čovjeka (HEp2) pokazano je da prilikom razvoja otpornosti na cisplatinu može doći do *de novo* ekspresije integrina αvβ3 (Ambriović-Ristov i sur. 2004). U istom modelu stanica HEp2, stabilnom transfekcijom plazmida koji sadrži gen za podjedinicu integrina β3 koja je dovela do *de novo* ekspresije heterodimera integrina αvβ3, otkriven je mehanizam otpornosti – ekspresija integrina αvβ3 povećava ukupnu razinu glutationa u stanici koji učinkovitije uklanja reaktivne oksidativne vrste nastale djelovanjem cisplatine, mitomicina C i doksorubicina, te dovodi do pojave otpornosti na ove protutumorske lijekove (Brozović i sur. 2008). Kako bi se istražio utjecaj *de novo* ekspresije integrina αvβ3 na osjetljivost na protutumorske lijekove u modelu stanica karcinoma pločastog epitela čovjeka (Cal27) ove su stanice stabilno transficirane plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β3 i kontrolnim plazmidom, te su izdvojeni klonovi Cal27-ϕ (transficiran kontrolnim plazmidom), Cal27-2B1 i Cal27-2B3 (transficirani plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β3). Klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3, za razliku od Cal27 i kontrolnog klona Cal27-ϕ, na površini eksprimiraju integrin αvβ3, te imaju povećanu ekspresiju integrina αvβ5. Ove stanice, usporedbom s Cal27 i Cal27-ϕ, pokazuju povećanu otpornost na 5 protutumorskih lijekova (cisplatinu, mitomicin C, doksorubicin, etopozid i 5-fluorouracil) (Stojanović i sur., neobjavljeni rezultati).

Cilj je ovog diplomskog rada diferencijalnom proteomskom analizom, primjenom dvodimenzionalne gel elektroforeze u sprezi sa spektrometrijom masa, istražiti razlike u ekspresiji proteina između stanica Cal27 i klona Cal27-2B1. Rezultati ovog rada mogli bi ukazati na signalni put potaknut integrinom αvβ3 koji vodi do razvoja otpornosti na protutumorske lijekove. Saznanja o mehanizmu razvoja otpornosti na protutumorske lijekove od velikog su značaja za terapiju tumora, kao i uvid u nove moguće mete za razvoj ciljanih terapija protiv ove zloćudne bolesti.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Stanične linije

Za izradu ovog rada korištene su stanice karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka (engl. *human tongue squamous cell carcinoma*, Cal27, ATCC, CRL – 2095), čije je porijeklo potvrđeno analizom u Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH u Njemačkoj. Klon Cal27-2B1 dobiven je stabilnom transfekcijom plazmida pcDNAβ3 koji sadrži gen za podjedinicu integrina β3 (Stojanović, 2014).

3.1.2. Osnovne kemikalije

1-butanol (Kemika, Hrvatska); 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonat (CHAPS) (Sigma, SAD); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT) (Chemicon International Inc., SAD); α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA) (Sigma, SAD); aceton (Kemika, Hrvatska); acetonitril (MeCN) (J. T. Baker, SAD); agaroza (Sigma, SAD); akrilamid (Sigma, SAD); amonijev hidrogenkarbonat (Sigma, SAD); amonijev persulfat (APS), (Sigma, SAD); bisakrilamid (Sigma, SAD); bromfenol modrilo (Fluka, Njemačka); cisplatina (Sigma-Aldrich, Njemačka); Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, SAD); dimetilsulfoksid (DMSO) (Kemika, Hrvatska); ditiotreitol (DTT) (Sigma, SAD); Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) (Invitrogen, SAD; Lonza, Švicarska); etanol (Kemika, Hrvatska); fosforna kiselina (Kemika, Hrvatska); glicerol (Kemika, Hrvatska); glicin (Sigma, SAD); inhibitori proteaza (Roche, Švicarska); jodoacetamid (IAA) (Sigma, SAD); kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Hrvatska); klorovodična kiselina (Kemika, Hrvatska); metanol (Kemika, Hrvatska); mineralno ulje (Bio-Rad, SAD); N, N, N', N' – tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma, SAD); natrijev cijanoborohidrid (Merck, Njemačka); natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate,* SDS) (Sigma, SAD); octena kiselina (Kemika, Hrvatska); otopina za brojanje stanica (IsoFlow Sheath Fluid; Beckman Coulter, UK); serum fetusa goveda (engl. *fetal calf*

serum, FCS) (Invitrogen, SAD); tiourea (Sigma, SAD); trifluoroctena kiselina (TFA) (Merck, Njemačka); tripsin (Invitrogen, SAD); tripsin (Merck, Njemačka); Triton X-100 (Sigma, SAD); Trizma® base (Sigma, SAD); urea (Sigma, SAD); deionizirana voda (diH_2O); pročišćena destilirana voda, otpornost ≥18 MΩ/cm^3 pri 25 °C, ukupna količina ugljika ≤ 5 µg/dm^3 (milliQ).

3.1.3. Puferi i otopine

Inkubacijski pufer (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$); Pufer za lizu stanica (10% inkubacijski pufer, 7% smjesa inhibitora proteaza, 0,1% Triton X-100, *φ*); M1 pufer (7 M urea, 2 M tiourea, 40 g/dm^3 CHAPS); radni pufer (10 g dm^{-3} DTT; 14,28% smjesa inhibitora proteaza, 85,72% M1 pufer; *φ*); Bradfordov reagens (100 g/dm^3 Coomassie Brilliant Blue G-250; 10% fosforna kiselina, 5% etanol; *φ*); pufer za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin; 0,1% SDS; *φ*; pH 8,3); ekvilibracijski pufer (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M urea, 20 g/dm^3 SDS, bromfenol modrilo na vrhu nastavka pipetora; 30% glicerol; *φ*); otopina agaroze (0,5% agaroza, 0,0002% bromfenol modrilo, 95% 5x koncentriran pufer za elektroforezu; *w*); tripsinski pufer (25 mM NH_4HCO_3); otopina za digestiju tripsinom (10 µg/mL tripsina koji je razrijeđen u tripsinskom puferu); ekstrakcijska otopina (50% acetonitril, 45% milliQ voda, 5% TFA; *φ*); otopina matrice CHCA (5 mg/cm^3 CHCA; 50% MeCN, 49,95% milliQ voda, 0,05% TFA; *φ*); DMEM-FCS (50 mL FCS u 450 mL DMEM); otopina cisplatine (500 µg/mL, otapa se u vodi); matična otopina MTT (12,1 mM; 5 mg MTT otopljeno u 1 mL fosfatnog pufera); otopina MTT (10% MTT u DMEM-FCS; *φ*); otopina za zamrzavanje stanica (450 µL DMEM-FCS, 450 µL FCS, 100 µL DMSO); 0,25% otopina tripsina (2,5 g tripsina, 0,01 g streptomicina, 6 mg penicilina, 0,02 g fenol crvenog; pH 7,0 - 7,2).

3.1.4. Uređaji i programska podrška za obradu podataka

Automatski brojač stanica Coulter Counter (Beckman Coulter, UK); Centrifuga za stanice (Heraeus, Njemačka); Inkubator za uzgoj stanica (Heraeus, Njemačka); Kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Klimaoprema, Hrvatska); Spektrofotometar za mikrotitarske pločice StatFax 2100 (Awareness Technology INC, SAD); Svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka); Tresilica Vibromix 301EVT (Tehtnica, Slovenija); termomiješalica Comfort (Eppendorf, Njemačka); centrifuga 5415R (Eppendorf, Njemačka); centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka); vakuum centrifuga 5301 (Eppendorf, Njemačka); tresilica IKA® MS 3 basic,

brzina 200-3000 rpm (IKA, SAD); tresilica GFL® 3006 (GFL® - Gesellschaft für Labortechnik , Njemačka); spektrofotometar BioPhotometer (Eppendorf, Njemačka); PROTEAN IEF cell (Bio-Rad, SAD); IPG trake, Immobiline™ DryStrip 18 cm, pH 3-10 NL (GE Healthcare, Švedska); jedinica za sastavljanje velikih gelova te jedinica za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu; PROTEAN II XL cell (Bio-Rad, SAD); uređaj za napajanje PowerPac™ 3000 (Bio-Rad, SAD); VersaDoc Imaging System, model 4000 (Bio-Rad, SAD); sonifikacijska kupelj SONOREX (Bandelin, Njemačka); Zip-Tip, C18 (Millipore, SAD); 4800 plus MALDI TOF/TOF™ (Applied Biosystems, SAD); MALDI pločica za nanošenje uzoraka (Applied Biosystems, SAD); PDQuest SW, verzija 7.4.0 (Bio-Rad, SAD); Mascot platforma za pretraživanje, verzija 2.4 (Matrix Science, Velika Britanija).

3.2. METODE

3.2.1. RAD SA STANICAMA

3.2.1.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanice su uzgajane u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37 °C uz 5% CO_2, u Petrijevim zdjelicama ili bočicama za uzgoj stanica površine 25 cm^2 (T-25), u hranjivoj podlozi DMEM-FCS. Prilikom presađivanja stanice su isprane 2 puta s po 1 mL otopine tripsina, te odvojene od podloge inkubacijom u 1 mL otopine tripsina tijekom 3 do 5 minuta, što se pratilo svjetlosnim mikroskopom. Nakon odvajanja stanica od podloge, dodano je 5 mL hranjive podloge DMEM-FCS koja zaustavlja djelovanje tripsina i stanice su resuspendirane višestrukim uvlačenjem i ispuštanjem iz pipete. Stanice su brojane automatskim brojačem stanica Coulter Counter, na način da se iz suspenzije stanica uzima 250 μL i pomiješa s 9750 μL tekućine za brojanje (razrjeđenje 40 puta). Prema potrebi stanice se mogu rasaditi u posude za daljnji uzgoj ili smrznuti. Ukoliko se stanice smrzavaju potrebno ih je centrifgurati tijekom 10 min pri 1000 x g, talog stanica resuspendirati u 0,9 mL hladnog DMEM-FCS, prebaciti u ampulice za smrzavanje i pohraniti ih 30 min na ledu. Neposredno prije nego se stanice pohranjuju u zamrzivač pri -80 °C (ili u pare tekućeg dušika) na najmanje 2 sata, dodaje se 100 μL DMSO čija konačna koncentracija iznosi 10%. Za dužu pohranu stanice se odlažu u spremnike s tekućim dušikom u kojima je temperatura -196 °C. Za razliku od

smrzavanja, koje ide postupno, odmrzavanje stanica treba ići naglo. Pri odmrzavanju ampulice sa stanicama su izvađene iz tekućeg dušika, te odmrznute u vodenoj kupelji pri 37 °C i prenesene u posudu za uzgoj s DMEM-FCS zagrijanim na 37 °C.

3.2.1.2. MTT test

MTT test je kolorimetrijska metoda za određivanje vijabilnosti stanica, a temelji se na reakciji redukcije žute topljive tetrazolijeve soli (MTT) u ljubičaste kristale formazana u mitohondrijima. Nastali ljubičasti kristali su topljivi u DMSO, te se mjeri apsorbancija pri 600 nm.

Stanice su nasađene u pločicu s 96 bunarića ($5x10^3$ stanica u svakom bunariću u 180 μL DMEM-FCS), te je dodano po 20 μL citostatika po bunariću. Tri dana nakon izlaganja stanica citostatiku hranjiva podloga se mehanički uklanja sa stanica (naglim okretanjem pločice naopako), te je u svaki bunarić dodano 40 μL otopine MTT i pločica je inkubirana tijekom 3 sata pri 37 °C. Za otapanje kristala formazana dodano je 170 μL DMSO i pločica je stavljena na tresilicu na 400 rpm dok boja nije postala jednolična u svim bunarićima. Apsorbancija je izmjerena na spektrofotometru pri 600 nm. Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja se analiziraju i računa se postotak preživljenja. Od izmjerenih apsorbancija kontrolnih i tretiranih stanica potrebno je oduzeti apsorbanciju slijepe probe (negativna kontrola), te se preživljenje računa na način da se podijele vrijednosti apsorbancija tretiranih stanica s onima kontrolnih stanica.

3.2.2. ANALIZA PROTEINA

3.2.2.1. Izolacija proteina

Ukupni stanični proteini su izolirani iz 10^7 stanica staničnih linija Cal27 i Cal27-2B1. Stanice su bile u obliku taloga u 1,5 mL plastičnim mikroepruvetama, te im je dodano 300 μL pufera za lizu stanica i resuspendirane su na tresilici i centrifugirane (20 min, 10000 rpm, 4 °C). Nakon centrifugiranja izdvojen je supernatant u novu plastičnu mikroepruvetu, te mu je dodano 2 μL RNaze i 15 μL DNaze i inkubiran je 10 min pri 37 °C u termomikseru. Za uklanjanje ionskih nečistoća i lipida korištena je metoda precipitacije acetonom, odnosno na

uzorak je dodano 1500 µL acetona ohlađenog na -20 °C, te je smjesa pohranjena pri -20 °C preko noći. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani (20 min, 10000 rpm, 4 °C), aceton je uklonjen, a talog posušen na zraku i resuspendiran u M1 puferu.

3.2.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Nakon izolacije proteina resuspendiranim talozima određene su koncentracije metodom po Bradfordu. To je spektrofotometrijska metoda, a koristi se otopina boje Coomassie Brilliant Blue G-250, koja prilikom reakcije s bazičnim aminokiselinama u kiselom mediju mijenja boju iz smeđe-crvene u plavu, te se mjeri apsorbancija na 595 nm. Koncentracija proteina se zatim očitava iz baždarne krivulje, dobivene mjerenjem apsorbancija standarda, u ovom slučaju je to albumin iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u koncentracijama: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 i 50 µg/mL.

Napravljeni su triplikati i razrijeđeni s vodom u omjeru 1:100 u ukupnom volumenu 10 µL i dodano im je 100 µL Bradfordovog reagensa, te su na spektrofotometru očitane koncentracije uzoraka.

3.2.3. DVODIMENZIONALNA GEL ELEKTROFOREZA

3.2.3.1. Izoelektrično fokusiranje i ekvilibracija IPG traka

Izoelektrično fokusiranje rađeno je na IPG trakama nelinearnog pH gradijenta 3-10 i dužine 18 cm. Uzorci su nanešeni na način da ukupna masa proteina na gelu bude 700 µg, a ukupni volumen 350 µL, koji uključuje uzorak i radni pufer i dodano mu je bromfenol modrilo na vrhu nastavka pipetora (za praćenje uzorka). Ovako pripremljeni uzorak stavljen je u kadicu za izoelektrično fokusiranje, na koji je položena IPG traka, gelom okrenutim prema dnu kadice, a plus kraj je smješten na anodu. Nakon uklanjanja mjehurića zraka trake se nadsloje s 3 mL mineralnog ulja, koje služi kao zaštita od isušivanja i zagađenja. Kadica je pažljivo umetnuta u uređaj za izoelektrično fokusiranje PROTEAN IEF cell, te su trake rehidrirane (14 sati, 50 V, 20 °C), odnosno uzorak je ušao u gel. Kada je rehidracija završena, pod krajeve traka na elektrodama su umetnuti komadići filter papira natopljeni s vodom, te je pokrenuto izoelektrično fokusiranje prema navedenim uvjetima (Tablica 1).

Tablica 1. Uvjeti izoelektričnog fokusiranja.

Korak	Porast napona	Ostvareni napon / V	Trajanje / min	Trajanje / V h
1	Spori	200	75	-
2	Spori	500	15	-
3	Brzi	500	60	-
4	Spori	1000	15	-
5	Brzi	1000	60	-
6	Spori	7000	240	-
7	Brzi	7000	-	90000
8	brzi	500	1440 (max. 24h)	-

Po završetku izoelektričnog fokusiranja IPG trake se pažljivo vade iz kadice i ukloni se višak mineralnog ulja sa strane suprotne od gela. Da bi bile spremne za elektroforezu potrebno je bilo ekvilibrirati ih. Sam proces se sastoji od inkubacije na tresilici 15 min u epruveti u kojoj se nalazi ekvilibracijski pufer s 10 mg/L DTT-a, koji reducira disulfidne mostove. Zatim se inkubiraju dodatnih 15 min na tresilici u epruveti s ekvilibracijskim puferom i 25 g/L IAA, koji sprječava ponovni nastanak disulfidnih mostova. Tokom cijelog procesa važno je pažljivo rukovati s trakama i paziti da se gelom ne dotaknu stijenke epruveta.

3.2.3.2. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza

Nakon razdvajanja proteina na temelju pI vrijednosti na IPG trakama, oni se razdvajaju prema masi u drugoj dimenziji, SDS gel elektroforezi u denaturirajućim uvjetima. Uređaj za elektroforezu se sastavlja prema uputama proizvođača, a stakla je potrebno prethodno oprati tehničkim etanolom i ostaviti da se dobro posuše. Za elektroforezu su izlivena dva 12% poliakrilamidna gela, debljine 1 mm i veličine 20 x 18 cm (60 mL smjese akrilamid/bisakrilamid; 50,2 mL milliQ vode; 37,5 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 3 mL 100 g/dm^3 otopine SDS; 30,8 %T, 2,67 %C). Također, od te smjese izdvojeno je 6 mL kako bi se pripremili brzopolimerizirajući gelovi, koji se ulijevaju prije cjelokupne smjese da bi se spriječilo curenje, a dobiju se dodatkom 50 μL 10% APS i 20 μL TEMED. Nakon što se ovaj sloj stvrdne, smjesi za gelove se dodaje 750 μL 10% APS i 75 μL TEMED, te se pipetorom

smjesa izlijeva između stakala sve dok se prostor u potpunosti ne ispuni. Zatim se gelovi nadslojavaju n-butanolom kako bi se spriječio pristup kisiku površini gela, što usporava polimerizaciju gela, te da bi površina gela bila ravna. Nakon što su gelovi polimerizirali n-butanol se izlije, te se površina gelova ispire miliQ vodom, te se filtar papirom osuše. Gelovi s držačima se potom postavljaju na sustav za elektroforezu, na način da je manje staklo s unutrašnje strane. IPG trake se pincetom vade iz otopine IAA, te se nekoliko puta umoče u menzuru u koju smo prethodno ulili *running buffer*, te se kratko posuše i okrenu da je natpis na traci s lijeve strane i da se može pravilno pročitati. Zatim se IPG traka prislanja na veće staklo, dok je gel okrenut prema manjem staklu i spatulom s ravnim krajem se pogura kako bi došao na površinu gela. Eventualni mjehurići zraka se istisnu. Potom se ulijeva 3-4 mL agaroze kako bi se preostali zrak uklonio i kako bi se dodatno povezalo traku s gelom i olakšao prijelaz proteina u gel. Kada se agaroza ispolimerizirala, sustav s gelovima se prebacuje u kadicu za elektroforezu. Između gelova se izlijeva oko 100 mL pufera za elektroforezu, dok se ostatak (oko 1500 mL) izlijeva u kadu pored držača. Stavlja se poklopac, te se cijeli sustav spaja na vodu za hlađenje i na izvor struje, te se pokreće elektroforeza prema navedenim uvjetima (Tablica 2.)

Tablica 2. Uvjeti SDS poliakrilamidne elektroforeze u 2-DE. (* trajanje koraka ovisi o brzini gibanja proteina kroz gel, zaustavlja se kada proteini dođu do ruba)

Korak	Jakost struje / mA	Trajanje / min	Trajanje/ V sati
SO1	15	60	-
SO2	20	-	600
SO3	30	300*	-

3.2.3.3. Bojanje i analiza gelova

Nakon završene elektroforeze sustav se rastavlja, te se gelovi pažljivo vade rastavljanjem stakala, na način da se manje staklo ukloni, te gel ostane na većem staklu. IPG traka se ukloni s površine gela, te se zareže gornji kut gela (na kojem je bio + kraj trake) kako bi se označio početak. Gelovi se zatim prebacuju u posude s 300 mL koloidne otopine boje Coomassie Brilliant blue (0,1% Coomassie Brilliant Blue G250, 10% amonijev sulfat; w; 2% orto-fosforna kiselina; φ), koja je pomiješana s metanolom (80% otopine boje, 20% metanola;

φ). Posude s gelovima stavljaju se na tresilicu, te se gelovi bojaju preko noći. Idući dan boja se izlijeva iz posude, te se gelovi ispiru nekoliko puta u milliQ vodi i ostavljaju u vodi preko noći kako bi se odbojali.

Kada su gelovi odbojani, snimljeni su i analizirani uređajem za analizu (VersaDoc Imaging System, model 4000), te su pomoću računalnog programa za analizu dvodimenzionalnih gelova PDQuest SW, verzija 7.4.0. denzimetrijski i kvantitativno obrađeni. Za normalizaciju korištena je metoda ukupne gustoće na slici gela (engl. *Total Density in Gel Image*), kod koje se zbrajaju vrijednosti optičkih gustoća svih točaka unutar slike. Analizom slika gelova odabrane su proteinske mrlje u kojima se gustoće značajno razlikuju (koncentracije proteina koje se razlikuju više od 1,5x) i izrezane za daljnju analizu.

3.2.3.4. Izrezivanje i odbojavanje proteinskih mrlja

Proteinske mrlje se izrezuju iz gela na način da se nastavak za pipetor odreže na prosječnu veličinu mrlje, te se pomoću njega izrezuju odabrana mjesta iz gela. Izrezani komadići se potom prebacuju u mikroepruvetu s 500 µL otopine za odbojavanje, te se inkubiraju preko noći na termomiješalici (500 rpm, 25 °C). Komadići gela koji se nisu odbojali na ovaj način se dodatno odbojavaju izmjenom otopine i inkubacijama u mikrovalnoj pećnici (90 W, 5 min) sve dok se ne odbojaju u potpunosti.

3.2.3.5. Digestija proteina u gelu i derivatizacija uzoraka

Kada su komadići gela u potpunosti odbojani otopina se uklanja, i dodaje se 500 µL otopine 50 mM NH_4HCO_3 i inkubira se 5 min na tresilici (500 rpm, 25 °C). Otopina se uklanja, te se dodaje novih 500 µL i ponavlja se inkubacija od 5 min, te se nakon druge izmjene otopine inkubira 30 min. Otopina se uklanja, a u mikroepruvete se dodaje 500 µL otopine 50 mM NH_4HCO_3 i MeCN u omjeru 1:1, te se inkubira 30 min na tresilici (500 rpm, 25 °C). Nakon inkubacije otopina se uklanja, te se dodaje 100 µL MeCN i gelovi se inkubiraju sve dok se ne smanje i ne pobijele, kada se uklanja MeCN, a komadići se posuše u vakuum centrifugi. Mikroepruvete se potom pažljivo vade iz centrifuge i prebacuju u nove plastične mikroepruvete volumena 100 µL , gdje se na njih dodaje 10 µL otopine za digestiju tripsinom (po ptrebi moguće i više, važno je da gelovi budu u potpunosti prekriveni), te se inkubiraju 18 sati na termomiješalici (400 rpm, 37 °C). Otopine se zatim odvajaju u posebne mikroepruvete i suše u vakuum centrifugi, a komadićima gela dodaje se 10 µL ekstrakcijske

otopine i inkubiraju se 30 min u ultrazvučnoj kupelji, te dodatnih 15 min na termomiješalici (500 rpm, 25 °C). Ekstrakti se dodaju u mikroepruvete na posušene digestijske otopine i posuše se u vakuum centrifugi.

Nakon digestije proteina u gelu, u mikroepruvetama se nalaze sasušeni talozi peptida, koje je potrebno derivatizirati prije spektrometrije masa. Derivatizacija peptida ili CAF (engl. *Chemically Activated Fragmentation*) radi se u svrhu obilježavanja amino-terminusa peptida. Derivatizacijska smjesa napravljena je miješanjem 1:1 otopina 8 mg/mL 5-formil-1,3-benzendisulfonične kiseline dinatrijeve soli hidrat 4-sulfofeniltioizocijanata u 10 mM KH_2PO_4 puferu i 12 mg/mL natrijevog cijanoborohidrida u 10 mM KH_2PO_4 puferu, a dodana je u volumenu od 20 µL na talog peptida. Nakon dodavanja otopine uzorci su inkubirani u mikrovalnoj pećnici (90 W, 3 x 4 min), te su posušeni u vakuum centrifugi.

3.2.3.6. Pročišćavanje peptida tehnikom Zip-Tip

Peptidne fragmente je nakon derivatizacije potrebno pročistiti od nečistoća i soli, koji mogu negativno utjecati na rezultate spektrometrije masa. Pročišćavanje se radi metodom Zip-Tip, gdje se koriste specijalni nastavci za pipetor, koji sadrže kromatografske kolone sa ugljikovodičnim lancima dužine 18 ugljikovih atoma (C18). Suhi talozi peptida resuspendirani su u 10 µL otopine 0,1 % amonijevog formijata (AF). Prvi korak je kondicioniranje kolone, odnosno ispiranje uvlačenjem 5 puta po 10 µL prve otopine (80% MeCN, 20% voda, 0,1% AF; φ). Zatim slijedi uvlačenje 3 puta po 10 µL druge otopine (50% MeCN, 50% voda, 0,1% AF; φ), te 3 puta po 10 µL treće otopine (0,1% AF; φ). Slijedi vezanje peptida na kolonu, odnosno uvlači se i ispušta 10 puta po 10 µL otopine uzorka. Idući korak je ispiranje u kojem se uvlači 3 puta po 10 µL treće otopine, te se ponavlja uvlačenje i ispuštanje uzorka 10 puta po 10 µL i ispiranje, 5 puta po 10 µL treće otopine. Kada je uzorak ispran, eluira se s kolone na način da se uvuče 10 µL prve otopine, te se u novoj mikroepruveti taj volumen izvlači i uvlači 10 puta kako bi se osiguralo da cijeli uzorak izađe s kolone. Peptidi su osušeni u vakuum centrifugi kako bi se dobio suhi talog.

3.2.3.7. Spektrometrija masa i bioinformatička analiza

Suhi peptidni talozi resuspendirani su u 4 µL otopine matrice CHCA, te su nakapani na MALDI pločicu u duplikatima po 2 µL. Za internu kalibraciju koriste se peptidni fragmenti nastali autolizom tripsina. Na MALDI TOF/TOF uređaju snimljeni su MS spektri uzoraka u

pozitivnom i negativnom načinu rada, te su odabrani fragmenti za MS/MS analizu, prema parametrima u tablici 3. Na temelju dobivenih MS i MS/MS spektara pretražena je baza podataka NCBInr i identificirani su proteini na temelju sekvenci peptida.

Tablica 3. Parametri MALDI-TOF/TOF analize

Tip analize	**MS-**	**MS/MS+**	**MS/MS-**
Detekcija iona	Negativna	Pozitivna	Negativna
Zrcalo	Reflektron	Reflektron	Reflektron
Broj snimaka po spektru	1000	2000	2000
Raspon masa/Da	1000-4000	9-3833	9-3833
Vrijeme odziva/ns	500	400	400

4. REZULTATI

4.1. Opis modela

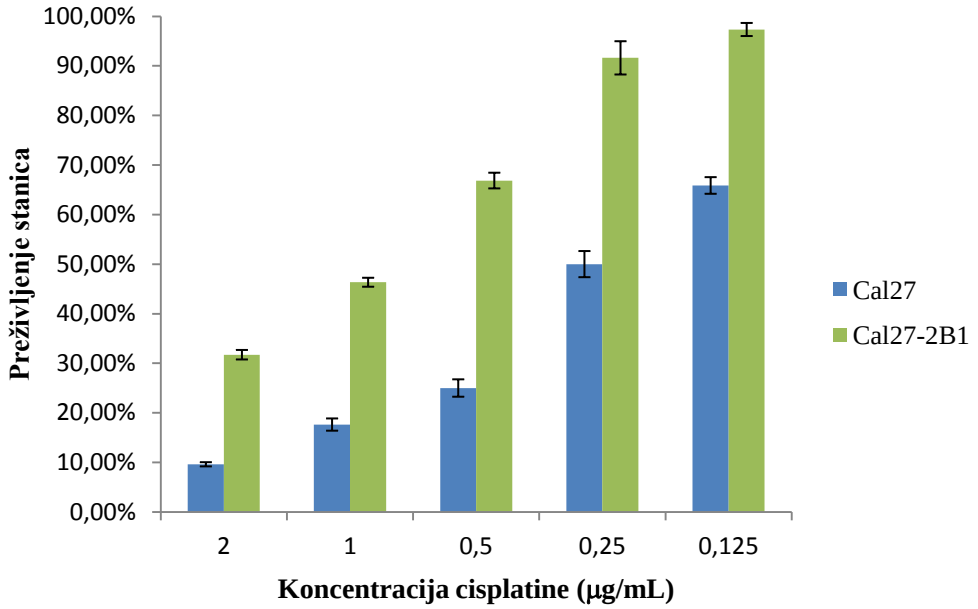
Kako bi istražili utjecaj *de novo* ekspresije integrina αvβ3 na osjetljivost stanica Cal27 na kemoterapeutike u grupi Ambriović-Ristov izrađena je doktorska disertacija (Stojanović, 2014) u kojoj je konstruiran Cal27 stanični model kojeg čine: stanice Cal27, kontrolni transfektant stanica Cal27 stabilno transficiran plazmidom pcDNA3, te dva klona Cal27-2B1 i Cal27-2B3 stabilno transficirani plazmidom pcDNA3 koji sadrži gen za podjedinicu integrina β3. Pokazano je da integrin β3-stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na kontrolni klon Cal27-ϕ i stanice Cal27: (i) eksprimiraju integrin αvβ3; (ii) eksprimiraju povećanu količinu integrina αvβ5; (iii) pokazuju jednaku brzinu proliferacije; (iv) povećano adheriraju na vitronektin i fibronektin; (v) imaju smanjenu migratornu sposobnost; (vi) pokazuju povećanu otpornost na citostatike koji djeluju na molekulu DNA; (vii) eksprimiraju smanjenu količinu ukupnog Src, pSrc i povećanu količinu ILK. Slijedom eksperimenata je pokazano da povećana ekspresija ILK nije uključena u mehanizam otpornosti na kemoterapeutike, već je za to odgovorna smanjena količina pSrc.

Ovaj diplomski rad, čiji je cilj diferencijalnom proteomskom analizom, primjenom dvodimenzionalne gel elektroforeze u sprezi sa spektrometrijom masa, istražiti razlike u ekspresiji proteina u Cal27 staničnom modelu, izrađen je na stanicama Cal27 i jednom integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1.

4.2. Integrin β3-stabilno transficirani klon Cal27-2B1 pokazuje povećanu otpornost na cisplatinu

Kako bi potvrdili da su stanice Cal27-2B1 otporne na cisplatinu korišten je MTT test. Mjereno je preživljenje stanica Cal27 i integrin β3-stabilno transficiranog klona Cal27-2B1 u različitim koncentracijama cisplatine (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 μg/mL).

Rezultati mjerenja prikazani su na slici 9. Iz histograma je vidljivo kako klon Cal27-2B1 pokazuje povećanu otpornost na djelovanje cisplatine u odnosu na stanice Cal27.

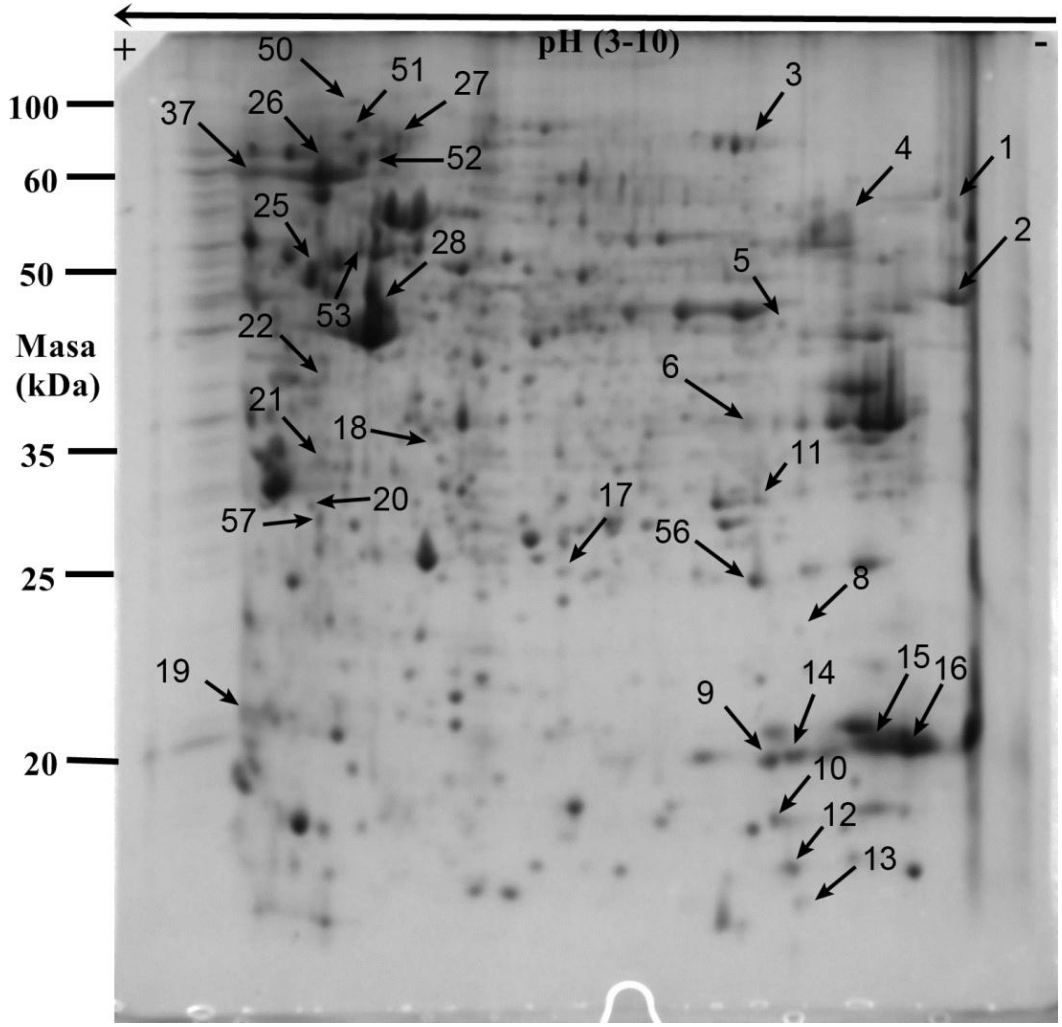


Slika 9. Preživljenje stanica Cal27 i integrin β3-stabilno transificiranog klona Cal27-2B1 tretiranih cisplatinom koncentracija 2, 1, 0,5, 0,25 i 0,125 µg/mL. Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića i tretirane cisplatinom u navedenim koncentracijama. Nakon 72 sata preživljenje stanica određeno je MTT testom.

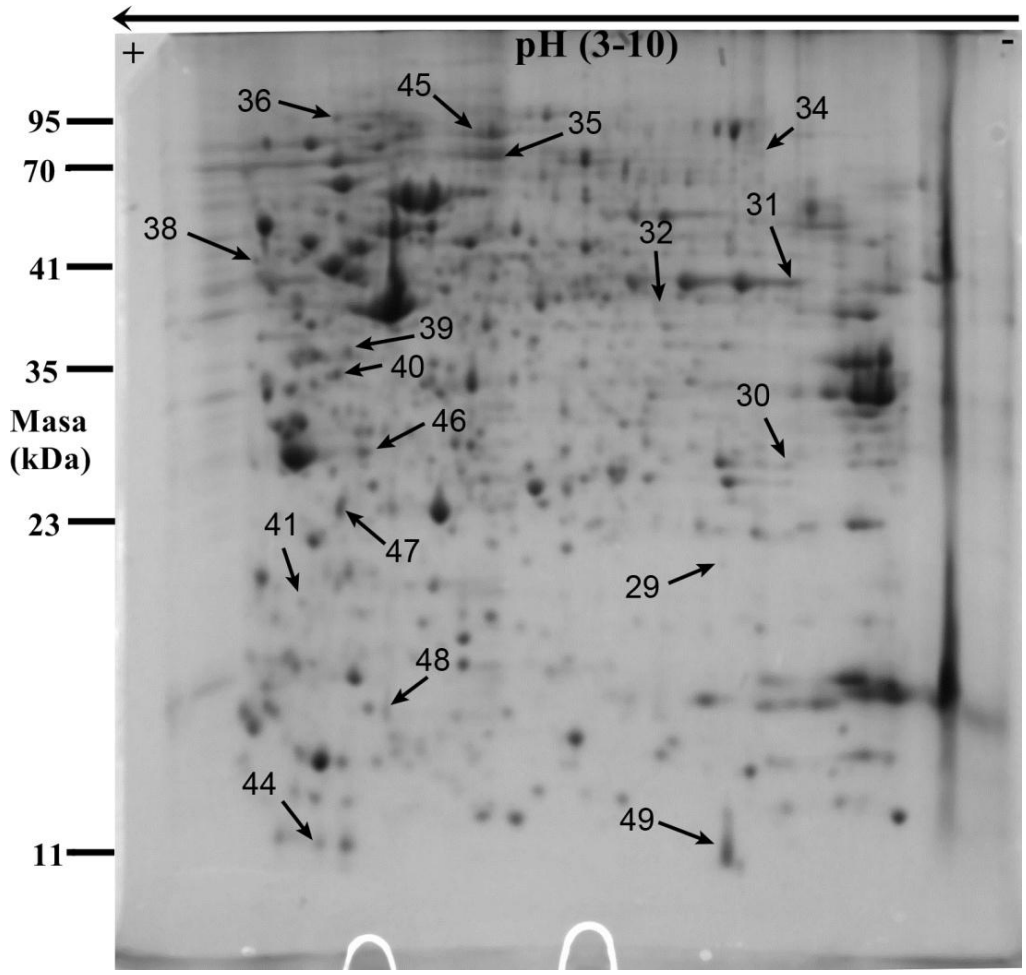
4.3. 2D-PAGE analiza pokazala je da postoje razlike u ekspresiji proteina u stanicama Cal27 i klonu Cal27-2B1

Nakon potvrde otpornosti stanica Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 na cisplatinu, stanice Cal27 i Cal27-2B1 su lizirane i izolirani su ukupni proteini kojima je određena koncentracija metodom po Bradfordu. Iz uzorka s 10^7 stanica koje su lizirane u 300 µL pufera za lizu dobiveni su lizati proteina koncentracije 9,97 mg/mL za staničnu liniju Cal27, odnosno 10,30 mg/mL za klon Cal27-2B1. Proteini (ukupno 700 µg) su razdvojeni dvodimenzionalnom gel elektroforezom, te su poliakrilamidni gelovi obojani koloidnom otopinom boje Coomassie Brilliant Blue. Gelovi su slikani uređajem za analizu gelova VersaDoc Imaging System, te su pomoću računalnog programa PDQuest analizirani i

određene su proteinske mrlje od interesa, koje su zatim izrezane. Slike 10. i 11. prikazuju obojene i analizirane gelove nakon 2D-PAGE. Za nastavak istraživanja odabrane su mrlje gustoća koje se razlikuju između gelova (određena gustoća proporcionalna je količini proteina u mrlji, tako da se gledaju proteini kojima se razlikuje ekspresija).



Slika 10. Poliakrilamidni gel dobiven 2D-PAGE analizom ukupnih staničnih proteina stanica Cal27. U prvoj dimenziji (IEF) proteini su razdvojeni prema pI vrijednostima (skala prikazana iznad gela), dok su u drugoj dimenziji (SDS-PAGE) razdvojeni prema molekulskim masama (skala lijevo od gela). Brojevi i strjelice označavaju proteinske mrlje odabrane za izrezivanje i identifikaciju proteina.



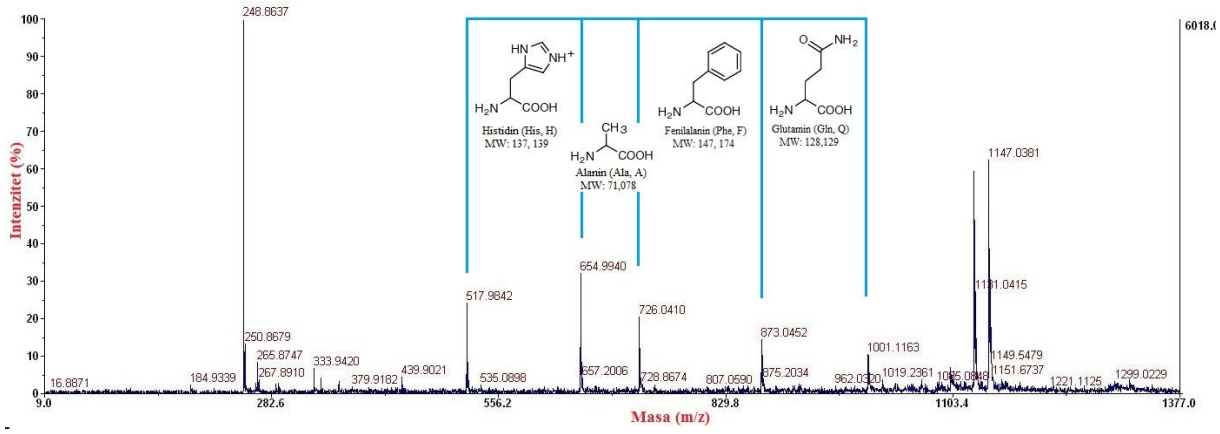
Slika 11. Poliakrilamidni gel dobiven 2D-PAGE analizom integrin β3-stabilno transficiranog klona Cal27-2B1. U prvoj dimenziji (IEF) proteini su razdvojeni prema pI vrijednostima (skala prikazana iznad gela), dok su u drugoj dimenziji (SDS-PAGE) razdvojeni prema molekulskim masama (skala lijevo od gela). Brojevi i strjelice označavaju proteinske mrlje odabrane za izrezivanje i identifikaciju proteina.

4.4. Proteini kojima je otkrivena razlika u ekspresiji identificirani su spektrometrijom masa

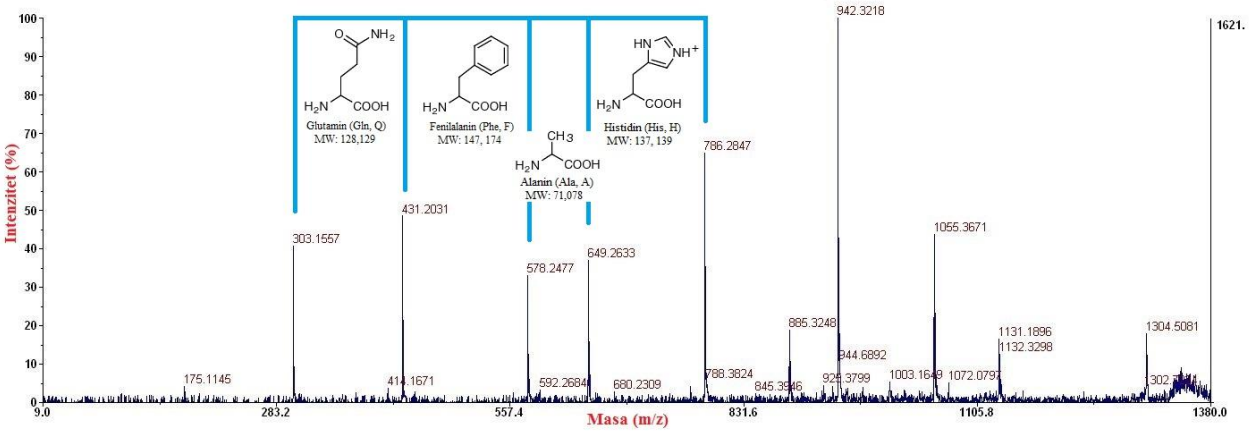
Kako bi se identificirali proteini kojima se razlikuju ekspresije u staničnim linijama Cal27 i Cal27-2B1 izolirani su ukupni stanični proteini, koji su potom razdvojeni dvodimenzionalnom elektoforezom, te su proteinske mrlje po kojima se razlikuju gelovi izrezane i proteini su razgrađeni na peptidne fragmente. Peptidni fragmenti su identificirani spektrometrijom masa i određeno je o kojim se proteinima radi. Važno je napomenuti kako je

eksperiment rađen samo jednom, te su prikazani rezultati analize isključivo preliminarni, tako da prikazani proteini predstavljaju samo prvi uvid u razlike ovih stanica, te ne daju konačan odgovor o promjenama koje su se dogodile u stanicama otpornima na kemoterapeutike.

Peptidni fragmenti analizirani su uređajem MALDI-TOF/TOF na način da su snimljeni spektri peptidnih fragmenata (MS analiza), te su odabrani peptidi koji su dodatno pocijepani na manje fragmente unutar uređaja (MS/MS analiza). Obzirom na derivatizaciju uzorka, snimljeni su spektri u pozitivnom i negativnom načinu rada, koji su računalno obrađeni kako bi se dobila sekvenca peptidnog fragmenta. Prilikom obrade određuju se aminokiselinski sljedovi, te je važno da su oni zrcalni u spektrima istih fragmenata. Primjer analize prikazan je slikama 12. i 13.



Slika 12. Spektar dobiven analizom peptidnog fragmenta u negativnom načinu rada. Visina signala odgovara intenzitetu, a računa se u odnosu na intenzitet osnovnog signala. Na slici su označene razlike u masama koje odgovaraju pojedinim aminokiselinama, te je aminokiselinski slijed dijela fragmenta prikazanog na slici HAFQ.



Slika 13. Spektar dobiven analizom peptidnog fragmenta u pozitivnom načinu rada. Visina signala odgovara intenzitetu, a računa se u odnosu na intenzitet osnovnog signala. Na slici su označene razlike u masama koje odgovaraju pojedinim aminokiselinama, te je aminokiselinski slijed dijela fragmenta prikazanog na slici QFAH.

Analizom peptidnih fragmenata i pretragom baza podataka otkriveno je o kojim se proteinima radi, te su oni više eksprimirani u stanicama Cal27 prikazani u Tablici 4., dok su proteini više eksprimirani u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 prikazani u Tablici 5. Kao što je vidljivo u tablicama, u nekim mrljama se nalazi po jedan, dva ili tri proteina, dok su neki neidentificirani (engl. *unnamed protein product*). U ovim slučajevima provedena je analiza pomoću računalnog programa BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool,* http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), koji pretražuje bazu podataka prema sekvenci proteina, te pronalazi homologe, odnosno proteine koji imaju najsličniju strukturu, te su imena tih proteina navedena u zagradi. Nadalje, u slučaju više proteina može se raditi o dimerima, nekovalentnim partnerima ili pak različitim proteinima iste ili slične mase i pI vrijednosti, te su svi rezultati uzeti u obzir kod tumačenja rezultata. Zamijećeno je i da se isti proteini pojavljuju na različitim mjestima u gelu, što može biti rezultat njihovih posttranslacijskih modifikacija, koji im mijenjaju masu ili izoelektričnu točku (u tumorskom tkivu je naročito prisutna glikozilacija).

Tablica 4. Popis identificiranih proteina iz stanica Cal27. Navedeni proteini izdvojeni su nakon 2D-PAGE ukupnih staničnih proteina linije Cal27, te su za njih utvrđene povećane ekspresije, odnosno njima je smanjena ekspresija u staničnoj liniji Cal27-2B1. U tablici su navedene informacije o mjestu na MALDI pločici, oznaku izrezanog mjesta na gelu (Spot; brojevi odgovaraju pozicijama na Slici 10), nazivu proteina, njegovom pristupnom broju, molekulskoj masi, pI, te Fold change. (*odnos između količine proteina između gelova, izražava se u pikselima prema površini mrlje. Diferencijalno eksprimirani proteini imaju Fold Change vrijednost ≥ 1.5, te P vrijednost < 0.05)

MALDI	Spot	Ime proteina	Pristupni broj (gi)	Mr (Da)	pI	Fold Change*
I1	1	Elongation factor 1-alpha 2 (EEF1A2) unnamed protein product (EEF1A1)	4503475 31092	50.471 50.127	9,1 9,1	3.663-
I2	2	Elongation factor 1-alpha 2 (EEF1A2) unnamed protein product (EEF1A1)	4503475 31092	50.471 50.127	9,1 9,1	1.556-
I3	3	Elongation factor 2	4503483	95.339	6,4	1.672-
I4	4	Pyruvate kinase	35505	57.878	7,6	2.383-
I5	5	Fumarate hydratase, mitochondrial	19743875	54.637	8,8	12.283-
I6	6	Annexin A2	16306978	38.618	7,6	2.388-
I8	8	Biliverdin-IX beta reductase isozyme I	544759	21.860	7,3	-
I9	9	Cypa Complexed With Hagpia	2981729	17.881	7,8	2.388-
I10	10	Profilin-1 Ubiquitin-like protein ISG15 precursor	4826898 4826774	15.054 17.888	8,4 6,8	4.366-
I11	11	Carbonic anhydrase II	300508602	29.233	6,5	2.266-
I12	12	Macrophage Migration Inhibitory Factor Macrophage Migration Inhibitory Factor 2	27065391 329666047	12.345 12.581	8,2 7,3	3.137-
I13	13	Protein S100-A10 (p11)	4506761	11.203	6,8	-
I14	14	Cypa Complexed With Hagpia	2981729	17.881	7,8	2.455-
I15	15	Destrin isoform a	5802966	18.506	8,1	1.527-
I16	16	Nm23 protein	35068	20.412	7,1	1.758-
I17	17	HMG-1 unnamed protein product (ASC)	184251 7020147	24.984 16.521	5,4 5,1	2.212-
I18	18	Annexin A8	49257004	36.895	5,6	-
I19	19	Ribosomal S17	119580409	15.602	9,6	4.780-
I20	20	CAPNS1 protein	15080279	33.786	5,8	1.614-
I21	21	EF-hand domain-containing protein D2 14-3-3 protein epsilon YWHAZ protein, partial	20149675 5803225 30354619	26.698 29.174 35.336	5,2 4,6 7,0	7.446-
I22	22	C protein unnamed protein product (EEF1D)	306875 189067253	31.976 71.450	5,1 6,0	3.185-
J1	25	Beta-tubulin	338695	49.579	4,8	-
J2	26	TNF-1 receptor associated protein 90kDa heat shock protein unnamed protein product (HSP90)	687237 306891 32488	75.343 83.295 84.674	8,4 5,0 4,9	1.661-
J3	27	Alpha actinin 4	2804273	102.269	5,3	1.695-
J4	28	Actin, cytoplasmic 1	4501885	41.737	5,3	1.503-

J13	37	90kDa heat shock protein	306891	83.295	5,0	1.875-
		unnamed protein product (HSP90)	32488	84.674	4,9	
M7	50	Oxygen regulated protein precursor variant	62897071	111.280	5,1	2.515-
M8	51	APG-2	4579909	94.301	5,2	1.531-
		Antigen NY-CO-25	3170190	98.498	5,3	
M9	52	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	6005942	89.323	5,1	1.791-
M10	53	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	41399285	61.055	5,7	3.351-
M13	56	Karyopherin Beta2-Ran Nuclear Tr. Complex	5107637	24.369	7,0	2.765-
		unnamed protein product (Mn superoxide dismutase)	34711	24.721	8,7	
M14	57	Rho GDP dissociation inhibitor	36038	23.193	5,0	-

Tablica 5. Popis identificiranih proteina iz integrin β3-stabilno transficiranog klona Cal27-2B1. Navedeni proteini izdvojeni su nakon 2D-PAGE ukupnih staničnih proteina linije Cal27-2B1, te su za njih utvrđene povećane ekspresije u odnosu na stanice Cal27. U tablici su navedene informacije o mjestu na MALDI pločici, oznaku izrezanog mjesta na gelu (Spot; brojevi odgovaraju pozicijama na Slici 10), nazivu proteina, njegovom pristupnom broju, molekulskoj masi, pI, te Fold change. (*odnos između količine proteina između gelova, izražava se u pikselima prema površini mrlje. Diferencijalno eksprimirani proteini imaju Fold Change vrijednost ≥ 1.5, te P vrijednost < 0.05)

MALDI	Spot	Ime proteina	Pristupni broj (gi)	Mr (Da)	pI	FC*
J5	29	PEST-containing nuclear protein	9966827	18.925	6,9	+
J6	30	phosphoglycerate mutase 1	4505753	28.804	6,7	+
		carbonic anhydrase II	300508602	29.233	6,5	
J7	31	2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase	693933	47.109	7,0	+
J8	32	squamous cell carcinoma antigen	239552	44.535	6,3	2.562+
J10	34	FUBP1 protein	16878077	68.605	6,8	1.972+
J11	35	90kDa heat shock protein	306891	83.295	5,0	1.501+
		unnamed protein product (HSP90)	32488	84.674	4,9	
J12	36	90kDa heat shock protein	306891	83.295	5,0	1.511+
		unnamed protein product (HSP90)	32488	84.674	4,9	
J14	38	26S proteasome:SUBUNIT=5a	1587697	40.822	4,7	+
J15	39	C protein	306875	31.976	5,1	1.837+
		WD-40 repeat protein	4519417	38.497	4,9	
J16	40	unnamed protein product (EEF1D)	189067253	71.450	6,0	1.500+
		thioredoxin-like protein 1	4759274	32.252	4,8	
J17	41	proteasome LMP2.s	896224	22.328	4,9	+
J20	44	protein S100-A2	5174661	10.986	4,7	1.947+
M1	45	KIAA0088	577295	106.770	5,7	1.851+
		endoplasmin precursor	4507677	92.470	4,8	
M2	46	14-3-3 protein/cytosolic phospholipase A2, partial	4262000	7.957	8,2	2.387+
		proteasome subunit alpha type-3 isoform 1	4506183	28.433	5,2	

M3	47	rho GDP dissociation inhibitor	36038	23.193	5,0	1.587+
M4	48	coactosin-like protein	21624607	15.945	5,5	4.821+
M5	49	unnamed protein product (protein S100-A8)	29888	10.938	9,2	1.896+

Analizom dobivenih podataka i pretragom relevantne literature odabrano je 17 od 56 diferencijalno eksprimiranih proteina koji su u tablici označeni svijetlo plavom bojom, a koji će biti raspravljeni u nastavku. Kriterij za odabir bila je značajnija razlika u ekspresiji tih proteina između stanica Cal27 i klona Cal27-2B1. Odabrani su proteini kojima je FC vrijednost „+“ i „-“, što označava kako su oni izolirani i identificirani samo u jednom tipu stanica, te oni kojima je FC vrijednost ≥ 2,5. Važno je za napomenuti da proteini koji su identificirani samo u stanicama Cal27 (FC oznaka „+“) ili klonu Cal27-2B1 (FC oznaka „-“) nisu nužno eksprimirani samo u tim stanicama. Zbog osjetljivosti metode i jednog ponavljanja eksperimenta za njih se može reći samo kako im je povećana ekspresija u jednoj liniji. Kako je već spomenuto, na položaj proteina u 2D gelu utječu posttranslacijske modifikacije i partneri s kojima se proteini povezuju, tako da je moguće da su te razlike nastale zbog različitog razmještaja istog proteina u gelu. Nadalje, proteinske mrlje koje sadržavaju više od jednog proteina nisu uzete u razmatranje, iz razloga što se ne može precizno odrediti kolika je FC vrijednost pojedinog proteina (jedini način određivanja bila bi analiza spektara masa, kada bi se ekstrapolacijom iz intenziteta signala moglo odrediti ima li nekog proteina u mrlji više ili manje nego drugog).

5.RASPRAVA

Integrini su heterodimerni transmembranski receptori koji se sastoje od jedne α i jedne β podjedinice, te povezuju stanice s proteinima ECM. Otkriveno je 18 α i 8 β podjedinica integrina, a kombinacije koje nastaju njihovim povezivanjem (ukupno 24 različita heterodimera) određuju vezanje i afinitet receptora za određene proteine ECM. Zbog velikog broja interakcijskih partnera uključujući adaptorne i signalne molekule integrini su ključne molekule u povezivanju staničnog citoskeleta s izvanstaničnim prostorom, te putem aktivacije signalnih kaskada utječu na preživljenje stanice i migraciju. Integrini su često prekomjerno eksprimirani na stanicama različitih tumora, te su zbog toga prepoznati kao potencijalne ciljne molekule za terapiju. Naročito su važni u tumorima koji potječu od epitelnih stanica (Eke i Cordes, 2014).

Stojanović je u svome radu (2014) istražila utjecaj *de novo* ekspresije integrina αvβ3 u stanicama karcinoma pločastog epitela čovjeka Cal27. Stabilnom transfekcijom plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β3 izdvojila je klon Cal27-2B1 za koji je utvrdila da je otporan na djelovanje pet kemoterapeutika čiji je zajednički mehanizam djelovanja oštećenje DNA (cisplatina, etopozid, mitomicin C, doksorubicin, 5-fluorouracil). Pokazala je da je u klonu Cal27-2B1 došlo do promjena u dvije kinaze koje se nalaze u fokalnim adhezijama: povećane količine ILK i smanjene količine ukupnog Src i pSrc (Y418). Pokusima utišavanja ILK u klonu Cal27-2B1 pokazala je da promjena u ekspresiji ILK nije odgovorna za primijećeni mehanizam otpornosti. Međutim u stanicama Cal27 utišavanjem ukupne količine Src, čime dolazi i do umjerenog smanjenja pSrc (Y418), te pokusima inhibicije fosforilacije pSrc (Y418) dasatinibom, čime se imitira promjena nastala *de novo* ekspresijom integrina αvβ3 u klonu Cal27-2B1, pokazala je da je za otpornost na kemoterapeutike odgovorna promjena u količini fosforiliranog oblika Src (Y418). Ovaj rezultat, iako neočekivan jer se u literaturi uglavnom povećanje ekspresije pSrc (Y418) povezuje s otpornošću na terapiju, u skladu je sa zamijećenom smanjenom migratornom sposobnosti klona Cal27-2B1. Cilj ovog diplomskog rada je diferencijalnom proteomskom analizom otkriti proteine uključene u promijenjene signalne puteve *de novo* ekspresijom integrina αvβ3. Na temelju dobivenih rezultata, pretragom relevantne literature, izdvojeni su proteini

koji bi mogli biti uključeni u spomenute promjene u osjetljivosti na kemoterapeutike i migraciji Proteini su svrstani u četiri skupine: (i) identificirani samo u stanicama Cal27, (ii) povećano eksprimirani u Cal27; (iii) identificirani samo u klonu Cal27-2B1 i (iv) povećano eksprimirani u Cal27-2B1. Zbog niske rezolucije i osjetljivosti korištene metode, za proteine koji su otkriveni samo u jednoj staničnoj liniji ne može se sa sigurnošću reći kako ih u drugoj nema, već samo da su povećano eksprimirani.

U stanicama Cal27 identificiran je protein biliverdin-IX reduktaza (BVR), koji nije pronađen u klonu Cal27-2B1. To je enzim koji reducira molekulu biliverdin-IXa, koja nastaje kao produkt razgradnje hema. U stanici, osim navedene uloge, BVR obavlja i funkciju fosforilacije proteina i to kao kinaza dvostruke specifičnosti, a signalni putevi u kojima sudjeluje su potaknuti inzulinom. Jedan od njih je signalni put MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*), koji se povezuje s transkripcijskom i mitogenom ulogom koju inzulin ima na stanicu, te PI3K put, koji potiče metabolizam stanice. Otkriveno je i da regulira protein kinazu C (engl. *protein kinase C,* PKC), koja povezuje ova dva signalna puta (Maines, 2005). Prema dostupnoj literaturi ovaj se protein ne povezuje izravno s osjetljivosti na citostatike ili migratornom sposobnosti stanice već sudjeluje u signalnim putevima čija je deregulacija jedno od glavnih obilježja tumorskih stanica. Prema tome nije moguće zaključiti može li se promjena u ekspresiji protein BVR povezati s *de novo* ekspresijom integrina $\alpha v\beta 3$.

Još jedan od proteina identificiranih samo u stanicama Cal27 je p11 (S100-A10). Ovaj je protein poznati partner aneksina A2, za koji je u istom pokusu pronađena 2,39 puta veća ekspresija u stanicama Cal27 u odnosu na klon Cal27-2B1. S100A10 otkriven je kao supstrat transformirajuće protein kinaze Rousovog virusa sarkoma ($pp60^{v\text{-}Src}$), te su istraživanja pokazala kako obavlja više različitih funkcija u stanici. Primarna funkcija S100A10 je povezivanje s aneksinom A2, prilikom čega dolazi do stvaranja molekularnog kompleksa koji je lokaliziran na staničnoj membrani i, između ostaloga, sudjeluje u procesu zgrušavanja krvi preko proteina plazmina. Nadalje, pokazano je kako stimulira translokaciju aneksina A2 na kortikalni citoskelet i tijekom egzocitoze potiče povezivanje s F-aktinom. Sudjeluje i u inhibiciji upale preko fosfolipaze A2, a interakcijom s proteinom BAD (engl. *Bcl-2-associated death promoter*) inhibira njegovu proapoptotsku ulogu (Madureira i sur. 2012). Ekspresija S100A10 u različitim tumorima malo je istražena, a rezultati pokazuju ovisnost o tipu tumora. Primjerice, u tumorima štitne žlijezde pronađene su visoke razine S100A10 i

aneksina A2, te se povezuju s agresivnim fenotipom tumora, dok se u tumorima dojke povišena razina ne povezuje s agresivnošću bolesti i preživljenjem. U karcinomu pločastih stanica jednjaka pokazano je smanjenje ekspresije S100A10 u odnosu na zdravo tkivo (Hedhli i sur. 2012). Ekspresija njegovog partnera, aneksina A2, regulirana je u tumorskim stanicama na razini transkripcije faktorima rasta (inzulin, faktor rasta fibroblasta, epidermalni faktor rasta), te je inducirana u stanicama transformiranih s v-*src*, v-H-*ras* ili v-*mos*. Aktivacijska fosforilacija aneksina A2 događa se na poziciji T23, a *in vivo* i *in vitro* pokazano je kako ju vrši $pp60^{vSrc}$. Monomeri aneksina A2 sudjeluju u stvaranju snopova F-aktina i reguliraju rast filamenata, za razliku od kompleksa sa S100A10, kada nema ulogu u stvaranju filopodija i stresnih vlakana, već se povezuje sa strukturama kao što su fagosomi. Utvrđeno je i kako sudjeluje u adheziji stanica organizacijom i aktivacijom Rho i Rac1 GTPaza. Istraživanja razine aneksina A2 u stanicama tumora jednjaka i nazofarinska pokazala su smanjenje ekspresije u odnosu na zdravo tkivo, dok su u stanicama HNSCC pokazani i smanjenje i povećanje ekspresije, što ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjem mehanizama regulacije ovog proteina (Bharadwaj i sur. 2013). U ovom je radu pokazano da *de novo* ekspresija integrina αvβ3 u stanicama Cal27 smanjuje ekspresiju dvaju međusobno povezanih proteina, aneksina A2 i S100A10. Budući da postoje podaci o ulozi ovih proteina u inhibiciji apoptoze, interakcijama s aktinom i adheziji, moguće je da su uključeni u mehanizam otpornosti stanica na citostatike i smanjenu migratornu sposobnost klona Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27.

Aneksin A8 najmanje je proučavani član porodice aneksina, no pokazuje slične uloge u dinamici između stanične membrane i citoskeleta, te je pokazana njegova niska ekspresija u tkivima, s izuzetkom stanica promijelocitne aktutne leukemije (Goebeler i sur. 2006). U prilog korištenom staničnom modelu u ovom radu ide istraživanje koje su proveli Pimiento i suradnici (2014) u stanicama karcinoma gušterače, gdje su pokazali da utišavanjem ekspresije aneksina A8 dolazi do smanjenja vijabilnosti, proliferacije i migracije stanica. Pokazali su i kako smanjenje njegove ekspresije utječe na proces endocitoze smanjenim povezivanjem kasnih endosoma s aktinskim filamentima. Obzirom kako aneksin A8 nije identificiran u klonu Cal27-2B1 koji pokazuje smanjenu migraciju, moguće je kako je ovaj protein, uz prethodno već opisan aneksin A2, uključen u mehanizam smanjenja migracije stanica.

Mikrotubuli su ključni element citoskeleta stanica eukariota koji je sastavljen od heterodimera α- i β–tubulina. Unatoč visokoj očuvanosti, mikrotubuli su uključeni u velik broj funkcija u stanici (Janke, 2014), kao što je utjecaj na oblik, transport, pokretljivost i diobu stanice. Sve navedene funkcije posredovane su interakcijom mikrotubula s velikim brojem proteina koji su na njega vezani, a koji su važni za regulaciju i distribuciju mikrotubula u stanici (Nogales, 2000). Lobert je sa suradnicima (2014) istraživala razine mRNA β-tubulinskih razreda u pacijenata oboljelim od HNSCC, te je pokazano kako je u tumorskim stanicama ekspresija β-tubulina i do 10 puta veća nego u udaljenom zdravom tkivu. Kako su tubulini mete kemoterapeutika koji djeluju na diobeno vreteno (npr. vinkristin, paklitaksel), komentirali su da bi se zbog razlike u ekspresiji ovi kemoterapeutici mogli primjenjivati u kombinaciji s klasičnim liječenjem cisplatinom i 5-fluorouracilom kako bi se povećalo preživljenje. Rezultati koje je Stojanović prikazala u doktorskoj disertaciji (2014) pokazuju kako je klon Cal27-2B1, zahvaljujući de novo ekspresiji integrina αvβ3, otporan na kemoterapeutike koji djeluju na molekulu DNA, ali da je jednako osjetljiv na vinkristin i paklitaksel. Obzirom na to da je β-tubulin identificiran samo u stanicama Cal27, moguće je da je došlo do posttranslacijskih modifikacija koje su uzrokovale različit položaj u 2D gelovima, jer da njegove ekspresije nema u klonu Cal27-2B1 stanice bi pokazivale promijenjenu osjetljivost na vinkristin i paklitaksel.

Za migraciju stanica ključna je prostorna i vremenska koordinacija između reorganizacije aktina i adhezije stanice. Organizaciju aktina regulira obitelj Rho GTPaza (RhoA, Rac1 i Cdc42), koje potiču izduživanje prednjeg kraja stanice (engl. *leading edge*) i stvaranje filopodija i lamelopodija. Interakcije s efektornim molekulama mogu se dogoditi jedino kada je na Rho vezan GTP (engl. *guanosine-5'-triphosphate,* gvanozin-trifosfat), što reguliraju faktori izmjene gvanin-nukleotida (engl. *guanine nucleotide exchange factors,* GEFs) i proteini koji aktiviraju GTPaznu aktivnost (engl. *GTPase activating proteins,* GAPs), te inhibitori disocijacije gvanin-nukleotida (engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitors,* GDIs), koji su antagonisti GEF i GAP i sudjeluju u kruženju Rho proteina između citosola i membrane. Lokalizacija proteina Rac1 na membrani potrebna je za aktivaciju njegovog efektora Pak, a kako se GTP-Rac1 veže s većim afinitetom na membranu adherentne stanice, jasno je kako upravo integrini reguliraju povezivanje Rac1 s Pak. Daljnjom analizom utvrđeno je i kako integrini induciraju lokalno povezivanje Rac1 s efektorom na način da ga usmjeravaju prema membrani i disociraju s Rho-GDI, čime se omogućuje povezivanje Rac1 i

efektora, što inducira stvaranje lamelopodija i produljenje fronte stanice. Dakle, faktori rasta mogu aktivirati Rac1 unutar stanice, no mjesto povezivanja s efektorima određuju integrini, te na taj način usmjeravaju migraciju stanice (Del Pozo i sur. 2002). Obzirom na uključenost integrina u ovaj proces, DerMardirossian i suradnici proveli su istraživanje (2006) u kojem su pokazali kako je aktivirani Src uključen u ovaj proces. Naime, rast i metastaziranje različitih vrsta tumora ovisi o Rho GTPazama, koje se nalaze u ravnoteži između aktivnog i inaktivnog stanja, koju mogu narušiti deregulacija GAP, GEF i GDI. Pokazano je kako je Rho-GDI supstrat Src, te fosforilacija koju Src obavlja utječe na lokalizaciju Rho-GDI i povezivanje s Rho proteinima. Rezultat ove fosforilacije je trajna lokalizacija Rho-GDI na membrani i pojačavanje aktivnosti Rho GTPaze u remodeliranju aktina, te je predloženi model jedan od mehanizama regulacije signaliziranja i lokalizacije Rho GTPaza i Rho-GDI. Slučaj proteina Rho-GDI vrlo je zanimljiv, budući da su usporedbom gelova dobivenih 2D-PAGE analizom stanica Cal27 i klona Cal27-2B1 dobiveni kontradiktorni rezultati: analiza jedne proteinske mrlje pokazuje odsustvo ekspresije Rho-GDI u klonu Cal27-2B1, dok analiza druge proteinske mrlje pokazuje povećanje ekspresije 1,6 puta u klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27. Objašnjenje ove pojave može biti različita posttranslacijska modifikacija u stanicama Cal27 i klonu Cal27-2B1, koja je uzrokovala različit položaj proteina na gelu. Prema opisu proteina iz literature poznato je kako u stanicama dolazi do njegove fosforilacije kinazom Src, dok je iz opisa modela poznato da je u klonu smanjena ekspresija Src, te bi to mogla biti potencijalna poveznica koja bi objasnila različitu modifikaciju proteina, ali i smanjenu migraciju klona Cal27-2B1. Međutim, potrebno je ponoviti 2D-PAGE analizu i utvrditi postoje li uistinu značajne razlike ili su one posljedica ograničenja primijenjene metode.

Protein kojemu je povećana ekspresija više od 3,5 puta u stanicama Cal27, odnosno smanjena u klonu Cal27-2B1 je elongacijski faktor 1α (engl. *eucaryotic elongation factor 1 alpha*, EEF1A). To je protein uključen u jedan od najvažnijih biokemijskih procesa u stanici, translaciju proteina. Sam proces translacije sastoji se od 3 faze: inicijacije, elongacije i terminacije. EEF1A katalizira prvi korak elongacije, u kojemu prenosi aminoacil-tRNA do A mjesta na ribosomu, koje sadrži nascentni polipeptidni lanac. Nadalje, ovaj protein uključen je i u brojne druge procese u stanici, kao što su embriogeneza, senescencija, onkogena transformacija, proliferacija, organizacija citoskeleta i apoptoza. U procese apoptoze EEF1A je uključen preko proteina p53 koji mu potiče ekspresiju (Lamberti i sur. 2004). Liu i

suradnici su u svome istraživanju (2002) identificirali EEF1A kao dio molekularnog kompleksa koji sidri mRNA za aktinske filamente *in vivo*. Zbog toga što je elongacijski faktor, a pokazuje i sposobnost vezanja F-aktinske i β-aktinske mRNA istodobno, zaključili su kako su eukariotske stanice evoluirale na način da lokaliziraju EEF1A i mRNA na mjestima sinteze funkcionalno sličnih proteina, što je ključno za održavanje polarnosti stanice. Kada se ovi podaci stave u kontekst istraživanog modela stanica Cal27 i integrin β3-stabilno transficiranog klona Cal27-2B1, veća ekspresija EEF1A u stanicama Cal27 može se povezati s većom migratornom sposobnosti koju pokazuju stanice Cal27 u odnosu na klon Cal27-2B1.

Inhibitor migracije makrofaga (engl. *Macrophage migration inhibotory factor*, MIF) medijator je upale i prvi dokaz aktivnosti citokina. Proizvode ga različite stanice imunološkog sustava (monociti/makrofagi, limfociti B i T), kao i endotelne i epitelne stanice, a nalazi se lokaliziran u citoplazmi, te se otpušta uslijed imunološkog odgovora, pri proliferaciji stanica i uvjetima hipoksije. Visoka ekspresija MIF u stanicama melanoma utječe na angiogenezu, rast tumora, te migraciju stanica (Grieb i sur. 2010). Kako je u ovom radu pokazana smanjena ekspresija MIF u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27, moguće je da MIF ima u tome ulogu.

Najveću razliku u ekspresiji (preko 12 puta) pokazao je metabolički enzim fumaraza, za kojega se smatra da je jedan od tumor supresor gena u stanici. Fumaraza (u viših eukariota se naziva i fumarat hidrataza, FH) sudjeluje u ciklusu limunske kiseline u matriksu mitohondrija. No, pokazano je da postoji i izozim fumaraze u citosolu, koji obrađuje fumarat nastao u ciklusu ureje i katabolizmu aminokiselina. Oba proteina produkt su jednoga gena, no još nije poznat mehanizam distribucije između mitohondrija i citosola. Istraživanjima u kojima je utišana ekspresija FH otkriveno je kako je uključena i u proces odgovora stanice na dvolančane lomove u molekuli DNA. Predložen je model u kojem FH postoji u mitohondriju gdje sudjeluje u metaboličkom putu, ali i u citosolu, odakle odlazi u jezgru nakon stvaranja lomova u DNA, te lokalno katalizira pretvorbu malata u fumarat, koji zatim sudjeluje u regulaciji i/ili stabilizaciji molekularnih kompleksa koji sudjeluju u popravku DNA (Yogev i sur. 2010). Drugi pristup istraživanju aktivnosti FH prikazan je u istraživanju Bardelle i suradnika (2012), gdje je naglasak stavljen na ulogu u tumorigenezi kroz aktivaciju AMP-aktivirane protein kinaze (engl. *AMP-activated protein kinase*, AMPK), te transkripcijskog

faktora HIF. Njihovi rezultati pokazuju da u stanicama bubrega čovjeka i fibroblastima sa smanjenom aktivnosti FH dolazi do fosforilacije i aktivacije AMPK, što dovodi do izbjegavanja stanične smrti. Gubitak aktivnosti FH vodi i do pseudohipoksičnog signaliziranja posredovanog HIF, čime se stanice prilagođavaju na preživljenje u hipoksiji, te HIF aktivira ciljne gene, povećavajući ekspresiju GLUT1 (engl. *glucose transporter 1*) i VEGF, koji promiču glikolizu i angiogenezu, što pogoduje širenju tumora. Naši rezultati pokazuju da je FH više od 12 puta manje eksprimirana u klonu Cal27-2B1 otpornom na kemoterapeutike u usporedbi sa staničnom linijom Cal27. Zajednički mehanizam djelovanja kemoterapeutika na koje su ove stanice otporne (cisplatina, mitomicin C, doksorubicin, etopozid i 5-fluorouracil) je upravo oštećenje DNA. Da je funkcija FH upravo u pomaganju popravka DNA lezija nastalih djelovanjem kemoterapeutika, razlika u količini FH između Cal27 i 2B1 trebala bi biti u obrnutom smjeru. No, prethodno je opisano kako FH ima ulogu i u regulaciji apoptoze (Bardelle i sur., 2012). Moguće je da je smanjenje FH u klonu Cal27-2B1 dovelo do aktivacije AMPK koja potiče preživljenje stanica.

U ovom je radu pokazana smanjena ekspresija ribosomalnog proteina S17, u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 i to 4,8 puta. Uloga proteina S17 istražena je u sastavljanju podjedinice ribosoma 30S, gdje je pokazano kako je važan korak u sastavljanju vezanje različitih proteina, među kojima je i protein S17, na 16S rRNA i njezina stabilizacija. (Ramaswamy i Woodson, 2009). Ribosomi su sastavni dio svake stanice, te kako nisu identificirane druge uloge proteina S17, nije ga moguće povezati uz korišteni model stanica i promjena koje su u njemu primjećene.

U integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 primijećena je 2,5 puta smanjena količina prekursora za protein reguliran kisikom (engl. *oxygen regulated protein,* ORP). ORP je poznat i kao protein reguliran glukozom (engl. *glucose-regulated protein,* GRP), te HYOU1 (engl. *hypoxia up-regulated 1*). Opisan je kao šaperon induciran stresom lokaliziran u endoplazmatskom retikulumu (ER) u različitim tipovima stanica. Do povećanja njegove ekspresije dolazi prilikom hipoksije, izgladnjivanja, ishemije, te u tumorima, a funkcije koje obavlja u stanici nisu razjašnjene do kraja, ali je poznato da ima ulogu u apoptozi, izlučivanju inzulina i zacjeljivanju rana. Što se sudjelovanja u apoptozi tiče, pretpostavlja se da ima antiapoptotski efekt uzvodno od otpuštanja citokroma c, a vezan je uz regulaciju količine kalcija u ER (Arrington i Schnellmann, 2008). Klinički

podaci pokazuju kako je ORP povećano eksprimiran u tumorima prostate, mjehura i dojke, te su ispitivanja na uzorcima invazivnog tumora dojke pokazala kako je njegova ekspresija vezana uz lošiju prognozu bolesti, te kako bi mogao biti potencijalni prognostički marker (Stojadinovic i sur. 2007). Smanjenje ekspresije ovog proteina u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 moglo bi biti povezano s povećanim preživljenjem stanica nakon izlaganja kemoterapeuticima i to zbog smanjenog potencijala poticanja apoptoze. Međutim direktnih dokaza za ovu tvrdnju nema.

Proteini toplinskog šoka (engl. *Heat Shock Proteins,* HSP) obitelj su visoko konzerviranih proteina eksprimiranih u svim stanicama, a imaju zaštitnu ulogu. Inducirani su toplinom, hipoksijom, teškim metalima, ishemijom, te hipotermijom. Eksprimirani su i konstitutivno (u normalnoj formi) ili uslijed stresa (u inducibilnoj formi). HSP štite stanice smatajući denaturirane proteine, stabilizirajući makromolekule i obilježavajući oštećene proteine za razgradnju. Imaju složenu ulogu u apoptozi, ali prvenstveno djeluju antiapoptotski, inhibirajući proteolitičko sazrijevanje i/ili aktivnost kaspaza i njihovih supstrata (Gupta i Knowlton, 2005). HSP60 je glavni šaperonin u mitohondriju, a obavlja važnu ulogu u smatanju proteina nakon ulaska u mitohondrij. Njegova uloga u tumorskim stanicama nije istražena u potpunosti, no uzevši u obzir njegovu lokalizaciju u mitohondriju, organelu u kojem se odvijaju bioenergetski procesi i biokemijski mehanizmi koji vode u apoptozu, predložen je kao potencijalna meta za terapiju tumora (Sarangi i sur. 2013). Stanice Cal27 eksprimiraju 3,5 puta više mitohondrijskog proteina HSP60 nego klon Cal27-2B1. Na temelju pregledane literature povećana količina HSP60 uglavnom se povezuje s otpornošću na cisplatinu (Nakata i sur. 2006), pa prema tome pretpostavljamo da promjena u ekspresiji ovog proteina nije ključna u ovom staničnom modelu za osjetljivost na citostatike. Pregledom literature nije pronađena moguća veza između HSP60 i migratorne sposobnosti stanica.

Jedan od proteina koji su identificirani samo u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 je enolaza. To je enzim poznat i pod nazivom fosfopiruvat hidrataza, a jedan je od najzastupljenijih proteina u citosolu, te sudjeluje u procesu glikolize, gdje katalizira pretvorbu 2-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat. Pokazano je kako povećana ekspresija enolaze pridonosi toleranciji na hipoksiju kroz neglikolitičke mehanizme čime potiče rast tumora, te se smatra potencijalnim dijagnostičkim markerom. Povećana ekspresija pronađena je i u karcinomima glave i vrata, gdje se, osim s rastom tumora, povezuje i s lošom prognozom

bolesti (Diaz-Ramos i sur. 2012). Opis ovog proteina nije u skladu s fenotipom klona Cal27-2B1, budući da ove stanice pokazuju smanjenu migratornu sposobnost u odnosu na Cal27.

Razgradnja proteina ovisna o ubikvitinu regulira brojne stanične procese, uključujući stanični ciklus, popravak DNA, diferencijaciju i transport proteina, a posredovana je ubikvitinskim ligazama, koje prenose ubikvitinske ostatke na ciljne proteine i time ih označavaju za razgradnju. PEST sekvence, koje su bogate prolinom (P), glutamatom (E), serinom (S) i treoninom (T), pronađene su u mnogim kratko živućim proteinima, primjerice transkripcijskim faktorima i proteinima vezanima uz stanični ciklus. Funkciju proteina s PEST sekvencama najčešće kontrolira proteoliza, putem razgradnje ovisne o ubikvitinu (Schnupf i sur. 2006). Jedan takav protein identificiran je u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1, za razliku od stanica Cal27 u kojima nije pronađen, a naziva se jezgrin protein s PEST sekvencom.. Pretragom literature nije pronađeno mnogo podataka o ovom proteinu, osim jednog istraživanja, koje su proveli Mori i suradnici (2004). Oni su proučavajući ubikvitinsku ligazu NIRF (engl. *Np95/ICBP90-like RING finger protein*) identificirali jezgrin protein s PEST sekvencom kao njegov supstrat, te je pretpostavljeno kako bi mogli biti uključeni u iste signalne puteve vezane uz regulaciju staničnog ciklusa i/ili stabilnost genoma. Kako je to jedini podatak o ulozi ovog proteina, ne može se povezati uz korišteni model stanica Cal27. Ipak vrijedi reći da proteini koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa mogu utjecati na osjetljivost stanica na kemoterapeutike.

U stanicama integrin β3-stabilno transficiranog klona Cal27-2B1 utvrđena je ekspresija podjedinice 5a 26S proteasoma, kao i LMP2 podjedinice, dok u stanicama Cal27 nije dokazana prisutnost ovih proteina. Obzirom na to da su te podjedinice obje dio proteasomskog kompleksa, bit će opisane zajedno. Proteasomski kompleks 26S je odgovoran za proteolizu proteina neovisnu o lizosomima u eukariotima, a nalazi se u citoplazmi i jezgri stanice. Sastoji se od centralne 20S podjedinice, u kojoj se vrši proteoliza, i regulatorne 19S podjedinice, koja pokazuje ovisnost o ATP-u (engl. *Adenosine triphosphate,* adenozin-trifosfat) i specifičnost za proteine konjugirane ubikvitinom. Postoji u dva oblika, konstitutivni (26S) proteasom, te imunoproteasom, koji je eksprimiran u stanicama vezanima za imunološki sustav, a formira se u odgovoru na podražaj citokinima. 26S proteasom regulira većinu staničnih funkcija, od kojih su najvažnije napredak kroz faze staničnog ciklusa, rast, kemotaksija, angiogeneza i apoptoza, te su u tumorskim stanicama ovi procesi često

izmijenjeni, što potpomaže procesu karcinogeneze (Frankland-Searby i Bhaumik, 2012). Proteasomska razgradnja proteina jedan je od ključnih obrambenih mehanizama stanice, uz HSP proteine. Inhibitori ubikvitin-proteasomskog puta kao što je to npr. Bortezomib su pokazali učinkovitost u pacijenata. Osim toga pokazano je da bi mogli biti korisni u povećanju osjetljivosti stanica tumora na kemo ili radio terapiju (Chen i sur. 2011). Na temelju podataka koje pružaju naši eksperimentalni podaci nije moguće pretpostaviti da li je u integrin β3-stabilno transficiranog klona Cal27-2B1 povećana aktivnost ubikvitin-proteasomskog puta i je li moguće da je upravo taj mehanizam podloga otpornosti na kemoterapeutike.

Antigen karcinoma pločastih stanica (engl. *squamous cell carcinoma antigen,* SCCA) opisali su Kato i Torigoe 1977. godine u karcinomu vrata maternice, te su pokazali kako njegova koncentracija u serumu korelira s rastom tumora (Murakami i sur. 2001). SCCA pripada porodici inhibitora ovalbumin-serin proteinaza, uključenoj u apoptozu, imunološki odgovor, koagulaciju krvi, migraciju stanica i invazivnost. Njegova povećana ekspresija karakteristična je za karcinome, a povezuje se s otpornošću na spojeve platine (Lim i sur. 2012). O ovom proteinu nije poznato mnogo podataka, ali povećanje ekspresije u integrin β3-stabilno transficiranog klonu Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 od 2,6 puta moglo bi biti povezano s mehanizmom otpornosti na cisplatinu.

Posljednji protein sa znatnije povećanom ekspresijom (oko 5 puta) u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 je protein nalik koaktozinu (engl. *coactosin-like protein,* CLP). Prema podacima Dai i suradnika (2006) CLP ne interagira s aktinskim monomerima i nema ulogu u polimerizaciji aktina, ali uključen je u zaštitu krajeva aktinskih filamenata (engl. *capping*). S druge strane, Kim i suradnici (2014) svojim istraživanjem imunoloških sinapsi pokazali su kako se natječe s kofilinom za vezno mjesto na F-aktinu i na taj način sprječava depolimerizaciju F-aktina posredovanu kofilinom prilikom stvaranja lamelopodija. Na temelju ovog podatka može se pretpostaviti da bi ovaj protein mogao imati ulogu u migraciji stanica, ali nije u potpunosti jasno kako bi povećana ekspresija ovog proteina utjecala na migratornu sposobnost.

Od diferencijalno eksprimiranih proteina koji bi mogli biti uključeni u mehanizam otpornosti na kemoterapeutike i smanjenja migracije, zabilježen u integrin β3-stabilno transficiranom klonu Cal27-2B1 u odnosu na Cal27, u ovom radu opisani su samo neki.

Pretragom literaturnih izvora izdvojeno je 17 proteina za koje je utvrđena najveća razlika u ekspresiji između stanica Cal27 i klona Cal27-2B1, te su im opisane uloge u stanici i pretpostavljeno je da li bi te promjene mogle imati ulogu u navedenim mehanizmima. Za veliki broj proteina nisu poznate sve funkcije u stanici, te je stoga moguće da se u popisu proteina nalaze i bolji kandidati od onih koji su opisani. Međutim, najvažniji problem u ovom istraživanju je što je eksperiment metodološki zahtjevan i u okviru ovog diplomskog rada napravljen samo jednom. Stoga je moguće da neke od navedenih promjena nisu statistički značajne. Posljedica je to osjetljivosti primijenjene metode. Proteomski se pristup koristi kako bi se dobile informacije o promjeni ekspresije unutar stanica, no potrebni su dodatni pokusi kako bi se potvrdili dobiveni podaci o proteinima. Kako je Stojanović u svome radu kao odgovornu molekulu uključenu u signalni put odgovoran za otpornost navela pSrc (Y418) pokus koji bi posebno bilo dobro napraviti je diferencijalna proteomska analiza primjenom dvodimenzionalne gel elektroforeze u sprezi sa spektrometrijom masa, stanica Cal27 i stanica Cal27 u kojima je fosforilacija Src (Y418) inhibirana izlaganjem inhibitoru dasatinibu.

6. ZAKLJUČAK

- Kako bi se dobio uvid u promjenu ekspresije unutarstaničnih proteina potaknutu *de novo* ekspresijom integrina αvβ3 korištena je dvodimenzionalna elektroforeza u sprezi sa spektrometrijom masa, te su indentificirana 56 različito eksprimirana proteina u stanicama Cal27 i klonu Cal27-2B1. Pretragom literaturnih izvora izdvojeno je njih 17, od kojih neki imaju ulogu u procesima izmijenjenima u klonu Cal27-2B1, smanjenoj migraciju stanica i povećanoj otpornosti na kemoterapeutike koji djeluju na molekulu DNA.

- Obzirom kako je eksperiment urađen samo jednom, potrebne su dodatne potvrde kako bi se mogao donijeti konačni zaključak o proteinima odgovornima za navedene promjene. Ovo preliminarno istraživanje ukazalo je na nekoliko proteina koji bi mogli biti uključeni u mehanizam razvoja otpornosti na cisplatinu, koji sadržava potencijalne mete ciljanih terapija koje bi, uz već postojeće terapije, pomogle u izlječenju osoba oboljelih od ove bolesti.

7.LITERATURA

Ambriović-Ristov, A., Gabrilovac, J., Čimbora-Zovko, T., Osmak, M. (2004): Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin αvβ3 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(2):** 1-11.

Aoudjit, F., Vuori, K. (2012): Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance. *Chemother Res Pract* **2012:** 1–16.

Arrington, D.D., Schnellmann, R.G. (2007): Targeting of molecular chaperone oxygen-regulated protein 150 (ORP150) to mitochondria and its induction by cellular stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **294:** C641-C650.

Bardella, C., Olivero, M., Lorenzato, A., Geuna, M., Adam, J., et al. (2012): Cells Lacking the Fumarase Tumor Suppressor Are Protected from Apoptosis through a Hypoxia-Inducible Factor-Independent, AMPK-Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol* **32(15):** 3081–3094.

Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R., Waisman, D. (2013): Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function. *Int J Mol Sci* **14:** 6259-6305.

Brewis, I., Brennan, P. (2010): Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Adv Protein Chem Struct Biol* **80:** 1-44.

Brozović, A., Majhen, D., Roje, V., Mikac, N., Jakopec, S., et al. (2008): αvβ3 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.

Chai, S., To, K.K., Lin, G. (2010): Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chinese medicine* **5:** 26.

Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., Dou, Q.P. (2011): Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* **11(3):** 239-253.

Cortez, V., Nair, B.C., Chakravarty, D., Vadlamudi, R.K. (2011): Integrin-linked kinase 1: role in hormonal cancer progression. *Frontiers in bioscience (scholar edition)*, **3(7):** 788–796.

Dai, H., Huang, W., Xu, J., Yao, B., Xiong, S., et al. (2006): Binding model of human coactosin-like protein with filament actin revealed by mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1764:** 1688-1700.

Damjanov, I., Jukić S., Nola M. (2011): Patologija, 3. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.

Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M., Schwartz, M.A. (2002): Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* **4:** 232-239.

DerMardirossian, C., Rocklin, G., Seo, J.-Y., Bokoch, G.M. (2006): Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase Binding and Cytosol-Membrane Cycling. *Mol Biol Cell* **17:** 4760-4768.

Desgrosellier, J.S., Cheresh, D. (2010): Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **10(1)**: 9–22.

Díaz-Ramos, À., Roig-Borrellas A., Garcia-Melero A., Lopez-Alemany R. (2012): α-enolase, a multifunctional protein: Its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotech* **2012**: 12.

Eke, I., Cordes, N. (2014): Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, pp.1–11.

Frankland-Searby, S., Bhaumik, S.R. (2012): The 26S Proteasome Complex: An Attractive Target for Cancer Therapy. *Biochim Biophys Acta* **1825(1):** 64-76.

Galić N. (2004): Spektrometrija masa – za kolegij Instrumentalne analitičke metode II, Interna skripta. Zagreb.

Goebeler, V., Ruhe, D., Gerke, V., Rescher, U. (2006): Annexin A8 displays unique phospholipid and F-aktin binding properties. *FEBS Letters* **580**: 2430-2434.

Govindan, R. (2010): INTERESTing biomarker to select IDEAL patients for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: Yes, for EGFR mutation analysis, others, I PASS. *J Clin Oncol* **28:** 713–715.

Grieb, G., Merk, M., Bernhagen, J., Bucala, R. (2010): Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. *Drug News Perspect* **23(4):** 257-264.

Gupta, S., Knowlton, A.A. (2005): HSP60, Bax, Apoptosis and the Heart. *J Cell Mol Med* **9:** 51-58.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144(5)**: 646–674.

Hedhli, N., Falcone, D.J., Huang, B., Cesarman-Maus, G., Kraemer R., et al. (2012): The Annexin A2/S100A10 System in Health and Disease: Emerging Paradigms. *J Biomed Biotech* **2012**: 1-13.

Hehlgans, S., Haase, M., Cordes, N. (2007): Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta - Reviews on Cancer*, **1775:** 163–180.

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., Johnston, P.G. (2013): Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev. Cancer* **13(10)**: 714–26.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., et al. (2014): Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers* **6**: 1769-1792.

Hu, P., Luo, B.H. (2013): Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol* **228(7):** 306–312.

Issaq, H.J., Veenstra, T.D. (2008): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives. *BioTechniques* **44(5):** 697–700.

Janke, C. (2014): The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* **206(4):** 461-472.

Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D. (2004): MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol biotech* **26:** 147–164.

Kim, J., Shapiro, M.J., Bamidele, A.O., Gurel, P., Thapa, P., et al. (2014): Coactosin-Like 1 Antagonizes Cofilin to Promote Lamellipodial Protrusion at the Immune Synapse. *PLoS ONE* **9(1):** e85090.

Knowles, M.A., Selby, P.J. (2006): Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press, Oxford.

Kurio, N., Shimo, T., Fukazawa, T., Okui, T., Honami, T., et al. (2012): Anti-tumor effect of a novel FAK inhibitor TAE226 against human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* **48(11):** 1159–1170

Lamberti, A., Caraglia, M., Longo, O., Marra, M., Abbruzzese, A., Arcari, P. (2004): The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article. *Amino acids* **26:** 443–448.

Lau, J., Castelli, L.A., Lin, E.C.K., Lance Macaulay, S. (2006): Identification of elongation factor 1A as a potential associated binding partner for Akt2. *Mol Cell Biochem* **286:** 17–22.

Lim, W., Kim, H.S., Jeong, W., Ahn, S.E., Kim, J., et al. (2012): SERPINB3 in the Chicken Model of Ovarian Cancer: A Prognostic Factor for Platinum Resistance and Survival in Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS ONE*, **7(11)**: 10.

Liu, G., Grant, W.M., Persky, D., Latham Jr., V.M., Singer, R.H., Condeelis, J. (2002): Interactions of Elongation Factor 1a with F-Actin and b-Actin mRNA: Implications for anchoring mRNA in Cell Protrusions. *Mol Biol Cell* **13**:579-592.

Lobert, S., Graichen, M.E., Hamilton, R.D., Pitman, K.T., Garrett, M.R., et al. (2014): Prognostic Biomarkers for HNSCC using Quantitative Real-Time PCR and Microarray Analysis: β-Tubulin Isotypes and the p53 Interactome. *Cytoskeleton* **71**: 628-637.

Loyo, M., Li, R.J., Bettegowoda, C., Pickering, C.R., Frederick, M.J., et al. (2013): Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck* **35(3)**: 454-63.

Luo, J., Solimini, N.L., Elledge, S.J. (2009): Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* **136:** 823–837.

Luqmani, Y. (2005): Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* **14 Suppl 1:** 35–48.

Madureira, P.A., O'Connell, P.A., Surette, A.P., Miller, V.A., Waisman, D.M. (2012): The Biochemistry and Regulation of S100A10: A Multifunctional Plasminogen Receptor Involved in Oncogenesis. *J Biomed Biotech* **2012:** 1-21.

Maines, M.D. (2005): New Insights into Biliverdin Reductase Functions: Linking Heme Metabolism to Cell Signaling. *Physiology* **20**: 382-389.

Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., Syrigos, K. (2009): Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer invest* **27:** 1023–1037.

Millard, M., Odde, S., Neamati, N. (2011): Integrin targeted therapeutics. *Theranostics* **1:** 154–188.

Miyata, Y., Nakamoto, H., Neckers, L. (2013): The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr pharm des* **19:** 347–365.

Mizejewski, G.J. (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* **222(44435):** 124–138.

Mori, T., Li, Y., Hata, H., Kochi, H. (2004): NIRF is a ubiquitin ligase that is capable of ubiquinating PCNP, a PEST-containing nuclear protein. *FEBS Letters* **557**: 209-214.

Murakami, A., Suminami, Y., Hirakawa, H., Nawata, S., Numa, F., Kato, H. (2001): Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br J Cancer* **84:** 851–858.

Nakata, B., Hom, D., Barton, R., Howell, S., Los, G. (1996): mRNA levels of molecular chaperones HSP27, HSP60 and HSP70 in cisplatin resistant squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* **8(6):** 1229-1235.

Nemunaitis, J., Nemunaitis, J. (2011): Head and neck cancer: Response to p53-based therapeutics. *Head Neck* **33(1)**: 131-134.

Nelson D. L., Cox M. M. (2005): Lehninger Principles of Biochemistry 4th Edition. W. H. Freeman, New York.

Nogales, E. (2000): Structural Insights into Mictotubule Function. *Annu Rev Biochem* **69:** 277-302.

Pai, S., Westra, W. (2009): Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol* **4:** 49–70.

Payne, S., Miles, H. (2008): Mechanisms of anticancer drugs. *Scott-Brown's Otorhinolaringology: Head and Neck Surgery 7Ed:3volume set: 134.*

Pecorari, L., Marin, O., Silvestri, C., Candini, O., Rossi, E., et al. (2009): Elongation Factor 1 alpha interacts with phospho-Akt in breast cancer cells and regulates their proliferation, survival and motility. *Mol cancer* **8:** 58.

Pimiento, J.M., Chen, D.-T., Centeno, B.A., Davis-Yadley, A.H., Husain, K., et al. (2014): Annexin A8 Is a Prognostic Marker and Potential Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Pancreas* **44(1):** 122-127.

Rabilloud, T., Lelong, C. (2011): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J Proteom* **74(10)**: 1829–1841.

Ramaswamy, P., Woodson, S.A. (2009): Global Stabilization of rRNA structure by ribosomal proteins S4, S17 and S20. *J Mol Biol* **392(3)**: 666-677.

Sarangi, U., Singh, M.K., Abhijnya, K.V.V., Reddy, L.P.A., Prasad, B.S., et al. (2013): Hsp60 Chaperonin Acts as Barrier to Pharmacologically Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Tumor Cells with Differential Stress Response. *Drug Target Insights* **2013:7**: 35-51.

Schnupf, P., Portnoy, D.A., Decatur, A.L. (2006): Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in Mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cell Microbiol* **8(2):** 353-364.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., Old, L.J. (2012): Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **12(4):** 278–287.

Stojadinovic, A., Hooke, J.A., Shriver, C.D., Nissan, A., Kovatich, A.J., et al. (2007). HYOU1/Orp150 expression in breast cancer. *Med Sci Monit* **13(11)**: BR231-239.

Stojanović, N. (2014): Otpornost na protutumorske lijekove posredovana integrinom avb3 u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka. Doktorska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Storch, K., Cordes, N. (2012): Focal Adhesion-Chromatin Linkage Controls Tumor Cell Resistance to Radio- and Chemotherapy. *Chemother Res Pract* **2012**: 1–10.

Stupp, R., Hegi, M.E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., et al. (2010): Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed By Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Clin Oncol* **28**: 2712-2718.

Stupp, R., Hegi, M.R., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., et al. (2014): Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated

MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15(10)**: 1100-8.

Sulzmaier, F.J., Jean, C., Schlaepfer, D.D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* **14(8)**: 598–610.

Takada, Y., Ye, X., Simon, S. (2007): The integrins. *Genome biol* **8**: 215.

Tanaka, T., Tanaka, M., Tanaka, T. (2011): Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Pathol Res Int* **2011:** 431246.

Walsh, J.E., Lathers, D.M.R., Chi, A.C., Gillespie, M.B., Day, T.A., et al. (2007): Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treatment Options in Oncol* **8:** 227–238.

Weis, S.M., Cheresh, D. (2011): αV integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **1**.

Yogev, O., Yogev, O., Singer, E., Shaulian, E., Goldberg, M., et al. (2010): Fumarase: A mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the dna damage response. *PLoS Biology*, **8(3)**.

Yu, Z.W., Zhong, L.P., Ji, T., Zhang, P., Chen, W.T., Zhang, C.P. (2010): MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncology* **46:** 317–322.

Zahreddine, H., Borden, K.L.B. (2013): Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacol* **4(3)**: pp.1–8.

Zannetti, A., Del Vecchio, S., Iommelli, F., Del Gatto, A., De Luca, S., et al. (2009). Imaging of αvβ3 expression by a bifunctional chimeric RGD peptide not cross-reacting with α vβ5. *Clin Cancer Res* **15(16):** 5224–5233.

Zhao, Xiaofeng, Guan, J.-L. (2012): Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* **63(8)**: 610–615.

http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 19. srpnja 1991. godine u Osijeku. Pohađao sam Osnovnu školu „Tin Ujević“ od 1997. do 2001. godine, te Osnovnu školu „Mladost“, koju sam završio 2005. godine. Srednjoškolsko obrazovanje stekao sam u „III. Gimnaziji“ u Osijeku, koju sam završio s odličnim uspjehom 2009. godine. U srpnju iste godine upisao sam preddiplomski studij molekularne biologije u trajanju od šest semestara na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, koji sam završio u rujnu 2012. godine i stekao zvanje sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol.). U listopadu 2012. godine upisao sam diplomski studij molekularne biologije u trajanju od četiri semestra na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tokom studija sudjelovao sam na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima, te sam 3 godine aktivno sudjelovao u manifestaciji Noć biologije. Aktivno poznajem engleski jezik.