

# Uloga proteina uključenih u adheziju u otpornosti stanica raka prostate LNCaP na ionizirajuće zračenje

---

**Pehar, Isabela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:052714>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2020.

Isabela Pehar

1315/MB

**ULOGA PROTEINA UKLJUČENIH  
U ADHEZIJU U OTPORNOSTI  
STANICA RAKA PROSTATE  
LNCaP NA ZRAČENJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov i uz pomoć dr. sc. Ivane Samaržija, poslijedoktorandice i voditeljice projekta dobivenog u sklopu natječaja Zagrebačke banke (Moj Zaba Start 2019.) - „Udruživanjem temeljnih i kliničkih znanstvenih istraživanja do poboljšanja tretmana i povećane društvene osviještenosti o raku prostate“.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Institut Ruđer Bošković  
Zavod za molekularnu biologiju  
Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### ULOGA PROTEINA UKLJUČENIH U ADHEZIJU U OTPORNOSTI STANICA RAKA PROSTATE LNCaP NA IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE

*Isabela Pehar, 1315/MB*

**Sažetak:** *Karcinom prostate većinom se uspješno liječi radioterapijom koja postaje neučinkovita ukoliko stanice razviju otpornost. Jedan od mehanizama koji doprinosi nastanku otpornosti stanica na radioterapiju je promjena u adheziji stanica posredovana integrinima. Kompleks adhezije integrina je multimolekularni kompleks koji se zajednički naziva adhesom i povezuje se s razvojem zloćudnih tumora, ali i s promjenom osjetljivosti stanica na zračenje. Stoga se ciljanje adhesoma može iskoristiti za povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na radioterapiju. Cilj ovog rada bio je usporediti sastav adhesoma stanične linije karcinoma prostate LNCaP i sublinije otporne na radioterapiju LNCaP RR. Izolirani su kompleksi adhezije integrina obje stanične linije nakon kemijskog umrežavanja i uspoređeni Western blot analizom. U stanicama LNCaP RR otpornim na radioterapiju primijećena je povećana ekspresija paksilina. Ovim radom stečeni su preduvjeti za buduću analizu kompleksa adhezije integrina ovog staničnog modela spektrometrijom masa koji bi mogli doprinijeti razumijevanju uloga proteina adhesoma u razvoju otpornosti stanica na radioterapiju.*

**Ključne riječi:** karcinom prostate, adhezija stanica, integrini, adhesom, radiorezistencija

**Rad sadrži:** 61 stranica, 13 slika, 6 tablica, 205 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica  
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *izv. prof. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica*

**Pomoć pri izradi:** *dr. sc. Ivana Samaržija, znanstvena suradnica*

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. *Izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević*
2. *Izv.prof.dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica*
3. *Dr.sc. Ivana Samaržija, znanstvena suradnica*
4. *Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo (zamjena)*

**Datum obrane:** 7.7.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Ruder Bošković Institute**  
**Department of molecular biology**  
**Laboratory for cell biology and signalling**  
**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Biotechnology

### **THE ROLE OF ADHESION PROTEINS IN THE RESISTANCE OF PROSTATE CARCINOMA CELL LINE LNCaP TO IONIZING RADIATION**

*Isabela Pehar, 1315*

**Abstract:** *Prostate cancer is mostly successfully treated with radiotherapy which becomes ineffective if the cells develop resistance. One of the mechanisms that contributes to the development of cell resistance to radiotherapy is a change in cell adhesion mediated by integrin. The integrin adhesion complex is a multimolecular complex called adhesome, and is associated with the development of malignant tumors, but also with a change in the sensitivity of cells to radiation. Therefore, targeting the adhesome can be used to increase the sensitivity of tumor cells to radiotherapy. The aim of this study was to compare the composition of the LNCaP prostate cancer cell line adhesome and the LNCaP RR radiotherapy-resistant subline. The integrin adhesion complexes of both cell lines were isolated after chemical crosslinking and compared by Western blot analysis. An increased expression of paxilin was observed in LNCaP RR cells. This study provides the preconditions for future analysis of the integrin adhesion complex of this cell model by mass spectrometry, which could contribute to the understanding of the role of adhesome proteins in the development of cell resistance to radiotherapy.*

**Keywords:** *prostate cancer, cell adhesion, integrins, adhesome, radioresistance*

**Thesis contains:** 61 pages, 13 figures, 6 tables, 205 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *Andreja, Ambriović Ristov, PhD., Associate professor, Senior Scientist*

**Technical support and assistance:** *Ivana, Samaržija, PhD., Research Associate*

#### **Reviewers:**

1. *Kristina, Radošević, PhD., Associate Professor*
2. *Andreja, Ambriović Ristov, PhD., Associate Professor, Senior Scientist*
3. *Ivana Samaržija, PhD., Research Associate*
4. *Marina, Cvjetko Bubalo, PhD., Assistant Professor (substitute)*

**Thesis defended:** 7<sup>th</sup> July 2020

# SADRŽAJ

<b>1.UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2.TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. TUMORI</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Karcinom prostate .....	2
2.1.2. Liječenje karcinoma prostate .....	3
2.1.3. Otpornost stanica karcinoma prostate na radioterapiju .....	4
2.1.4. Stanične linije karcinoma prostate kao model za istraživanje.....	6
2.2.1. Izvanstanični matriks.....	7
2.2.2 Adhezija stanica .....	9
2.2.3. Integrini .....	11
2.2.4. Adhezija posredovana integrinima.....	12
2.2.4.1. Nascentne adhezije, fokalni kompleksi, fokalne adhezije i fibrilarne adhezije ..	13
2.2.4.2. Podosomi i invadopodiji.....	15
2.2.4.3. Hemidezmosomi i retikularne adhezije.....	15
2.2.5. Adhesom integrina .....	15
2.2.5.1. ILK-PINCH.....	17
2.2.5.2. Kindlin.....	18
2.2.5.3. Talin .....	18
2.2.5.4. Vinkulin.....	19
2.2.5.5. Paksilin i FAK.....	19
2.2.5.6. $\alpha$ -aktinin, ziksin i VASP.....	20
2.2.5.7. Tenzin.....	20
2.2.6. Adhesom integrina kao izvor potencijalnih meta u liječenju tumora otpornih na radioterapiju .....	21
<b>2.3. ADHESOM STANICA PROSTATE I PROMJENA EKSPRESIJE PROTEINA ADHESOMA U STANICAMA TUMORIMA PROSTATE</b> .....	<b>22</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>25</b>
3.1.1. Stanice karcinoma prostate.....	25
3.1.2. Osnovne kemikalije.....	25
3.1.3 Otopine i njihova priprema .....	26
3.1.4. Komplet kemikalija i standardi .....	28
3.1.5. Protutijela korištena u metodi western blot.....	28
3.1.6. Uređaji.....	29
3.1.7. Laboratorijski pribor .....	30
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>31</b>
3.2.1. Kultura stanica.....	31

3.2.2. Izdvajanje kompleksa adhezije integrina (IAC).....	32
3.2.3. Analiza ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot.....	33
3.2.3.1. SDS-PAGE.....	33
3.2.3.2. Western blot .....	34
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>35</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>45</b>



# 1.UVOD

Karcinom prostate drugi je vodeći uzrok smrti od svih zloćudnih tumora kod muškaraca (Ferlay i sur., 2018). Radioterapija (zračenje) je metoda liječenja karcinoma prostate koja u 90 % slučajeva djeluje uspješno, ali je neučinkovita ako stanice razviju otpornost (Seifert i sur., 2019). Stanična adhezija jedan je od mehanizama koji doprinosi nastanku otpornosti stanica na radioterapiju, ali još uvijek nije dovoljno istražen kod većine oblika tumora, uključujući i karcinom prostate (Eke i Cordes., 2015). Adhezija stanica na izvanstanični matriks i susjedne stanice nužna je za održavanje homeostaze u organizmu, a posredovana je različitim membranskim proteinima među kojima važnu ulogu imaju integrini (Geiger i Yamada, 2011). Kompleksi adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complexes*, IACs) važni su u regulaciji proliferacije, diferencijacije, preživljenja i migracije stanica (Horton i sur., 2015). Nastaju nakon aktivacije integrina nakupljanjem velikog broja proteina oko citoplazmatske domene integrina i tako stvaraju multimolekularni kompleks IAC (Winograd-Katz i sur., 2014) koji se skraćeno naziva adhesom (Geiger i Yamada, 2011). Mutacije ili deregulacije komponenti adhesoma povezuju se s brojnim bolestima kao što su krvožilne, imunosne, metaboličke i neurološke (Winograd-Katz i sur., 2014), a 32 proteina adhesoma vežu se uz proces razvoja zloćudnih tumora (Horton i sur., 2016). Pokazano je i da promjena ekspresije nekih proteina adhesoma može utjecati na osjetljivost stanica tumora na zračenje, stoga se ciljanje integrina ili ostalih proteina IAC-a može iskoristiti kako bi se dodatno povećala osjetljivost tumorskih stanica na postojeće protutumorske lijekove i radioterapiju (Dickreuter i Cordes, 2017; Eke i sur., 2010). *In vitro* istraživanja karakteristika različitih staničnih linija karcinoma i njihovih sublinija otpornih na radioterapiju mogu doprinijeti boljem razumijevanju uloga onih proteina adhesoma koji su uključeni u nastanak otpornosti stanica.

Cilj ovog diplomskog rada je usporediti sastav adhesoma stanične linije karcinoma prostate LNCaP i od nje dobivene sublinije otporne na radioterapiju LNCaP RR, metodom spektrometrije masa, te na temelju dobivenih rezultata bolje razumjeti ulogu proteina adhesoma uključenih u otpornost stanica na radioterapiju i tako doprinijeti mogućem razvoju molekularno ciljane terapije usmjerene prema uspješnijem liječenju pacijenata (Ganguly i sur., 2013).

## 2. TEORIJSKI DIO

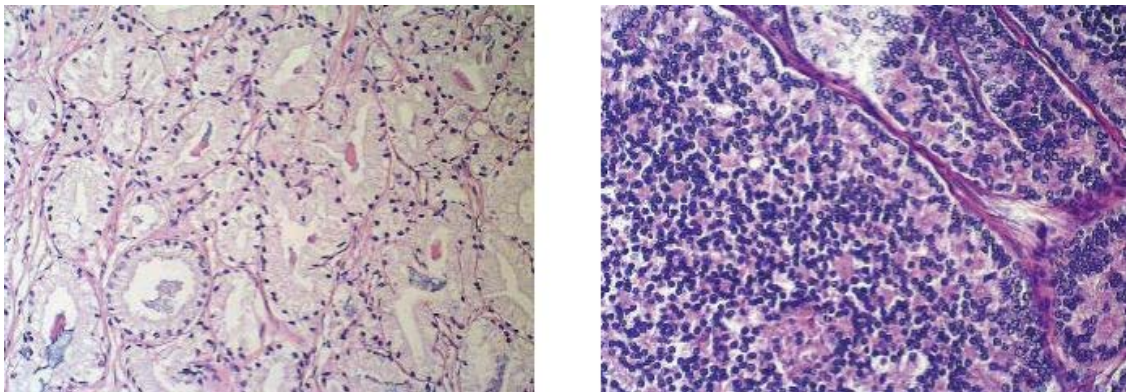
### 2.1. TUMORI

Rast i dioba stanice nužni su procesi za održavanje homeostaze u organizmu. Tumor ili neoplazma je čvrsta masa tkiva nastala nekontroliranom proliferacijom stanica (Birbrair i sur., 2014). Razvoj tumorske stanice iz zdrave, događa se nakupljanjem nekoliko tumorspecifičnih mutacija (Alberts i sur., 2002) zbog kojih stanica poprima nova biološka obilježja koja joj pomažu da izbjegne staničnu smrt i djelovanje supresora rasta, ali joj istovremeno omogućuju neograničenu replikaciju genetičkog materijala i autokrinu stimulaciju proliferacije. Uza sve to, nova biološka obilježja induciraju angiogenezu i potiču stanicu na metastaziranje (Hanahan i Weinberg, 2011). Klinički gledano, tumori se dijele na zloćudne (maligne) i dobroćudne (benigne). Zloćudnost tumora definira se kao sposobnost tumora da razara okolno tkivo i prodire u njega te mogućnost da metastazira u organizmu putujući krvožilnim ili limfnim sustavom. Tada dolazi do formiranja sekundarnih tumora koje nazivamo metastaze (Sleeboom i sur., 2018). Zloćudni tumor, ovisno o vrsti stanica iz koje je nastao, može biti *karcinomom* (razvija se iz epitelnih stanica), *sarkom* (razvija se iz vezivnih ili mišićnih stanica), *tumor hematopoetskih stanica* ili *tumor stanica živčanog sustava* (Alberts i sur., 2002).

#### 2.1.1. Karcinom prostate

Prostata je neparna, pomoćna spolna žlijezda kod muškaraca koja okružuje početni dio mokraćne cijevi. Razvoj prostate započinje tijekom 10. tjedna embrionalnog života i odvija se tijekom cijele trudnoće. Nakon toga, razvoj prostate ulazi u mirno razdoblje sve do početka puberteta kada zbog porasta koncentracije hormona testosterona dolazi do njezinog daljnjeg razvoja. Aktivnost prostate ovisi o prisutnosti muških spolnih hormona – androgena. Prostata odraslog muškarca je veličine kestena, a volumen joj varira od 20 do 50 mL. Sekret koji izlučuje čini 30 % ejakulata, a sadrži spermin, proteaze, kiselu fosfatazu (specifičnu za prostatu), imunoglobuline, prostaglandine, prostata specifični antigen (PSA) te cink (Šamija i sur., 2010). PSA je glikoprotein specifičan za stanice prostate i najčešće se koristi kao biljeg za otkrivanje i praćenje procesa u prostati. Povišena koncentracija PSA u krvi može biti jedan od prvih pokazatelja koji liječnika upućuje na mogući karcinom prostate, ali osim analize krvi (Bell i sur., 2014) važno je pacijenta uputiti i na biopsiju – postupak pregledavanja male

količine uzorka prostate (Fujita i Nonomura, 2018; Bell i sur., 2014). Na osnovu pregledanog tkiva i analize koncentracije PSA u krvi, liječnik može postaviti dijagnozu. Iz tih razloga, vrlo je važna vrijednost GS (engl. *Gleason-Score*; GS) koja se dodjeljuje pregledanom tkivu. GS je zbroj dva najzastupljenija obrasca rasta tumorskih stanica i upućuje na njihovu diferenciranost. Dobiva se pregledom tkiva koje je obojano hematoksilin-eozinom (HE) pri čemu se u stanici jasno razlikuje plavo obojana jezgra od crveno obojane citoplazme (slika 1). Što je viša vrijednost GS, to je veća vjerojatnost agresivnosti tumora i njegovog bržeg rasta pa tako vrijednost GS 8 – 10 upućuje na slabo diferencirane stanice i na ozbiljniju prognozu bolesti (Krušlin i sur., 2005). Iako klinički vrlo značajna, vrijednost GS može predstavljati ograničen pristup zbog heterogenosti uzoraka pacijenata (Seifert i sur., 2019). Patolozi se prilikom pregleda tkiva mogu poslužiti i imunohistokemijskim metodama kojima detektiraju prisutnost specifičnih staničnih antigena. Kod karcinoma prostate najčešće se koristi imunohistokemijski marker p63 koji je prisutan u bazalnim stanicama zdrave prostate, ali ga ne nalazimo u karcinomu (Krušlin i sur., 2005).



(A)

(B)

**Slika 1.** Histološki prikaz stanica karcinoma prostate nakon HE bojanja; jezgra (plavo) i citoplazma stanice (crveno). Niža GS vrijednost (A) povezuje se s povećanom diferenciranosti stanica dok povećana GS vrijednost (B) ukazuje na smanjenu diferenciranost stanica karcinoma i upućuje na abnormalni izgled stanica (Prilagođeno prema Krušlin i sur., 2005).

### 2.1.2. Liječenje karcinoma prostate

Karcinom prostate spada u skupinu adenokarcinoma – malignih tumora epitelnih stanica žlijezde. Obično se javlja kod muškaraca starijih od 50 godina i predstavlja drugi vodeći uzrok smrti od svih zloćudnih tumora (Ferlay i sur., 2018). Većina otkrivenih karcinoma prostate su izlječivi kirurškim odstranjivanjem, radioterapijom ili kombinacijom

radioterapije i hormonalne terapije čime se postiže uspješniji terapijski učinak zračenja (Peitzsch i sur., 2016). Kirurškim odstranjivanjem bolesna se prostata odstranjuje parcijalno ili u potpunosti. Hormonalna terapija (androgena deprivacija) je pristup kojim se nastoji suzbiti djelovanje muškog spolnog hormona testosterona o kojem je ovisno više od 80 % karcinoma prostate. Lučenje testosterona iz testisa je pod utjecajem žlijezde hipofize, odnosno, stimulirano je luteinizirajućim hormonom (LH). Jedan od pristupa u liječenju hormonskom terapijom je kirurško smanjenje lučenja testosterona pri čemu se odstranjuju testisi, a s njima i djelovanje testosterona na stanice karcinoma. Drugi pristup je korištenje različitih hormonskih lijekova poput LH-agonista ili anti-androgenih lijekova koji djeluju na proizvodnju ili na djelovanje testosterona u organizmu. Hormonalna terapija, u kombinaciji s kemoterapijom, može se primijeniti kod pacijenata s metastatskim karcinomom prostate osjetljivim na hormone, međutim, ne kao dugoročan način liječenja i vrlo često uz smanjenu vjerojatnost preživljenja pacijenta (Hofland i sur., 2010). Pojedini oblici karcinoma prostate spadaju u skupinu androgen-neovisnih oblika i ne reagiraju na hormonalni oblik liječenja (Robson i Dawson, 1996). Radioterapija (zračenje) je primjena zraka visoke energije i njihovo usmjeravanje prema karcinomu, bilo da se radi o primarnom tumoru ili metastazama. Nuklearna medicina primjenjuje dva načina zračenja: (1) vanjsku radijaciju i (2) unutarnju radijaciju (brahiterapija). Kod vanjske radijacije izvor zračenja dolazi iz uređaja koji je smješten u prostoriji u kojoj se provodi tretman, a zrake putuju iz više smjerova prema željenom mjestu na tijelu pacijenta. Brahiterapija je zračenje kratkog dometa kod kojeg je radijacijski implantant stavljen u tkivo koje je zahvatio karcinom i koje je potrebno ozračiti. Ova metoda dobra je zbog toga što omogućava korištenje većih doza zračenja (Nag i sur., 1990).

### 2.1.3. Otpornost stanica karcinoma prostate na radioterapiju

Radioterapija, ovisno o stadiju karcinoma prostate, u 90 % slučajeva djeluje uspješno, međutim, kod pojedinih pacijenata radioterapija može biti neučinkovita ako stanice karcinoma prostate razviju otpornost na zračenje. Mehanizam kojim radioterapija ubija stanice raka je stvaranje dvolančanih lomova u molekuli DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid*; DNA) (Seifert i sur., 2019). Stanica je zaštićena od gubitka informacija specifičnom građom molekule DNA u kojoj pohranjuje dvije odvojene kopije svih gena i ukoliko dođe do oštećenja jednog lanca, drugi koristi kao predložak za popravak. Oštećenje oba lanca molekule DNA koje izaziva radioterapija vrlo je opasno za stanicu jer izostaje mogućnost korištenja drugog lanca kao

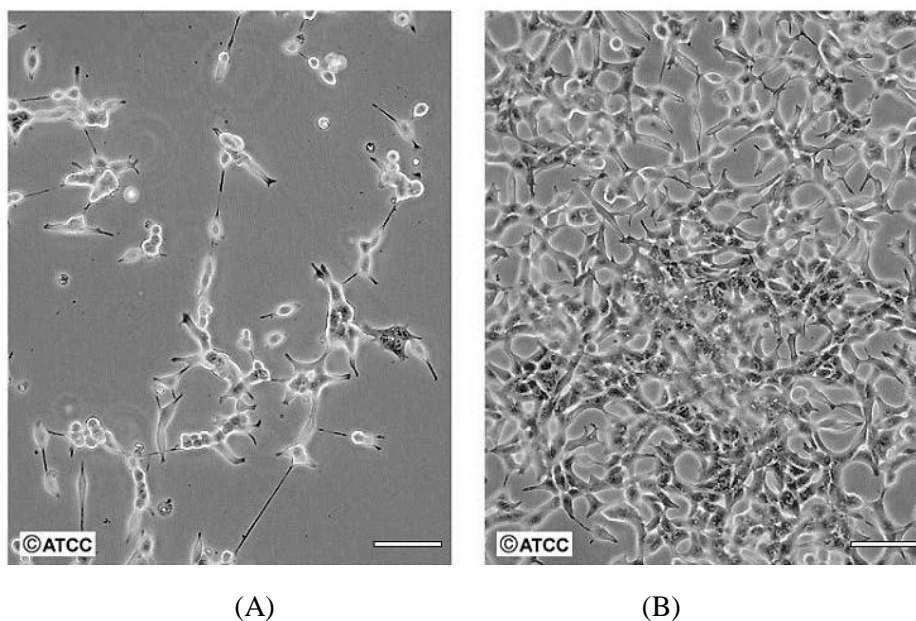
predložka. Ako je takvih dvolančanih lomova mnogo, stanica ih neće uspjeti popraviti i događa se stanična smrt, međutim, ako ih stanica uspije popraviti različitim mehanizmima to najčešće rezultira povećanjem broja kopija gena i/ili njihovim delecijama i može voditi prema razvoju otpornosti na radioterapiju (Alberts i sur., 2002; Seifert i sur., 2019). Stoga se ovaj fenomen otpornosti na radioterapiju povezuje s aktivacijom određenih signalnih puteva proliferacije i preživljenja (PI3K/Akt, mTOR), ali i promjenama u signalnim putevima odgovornim za popravak DNA molekule (Seifert i sur., 2019; King i sur., 2015). Uz navedeno, subpopulacija tumorskih stanica - *matične stanice raka* (engl. *Cancer Stem Cells*; CSC) također se povezuju s otpornošću na radioterapiju stanica karcinoma s obzirom na to da imaju povećanu sposobnost diobe i diferencijacije te pojačanu ekspresiju gena odgovornih za popravak DNA (Cojoc i sur., 2015; Li i Tang, 2011). Otpornost stanica na radioterapiju povezuje se i s *epitelno-mezenhimalnom tranzicijom* (engl. *epithelial–mesenchymal transition*; EMT). EMT je biološki proces u kojem epitelna stanica gubi svoju polarnost i povezanost sa susjednim stanicama te prolazi kroz niz biokemijskih promjena zbog kojih mijenja svoj fenotip i ekspresijski obrazac. Zbog toga poprima karakteristike stanica mezenhinskog tkiva i stječe invazivnu i metastatsku sposobnost (Lamouille i sur., 2014; Thiery i Sleeman, 2006).

Svim spomenutim mehanizmima, koji doprinose nastanku otpornosti stanica na radioterapiju, može se pridružiti još jedan - stanična adhezija (Eke i Cordes., 2015). Taj proces zahtjeva aktivnost brojnih staničnih proteina od kojih se posebno ističu integrini. Integrini spadaju u adhezijske proteine koji sudjeluju u gotovo svim staničnim procesima, a njihova uloga u staničnoj migraciji i invaziji jedna je od najbolje istraženih u biologiji tumora (Mitra i Schlaepfer, 2006). Osim toga, i proces proliferacije stanice pod njihovom je regulacijom. Kod većine tumora proces proliferacije je dereguliran, međutim, kod nekih oblika on je i dalje ovisan o integrinima (Assoian i Klein, 2008; Han i sur., 2001; Vellon i sur., 2005). Kako zapravo integrini utječu na preživljenje tumorskih stanica i stjecanje radiorezistencije pitanja su koja mogu dovesti do saznanja o stvarnoj djelotvornosti integrina kao potencijalnih antagonista tumora (Desgrosellier i Cheresch, 2010). Odgovor na ovakva mogu dati *in vitro* istraživanja različitih staničnih linija karcinoma i njihovih sublinija otpornih na radioterapiju. Usporedba karakteristika ovih linija vodi k boljem razumijevanju onih proteina koji su uključeni u otpornost stanica na zračenje, ali i otvara mogućnost razvoja ciljane terapije za bolji ishod u liječenju pacijenata koji boluju od karcinoma prostate (Seifert i sur., 2019).

#### 2.1.4. Stanične linije karcinoma prostate kao model za istraživanje

Stanice izolirane iz tkiva čovjeka i uzgojene u umjetnoj hranjivoj podlozi u laboratoriju čine primarnu staničnu kulturu čiji je životni vijek ograničen, a dijelimo je na (1) suspenzijsku, kada stanice rastu slobodno u hranjivoj podlozi te (2) adherentnu, kod koje stanice rastu pričvršćene za podlogu. Subkultivacijom, primarna stanična kultura postiže svojstva stanične linije koja se dijeli na konačnu i kontinuiranu. Konačne stanične linije imaju ograničen broj dioba (20 – 80) dok se kontinuirane dijele beskonačno i često uz promijenjenu morfologiju stanice (Freshney, 2000). Najčešće korištene stanične linije u istraživanjima karcinoma prostate su DU145 (metastatske stanice karcinoma prostate izolirane iz mozga), PC-3 (metastatske stanice karcinoma prostate izolirane iz kosti) i LNCaP (metastatske stanice karcinoma prostate izolirane iz limfnog čvora) koje se međusobno razlikuju. LNCaP je androgen ovisna stanična linija dok su PC3 i DU145 androgen-neovisne stanične linije (ATCC, 2020). Isto tako, PC3 staničnu liniju karakterizira visok metastatski potencijal koji je kod DU145 umjeren, a kod LNCaP vrlo nizak (Lima i sur., 2018). Istraživanje u ovom diplomskom radu napravljeno je na staničnoj liniji LNCaP.

LNCaP klon, 1977. godine, izolirali su Horoszewicz i suradnici (1983) biopsijom lijevog, supraklavikulranog limfnog čvora pedesetogodišnjeg pacijenta. Pacijent je bio bijelac (krvne grupe B+) i imao je dijagnozu metastatskog oblika karcinoma prostate. Stanična kultura LNCaP je adherentna, a stanice rastu uglavnom vrlo polako, pojedinačno ili u obliku slabo pričvršćenih klastera (slika 2) (ATCC, 2020). LNCaP stanice osjetljive su na androgen (5-alfa-dihidrotestosteron) koji potiče njihov rast i proizvodnju specifičnog enzima kisele fosfataze (Horoszewicz i sur., 1983). Stanične linije karcinoma prostate predstavljaju važan modelni sustav za proučavanje i razumijevanje promjena na molekularnoj razini stanice koje doprinose otpornosti na radioterapiju (Seifert i sur., 2019).



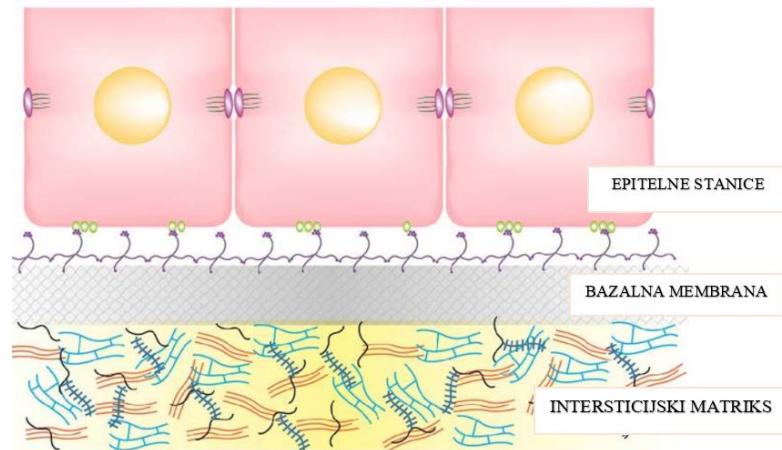
**Slika 2.** Prikaz LNCaP stanične kulture. (A) Mala gustoća adherentnih stanica uzgojenih u kulturi. (B) Vrlo gusto uzgojena kultura adherentnih stanica (Prilagođeno prema ATCC-u, 2020).

### 2.2.1. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks (ECM) je dinamična, trodimenzionalna mreža makromolekula tekuće, polu-tekuće ili krute konzistencije koju izlučuje stanica (Alberts i sur., 2014). ECM služi kao supstrat na koji se stanica povezuje specifičnim proteinskim strukturama te se putem tih struktura istovremeno izgrađuje i modelira (Geiger i Yamada, 2011). Osim toga, ima funkciju mehaničke potpore tkivu, a izvor je i faktora rasta i brojnih signalnih molekula nužnih za pokretanje biokemijskih i biomehaničkih puteva u stanici (Theocharis i sur., 2016; Frantz i sur., 2010). Međudjelovanjem stanice i ECM-a regulira se orijentacija i remodeliranje staničnog citoskeleta, a to je važno kako bi stanica mogla osjetiti i reagirati na promjene u okolini (Alberts i sur., 2014).

Sastav ECM-a vrlo je složen i može značajno varirati, ali osnovne komponente su (1) kolagen, (2) adhezijski glikoproteini (laminin, fibronektin, vitronektin), (3) proteoglikani i (4) elastična vlakna (Theocharis i sur., 2016; Michel i sur., 2010). Navedene molekule unutar ECM-a organizirane su kao intersticijski matriks (izvanstanični matriks) i kao bazalna membrana (slika 3) (Barber i sur., 2014). Intersticijski matriks nalazi se između stanica i s obzirom na to da je građen od vlaknastih proteina i proteoglikana, djeluje kao zaštita stanicama od vanjskog pritiska (Alberts i sur., 2002). Bazalna membrana je tanak sloj ECM-a koji je u izravnom kontaktu s epitelnim stanicama i služi im kao sidrište u vezivno tkivo.

Građena je pretežno od mreže laminina i kolegena tipa IV (Glentis i sur., 2014). Uz to, bazalna membrana je važna i u održavanju stanične polarnosti i mehanička je barijera koja sprječava širenje primarnog tumora u okolna tkiva, odnosno, sprječava proces EMT (Kelley i sur., 2014; Yurchenco i sur., 2011).



**Slika 3.** Pojednostavljeni prikaz organizacije molekula ECM-a. Intersticijski matriks (izvanstanični matriks) okružuje stanice, a bazalna membrana proteže se ispod epitelnih stanica (Prilagođeno prema Barber i sur., 2014).

**Proteoglikani** su strukturno i funkcionalno vrlo važne biomakromolekule ECM-a (Theocharis i sur., 2016), a možemo ih, ovisno o tome gdje se nalaze, podijeliti na unutarstanične, izvanstanične, proteoglikane s površine stanice i na one koji grade bazalnu membranu (Iozzo i Schaefer, 2015). Građeni su od proteinske srži na koju je povezan jedan ili više istih/različitih lanaca glikozaminoglikana (GAG) – dugih polisaharidnih lanaca koji se međusobno razlikuju po molekularnoj masi, disaharidima od kojih su građeni i po tome jesu li, i u kojem omjeru sulfatirani (Caligur, 2008). Postoji nekoliko vrsta GAG molekula: hijaluronska kiselina, heparan sulfat, dermatan sulfat i hondroitin sulfat (Theocharis i sur., 2010). Hijaluronska kiselina specifična je po tome što jedina nije sulfatirana i što veže velike količine vode i tako unutar intersticijskog matriksa stvara strukturu gela koju stanica koristi kao zaštitu od vanjskih kompresija (Theocharis i sur., 2016). **Kolagen** je protein vrlo zastupljen u ECM-u vezivnog tkiva koji osigurava elastičnost. Nalazimo ga u 27 različitih oblika, a najznačajniji su kolagen tipa I, II, III i IV ( Di Lullo i sur., 2002). **Fibronektin** je glikoprotein ECM-a koji se sastoji od nekoliko domena s kojima se povezuje na kolagen, proteoglikane, elastična vlakna, ali i na integrine (Theocharis i sur., 2016) koji ih prepoznaju

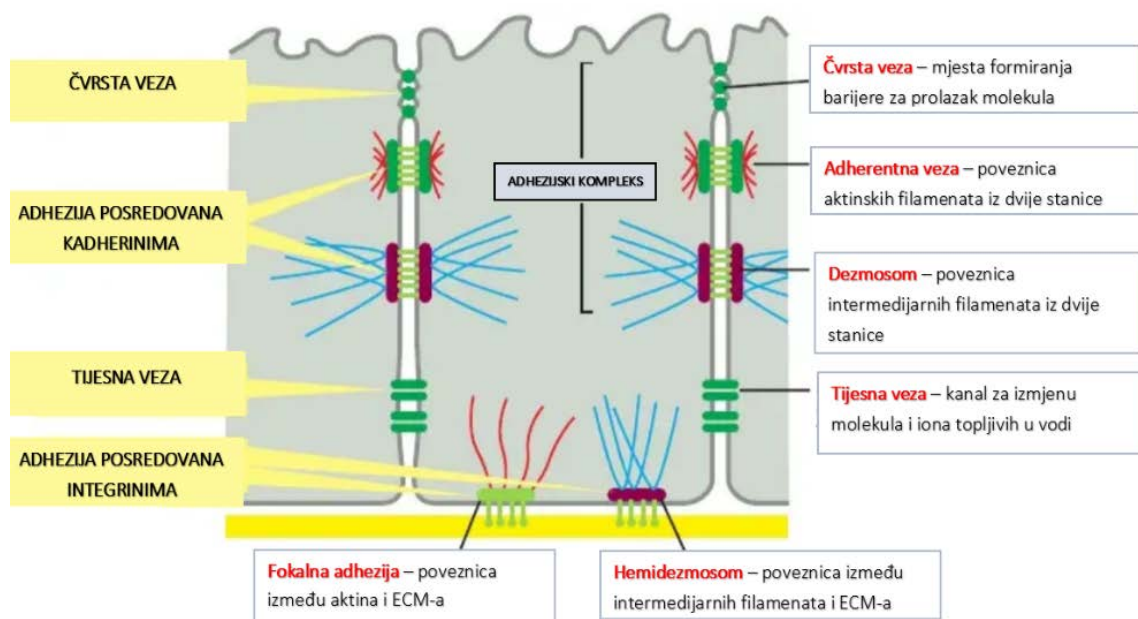


po specifičnoj aminokiselinskoj sekvenci (Pierschbacher i Ruoslahti, 1984). **Laminini** su veliki glikoproteini koji ulaze u interakciju s ostalim komponentama ECM-a, ali i s receptorima na stanici i tako utječu na diferencijaciju, migraciju stanica i staničnu adheziju (Hallman i sur., 2005).

### 2.2.2 Adhezija stanica

Adhezija stanica je proces koji podrazumijeva uspostavljanje kontakta između stanica i/ili između stanica i sastavnica ECM-a (Alberts i sur., 2002). Zbog toga, stanična adhezija ima vrlo važnu ulogu u razvoju trodimenzionalne strukture tkiva, održavanju homeostaze (Sumigray i Lechler, 2015) i odgovoru stanice na signale iz okoline (Gumbiner, 1996). Nastaje kao posljedica interakcija adhezijskih molekula na površini stanice (engl. *Cell-Adhesion Molecules*; CAMs) koje možemo podijeliti na: integrine, kadherine, selektine i superporodicu imunoglobulina (Albert i sur., 2014). CAMs su transmembranski proteini, i osim što se izvanstaničnim dijelom povezuju na proteine okolnih stanica ili sastavnice ECM-a, citoplazmatskim dijelom se povezuju na stanični citoskelet (aktinski filament, intermedijarni filament, mikrotubuli) (Alberts i sur., 2014; Ginsberg, 2014). Integrini, kadherini, selektini i imunoglobulini međusobno imaju različite funkcije i različite afinitete prema ligandima. Tako se, primjerice, kadherini i imunoglobulini povezuju isključivo s istovrsnim proteinima (homofilne interakcije) dok se integrini i selektini povezuju sa svim vrstama CAM-a (heterofilne interakcije) (Alberts i sur., 2014).

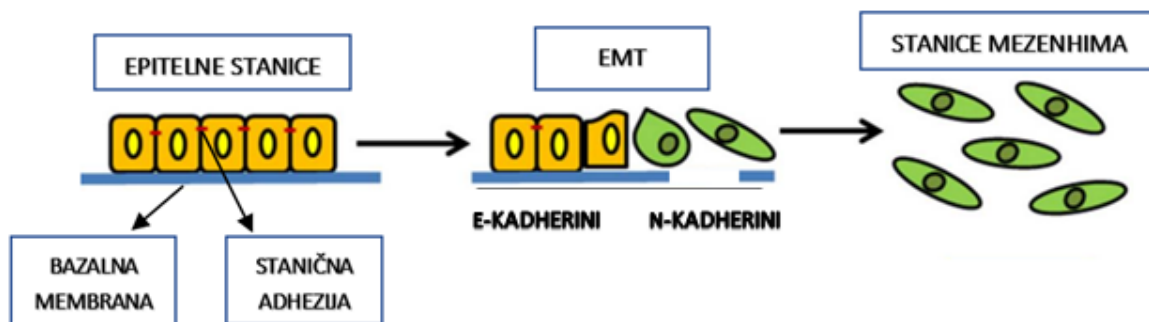
Dominantni proteini u interakciji dvije stanice su kadherini koji mogu biti povezani na intermedijarne filamente pa stvaraju strukture pod nazivom dezmosomi ili na aktinske filamente pa stvaraju strukture pod nazivom adherentna veza. Osim toga, proteini stanične adhezije mogu uspostaviti i neke druge strukture poput čvrste i tijesne veze (slika 4). One su stanici vrlo važne jer joj omogućuju lakšu regulaciju protoka molekula, njihov transport i difuziju (Bloemendal i Kück, 2013; Evans i Martin, 2002). Integrini dominiraju u stanica-ECM interakciji i vežu se na aktinske filamente pa stvaraju fokalne adhezije ili na intermedijarne filamente pa stvaraju hemidezmosome kojima se stanica povezuje na bazalnu membranu (slika 4) (Alberts i sur., 2014).



**Slika 4.** Prikaz adhezijskih struktura nastalih posredstvom CAMs (Prilagođeno prema Alberts i sur., 2014).

Dakle, molekule stanične adhezije omogućuju blisku povezanost epitelnih stanica, ali i njihovo usidravanje u bazalnu membranu. Za razliku od epitelnih, stanice mezenhima morfološki su drugačije i karakterizira ih manjak spomenutih adhezijskih struktura (Yeldag i sur., 2018; Thiery i Sleeman, 2006). Epitelno-mezenhimalna tranzicija običajen je biološki proces tijekom embriogeneze i tijekom zacjeljivanja rana. U isto vrijeme, u bolestima kao što su tumori, pomaže stanicama da budu invazivne i da steknu metastatsku sposobnost (Lamouille i sur., 2014; Thiery i Sleeman, 2006). Osim toga uključen je i u stjecanje otpornosti tumorskih stanica na radioterapiju (poglavlje 2.1.3.). EMT započinje gubitkom adhezijskih struktura između dvije stanice kao što su tjesne, adhezijske i čvrste veze ili dezmosomi (slika 5). Zapravo, primijećeno je da su dva oblika kadherina različito eksprimirani u epitelnim i mezenhimalnim stanicama. E-kadherini, proteini adherentne veze, eksprimirani su na epitelnim stanicama, ali gube se tijekom procesa EMT i zamjenjuju s N-kadherinima te stanica stječe sposobnost invazivnosti (Lamouille i sur., 2014; Wheelock i sur., 2008; Yang i Weinberg, 2008).

Drugim riječima, razumijevanje stanične adhezije obuhvatit će i razumijevanje ovog biološkog procesa i njihove zajedničke uloge u razvoju stanične otpornosti na zračenje (Fischer i sur., 2015; Zheng i sur., 2015).



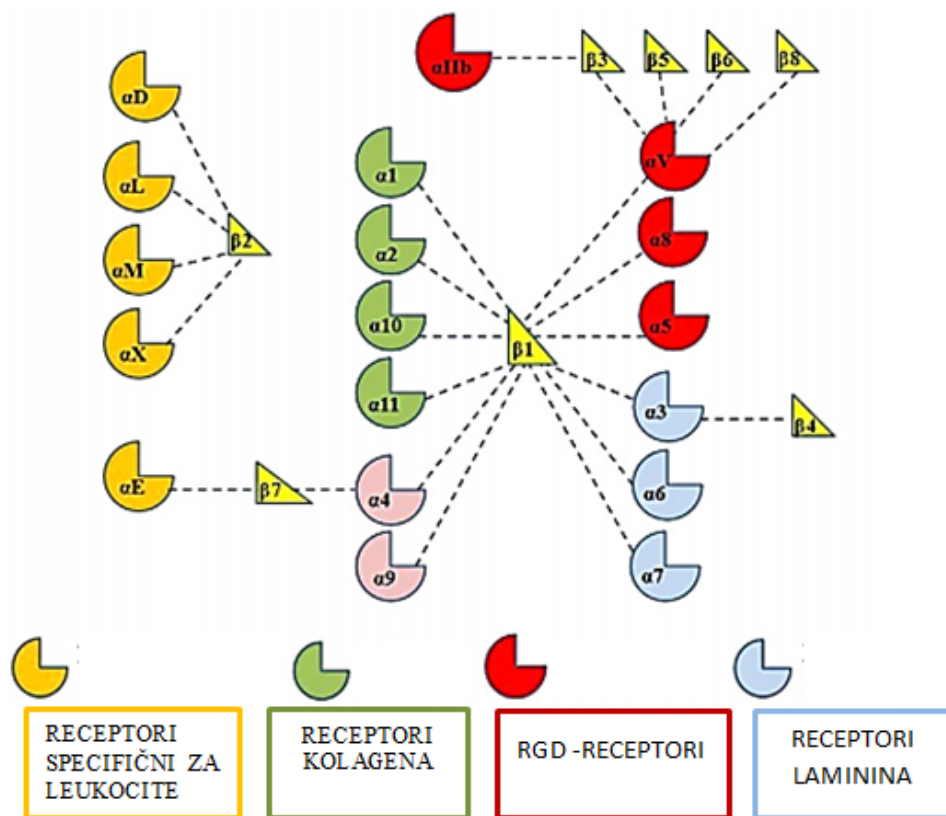
**Slika 5.** Pojednostavljeni prikaz epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) tijekom koje epitelna stanica poprima karakteristike mezenhimalne stanice i postaje invazivna (Prilagođeno prema Yanyuan i sur., 2016).

### 2.2.3. Integrini

Integrini su adhezijski glikoproteinski receptori sastavljeni od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice. Do danas je poznato 18 različitih  $\alpha$ - i 8  $\beta$ -podjedinica koje se povezuju u 24 različita  $\alpha\beta$ -heterodimerna proteina. Svaka podjedinica integrina sastoji se od transmembranske domene i kratkog citoplazmatskog repa (Ginsberg, 2014). Integrini se međusobno razlikuju prema ligandima ECM-a s kojima ulaze u interakcije (slika 6) pa ih sukladno tome možemo podijeliti na (1) receptore laminina ( $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$  i  $\alpha6\beta4$ ), (2) receptore kolagena ( $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha10\beta1$ ,  $\alpha11\beta1$ ), (3) receptore specifične za leukocite (integrini  $\beta2$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha4\beta7$ ,  $\alpha E\beta7$ ) te (4) RGD-receptore ( $\alpha v\beta1$ ,  $\alpha v\beta3$ ,  $\alpha v\beta5$ ,  $\alpha v\beta6$ ,  $\alpha v\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  i  $\alpha IIb\beta3$ ). RGD receptori prepoznaju specifičan slijed aminokiselina (arginin–glicin–aspartat) prisutan u mnogim proteinima koji izgrađuju ECM (fibronektin, kolagen, vitronektin) (Barczyk i sur., 2010).

Stanica koristi integrine da se pomoću njih čvrsto prihvati za ECM, kao poveznicu između ECM-a i staničnog citoskeleta te kao poveznicu između dvije stanice. Odgovorni su za različite procese u stanici kao što su stanični rast i preživljenje, diferencijacija, reorganizacija citoskeleta i stanična migracija. Bez tih aktivnosti razvoj i regeneracija tkiva, angiogeneza, imunološki odgovor stanice i održavanje homeostaze ne bi bio moguć (Ginsberg, 2014; Anderson i sur., 2014). Sve to, integrini mogu obavljati zbog sposobnosti da provode signal u dva smjera: iz stanice u okolinu (engl. *inside-out*) i iz okoline u stanicu (engl. *outside-in*) (Kim i sur., 2003). Aktivacija integrina je proces tijekom kojeg integrin putem ova dva mehanizma mijenja svoju konformaciju, a time i afinitet prema sastavnicama ECM-a. Inside-out i outside-in mehanizmi razlikuju se po tome što je kod inside-out

signalizacije glavni pokretač konformacijskih promjena stanica koja to čini vezanjem proteina, uglavnom talina i kindlina, na citoplazmatski rep integrina (Takagi i sur., 2001; Vinogradova i sur., 2002; Morse i sur., 2014), a kod outside-in signalizacije tu promjenu potiče sam integrin nakon vezanja za sastavnice ECM-a (Arnaout i sur., 2005; Chen i sur., 2006; Zhu i sur., 2007). Proces aktivacije integrina završava stvaranjem integrinskih klastera (tzv. nakupljanje integrina) i stvaranjem kompleksa adhezije integrina sastavljenim od velikog broja proteina na citoplazmatskoj strani integrinskog heterodimera (Anderson i sur., 2014).



**Slika 6.** Prikaz preferencije vezanja podjedinica integrina prema sastavnim molekulama ECM-a (Prilagođeno prema Das i sur., 2017).

#### 2.2.4. Adhezija posredovana integrinima

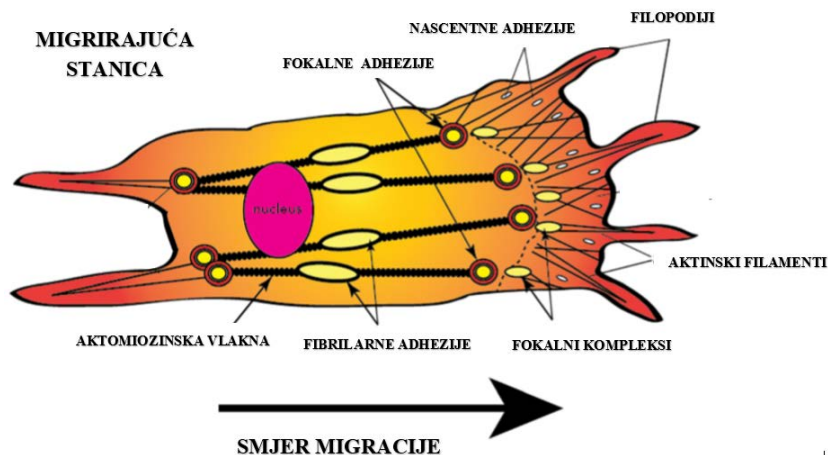
ECM i stanica povezani su specifičnim proteinskim strukturama – adhezijama od kojih velik broj nastaje posredstvom integrina (engl. *Integrin Adhesion Complexes*; IAC). Sastavljanje IAC-a posljedica je aktivacije integrina koja se događa u nekoliko koraka, a započinje vezanjem integrinske podjedinice na sastavnicu ECM-a. Nakon uspostavljene interakcije, formiraju se integrinski klasteri, a zatim slijedi regrutiranje brojnih citoskeletnih,

strukturnih i signalnih proteina oko citoplazmatskog repa integrina s ciljem reorganizacije staničnog citoskeleta i prijenosa informacija iz okoline u stanicu (Das i sur., 2017).

Kompleksi adhezije temeljeni na integrinima razlikuju se međusobno po molekularnom sastavu proteina, ali i po tipu integrinskih podjedinica koje sudjeluju u nastanku IAC-a (Humphries i sur., 2015). Ova raznolikost primijećena je kod različitih tipova stanica, zbog različitog sastava ECM-a koji ih okružuje, ali i ovisno o dijelu stanice koji promatramo (Horton i sur., 2015). Brojne funkcionalne i morfološke analize definirale su nekoliko glavnih oblika IAC-a: (1) nascentne adhezije (NA), (2) fokalni kompleksi (FC), (3) fokalne adhezije (FA), (4) fibrilarne adhezije (FB), (5) podosomi i invadopodiji, (6) hemidezmosom i (7) retikularne adhezije (Lock i sur., 2018; Walko i sur., 2015; Zaidel-Bar i sur., 2007; Beningo i sur., 2001).

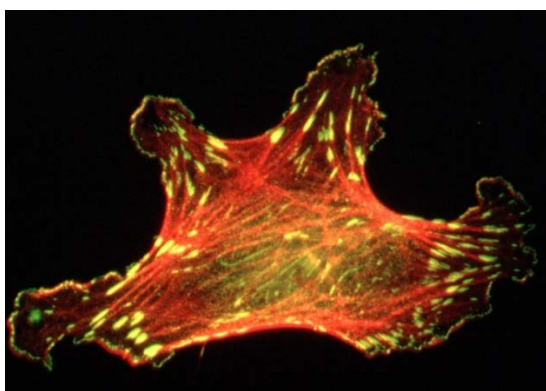
#### 2.2.4.1. *Nascentne adhezije, fokalni kompleksi, fokalne adhezije i fibrilarne adhezije*

NA i FC su male prolazne strukture koje se sastavljaju i rastavljaju (engl. *turning over*) tijekom nekoliko minuta i može se reći da "ispituju" lokalni ECM prije nego se rastave ili sazriju u stabilnije strukture poput FA. NA najmanje su adhezijske strukture (Aleksandrova i sur., 2008; Choi i sur., 2008). Nalaze se u blizini izduženih dijelova stanične membrane (filopodiji, mikrovili) koje stanica uspostavlja kako bi mogla migrirati (slika 7) (Sun i sur., 2014). Sastavljanje i stabilnost NA usko se povezuje s polimerizacijom aktina u stanici (Aleksandrova i sur., 2008). FC, također nastaju na periferiji stanice (slika 7), ali nešto bliže samom središtu u odnosu na NA (Zaidel-Bar i sur., 2003; Nobes i Hall, 1995). Njihov rast i produljenje u FA odvija se po predlošku aktinskog citoskeleta koji održava stabilnost i pruža potporu stanici tijekom stvaranja izduženih dijelova membrane (Choi i sur., 2008; Bartles, 2000). FB su duge i stabilne strukture smještene još bliže središnjem području stanice (slika 7) (Zaidel-Bar i sur., 2004), a bogate su snopovima fibronektina *in vivo*, integrinom  $\alpha 5\beta 1$  i proteinom tenzinom (Zamir i sur., 1999).



**Slika 7.** Prikaz smještaja adhezijskih struktura unutar migrirajuće stanice (Prilagođeno prema Anderson i sur. 2014).

Fokalne adhezije (FA) su vrlo dinamične i složene proteinske strukture koje povezuju ECM i aktinski citoskelet (Geiger i Yamada, 2011). Unutar stanice smještene su na krajevima aktomiozinskih filamenata nazvanih stresne niti (engl. *stress fibers*) (slika 7 i slika 8) čija je funkcija da rastezanjem i uspostavljenjem napetosti stvaraju kontrakcije koje stanica koristi za polarizaciju i migraciju. FA su signalizacijsko središte koje integrinima služi za prijenos signala iz okoline u stanicu važnih za regulaciju brojnih funkcija poput rasta, ekspresije gena ili preživljenja (Adams, 2002; Cukierman i sur., 2002). Integrini u FA imaju važnu ulogu jer oko svog citoplazmatskog repa, izravno ili neizravno, regrutiraju brojne proteine poput talina (Burrige i Connell, 1983), paksilina (Turner i sur., 1990), vinkulina (Geiger, 1979) i alfa-aktinina (Lazarides i Burrige, 1975). FA nastaju sazrijevanjem NA ili FC ako dođe do aktivacije integrina (Case i sur., 2016).



**Slika 8.** Prikaz fokalnih adhezija u stanicama vezivnog tkiva embrija štakora. Aktomiozinski filamenti (crveno) i vinkulin (žuto) (Prilagođeno prema: Catherine Nobes & Alan Hall. CC0 1.0 Universal).

#### 2.2.4.2. *Podosomi i invadopodiji*

Podosomi su aktinom bogate, prstenasto oblikovane adhezijske strukture, uglavnom prisutne kod stanica koje migriraju brzo (Gimona i sur., 2008). Njihov molekularni sastav vrlo je sličan onom kod FA, ali njihova rasprostranjenost u stanici se razlikuje. Podosomi su prisutni oko područja stanične membrane i uglavnom se pojavljuju povezani u strukture nalik rozeti, ali mogu biti prisutni i kao pojedinačne strukture (Seetharaman i Etienne-Manneville, 2019). Invadopodiji su vrlo slični, ali su karakteristični za invazivne tumorske stanice (Linder, 2009; Gimona i sur., 2008). Njihova rasprostranjenost slična je kao i kod podosoma, duž stanične membrane (Block i sur., 2008). Podosomi i invadopodiji razlikuju se po svojoj sposobnosti da djeluju kao lokalna mjesta razgradnje ECM-a regrutiranjem metaloproteinaza (Linder i sur., 2009).

#### 2.2.4.3. *Hemidezmosomi i retikularne adhezije*

Hemidezmosomi i retikularne adhezije se po svom sastavu u potpunosti razlikuju od prije spomenutih adhezija pa ih stoga opisujemo odvojeno, iako su hemidezmosomi poznati već desetljećima (Walko et al., 2015), a retikularne adhezije su otkrivene tek nedavno, točnije 2018. godine (Lock i sur., 2018). Hemidezmosomi su još jedna vrsta IAC-a koja omogućuje stabilnu adheziju bazalnih epitelnih stanica na bazalnu membranu. Srž ovih kompleksa čini integrin  $\alpha 6\beta 4$  i P1a izoforma citoskeletnog vezujućeg proteina plektina koji je poveznica adhezijske strukture s intermedijarnim filamentima (Walko i sur., 2015). Zanimljivo, podjedinica integrina  $\beta 4$  povezuje se isključivo s podjedinicom  $\alpha 6$  (Eke i sur., 2018), a posebna je i po značajno većoj duljini citoplazmatskog repa u odnosu na ostale  $\beta$  podjedinice (Walko i sur., 2015). Još jedna vrsta IAC-a su retikularne adhezije (RA) koju stvara integrin  $\alpha \nu \beta 5$  u odsutnosti talina i F-aktina. Dinamika razvoja i održavanja RA kao i njezina morfologija, čine je posebnom u odnosu na ostatak integrin posredovanih adhezijskih struktura. RA jedine su adhezijske strukture koje opstaju tijekom mitoze i tako osiguravaju sidrenje stanice u ECM što je neophodno za učinkovitu staničnu diobu (Lock i sur., 2018).

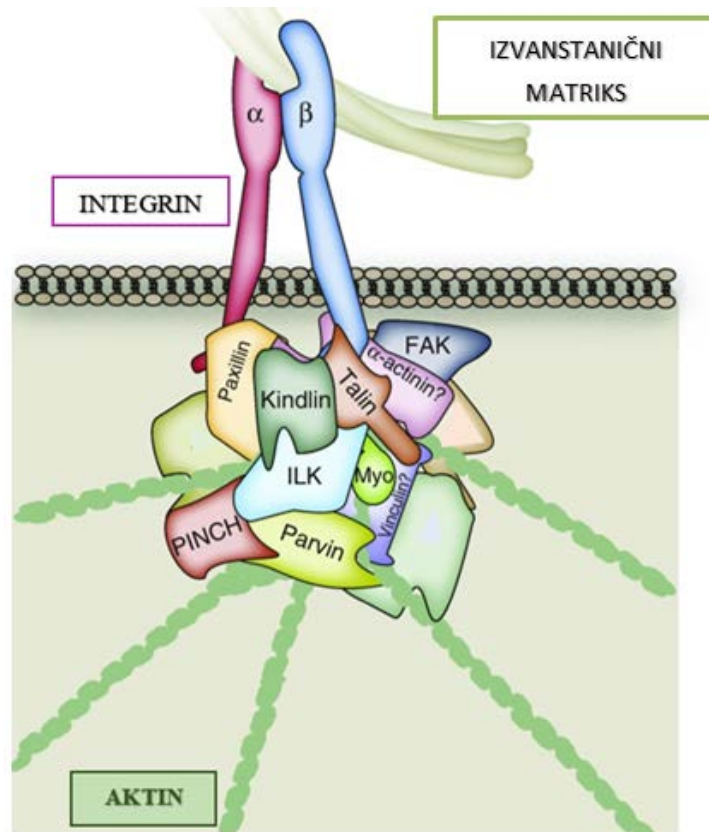
#### 2.2.5. Adhesom integrina

Ukupni proteini koji čine IAC još se nazivaju adhesom integrina ili skraćeno samo adhesom (Anderson i sur., 2014). Horton i suradnici (2015) proučavali su sastav adhesoma stanica koje su bile nasađene na fibronektinu i na temelju podataka dobivenih iz nekoliko

laboratorija definirali su meta-adhesom. Navedeni pojam označava sve proteine koji su pronađeni kao dio adhesoma kod stanica uzgojenih na fibronektinu, a radilo se o preko 2000 proteina. Budući da su stanice uzgajane na fibronektinu, dobiveni podaci odnosili su se uglavnom na adhesion integrina  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha 5\beta 1$  koji se povezuju na fibronektin (Horton i sur., 2016). Dodatno, definirali su i 60 najčešće zastupljenih proteina u adhesomu koje su nazvali konsenzus adhesom, odnosno, srž IAC-a koja je smještena između četiri osi proteina: (1) ILK–PINCH–kindlin, (2) FAK–paksilin, (3) talin–vinkulin i (4)  $\alpha$ -aktinin–ziksini–VASP.

Integrini nemaju katalitičku aktivnost pa su ovisni o regrutiranju brojnih staničnih proteina koji im omogućuju prijenos signala u/iz stanice (Anderson i sur., 2014). Najbolje istražena adhezijska struktura temeljena na integrinima je FA i unutar nje razlikujemo skeletne, strukturne i signalne proteine koje jednim imenom nazivamo adaptor proteinima. Svi adaptor proteini ulaze u interakcije jedni s drugima i tako su direktno ili indirektno povezani s integrinima (slika 9). Iako su im funkcije vrlo različite, svi proteini poveznici su u kompleksnu mrežu interakcija (Legate i Fässler, 2009). **Signalni adaptor proteini** odgovorni su za prijenos informacija u stanici i aktivaciju točno određenih signalnih puteva nizvodno od integrina. Proteini koji spadaju u ovu skupinu su uglavnom kinaze poput Src (engl. *Src family kinase*; SFK), ILK (engl. *integrin linked kinase*; ILK) ili FAK (engl. *Focal Adhesion Kinase*; FAK) (Arias-Salgado i sur., 2005; Ahmed i sur., 2002; Eliceiri i sur., 2002; Chen i sur., 2000; Hannigan i sur., 1996;). **Skeletni adaptor proteini** poput paksilina ili kindlina 2 povezuju integrine i ostale adaptor proteine (Moser i sur., 2008; Han i sur., 2006; Fagerholm i sur., 2005), a **strukturni adaptor proteini** izravna su poveznica integrina i aktinskog citoskeleta (F-aktin). U ovoj su skupini proteini poput filamina, tenzina, alfa-aktinina i talina (Calderwood i sur., 2003; 2001; 1999; Otey i sur., 1993). Ukratko, mreža interakcija unutar adhesoma vrlo je složena i dinamična, a regulirana je staničnom signalnom mašinerijom (Geiger i Yamada, 2011). U nastavku poglavlja slijedi opis nekoliko najvažnijih proteina adhesoma, njihove osnovne uloge i povezanost s različitim oblicima tumora.





**Slika 9.** Pojednostavljeni prikaz nekoliko osnovnih proteina IAC-a, izravno i neizravno povezanih na integrinsku podjedinicu i aktinski citoskelet; paksilin, kindlin, alfa-aktinin, talin, parvin, vinkulin, kinaza fokalne adhezije (FAK), integrin vezujuća kinaza (ILK), PINCH (Prilagođeno prema Durrant i sur., 2017).

### 2.2.5.1. ILK-PINCH

ILK i PINCH dva su vrlo zastupljena proteina fokalnih adhezija koji ulaze u interakciju i formiraju kompleks ILK-PINCH. PINCH je protein koji nema enzimsku aktivnost stoga ima ulogu posrednika brojnih molekularnih interakcija u fokalnim adhezijama (Tu i sur., 1999; Wu, 1999). ILK je, suprotno tome, protein koji u svojoj strukturi ima tri domene (Sedgwick and Smerdon, 1999; Wu, 1999): domenu za fosforilaciju, domenu za povezivanje s proteinom PINCH i domenu za interakciju s β podjedinicom integrina (β1, β3 ili β5) (Hannigan i sur., 1996). Osim autofosforilacije u *in vitro* uvjetima (Delcommenne i sur., 1998; Hannigan i sur., 1996), otkriveno je da ILK u stanici vrši i fosforilaciju proteina PKB/Akt, glavnih proteina Akt signalnog puta (Delcommenne i sur., 1998; Hannigan i sur., 1996). Ova reakcija vrlo je značajna s obzirom na to da se deregulacija proteina Akt povezuje s razvojem tumora (Mahajan i Mahajan, 2012), a povećana aktivnost Akt signalnog puta povezuje se s EMT i metastaziranjem stanica (Xue i Hemings, 2013). Na temelju ovih

saznanja, nije neobično što su Wu i suradnici (1998) mnogo ranije uspjeli dokazati da pojačana ekspresija proteina ILK u epitelnim stanicama potiče njihovu tumorigenost *in vivo*.

#### 2.2.5.2. Kindlin

Kindlini su proteini koji se nalaze u fokalnim adhezijama i fokalnim kompleksima (Ussar i sur., 2006), a nalazimo ih u tri izoforme (Plow i sur., 2016). Sudjeluju u regulaciji prijenosa signala u/iz stanice (Montanez i sur., 2008), a djeluju i kao poveznica integrina s aktinskim citoskeletom (Shi i sur., 2007; Ussar i sur., 2006; Tu i sur., 2003). Kindlini se smatraju koaktivatorima u talin-potpomognutoj aktivaciji integrina zato što se povezuju na citoplazmatski dio  $\beta 3$  integrinske podjedinice, reduciraju njezinu fleksibilnost i pospješuju vezanje talina i drugih adaptor proteina (Yan-Qing i sur., 2008). Primijećeno je da je ekspresijski obrazac kindlina u tumorskim stanicama čovjeka drugačiji u odnosu na zdrave stanice (Plow i sur., 2016), a protein kindlin-2 može se povezati s nastankom gotovo svih obilježja tumorskih stanica (Sossey-Alaoui i sur., 2016).

#### 2.2.5.3. Talin

Talin je protein staničnih adhezija koji ima ključnu ulogu u aktivaciji integrina i u povezivanju staničnog citoskeleta (F-aktin) s integrinima (Monkley i sur., 2000), a u stanici se pojavljuje u dvije izoforme (Gough i Goult, 2018). Talin je sastavljen od nekoliko domena pomoću kojih se povezuje na  $\beta$  integrine, aktinske filamente i vinkulin (Calderwood i sur., 2013; Schoenwaelder i Burridge, 1999; Pfaff i sur., 1998; Knezevic i sur., 1996). Osim s njim, ulazi i u interakciju s proteinima KANK (engl. *kidney ankyrin repeat containing*; KANK), FAK, paksilin i kindlin (Goult i sur., 2018). Iako mu je primarna funkcija vezanje na aktin, nedavno je otkriveno kako je talin važan i za organizaciju mikrotubula na mjestima nastanka FA i to putem interakcije s proteinima KANK (Chen i sur., 2018; Bouchet i sur., 2016; Sun i sur., 2016). Kindlini i talini ulaze u interakciju tijekom vezanja na citoplazmatski rep  $\beta$  podjedinice gdje sinergistički sudjeluju u regrutiranju ostalih adaptor proteina uključenih u aktivaciju integrina (Calderwood i sur., 2013; Yan-Qing i sur., 2008). Veza aktinskog citoskeleta i integrina ključna je za staničnu adheziju i migraciju stoga se deregulirana ekspresija proteina talin1 povezuje s povećanom adhezijom, migracijom i invazijom kod stanica karcinoma prostate koju su primijetili Sakamoto i suradnici (2009).

#### 2.2.5.4. Vinkulin

Vinkulin je protein fokalne adhezije koji nema enzimsku aktivnost, ali je esencijalan za njezino sazrijevanje i održavanje stabilnosti i čvrstoće (Dumbauld i sur., 2013; Diez i sur., 2011; Humphries i sur., 2007; Saunders i sur., 2006). Uz navedeno, omogućava i mehaničku osjetljivost fokalne adhezije (Plotnikov i sur., 2012), sudjeluje u regulaciji reorganizacije aktinskog citoskeleta (Thievensen i sur., 2013) i u regulaciji stanične smrti (Subauste i sur., 2004). Do danas je poznato da ulazi u interakciju s više od 14 različitih proteina poput talina (Burrige i Mangeat, 1984), alfa-aktinina (Otey i sur., 1993) i paksilina (Turner i sur., 1990). Primjerice, mehanička osjetljivost fokalne adhezije posljedica je njegove interakcije s paksilinom (Plotnikov i sur., 2012), a čvrstoća fokalne adhezije posljedica je interakcije s talinom (Dumbauld i sur., 2013). Tijekom sazrijevanja fokalnih adhezija, vinkulin je regrutiran u inaktivnom obliku i povezan na fosforilirani paksilin. Tek nakon vezanja talina, vinkulin se aktivira i počinje obavljati ranije nabrojane funkcije. Upravo zato se talin smatra glavnim u lokalizaciji i aktivaciji vinkulina (Case i sur., 2016). Kao i kod proteina spomenutih u prethodnim odlomcima, i ovdje postoji veza između deregulirane ekspresije i progresije tumorskih stanica koju su Shi i suradnici (2018) primijetili kod karcinoma gušterače.

#### 2.2.5.5. Paksilin i FAK

$\beta$ 1 integrin-ovisna signalizacija ne bi bila moguća bez proteina FAK i paksilina (Chen i sur., 2000). FAK je protein iz skupine tirozin kinaza koji se aktivira autofosforilacijom kao odgovor na povezivanje stanice s ECM-om (Siciliano i sur., 1996; Burrige i sur., 1992). Autofosforilacija proteina FAK kao i fosforilacija paksilina međusobno su usklađeni procesi, a oba proteina vežu se na istu regiju  $\beta$ 1 podjedinice (Chen i sur., 2000; Schaller i sur., 1992). Unutar migrirajuće stanice, aktivirani FAK smješten je u njezinom prednjem dijelu gdje regulira sastavljanje i rastavljanje fokalnih adhezija (Hu i sur., 2014). Paksilin je citoskeletni protein koji nema enzimsku aktivnost, ali se ponaša kao adaptor protein zbog vezujućih mjesta za druge proteine i tako uspostavlja vezu između ECM-a i aktinskog citoskeleta (Turner i sur., 1990). Osim što ulazi u interakciju s FAK/Src kompleksom i tako se aktivira, veže se i na adaptor proteine poput vinkulina i proteina Crk (Brown i Turner, 2004; Schaller, 2001; Turner, 2000). FAK i paksilin usko se vežu uz tumore. Primijećeno je da se pojačana ekspresija proteina FAK pojavljuje kod različitih oblika tumora (debelo crijevo, pluća, dojka, vrat i glava), a povezuje se i s migracijom, adhezijom i invazijom metastatskih stanica (Itoh i sur., 2004; Miyazaki i sur., 2003). Paksilin je pak vrlo podložan akumulaciji mutacija koje

mogu uzrokovati razvoj zloćudnih tumora (Deakin i sur., 2012; Short i sur., 2007) što je primijećeno kod karcinoma pluća (Jagadeeswaran i sur., 2008), melanoma (Velasco-Velázquez i sur., 2008), ali i kod karcinoma prostate (Sen i sur., 2012).

#### 2.2.5.6. $\alpha$ -aktinin, ziksin i VASP

VASP i ziksin su proteini koji se povezuju direktno na aktin, reorganiziraju ga i kataliziraju njegovu polimerizaciju (Wu i Gunst, 2015; Rottner i sur., 2001; Drees i sur., 2000). Njihova regrutacija događa se u nešto kasnijim fazama sazrijevanja fokalne adhezije nego primjerice regrutacija vinkulina i paksilina (Choi i sur., 2008).  $\alpha$ -aktinin je citoskeletni protein izravno povezan i s  $\beta 1$  podjedinicom integrina (Otey i sur., 1993), a u stanicama se nalazi u četiri izoforme (Trulsson i sur., 2011). Odsutnost  $\alpha$ -aktinina očituje se u neobično kratkim i neorganiziranim aktinskim filamentima (Choi i sur., 2008). Proteini VASP i ziksin mogu se povezati s nastankom i razvojem tumora. Tako je, primjerice, kod karcinoma prostate primijećeno da je upravo interakcija ziksina s tumor supresorom (Myopodin) esencijalna za sprječavanje progresije tumorskih stanica. Bez uspostave te interakcije, tumor supresor ne može djelovati, odnosno, javlja se deregulacija stanične pokretljivosti i invazivnost stanica (Lin i sur., 2001; Yu i sur., 2006). Ekspresija proteina VASP, za razliku od većine spomenutih proteina, nije deregulirana u tumorskim stanicama, već je jednako visoka kao i u onim zdravim. Iznimka je jedino karcinoma pluća kod kojeg je ta ekspresija bila povećana u odnosu na zdrave stanice (Dertsiz i sur., 2005). Iako njegova razina ekspresije nije najbolji biljeg tumorskih stanica, njegova fosforilacija na točno određenoj aminokiselini (Ser (157)) pokazala se potencijalno dobrim biljegom za predviđanje metastatskih stanica karcinoma prostate (Hasegawa i sur., 2008).

#### 2.2.5.7. Tenzin

Tenzini su fosfoproteini lokalizirani u fokalnim adhezijama. Građeni su od tri domene s kojima se vežu na aktinske filamente, ulaze u interakciju s integrinom  $\beta 1$  i tirozin-fosforiliranim proteinima. Protein CTEN (engl. *C-terminal Tensin-like*; CTEN) spada u porodicu tenzina, ali se njegova građa razlikuje od ostalih proteina (tenzin 1, 2 i 3) jer ne posjeduje N-terminalnu domenu za vezanje na aktinske filamente (Albasri i sur., 2009). Funkcija tenzina je, osim toga što sudjeluje u sastavljanju i rastavljanju fokalne adhezije, i da bude posrednik brojnih proteinskih interakcija (Lo, 2004). Albasri i suradnici (2009) svrstali

su CTEN-u ulogu onkogeni koji u stanicama kolorektalnog karcinoma stimulira proces EMT, stanične migracije i invazije i tako doprinosi širenju tumora.

#### 2.2.6. Adhesom integrina kao izvor potencijalnih meta u liječenju tumora otpornih na radioterapiju

Kao što je već navedeno u prethodnim poglavljima, adhezije posredovane integrinima imaju važnu ulogu u preživljenju i diferencijaciji stanice, migraciji, održavanju homeostaze, ali i u razvoju bolesti poput tumora (Horton i sur., 2015). Sastavljanje IAC-a, proces koji slijedi nakon aktivacije integrina, predstavlja vrlo složen i dinamičan mehanizam odgovora stanice na promjene iz okoline i izravno je povezan s njezinom sudbinom (Horton i sur., 2016). Konsenzus adhesom sastoji se od 60 proteina od kojih su neki izravno, a neki neizravno povezani na integrine. Mutacije ili deregulacije komponenti adhesoma povezuju se s brojnim bolestima kao što su krvožilne, imunosne, metaboličke i neurološke (Winograd-Katz i sur., 2014), a čak 32 proteina adhesoma veže se uz proces razvoja zloćudnih tumora (Horton i sur., 2016). Ciljanje integrina ili ostalih proteina IAC-a može se iskoristiti kako bi se dodatno povećala osjetljivost tumorskih stanica na postojeće protutumorske lijekove i radioterapiju (Dickreuter i Cordes, 2017; Eke i sur., 2010).

Unazad nekoliko godina, više grupa znanstvenika bavilo se istraživanjem uloge proteina adhesoma u otpornosti stanica na kemoterapiju (Wang i sur., 2020; Röselová i sur., 2018; Yo i sur., 2018; Aoudjit i Vuori, 2012) i radioterapiju (Li i sur., 2018; Eke i sur., 2012; 2010). Eke i suradnici (2010) pokazali su u *in vivo* i u *in vitro* uvjetima na mišjim fibroblastima da utišavanje ekspresije proteina PINCH utječe na pojačanu osjetljivost stanica na zračenje, ali i na protutumorski lijek – cisplatinu. Osim ovog istraživanja, Eke i suradnici (2012) proveli su još jedno u kojem su pokazali pojačanu osjetljivost stanica tumora glave i vrata na radioterapiju, ali ciljanjem integrina  $\beta 1$  inhibitornim protutijelima. Li i suradnici (2018), također su proučavali ulogu integrina  $\beta 1$  u otpornosti stanica na radioterapiju i pokazali da utišavanje njegove ekspresije doprinosi pojačanoj osjetljivosti stanica karcinoma grkljana na zračenje.

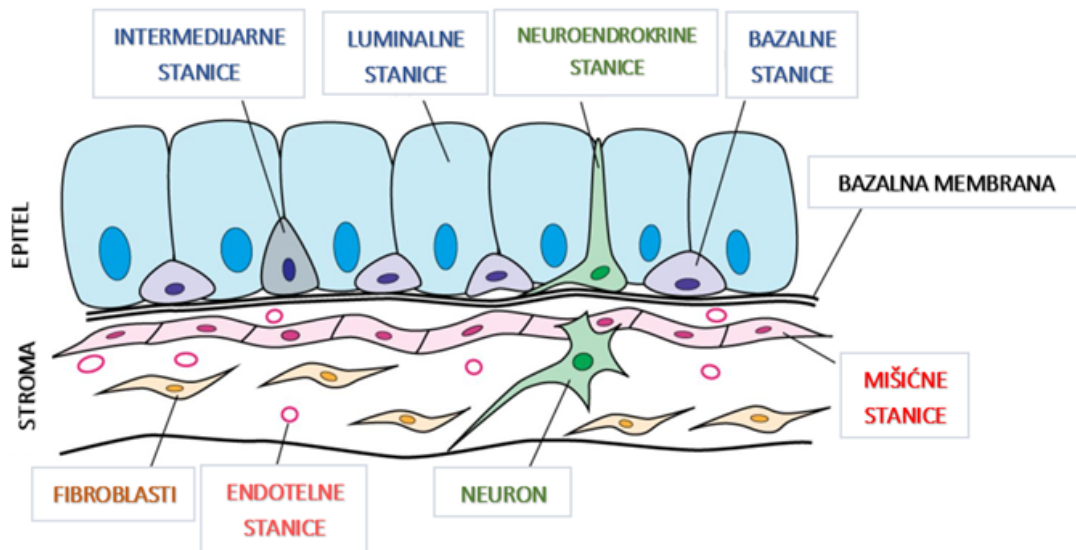
Sve navedeno upućuje na to da bi integrini i ostali proteini IAC-a potencijalno mogli biti dobre mete u liječenju različitih oblika tumora (Horton i sur., 2016). Za neke druge bolesti koje su povezane s IAC-om na tržištu već postoje lijekovi koji djeluju putem integrina. Napravljeni su tako da blokiraju integrin–ECM interakciju s ciljem sprječavanja aktivacije integrina i sastavljanja IAC-a. **Abituzumab** je monoklonsko protutijelo dizajnirano za ciljanje

integrina  $\alpha V$ . Lijek se koristi za sprječavanje stvaranja metastaza u kostima kod pacijenata s dijagnosticiranim karcinomom prostate koji ne reagiraju na terapiju androgene deprivacije i kod kojeg postoji opasnosti daljnjeg napretka bolesti (Hussain i sur., 2016; Behrens, 2014). **Natalizumab** je monoklonsko protutijelo koje je usmjereno prema integrinu  $\alpha 4\beta 1$  na površini bijelih krvnih stanica. Blokiranjem integrina, ovaj lijek sprječava prelazak bijelih krvnih stanica u područje mozga i kralježničke moždine i tako smanjuje upalni proces koji kod Chronove bolesti i multiple skleroze često završava oštećenjem tkiva pacijenta (Rice i sur., 2005; Van Assche i sur., 2005). **Vedolizumab** je monoklonsko protutijelo koje djeluje na heterodimer integrina  $\alpha 4\beta 7$ , a koristi se za liječenje ulceroznog kolitisa i Chronove bolesti (Fedyk i sur., 2012; Soler i sur., 2009).

### 2.3. Adhesom stanica prostate i promjena ekspresije proteina adhesoma u stanicama tumorima prostate

Jedan od mogućih pristupa u liječenju karcinoma prostate je radioterapija na koju stanice mogu razviti otpornost. Kao što je već navedeno u poglavlju 2.2.4., integrini i ostali proteini IAC-a pokazali su se potencijalno dobrim metama za povećanje osjetljivosti stanica različitih oblika tumora na već postojeće terapije, kemoterapiju i radioterapiju. Kako bi se bolje razumjelo može li se ciljanje integrina i ostalih proteina IAC-a u stanicama karcinoma prostate koristiti kao potencijalna meta za dokidanje otpornosti na zračenje važno je prvo istražiti razlike u sastavu adhesoma zdravih stanica prostate i stanica karcinoma prostate, a uz to, bitno je na isti način pristupiti i razumijevanju razlika u sastavu adhesoma osjetljivih stanica karcinoma u odnosu na one otporne na radioterapiju. Budući da je pristup istraživanju adhesoma njegovim izdvajanjem, nakon kemijskog umrežavanja iza čega slijedi analiza tako izdvojenog adhesoma metodom spektrometrije mase (Jones i sur., 2015) relativno nova metoda, u literaturi još nije primijenjen ovaj pristup.

Prostata je kod zdravog muškarca građena od epitelnih stanica (bazalne, luminalne i intermedijarne stanice), neuroendokrinih, endotelih, mišićnih stanica i stanica fibroblasta (slika 10) (Wu i Liao, 2018). Na površini bazalnih stanica prostate eksprimirani su integrini  $\alpha 2\beta 1$  i  $\alpha 6\beta 4$ , a u stanicama, vrlo je zastupljen CTEN, protein fokalne adhezije (poglavljje 2.2.3.) koji se usko veže uz regulaciju proliferacije stanica prostate (Wu i Liao, 2018; Lo i Lo, 2002).



**Slika 10.** Shematski prikaz stanica koje izgrađuju prostatu odraslog čovjeka. Epitel je izgrađen od bazalnih stanica izravno povezanih na bazalnu membranu, sekretornih luminalnih stanica te rijetkih intermedijarnih i neuroendokrinih stanica. Stroma, s kojom je povezan epitelijum, građena je od glatkih mišićnih stanica, fibroblasta te komponenta živčanog i krvožilnog sustava (Prilagođeno prema Toivanen i Shen, 2017).

Uspoređivanjem ekspresije integrina normalnih stanica prostate i tumorskih stanica primijećeno je da integrini  $\alpha V\beta 3$  (Zheng i sur., 1999) i  $\alpha V\beta 6$  (Raab-Westphal i sur., 2017) nisu prisutni kod normalnih, ali su eksprimirani kod stanica karcinoma. McCabe i suradnici (2007) pokazali su da se stanice karcinoma prostate inicijalno koriste upravo integrinom  $\alpha V\beta 3$  kako bi se mogle usidriti u ECM kosti, a naknadno je potvrđeno da se povećana ekspresija integrina  $\alpha V\beta 3$ , ali i  $\alpha V\beta 5$  povezuje s progresijom karcinoma prostate (Ahmedah i sur., 2017). U staničnoj liniji karcinoma prostate PC3 primijećena je pojačana ekspresija integrina  $\alpha 2\beta 1$  koja se povezuje se s angiogenezom, invazijom i preživljenjem stanice (Ryu i sur., 2016). Uz to, valja istaknuti da je kod više od 65 % karcinoma prostate pojačana ekspresija integrina  $\beta 1$  u odnosu na zdrave stanice (Juan-Rivera i Martinez-Ferrer, 2018). Eke i suradnici (2018) proveli su istraživanje u kojem su proučavali kako zračenje utječe na ekspresiju integrina kod različitih staničnih linija karcinoma prostate (DU145, LNCaP, PC3). Primijetili su različitu ekspresiju na površini stanica koje su bile ozračene u odnosu na one koje nisu. Kod stanične linije DU145, uočena je povećana ekspresija integrina  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  i  $\beta 4$ , kod stanične linije PC3 povećala se ekspresija integrina  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  i  $\beta 5$ , a kod stanične

linije LNCaP došlo je do povećane ekspresije integrina  $\alpha V$ ,  $\alpha 7$  i  $\beta 5$ . Osim integrina, i ostali proteini adhesoma razlikuju se u stanicama zdrave i bolesne prostate. Protein talin 1, koji je ključan u aktivaciji integrina, jače je eksprimiran u stanicama karcinoma nego u normalnim stanicama prostate, a njegovim utišavanjem u staničnoj liniji DU145 smanjila se migratorna sposobnost stanica (López-Colomé i sur., 2017; Sakamoto i sur., 2009). Protein paksilin, marker fokalne adhezije, također je prekomjerno eksprimiran u stanicama karcinoma gdje nosi niz mutacija koje nisu karakteristične za prostatu, a povezuju se s metastatskim sposobnostima stanice (López-Colomé i sur., 2017). Uz sve spomenute proteine adhesoma važno je istaknuti i proteine PINCH, ILK i FAK čije su ekspresije i aktivnosti značajno povišene u stanicama karcinoma u odnosu na normalne stanice (Dickreuter i Cordes, 2017).

Promjene u ekspresiji proteina IAC-a, osim u staničnim linijama karcinoma prostate, proučavane su i u njihovim sublinijama otpornim na radioterapiju. Seifert i suradnici (2019) primijetili su da kod stanica LNCaP i DU145 dobivenih izlaganjem zračenju i koje su na to postale otporne (LNCaP RR i DU145 RR) dolazi do prekomjerne ekspresije više desetaka gena uključenih u sintezu proteina IAC-a u odnosu na osjetljive stanice. Osim njih, i druge skupine znanstvenika uspoređivale su razne stanične linije i njihove otporne sublinije, međutim, do sada nisu provedene izolacije adhesoma ni usporedba njihovog sastava (Chebotarev i sur., 2019; Chang i sur., 2014; Chang i sur., 2013). Nova saznanja o razlikama adhesoma kod osjetljivih i otpornih stanica usmjerit će nas prema boljem razumijevanju ključnih molekula adhesoma uključenih u otpornost karcinoma na radioterapiju (Dickreuter i Cordes, 2017; Ganguly i sur., 2013), ali i mogućem razvoju molekularno ciljane terapije usmjerene prema potpunom izlječenju pacijenata (Ganguly i sur., 2013).



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Stanice karcinoma prostate

U radu je korištena stanična linija karcinoma prostate čovjeka (LNCaP) i stanična sublinija (LNCaP RR) otporna na radioterapiju koju su razvili prof. dr. Anna Dubrovska i njezina grupa (Technische Universität Dresden, Dresden). Prof. dr. Dubrovska omogućila je korištenje navedenih staničnih linija za ovo istraživanje.

##### 3.1.2. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Osnovne kemikalije korištene u radu.

<b>Kemikalija</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Proizvođač</b>
acetone	650501	Sigma-Aldrich, SAD
Amido crno (engl. <i>amido black</i> )		Kemika, Hrvatska
beta-merkaptetanol	63690	Fluka, Njemačka
bromfenol plavo (engl. <i>bromophenol blue</i> )	15375	Serva, Njemačka
DMEM Dulbeccova modifikacija Eagleove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )	D5796	Sigma-Aldrich, SAD
DMSO (dimetilsulfoksid) za smrzavanje stanica	D8418	Sigma-Aldrich, SAD
DTBP (dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat)	20665	Thermo Fisher Scientific, SAD
DTT (ditiotreitol)	D0632	Sigma-Aldrich, SAD
EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina, kompleks III)	1136808	GramMol, Hrvatska

etanol	P112001	GramMol, Hrvatska
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich, SAD
kemiluminiscentni reagens za western blot (Western lightning plus-ECL)	NEL104001EA	Perkin Elmer, SAD
L-glutamin		
metanol	P140501	GramMol, Hrvatska
mlijeko u prahu, nemasno	F145.1	Carl Roth, Njemačka
NaCl	P148590	GramMol, Hrvatska
natrijev deokiskolat (engl. sodium deoxycholate)	D6750	Sigma-Aldrich, SAD
penicilin 10 000 µg/mL /streptomycin 10 000 µg/mL	15140-122	Gibco, SAD
pufer RIPA (engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> )	89901	Thermo Fisher Scientific, SAD
RPMI 1640 hranjiva podloga (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )	R0883-500ML	Sigma-Aldrich, SAD
SDS (natrij-dodecil sulfat)	L5750	Sigma-Aldrich, SAD
Serum fetusa goveda (engl. <i>Fetal Bovine Serum</i> ; FBS)		
tripsin-EDTA	T4049	Sigma-Aldrich, SAD
tris baza	T1503	Sigma-Aldrich, SAD
tris HCl, tris-klorovodična kiselina	1.08219	Merck Millipore, Njemačka
triton X–100	X100	Sigma-Aldrich, SAD
tween–20	P139	Sigma-Aldrich, SAD

### 3.1.3 Otopine i njihova priprema

Otopine, način njihove pripreme i temperatura čuvanja navedeni su u tablici 2.

**Tablica 2.** Otopine, njihova priprema i temperatura čuvanja.

<b>Ime otopine</b>	<b>Priprema</b>	<b>Čuvanje</b>
5 %-tno mlijeko u TBST	5 % mlijeko u 1× TBS s 0,1 % Tween, priprema se	-

	netom prije korištenja	
10 %-tno mlijeko u TBST	10 % mlijeko u 1× TBS s 0,1 % Tween, priprema se netom prije korištenja	-
ARS (engl. <i>adhesion recovery solution</i> )	125 mM TrisHCl, pH 6,8, 1% SDS (w/V), 150 mM DTT; otopina se priprema netom prije pokusa	-
DMEM-HEPES	25 mM	4 °C
DMEM-FSB	DMEM s 10 %-tnim serumom fetusa goveda s 50 u/mL penicilina i 50 µg/mL streptomicina	4 °C
DTBP otopina	6 mM u 25 mM DMEM-HEPES; otopljen netom prije pokusa	-
EDTA otopina	0,5 M, pH 8	4 °C
HEPES	1 M, pH 7,4	4 °C
Hranjiva podloga za zamrzavanje stanica	950 µL DMEM-FSB + 50 µL DMSO; priprema netom prije korištenja	-
NaCl	4 M	4 °C
otopina za odbojavanje	40 % MetOH, 7 % octene kiseline	sobna
Otopina boje amido crno	0,1 % amido-crnilo, 10 % octena kiselina, 7,5 % MetOH	Sobna
PBS, fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i> ) pH 7,1-7,2	Otopina I: 27 mM KCl, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> . Otopina II: pomiješati 3 mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O i MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O. Autoklavirati zasebno. Pomiješati 80 mL otopine I i 100 mL otopine II; pH 7,2	4 °C
PBSΔ, fosfatni pufer bez Ca <sup>2+</sup> i Mg <sup>2+</sup>	2,7 mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	4 °C
pufer za elektroforezu	24 g Tris baza, 114 g glicina, 10 g SDS, pH 8,3	4 °C
pufer za nanošenje uzoraka za SDS-PAGE, 5×	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25 % (w/v) glicerol, 10 % (w/v) SDS, 0.01 % (w/v) bromofenolno plavilo, 20 % (v/v) 2-merkaptetanol	-20 °C
pufer za uklanjanje vezanih protutijela za membranu (engl. <i>stripping pufer</i> )	100 mM otopina glicina pH 2,8	4 °C

pufer za prijenos proteina	50 mL SDS Tris-HCl pH 8,3, 350 mL diH <sub>2</sub> O i 100 mL MetOH za 500 mL	4 °C
modificirana RIPA, 5×	250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 750 mM NaCl, 25 mM dinatrij EDTA (pH 8), 12,5 % (w/v) SDS, 5 % Triton X-100, 5 % natrij deoksikolat	4 °C
TBS 10×	250 mL 1 M TrisHCl (pH 7,5), 150 mL 5 M NaCl, diH <sub>2</sub> O do 500 mL	4 °C
TBS	1× TBS, 0,1 % Tween	4 °C
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM, pH 6,8	4 °C
Tris-HCl, pH 7,6	1 M, pH 7,6	4 °C
Tris-HCl, pH 8	1 M, pH 8	4 °C

#### 3.1.4. Komplet kemikalija i standardi

U tablici 3. naveden je komplet standarda korišten u radu.

**Tablica 3.** Standard za elektroforezu proteina korišten u radu.

<b>Upotreba</b>	<b>Standard</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Za SDS-PAGE proteina</b>	Standard za određivanje molekularne mase proteina <i>Pageruler Prestained Protein Ladder</i> , 26616.	Thermo Fisher Scientific, SAD

#### 3.1.5. Protutijela korištena u metodi western blot

U tablici 4. navedena su protutijela za određivanje ekspresije proteina metodom Western blot.

**Tablica 4.** Protutijela korištena u metodi Western blot.

<b>Specifičnost</b>	<b>Proizvedeno u</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Razrjeđenje</b>
$\alpha$ -aktinin	miš	sc17829	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500
Paksilin (Pax)	zec	ab2264	Abcam	1:100
Talin 1/2	miš	ab11188	Abcam	1:1000
KANK2	zec	HPA 01564	Sigma	1:500
Antigen ranog endosoma (engl. <i>Early Endosome Antigen 1</i> ), EEA1	zec	2411	Cell Signalling, SAD	1:1000
Laktat dehidrogenaza (LDH)	zec	sc33781	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:400
antimišji imunoglobulini, obilježen peroksidazom (hren)	ovca	NA931	GE Healthcare, SAD	1:5000
antizečji imunoglobulini, obilježen peroksidazom (hren)	koza	31466	Thermo Fischer Scientific, SAD	1:10.000

### 3.1.6. Uređaji

Uređaji korišteni u radu navedeni su u tablici 5.

**Tablica 5.** Uređaji korišteni u radu.

<b>Uređaj</b>	<b>Proizvođač</b>
analitička vaga AB54-S	Mettler Toledo Classic
brojač stanica Coulter Counter	Beckman Coulter, SAD
centrifuga za mikroprevute (do 14000 × g)	Eppendorf, Njemačka
centrifuga za stanice (do 12568 × g) Labofuge 400	Heraeus, Njemačka
frižider -80 °C	Skadi MORIS Technology, Latvija
frižider -20 °C	Bosch, Njemačka

frižideri 4 °C	Gorenje, Slovenija
inkubator za uzgoj stanica HeraCell 150	Heraeus, Njemačka
izvor napajanja za elektroforezu proteina PowerPac Basic	BioRad, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
kadica za elektroforezu	BioRad, SAD
kupelj JB Nova	Grant Instruments, UK
magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija
pH metar PH3 Sension+	Hach, SAD
spremnik za tekući dušik 35VHC	Taylor-Wharton, SAD
svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala Uvitec Alliance Q9 mini	Cambridge, UK
uređaj za polu-suhi prijenos proteina s gela	BioRad

### 3.1.7. Laboratorijski pribor

Laboratorijski pribor korišten u radu naveden je u tablici 6.

**Tablica 6.** Popis laboratorijskog pribora korištenog u radu.

<b>Laboratorijski pribor</b>	<b>Proizvođač</b>
ampule za smrzavanje stanica	Nunc
aparatura za vertikalnu elektroforezu proteina Mini-PROTEAN® <i>Tetra Cell Systems</i>	BioRad, SAD
bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75	Falcon, SAD
čaše, staklene različitih zapremnina	Kimble, SAD
epruvete, plastične 15 mL	Falcon, SAD
Erlenmeyer staklene tikvice različitih zapremnina	VWR, SAD
gradijentni poliakrilamidni gel za SDS-PAGE 4-15 %,	BioRad, SAD
membrana za prijenos proteina, nitrocelulozna Trans-Blot Turbo Transfer Pack	BioRad, SAD
mikroepruvete, plastične od 1,5 ili 2 mL	Falcon, SAD
strugač za stanice	TPP Techno Plastic Products AG,

	Švicarska
Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm	Falcon, SAD
pingvini za led	-
pipete, staklene, različitih zapremnina: 1, 2, 5, 10 i 25 mL	Bellco, SAD i Hirschmann, Njemačka

## 3.2. METODE

Većina metoda molekularne biologije koje su korištene u ovom diplomskom radu detaljno su opisane u priručniku Metode u molekularnoj biologiji (Ambriović Ristov i sur., 2007.).

### 3.2.1. Kultura stanica

Stanice su uzgajane prema preporukama ATCC u tekućoj hranjivoj podlozi RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) uz dodatak seruma fetusa goveda (engl. *foetal bovine serum*, FBS; 10 % v/v), L-glutamina i antibiotika (Streptomycin i Penicilin). Uzgoj se odvijao u T-bocama (površina 25 cm<sup>2</sup>) ili Petrijevim zdjelicama za uzgoj stanica (površina 75 cm<sup>2</sup>) u inkubatoru pri 37 °C u prisutnosti 5 % CO<sub>2</sub>. Stanice su presađivane dva ili tri puta tjedno ovisno o popunjenosti površine na kojoj rastu.

Presađivanje stanica započinje uklanjanjem hranjive podloge iz T-boca i/ili Petrijeve zdjelice i ispiranjem sa PBS-om (5 mL), a nastavlja se odvajanjem stanica od površine dodatkom tripsina (1 mL) zagrijanog na 37 °C. Tripsinizacija je praćena pod svjetlosnim mikroskopom, a zaustavljena je dodatkom četiri puta veće količine hranjive podloge. Tako se stanice održavaju u optimalnoj eksponencijalnoj fazi rasta. Koncentracija stanica za nasadivanje u Petrijeve zdjelice bila je u rasponu od 2,5 x 10<sup>6</sup> do 5,5 x 10<sup>6</sup>.

Kako bi se održala zaliha stanica ranih pasaža, dio stanica je prema potrebi zamrzavan u tekući dušik (-196 °C). Stanice uzgojene u T-bocama odvojene su od površine dodatkom tripsina i skupljene centrifugiranjem (pet minuta pri 1100 × g), a talog stanica je resuspendiran u 900 µL hranjive podloge RPMI 1640 te prebačen u ampule za smrzavanje. Nakon pola sata inkubacije u ledu, u suspenziju stanica dodano je 100 µL DMSO (zaštita od stvaranja kristala vode tijekom zamrzavanja) i stanice su zatim prebačene u spremnik za tekući dušik u pare tekućeg dušika (temperatura oko -80 °C) kako bi se osiguralo polagano zamrzavanje. Nakon 24 sata ampule sa stanicama su prebačene u spremnik za tekući dušik pri -196 °C gdje su čuvane do daljnjeg. Odmrzavanje stanica, ovisno o potrebi, provodilo se kratkotrajnim uranjanjem ampula u vodenu kupelj (37 °C), a daljnji uzgoj odvijao se u T-bocama i/ili Petrijevim zdjelicama uz dodatak

hranjive podloge kao što je već navedeno. Stanice se nakon odmrzavanja resuspendiraju u 10 puta većoj količini hranjive podloge i ostave u inkubatoru dok se ne prihvate za podlogu. Zbog prisutnosti DMSO u podlozi za zamrzavanje, nakon što su se stanice prihvatile za podlogu bilo je nužno zamijeniti hranjivu podlogu svježom .

### 3.2.2. Izdvajanje kompleksa adhezije integrina (IAC)

Izdvajanje kompleksa adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complexes*, IAC) provedeno je pomoću metode objavljene u Jones i suradnici (2015). Broj stanica nasadenih u Petrijeve zdjelice iznosio je  $4,8 \times 10^6$  kako bi nakon 48 sati popunjenost površine bila 80–90 % što je povoljno za izdvajanje IAC-a. Izolacija se provodila iz šest kontrolnih Petrijevih zdjelica (negativna kontrola) te iz šest Petrijevih zdjelica svake stanične linije. Kao negativna kontrola korištene su stanice koje nisu izložene djelovanju umreživača. Po 6 Petrijevih zdjelica svakih stanica izloženo je djelovanju DTBP-a tijekom 10 minuta. U svakoj eksperimentalnoj skupini potrebno je dodatno nasaditi dvije Petrijeve zdjelice, jednu za ukupni stanični lizat, a drugu koristimo za brojenje stanica neposredno prije izvođenja eksperimenta kako bi se pratio i uskladio broj stanica svih eksperimentalnih skupina.

Nakon uklanjanja hranjive podloge, stanice su dva puta isprane s 3 mL ugrijanog DMEM-HEPES (25 mM) s ciljem uklanjanja stanica koje nisu prihvaćene za podlogu. Stanice su zatim umrežene dodatkom 5 mL DTBP (6 mM) određeno vrijeme pri 37 °C. Umrežavanje je zaustavljeno dodavanjem 150 µL 1 M TrisHCl (pH 8) tijekom dvije minute pri sobnoj temperaturi, a zatim je uklonjena tekućina nad stanicama, a Petrijeve zdjelice su postavljene na ledene spremnike (tzv. pingvine). Nakon ispiranja stanica hladnim PBS-om dva puta, slijedi liza stanica dodatkom modificiranog RIPA pufera (1x; 5 mL) kroz dvije – tri minute pri sobnoj temperaturi, a cijeli proces prati se pod svjetlosnim mikroskopom. Preostale stanice u Petrijevim zdjelicama su jednoliko isprane jakim mlazom vodovodne vode iz slavine; u horizontalnom i vertikalnom smjeru, a zatim spiralno izvana prema unutra i iznutra prema van. Petrijeve zdjelice su zatim isprane hladnim PBS-om, sva tekućina je pažljivo uklonjena i postavljene na pingvine ohlađene na -20 °C.

Uzorak IAC-a iz svake eksperimentalne skupine skupljen je u 800 µL ARS tako da je u prvu Petrijevu zdjelicu skupine dodano 400 µL ARS nakon čega su proteini sastrugani strugačem za stanice. ARS iz prve Petrijeve zdjelice sa skupljenim proteinima prenesen je pipetom u iduću Petrijevu zdjelicu i ponovljeno je struganje strugačem. Postupak se ponavlja kod svih zdjelica u skupini sve do zadnje kada je uzorak IAC-a prebačen u mikroepruvetu i čuvan na ledu. Preostalih 400 µL ARS zatim je nanešeno na zadnje struganu Petrijevu



zdjelicu i postupak je ponovljen do prve, kada je uzorak skupljen u istu mikroeprevetu. Kako bi se istaložili proteini, u sakupljene uzorke IAC-a, dodan je aceton ohlađen na -20 °C u četiri puta većem volumenu te su uzorci pohranjeni na -80 °C do analize.

### 3.2.3. Analiza ekspresije proteina metodama sds-page i western blot

#### 3.2.3.1. SDS-PAGE

SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) je elektroforeza u gelu poliakrilamida u denaturirajućim uvjetima u kojoj se proteini razdvajaju isključivo na temelju molekulske mase. Takvo načelo razdvajanja posljedica je vezanja anionskog detergenta natrij dodecil sulfata (SDS) u točno određenom omjeru na protein (1,4 g SDS veže se na 1 g proteina). SDS se veže na hidrofobne regije proteina, razara vodikove veze, sekundarnu i tercijarnu strukturu i tako ga razmata i denaturira. U pufer za pripremu uzorka redovito se dodaje i reducirajući agens za razaranje disulfidnih veza (2-merkaptoetanol). U ovakvim okolnostima, svi proteini su negativno nabijeni i pod utjecajem napona kreću se u istom smjeru. Poliakrilamidni gel je mješavina akrilamida, umrežujućih bisakrilamida, slobodnih radikala – inicijatora polimerizacije i umrežavanja gela te TEMED-a – katalizatora reakcije. SDS-PAGE koristi se za određivanje veličine proteina na temelju poznatih standarda, identifikaciju proteina, provjeru čistoće proteinskog uzorka, identifikaciju disulfidnih mostova i kvantifikaciju proteina. SDS-PAGE provodi se na vertikalnom gelu i prethodi metodi western blot (Ambriović i sur., 2007).

Izdvojeni IAC proteini pripremljeni su za razdvajanje metodom SDS-PAGE taloženjem u acetonu i centrifugiranjem (16 000 rcf; 20 min; 4°C), pažljivim uklanjanjem supernatanta te sušenjem taloga u digestoru tijekom 15 minuta. Uzorci su zatim otopljeni u 40 µL 1x pufera za nanošenje uzorka (engl. *sample buffer*, SB) za SDS-PAGE. Nakon toga, grijani su pet minuta (pri 70 °C), a potom nanoseni u jažice gela (30 – 35 µL). Istovremeno je u jednu jažicu gela nanoseno 3 µL standarda za određivanje molekulske mase proteina. Metoda SDS-PAGE provodena je u komercijalno dostupnom gradijentnom poliakrilamidnom gelu (*Mini-PROTEAN TGX Pre-casted gradient gel (4-15 %) Cat: 456-1084*) pri 80 V tijekom dva sata.

### 3.2.3.2. *Western blot*

Western blot je metoda za detekciju jednog proteina iz mješavine puno različitih u uzorku. Nakon razdvajanja metodom SDS-PAGE, proteini se prenose na nitroceluloznu ili najlonsku membranu s ciljem izvođenja imunodetekcije. Membrana se prvo inkubira s protutijelima specifičnim za protein od interesa (tzv. primarna protutijela), a vezanje primarnih protutijela potom se određuju inkubiranjem membrane s novim protutijelima (tzv. sekundarna protutijela) koja su specifična za primarna protutijela i označena enzimom. Završni signal dobiva se kemijskom reakcijom (kolorimetrija ili kemiluminiscencija) (Ambriović i sur., 2007).

Nakon završene elektroforeze, gel se prenosi u složeni sustav za polu-suhi prijenos proteina s gela na komercijalno dostupnu nitroceluloznu membranu (Trans-Blot Turbo Transfer Pack Cat: 1704159). Redosljed slaganja sustava za prijenos od vrha do dna je sljedeći: filter papiri, gel, membrana i ponovno filter papiri pri čemu je gel bliže negativno nabijenoj anodi, a membrana pozitivno nabijenoj katodi. Prijenos traje otprilike deset minuta. Uspješnost prijenosa proteina na membranu određujemo bojanjem membrane u amido-crnoj boji. Nakon vizualizacije potrebno je ukloniti boju otopinom za odbojavanje uzastopnim izmjenama svježih otopina te blokirati membranu s 5 %-tnom otopinom mlijeka u prahu tijekom sat vremena na zibalici. Blokiranje je nužan korak kako bi se zasitila sva nespecifična vezna mjesta za proteine na membrani tj. kao bi se izbjeglo nespecifično vezanje proteina (protutijela za imunodetekciju) na membranu. Nakon blokiranja membrane, dodaje se otopina primarnog protutijela (2 sata; sobna temperatura) koja se nakon vezivanja za membranu ispiri (5 puta po 5 minuta) i dodaje joj se otopina sekundarnih protutijela na koja je povezan enzim peroksidaza porijeklom iz hrena. Nakon ispiranja (5 puta po 5 minuta), vizualizacija povezanih sekundarnih protutijela provodi se pomoću kemiluminiscentnog reagensa prema uputama proizvođača i uz pomoć uređaja Uvitec.

Na istoj membrani moguće je napraviti imunodetekciju više različitih proteina. Kako bi se uklonila vezana protutijela, membrana je inkubirana u puferu za uklanjanje vezanih protutijela tijekom 40 minuta na zibalici pri sobnoj temperaturi i blokirana u 10%-tnom mlijeku u TBST-u. Nakon provedenog postupka, membrana je ponovno inkubirana s primarnim, a zatim i sekundarnim protutijelom po postupku opisanom gore.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Osnovni cilj provedenog istraživanja bio je usporediti sastav adhesoma stanične linije karcinoma prostate (LNCaP) i od nje dobivene sublinije otporne na radioterapiju (LNCaP RR) kako bismo istražili imaju li proteini uključeni u adheziju ulogu u ovoj otpornosti. Radioterapija je metoda liječenja karcinoma prostate koja u 90 % slučajeva djeluje uspješno, ali postaje neučinkovita ako stanice razviju otpornost na radioterapiju (Seifert i sur., 2019). Stanična adhezija jedan je od mehanizama za koji je pokazano da doprinosi nastanku otpornosti na radioterapiju (Eke i Cordes., 2015), ali još uvijek nije dovoljno istražena kod većine oblika tumora, uključujući i karcinom prostate.

Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Instituta Ruđer Bošković, u kojem je napravljeno ovo istraživanje, unazad desetak godina objavio je više radova koji su se temeljili na saznanjima dobivenim izučavanjem povezanosti integrina i odgovora tumorskih stanica na protutumorske lijekove i metastaziranje. Tako su, primjerice, Brozović i suradnici (2008) i Stojanović i sur. (2016), *de novo* ekspresijom integrina  $\alpha V\beta 3$ , u stanicama karcinoma grkljana i stanicama karcinoma pločastog epitela jezika, transfekcijom s plazmidom koji eksprimira  $\beta 3$  podjedinicu, pokazali da integrin  $\alpha V\beta 3$  osigurava otpornost stanica na nekoliko različitih protutumorskih lijekova, povećanu migraciju i invaziju. Obrnuti pristup, tj. utišavanje ekspimiranih integrina s ciljem povećanja osjetljivosti i smanjenje migracije i invazije, primijenili su u stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke i melanoma (Stojanović i sur., 2018; Paradžik i sur., 2020). Stojanović i suradnici (2018) pokazali su da utišavanje integrina  $\alpha V$ , u nekim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke i melanoma, povećava osjetljivost prema protutumorskim lijekovima kao što su paklitaksel (PTX) i vinkristin (VCR) te smanjuje migraciju i invaziju, a novijim istraživanjem u stanicama melanoma MDA-MB-435S, Paradžik i suradnici (2020) pokazali su da je protein adhesoma KANK2, koji se nalazi u adhesomu integrina  $\alpha V\beta 5$ , potencijalno dobra meta za povećanje osjetljivosti stanica melanoma na PTX i VCR i smanjenje migratorne sposobnosti stanica. U skladu s rečenim i na temelju podataka iz literature (Chebotarev i sur., 2019; Chang i sur., 2014), koji upućuju na to da do danas ni jedna grupa znanstvenika nije proučavala razlike u sastavu adhesoma kod dvije stanične linije - osjetljive na radioterapiju i od nje dobivene sublinije otporne na radioterapiju, provedeno je ovo istraživanje. Uz to, važno je naglasiti i da u dostupnoj literaturi nije okarakteriziran sastav adhesoma karcinoma prostate, drugog vodećeg uzroka smrti od svih zloćudnih tumora kod muškaraca (Ferlay i sur., 2018) kao ni sastav adhesoma stanica karcinoma prostate otpornih na radioterapiju. Sukladno s time,





osnovni cilj ovog rada bio je spoznati razlike u sastavu IAC-a (adhesoma) metodom spektrometrije masa (MS) kod stanica karcinoma prostate i njihove sublinije otporne na radioterapiju uzgojenih u kulturi i na osnovu toga bolje razumijeti ulogu proteina adhesoma u otpornosti stanica na radioterapiju.

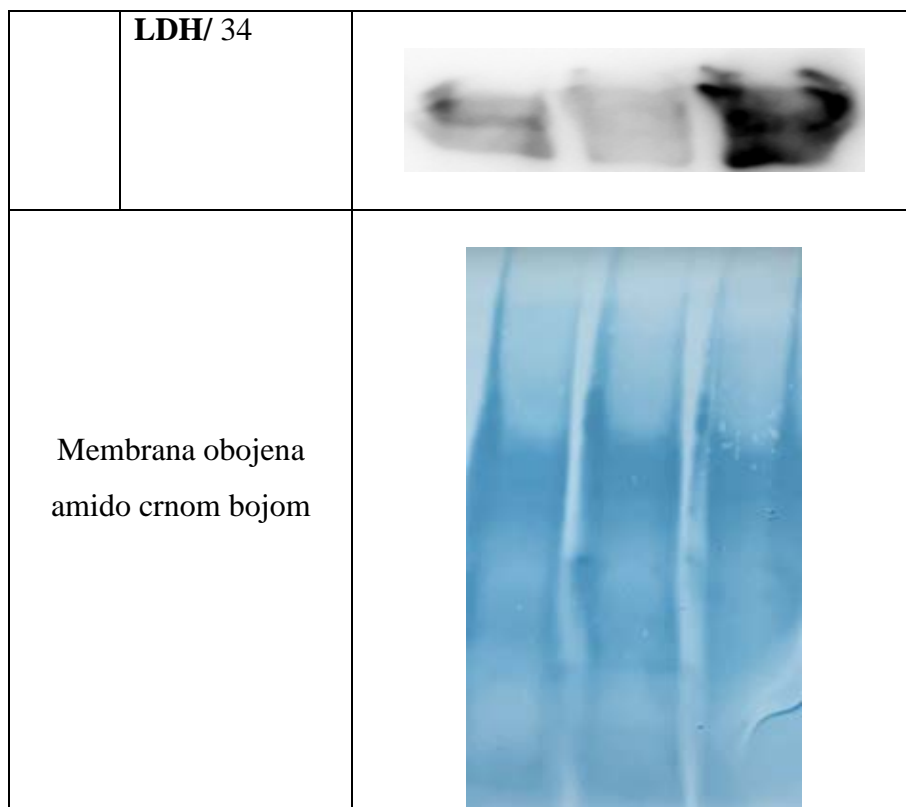
Prvi korak istraživanja stanica LNCaP i LNCaP RR bio je optimizacija protokola za izolaciju IAC. Svi radovi do sada, radili su izolaciju IAC-a nakon uzgoja stanica na fibronektinu. Takav pristup iskorišten je za definiranje konsenzus adhesoma i za dobivanje informacija o sastavu adhesoma integrina  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha 5\beta 1$  koji se povezuju na fibronektin (Horton i sur., 2016). Međutim, naša metoda temeljila se na uzgoju stanica tijekom 48 sati s ciljem da stanice samostalno stvore ECM. Osnovna prednost ove metode je u tome što stanicu ne ograničavamo postavljenim uvjetima okoline na koje se ona prilagođava već joj dopuštamo da sama sintetizira, remodelira i održava izvanstanični matriks. Zbog toga, ova nam metoda daje uvid i u sastav adhesoma, ali i u sastav matrisoma – ukupnih proteina od kojih je sastavljen izvanstanični matriks. U nedavno objavljenom radu pokazano je na ovaj način da stanice melanoma MDA-MB-435S stvaraju više različitih proteina izvanstaničnog matriksa kao što su vitronektin, fibronektin, tenascin, trombospondin, periostin i drugi (Paradžik i sur., 2020). Osim nas, ovu metodu koristili su još Lock i suradnici (2018), koji su u svom radu otkrili postojanje retikularnih adhezija. Zanimljivo, u oba istraživanja u kojima je korištena ova metoda, otkriveno je da stanica za adheziju preferencijalno koristi integrin  $\alpha V\beta 5$  (Paradžik i sur., 2020; Lock i sur., 2018). Jones i suradnici (2015) ovom metodom značajno su pojednostavnili izolaciju IAC-a koja je do tada bila vrlo kompleksna s obzirom na to da, za razliku od organela, IAC nema jasne granice unutar stanice (Kuo i sur., 2011; Todorović i sur., 2010). Metoda koju su razvili Kuo i suradnici (2011) prilagođena je za izolaciju FA, ali je dodatno otežana jer je potrebno ukloniti višak aktina specifičnim protutijelima prije proteomike, a metoda koju su razvili Todorović i suradnici (2010) zahtijeva probir proteina iz smjese u specifično razvijenim epruvetama s ciljem odvajanja specifičnih od nespecifičnih proteina. Obje metode (Kuo i sur., 2011; Todorović i sur., 2010) provedene su bez kemijskog umreživača DTBP-a čime se količina proteina koje ne očekujemo u adhesomu dodatno povećava i otežava daljnju analizu.

Za određivanje optimalne količine stanica koju je potrebno nasaditi u Petrijevu zdjelicu (promjera 10 cm) kako bi nakon 48 sati popunjenost podloge bila između 80 i 90 %, nasadili smo nekoliko različitih količina stanica i utvrdili da nasađivanje  $4,8 \times 10^6$  stanica po Petrijevoj zdjelici zadovoljava taj uvjet. Nakon toga bilo je potrebno odrediti optimalno vrijeme umrežavanja proteina DTBP-om. DTBP je kemijski umreživač koji prolazi kroz

stanični membranu i stabilizira IAC tako što umrežuje proteine u bliskoj interakciji od kojih je građen. Zbog toga je moguće provesti izolaciju IAC-a neovisno o drugim staničnim proteinima koji se većinom uklanjaju. Kako bi se odredilo optimalno vrijeme, prikupljeni su uzorci IAC-a obje stanične linije LNCaP i LNCaP RR nakon različitih vremena umrežavanja (5, 10 i 20 minuta). Uzorci su analizirani metodom western blot u kojoj su korištena primarna protutijela za proteine za koje znamo da se nalaze u IAC-a (talin 1 i 2,  $\alpha$ -aktinin 1 i 4, paksilin, KANK2) (Horton i sur., 2015) kao i protutijela za proteine koje ne očekujemo u IAC-a (EEEE1 i LDH) (Horton i sur., 2015.).

Na slici 11 jasno se vidi da izolati IAC-a umreženi DTBP-om tijekom 5 minuta imaju malo proteina specifičnih za IAC, ali se njihova količina povećava se vremenom. Ono što također vidimo na slici 11 je da je količina proteina LDH, koji ne očekujemo u IAC-u, vrlo visoka nakon umrežavanja DTBP-om tijekom 20 minuta. Budući da smo željeli dobiti uzorke sa što manje proteina koje ne očekujemo u IAC-u, a istovremeno smo željeli dovoljnu količinu proteina specifičnih za IAC, kako bismo mogli uspješno provesti metodu spektrometrije masa, pokus je ponovljen, a uzorci su umrežavani DTBP-om tijekom 10 i 15 minuta.

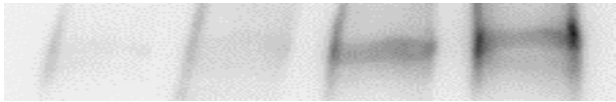
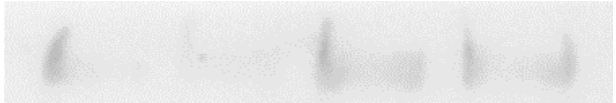

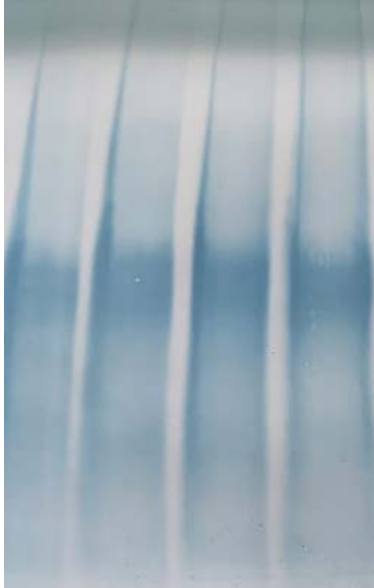
Protein/kDa		Izolirani proteini IAC-a		
		Vrijeme umrežavanja DTBP-om/minute		
		5	10	20
Specifični proteini IAC-a	Talin 1, 2 /271			
	KANK2/ 91			
	Paksilin/ 68			
Nespecifični proteini	EEEE1/ 170			



**Slika 11.** SDS-PAGE i western blot analiza izdvojenih proteina IAC-a u stanicama **LNCaP** za odabir optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om. Izolirani IAC proteini nakon tri različita vremena umrežavanja DTBP-om razdvojeni su pomoću SDS-PAGE, preneseni na nitroceluloznu membranu te je ekspresija proteina analizirana western blotom. Ukupna količina proteina u uzorcima je provjerena bojanjem membrane amido crnom bojom. Za analizu ekspresije pojedinačnih proteina membrana je inkubirana s primarnim protutijelima za proteine koji se nalaze u IAC (talin 1 i 2, KANK2, paksilin) i s primarnim protutijelima za proteine koje ne očekujemo u IAC (LDH i EEEA1). Vezanje svakog od prethodno navedenih primarnih protutijela otkrivano je sekundarnim protutijelima obilježenim enzimom peroksidaza iz hrena. Signal je razvijen kemiluminiscentnim reagensom i snimljen na uređaju Uvitec Alliance Q9 mini. Sve western blot analize napravljene su na istoj membrani rezanoj na tri djela za otkrivanje malih, srednje velikih i velikih proteina. Na nekim mebranama je napravljeno više od jednog western blota tako da su protutijela uklonjena nakon prve analize glicinskim puferom. Količina nasađenih stanica po zdjelici iznosila je  $2,5 \times 10^6$ , stanice su rasle tijekom 72 sata, a uzorci IAC-a prikupljeni su iz 4 Petrijeve zdjelice.

Slika 12 prikazuje da ne postoji značajna razlika u količini proteina specifičnih za IAC (talin 1 i 2, alfa-aktinin 1 i 4, paksilin) nakon umrežavanja DTBP-om tijekom 10 i 15 minuta. Uzimajući u obzir rezultate dobivene pokusom 1 i 2, odabrano je vrijeme umrežavanja od 10

minuta za obje stanične linije (LNCaP i LNCaP RR) koje bi trebalo omogućiti zadovoljavajuće uzorke za MS analizu s dovoljnom količinom proteina specifičnih za IAC i minimalnom količinom proteina koje ne očekujemo u IAC-u.

Protein/kDa		Izolirani proteini IAC-a			
		Vrijeme umrežavanja DTBP-om/minute			
		0	5	10	15
Specifični proteini IAC-a	Talin 1, 2 /271				
	$\alpha$ -aktinin/ 100				
	Paksilin/ 68				
Membrana obojena amido crnom bojom					

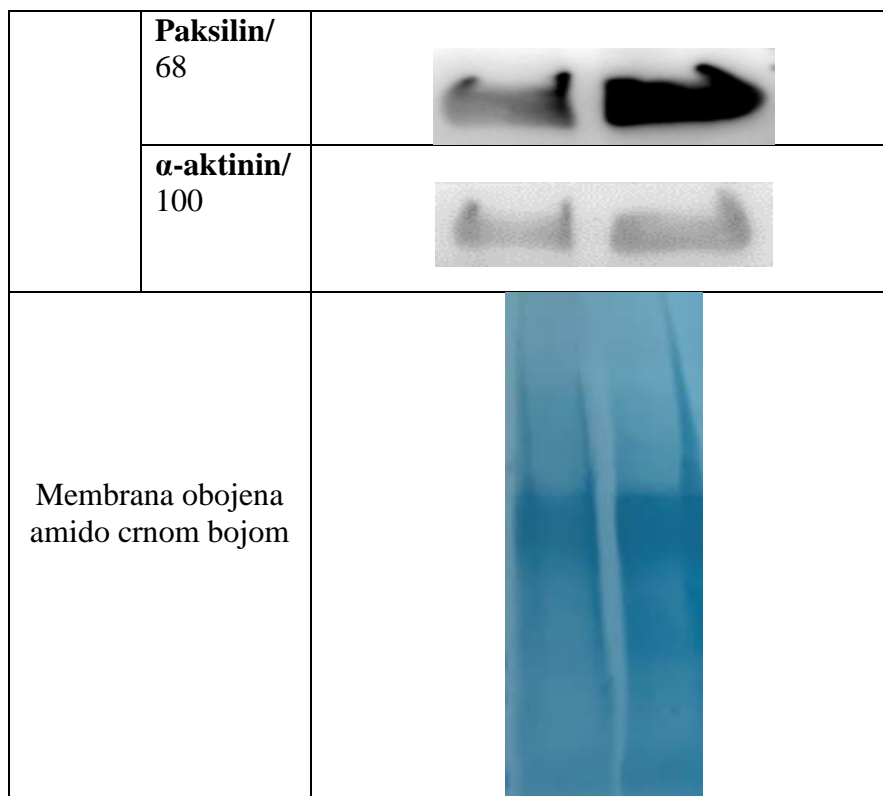
**Slika 12.** SDS-PAGE i western blot analiza izdvojenih proteina IAC-a u stanicama **LNCaP** za odabir optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om. Izolirani IAC-i nakon četiri različita vremena umrežavanja DTBP-om su razdvojeni koristeći SDS-PAGE, preneseni na nitroceluloznu membranu te je ekspresija proteina analizirana western blot metodom. Ukupna količina proteina u uzorcima

provjerena je bojanjem membrane amido crnom bojom. Za analizu ekspresije pojedinačnih proteina membrana je inkubirana s primarnim protutijelima za proteine koji se nalaze u IAC (talin 1 i 2, alfa-aktinin, paksilin). Vežanje svakog od prethodno navedenih primarnih protutijela otkrivanom je sekundarnim protutijelima obilježenim enzimom peroksidaza iz hrena. Signal je razvijen kemiluminiscentnim reagensom i snimljen na uređaju Uvitec Alliance Q9 mini. Sve western blot analize napravljene su na istoj membrani rezanoj na tri djela za otkrivanje malih, srednje velikih i velikih proteina. Na nekim mebranama je napravljeno više od jednog western blota tako da su protutijela uklonjena nakon prve analize glicinskim puferom. Količina nasadenih stanica po zdjelici iznosila je  $3,5 \times 10^6$ , stanice su rasle tijekom 72 sata, a uzorci IAC-a prikupljeni su iz 4 Petrijeve zdjelice.

Izolati IAC-a obje stanične linije dobiveni su pod istim uvjetima izolacije i to umrežavanjem tijekom 10 minuta, a western blot analizom uspoređena je količina proteina specifičnih za IAC (paksilin i  $\alpha$ -aktinin) i prikazana na slici 13. Ovaj pokus stavlja naglasak na ekspresiju proteina paksilina, markera FA, čija se prekomjerna ekspresija povezuje s povećanom sposobnosti metastaziranja i progresijom stanica karcinoma prostate. Iako je fosforilirani paksilin ključna komponenta adhesoma, on se u stanici nalazi u nefosforiliranoj formi, stoga nefosforilirani paksilin kojeg smo odredili možemo promatrati kao specifični, ali i kao nespecifični protein adhesoma (López-Colomé i sur., 2017). Osim paksilina, u trećem pokusu, praćena je i ekspresija  $\alpha$ -aktinina 1 i 4 za koje je ranije pokazano da su usko povezani s proliferacijom stanica karcinoma prostate i čija je ekspresija značajno slabija u odnosu na zdrave stanice prostate (Hara i sur., 2007). Unatoč tome što je praćenje ekspresije proteina paksilina i alfa-aktinina kod staničnih linija provedeno samo jednom, možemo na temelju dobivenih rezultata, na slici 13, pretpostaviti da paksilina ima značajno više u stanicama otpornim na radioterapiju u odnosu na osjetljive stanice dok je ekspresija  $\alpha$ -aktinina podjednaka kod obje stanične linije.

Protein/kDa	Izolirani proteini IAC-a	
	Stanične linije	
	LNCaP	LNCaP RR
	Vrijeme umrežavanja DTBP-om/minute	
10	10	10





**Slika 13.** SDS-PAGE i western blot analiza izdvojenih proteina IAC-a u stanicama **LNCaP** i **LNCaP RR**. Izolirani IAC-i nakon 10 minuta umrežavanja DTBP-om razdvojeni su koristeći SDS-PAGE, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je zatim obojana amido crnom bojom kako bi se provjerila uspješnost prijenosa. Za analizu ekspresije pojedinačnih proteina membrana je inkubirana s primarnim protutijelima za proteine koji se nalaze u IAC (alfa-aktinin, paksilin). Vežanje svakog od prethodno navedenih primarnih protutijela otkriveno je sekundarnim protutijelima obilježenim enzimom peroksidaza iz hrena. Signal je razvijen kemiluminiscentnim reagensom i snimljen na uređaju Uvitec Alliance Q9 mini. Sve western blot analize napravljene su na istoj membrani rezanoj na tri djela za otkrivanje malih, srednje velikih i velikih proteina. Količina nasadenih stanica po zdjelici iznosila je  $4,8 \times 10^6$ , stanice su rasle tijekom 48 sata, a uzorci IAC-a prikupljeni su iz 6 Petrijevih zdjelica.

Za otkrivanje sastava adhesoma planirali smo izolirati IAC iz dviju staničnih linija u tri neovisna pokusa i analizirati ih spektrometrijom masa kako bi se mogla napraviti statistička analiza. Za identifikaciju proteina u smjesi proteina uzorka potrebno ih je izložiti proteolizi za koju se najčešće koristi tripsin. Smjesa nastalih peptida se zatim analizira spektrometrijom masa. Osnovni princip metode spektrometrije masa je ionizacija uzorka i razvrstavanje nastalih iona na temelju omjera njihove mase i naboja. Ioni prolaze kroz analizator, a potom kroz detektor pri čemu se dobiva rezultat u obliku masenog spektra.

Maseni spektar je prikaz relativnog udjela iona u uzorku kao funkcije omjera mase i naboja (Han i sur., 2008). Proces ionizacije uzorka bio bi proveden metodom elektroraspršenja (engl. *electrospray ionization*, ESI), a dobiveni spektri identificirali bi se pomoću programa Mascot Daemon (Matrix science, inačica 2.5.1) pretragom baze podataka čovjeka Swissprot (inačica 2018\_01). Dopuštena tolerancija mase iznosila bi 0,50 Da za fragmente iona, a 5 ppm za molekulske ione. Identificirani peptidi i dobiveni broj spektara svakog proteina analizirali bi se i dodatno potvrdili programom Scaffold (*Proteome Software*) koji omogućuje prikaz proteina s minimalnim brojem spektara 1, a za daljnju analizu izdvojili bi se proteini s minimalnim brojem spektara 4, odnosno, oni proteini s minimalno četiri određena jedinstvena peptida. Validacija dobivenih rezultata provela bi se metodom western blot kojom bismo provjerili ekspresiju identificiranih proteina od interesa, a metodom imunofluorescencije, uz konfokalnu mikroskopiju, različitim fluorescentnim bojama vizualizirali bismo željene komponente IAC-a u stanici. Dobiveni rezultati dali bi nam uvid u to s kojim integrinima se naše stanice preferencijalno vežu za podlogu i na temelju toga, utišavanjem istih mogli bismo pratiti potencijalni povratak osjetljivosti stanica na radioterapiju.

Budući da je za vrijeme izrade diplomskog rada proglašena pandemija COVID-19 uzrokovana virusom SARS-CoV-2, sva daljnja istraživanja, među kojima je i spektrometrija masa koja je trebala biti provedena u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Sveučilište u Manchesteru, Ujedinjeno Kraljevstvo), nisu bila moguća. Stoga, na temelju rezultata o većoj količini paksilina u izoliranim IAC iz stanica otpornih na radioterapiju, možemo pretpostaviti da te stanice imaju više fokalnih adhezija od stanica osjetljivih na radioterapiju. Osim toga moguće je da ova promjena stanicama osigurava i povećanu migraciju i invaziju, odnosno povećani metastatski potencijal, upravo kako je to utvrđeno u pokusima *de novo* ekspresije integrina  $\alpha\beta3$  (Brozović i sur., 2008; Stojanović i sur., 2016). Daljnji pokusi kojima bismo mogli detaljnije proučiti migraciju i invaziju stanica, a nisu provedeni zbog pandemije, bili bi određivanje migracije i invazije stanica pomoću filtra s rupama veličine 8  $\mu\text{m}$  (engl. *Transwell inserts*). Ako bi stanice pokazivale promjene u migraciji i invaziji svakako bi nastavili s određivanjem markera epitelno-mezenhimalne tranzicije metodom RT-qPCR (engl. *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*; RT-qPCR) i metodom western blot. Dakle, ovim pristupom nastojali bismo pronaći uzroke povećane migracije i invazije otpornih stanica u markerima EMT. Takav pristup usko je povezan s istraživanjem koje su proveli Stojanović i suradnici (2016) u kojem su pokazali da integrin  $\alpha\beta3$  sudjeluje u stvaranju otpornosti stanica na kemoterapiju i uzrokuje povećanje

migracije i invazije, a Eke i suradnici (2018) povezali su deregulaciju signalnih puteva koje okidaju integrini s povećanom migracijom stanica karcinoma prostate i s razvojem otpornosti stanica na zračenje.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Optimalna količina stanica LNCaP i LNCaP RR koju je potrebno nasaditi u Petrijevu zdjelicu za izolaciju IAC-a, kako bi nakon 48 sati popunjenost podloge bila između 80 i 90 %, iznosi  $4,8 \times 10^6$  stanica po Petrijevoj zdjelici.
2. Vrijeme izlaganja stanica LNCaP i LNCaP RR kemijskom umreživaču DTBP-u, koje daje najbolji omjer sadržaja proteina koji se nalaze i onih koji se ne nalaze u IAC-u, iznosi 10 minuta.
3. Protein paksilin pojačano je eksprimiran u stanicama otpornim na radioterapiju LNCaP RR u odnosu na osjetljive LNCaP stanice.
4. Ekspresija izoformi proteina  $\alpha$ -aktinina približno je jednaka u stanicama otpornim na radioterapiju LNCaP RR i roditeljskim LNCaP stanicama.

## 6. LITERATURA

Adams, J. C. (2002) Regulation of protrusive and contractile cell-matrix contacts. *J. Cell Sci.* **115**, 257-265.

Ahmed, N., Niu, J., Dorahy, D., Gu, X., Andrews, S., Meldrum, C. i sur. (2002) Direct integrin alphavbeta6-ERK binding: implications for tumour growth. *Oncogene* **21**, 1370–1380.

Ahmedah, T. H., Patterson, H. L., Shnyder, D. S., Sheldrake, M. H. (2017) RGD-Binding Integrins in Head and Neck Cancers. *Cancers* **9**, 56.

Albasri, A., Seth, R., Jackson, D., Benhasouna, A., Crook, S., Nateri, A. S., Chapman, R., Ilyas, M. (2009) C-terminal Tensin-like (CTEN) is an oncogene which alters cell motility possibly through repression of E-cadherin in colorectal cancer. *J Pathol.* **218**, 57-65.

Alberts, B. (2002) Cell Communication. U: Molecular biology of the cell (4th edition), (Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., ured.) Garland Science, New York, str. 2120-2128.

Alberts, B. (2014) Basic genetic mechanisms. U: Molecular Biology of the Cell (6th Edition), (Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., ured.), Garland Science, New York, str. 173-237.

Alberts, B. (2014) Cells in their social context. U: Molecular Biology of the Cell (6th Edition), (Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., ured.), Garland Science, New York, str. 1035-1091.

Alexandrova A. Y., Arnold K., Schaub S., Vasiliev J. M., Meister J. J., Bershadsky A. D., Verkhovsky A. B. (2008) Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS ONE* **3**, 9.

Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. ur. (2007.) Metode u molekularnoj biologiji., 1. izd., Zagreb: Institut Ruđer Bošković.

Anderson, R. L., Owens, T. W., Naylor, J. M. (2014) Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys Rev.* **6**, 203–213. doi: 10.1007/s12551-013-0124-0.

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

Arias-Salgado, E., Lizano, S., Shattil, S., Ginsberg, M. (2005) Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J Biol. Chem.* **280**, 29699–29707.

Arnaout, M., Mahalingam, B., Xiong, J. P. (2005) Integrin structure, allostery and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 381–791.

Assoian, R. K., Klein, E. A. (2008) Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol.* **18**, 347–352.

ATCC (2020) LNCaP clone FGC (ATCC® CRL-1740™). ATCC - American Type Culture Collection, < [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1740.aspx?geo\\_country=hr#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1740.aspx?geo_country=hr#generalinformation)>. Pristupljeno 1. travnja 2020.

Austen, K., Ringer, P., Mehlich, A., Chrostek-Grashoff, A., Kluger, C., Klingner, C., Sabass, B., Zent, R., Rief, M., Grashoff, C. (2015) Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1597–1606.

Barber, T., Esteban-Pretel, G., Marín, M. P., Timoneda, J. (2014) Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix. *Nutrients.* **6**, 4984–5017.

Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res.* **339**, 269–280.

Bartles, R. J. (2000) Parallel Actin Bundles and Their Multiple Actin-bundling Proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 72–78.

Behrens, J. (2014) Biomarkers for inhibitors with anti-angiogenic activity. European Patent EP2706358A2.

Bell, N., Gorber, S. C., Shane, A., Joffres, M., Singh, H., Dickinson, J., Shaw, E., Dunfield, L., Tonelli, M. (2014) Recommendations on screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test. *Can. Med. Assoc. J.* **186**, 1225–1234.

Beningo, K. A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J. V., Wang, Y. (2001) Nascent Focal Adhesions Are Responsible for the Generation of Strong Propulsive Forces in Migrating Fibroblasts. *The J. Cell Biol.* **153**, 881–888.

Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z. M., Messi, M. L., Olson, J. D., Mintz, A., Delbono, O. (2014) Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **307**, 25–38.

Block, M. R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A. P., Faurobert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E., Albiges-Rizo, C. (2008) Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur. J. Cell Biol.* **87**, 491–506.

Bloemendal, S. Kück, U. (2013) Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Die Naturwissenschaften*. **100**, 3–19.

Bouchet, B. P., Gough, R. E., Ammon, Y. C., van de Willige, D., Post, H., Jacquemet, G., Altelaar, A. M., Heck, A. J., Goult, B. T., Akhmanova, A. (2016) Talin-KANK1 interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to focal adhesions. *Elife* **13**, 5.

Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 786–801.

Brozovic, A., Majhen, D., Roje, V., i sur. (2008) alpha(v)beta(3) Integrin-mediated drug resistance in human laryngeal carcinoma cells is caused by glutathione-dependent elimination of drug-induced reactive oxidative species. *Mol Pharmacol.* **74**, 298-306.

Brown, M. C., Turner, C. E. (2004) Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev.* **84**, 1315-1339.

Burridge, K., Connell, L. (1983) A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J. Cell Biol.* **97**, 359-367.

Burridge, K., Turner, C. E., Romer, L. H. (1992) Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* **119**, 893–903.

Burridge, K., Mangeat, P. (1984) An interaction between vinculin and talin. *Nature.* **308**, 744-746.

Calderwood, D. A., Campbell, I. D., Critchley, D. R. (2013) Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 503–517.

Calderwood, D., Fujioka, Y., de Pereda, J., García-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B. i sur. (2003) Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl. Acad. Sci.* **100**, 2272–2277.

Calderwood, D., Huttenlocher, A., Kiosses, W., Rose, D., Woodside, D., Schwartz, M. i sur. (2001) Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol* **3**, 1060–1068.

Calderwood, D., Zent, R., Grant, R., Rees, D., Hynes, R., Ginsberg, M. (1999) The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* **274**, 28071–28074.

Caligur, V. (2008) Glycosaminoglycan Sulfation and Signaling. *BioFiles.* **10**, 4.

Case, B. L., Baird, A. M., Shtengel, G., Campbell, L. S., Hess, F. H., Davidson, W. M., Waterman, C. M. (2016) Molecular mechanism of vinculin activation and nano-scale spatial organization in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* **17**, 880–892.

Chang, L., Graham, P. H., Hao, J., Bucci, J., Cozzi, P. J., Kearsley, J. H., Li, Y. (2014) Emerging roles of radioresistance in prostate cancer metastasis and radiation therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 469-496.

Chebotaev, D. A., Makhotkin, M. A., Naboka, A. V., Tyutyakina, M. G., Cherkasova, E. N., Tarasov, V. A. (2019) Involvement of MicroRNAs in Regulation of Radioresistance of HeLa and DU145 Cells. *Russ. J. Genet.* **55**, 1072-1081.

Chen, J., Yang, W., Kim, M., Carman, C., Springer, T. (2006) Regulation of outside–in signaling and affinity by the beta2 I domain of integrin alphaLbeta2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 13062–13067.

Chen, L., Bailey, D., Fernandez-Valle, C. (2000) Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J Neurosci* **20**, 3776–3784.

Chen, N. P., Sun, Z., Fassler, R. (2018) The Kank family proteins in adhesion dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **54**, 130-136.

Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zarenom, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., Horwitz, A. R. (2008) Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1039-1050.

Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Trautmann, F., Kunz-Schughart, L. A., Teleguev, G. D. Stakhovsky, E. A., Walker, J. R., Simin, K., Lyle, S., Fuessel, S., Erdmann, K., Wirth, M. P., Krause, M., Baumann, M., Dubrovskaya, A. (2015) Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by b-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res.* **75**, 1482-1494.

Cukierman, E., Pankov, R., Yamada, K. M. (2002) Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 633-639.

Das, V., Kalyan, G., Hazra, S., Mintu Pal, M. (2017) Understanding the role of structural integrity and differential expression of integrin profiling to identify potential therapeutic targets in breast cancer. *J. Cell Physiol.* **233**, 168–185.

Deakin, N. O., Pignatelli, J., Turner, C. E. (2012) Diverse roles for the paxillin family of proteins in cancer. *Gen. Cancer.* **3**, 362-370.



Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., Dedhar, S. (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**, 11211-11216.

Dertsiz, L., Ozbilim, G., Kayisli, Y., Gokhan, G. A., Demircan, A., Kayisli, U. A. (2005) Differential expression of VASP in normal lung tissue and lung adenocarcinomas. *Thorax* **60**, 576-581.

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

Di Lullo, G. A., Sweeney, M. S., Körkkö, J., Ala-Kokko, L., San Antonio, J. D. (2002) Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *J. Biol. Chem.* **277**, 4223–4231.

Dickreuter, E., Cordes, N. (2017) The cancer cell adhesion resistome: Mechanisms, targeting and translational approaches. *Biol. Chem.* **398**, 721-735.

Diez, G., Auernheimer, V., Fabry, B., Goldmann, W. H. (2011) Head/tail interaction of vinculin influences cell mechanical behavior. *Biochem Biophys Res Commun.* **406**, 85–88.

Drees, B., Andrews, K. M., and Beckerle, M. C. (2000) Molecular dissection of zyxin function reveals its involvement in cell motility. *J. Cell Biol.* **147**, 1549–1559.

Dumbauld, D. W. i sur. (2013) How vinculin regulates force transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9788–9793.

Durrant, T. N., van den Bosch, M. T., Hers, I. (2017) Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 outside-in signaling. *Blood.* **130**, 1607–1619.

Eke, I., Deuse, Y., Hehlhans, S., Gurtner, K., Krause, M., Baumann, M., Shevchenko, A., Sandfort, V., Cordes, N. (2012)  $\beta$ <sub>1</sub>Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. *J Clin Invest.* **122**, 1529-1540.

Eke, I., Koch, U., Hehlhans, S., Sandfort, V., Stanchi, F., Zips, D., Baumann, M., Shevchenko, A., Pilarsky, C., Haase, M., Baretton, G. B., Calleja, V., Larijani, B., Fässler, R., Cordes, N. (2010) PINCH1 regulates Akt1 activation and enhances radioresistance by inhibiting PP1 $\alpha$ . *J Clin Invest.* **120**, 2516-2527.

Eke, I., Makinde, Y. A., Aryankalayil, J. M., Reedy, L. J., Citrin, E. D., Chopra, S., Ahmed, M. M., Coleman, C. N. (2018) Long-term Tumor Adaptation after Radiotherapy: Therapeutic Implications for Targeting Integrins in Prostate Cancer. *Mol. Cancer Res.* **16**, 1855-1864.

Eke, I., Cordes, N. (2015) Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **31**, 65-75.

Eliceiri, B., Puente, X., Hood, J., Stupack, D., Schlaepfer, D., Huang, X. i sur. (2002) Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin  $\alpha(v)\beta5$  in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Cell Biol.* **157**, 149–160.

Evans, W. H., Martin, P. E. (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Mem. Biol.* **19**, 121–136.

Fagerholm, S., Hilden, T., Nurmi, S., Gahmberg, C. (2005) Specific integrin  $\alpha$  and  $\beta$  chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *J. Cell Biol.* **171**, 705–715.

Fedyk, E. R., Wyant, T., Yang, L. L., Csizmadia, V., Burke, K., Yang, H., Kadambi, V. J. (2012) Exclusive antagonism of the  $\alpha4\beta7$  integrin by vedolizumab confirms the gut-selectivity of this pathway in primates. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 2107–2119.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. (2018) Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer.* **144**, 1941–1953.

Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S., T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature.* **527**, 472–476.

Frantz, C., Stewart, K. M., Weaver, V. M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195–4200.

Freshney, R. I. (2000) *Animal Cell Culture*, 2.izd., Oxford University Press, New York.

Fujita, K., Nonomura, N. (2018) Urinary biomarkers of prostate cancer. *Int J Urol.* **25**, 770-779.

Furman, C. i sur. (2007) Ena/VASP is required for endothelial barrier function in vivo. *J. cell biol.* **179**, 761–775.

Ganguly, K. K., Pal, S., Moulik, S., Chatterjee, A. (2013) Integrins and metastasis. *Cell Adh. Migr.* **7**, 251–261.

Geiger, B. (1979) A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell* **18**, 193-205.

Geiger, B., Yamada, M. K. (2011) Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1.

Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S. A., Linder, S. (2008) Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 235-241.

Ginsberg, M. H. (2014) Integrin activation. *BMB Rep.* **47**, 655-659.

- Glentis, A., Gurchenkov, V., Matic Vignjevic, D. (2014) Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes. *Cell Adh. Migr.* **8**, 236–245.
- Gough, R. E., Goult, B. T. (2018) The tale of two talins - two isoforms to fine-tune integrin signalling. *FEBS Lett.* **592**, 2108-2125.
- Goult, B. T., Yan, J., Schwartz, M. A. (2018) Talin as a mechanosensitive signaling hub. *J. Cell Biol.* **217**, 3776-3784.
- Gumbiner, B. M. (1996) Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell.* **84**, 345–357.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., Sorokin, L. M. (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* **85**, 979–1000.
- Han, D., Rodriguez, L., Guan, J. (2001) Identification of a novel interaction between integrin beta1 and 14-3-3beta. *Oncogene* **20**, 346–357.
- Han, S., Khuri, F. R., Roman, J. (2006) Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res.* **66**, 315-323.
- Han, X., Aslanian, A., Yates, Y. R. (2008) Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* **12**, 483–490.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**, 646-674.
- Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppelino, M. G., Radeva, G., Filmus, J. i sur. (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91–96.
- Hara, T., Honda, K., Shitashige, M., Ono, M., Matsuyama, H., Naito, K., Hirohashi, S., Yamada, T. (2007) Mass Spectrometry Analysis of the Native Protein Complex Containing Actinin-4 in Prostate Cancer Cells. *Mol. Cell. Proteom.* **6**, 479-491.
- Hasegawa, Y., Murph, M., Yu, S., Tigyi, G., Mills, G. B. (2008) Lysophosphatidic acid (LPA)-induced vasodilatorstimulated phosphoprotein mediates lamellipodia formation to initiate motility in PC-3 prostate cancer cells. *Mol. Oncol.* **2**, 54-69.
- Hirata, H., Tatsumi, H., Sokabe, M. (2008) Zyxin emerges as a key player in the mechanotransduction at cell adhesive structures. *Commun. Integr. Biol.* **1**, 192–195.

Hofland, J., M. van Weerden, W., Dits, N. F. J., Steenbergen, J., J. L. H. van Leenders, G., Jenster, G., Schröder, F. H., H. de Jong, F. (2010) Evidence of Limited Contributions for Intratumoral Steroidogenesis in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **70**, 1256-1264.

Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., Murphy, G. P. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**, 1809-1818.

Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D., Humphries, M. J. (2015) Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1577-1587.

Horton, E. R., Humphries, J. D., James, J., Jones, M. C., Askari, J. A., Humphries, M. J. (2016) The integrin adhesome network at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 4159-4163.

Hu, Y. L., Lu, S., Szeto, K. W., Sun, J., Wang, Y., Lasheras, J. C., Chien, S. (2014) FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Sci Rep.* **12**, 6024.

Humphries, J. D. i sur. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* **179**, 1043–1057.

Humphries, J. D., Paul, N. R., Humphries, M. J., Morgan, M. R. (2015) Emerging properties of adhesion complexes: what are they and what do they do? *Trends Cell Biol.* **25**, 388-397.

Hussain, M., Le Moulec, S., Gimmi, C., Bruns, R., Straub, J., Miller, K. (2016) Differential Effect on Bone Lesions of Targeting Integrins: Randomized Phase II Trial of Abituzumab in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3192–3200. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2512.

Iozzo, R. V., Schaefer, L. (2015) Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* **42**, 11–55.

Itoh, S., Maeda, T., Shimada, M., Aishima, S., Shirabe, K., Tanaka, S., Maehara, Y. (2004) Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* **10**, 2812-2817.

Jagadeeswaran, R., Surawska, H., Krishnaswamy, S., Janamanchi, V., Mackinnon, A. C., Seiwert, T. Y., Loganathan, S., Kanteti, R., Reichman, T., Nallasura, V., Schwartz, S., Faoro, L., Wang, Y. C., Girard, L., Tretiakova, M. S., Ahmed, S., Zumba, O., Soulii, L., Bindokas, V. P., Szeto, L. L., Gordon, G. J., Bueno, R., Sugarbaker, D., Lingen, M. W., Sattler, M., Krausz, T., Vigneswaran, W., Natarajan, V., Minna, J., Vokes, E. E., Ferguson,

M. K., Husain, A. N., Salgia, R. (2008) Paxillin is a target for somatic mutations in lung cancer: implications for cell growth and invasion. *Cancer Res.* **68**, 132-142.

Jo, Y., Choi, N., Kim, K., Koo, H. J., Choi, J., & Kim, H. N. (2018) Chemoresistance of Cancer Cells: Requirements of Tumor Microenvironment-mimicking In Vitro Models in Anti-Cancer Drug Development. *Theranostics* **8**, 5259–5275. doi.org/10.7150/thno.29098.

Juan-Rivera, M. C, Martínez-Ferrer, M. (2018) Integrin Inhibitors in Prostate Cancer. *Cancers* **10**, 44.

Juretić, A., Marušić, A., Ježek, D., Šarić, N., Bašić-Koretić, M., Bišof, V. (2010) Anatomija, histologija, embriologija i fiziologija prostate. U: Rak prostate – najvarijabilniji zloćudni tumor (Šamija, M., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 3-11.

Kelley, L. C., Lohmer, L. L., Hagedorn, E. J., Sherwood, D. R. (2014) Traversing the basement membrane in vivo: a diversity of strategies. *J. Cell Biol.* **204**, 291–302.

Kim, M., Carman, C., Springer, T. (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**, 1720–1725.

King, D., Yeomanson, D., Bryant, H. E. (2015) PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. *Pediatr. Hematol. Oncol. J.* **37**, 245–251.

Knezevic, I., Leisner, T., Lam, S. (1996) Direct Binding of the Platelet Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa) to Talin - EVIDENCE THAT INTERACTION IS MEDIATED THROUGH THE CYTOPLASMIC DOMAINS OF BOTH  $\alpha$ IIb AND  $\beta$ 3. *J. Biol. Chem.* **271**, 16416–16421.

Krušlin, B. Tomas, D., Belicza, M. (2005) Patohistološka dijagnostika raka prostate. *Medix* **60/61**, 78-82.

Kuo, J. C., Han, X., Hsiao, C. T., Yates, J. R., Waterman, C. M. (2011) Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for  $\beta$ -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol.* **13**, 383-393.

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196.

Lazarides, E., Burridge, K. (1975) Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell* **6**, 289-298.

Legate, K. R., Fässler, R. (2009) Mechanisms that regulate adaptor binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic tails. *J Cell Biol.* **122**, 187-198.

Li, H., Tang, D. G. (2011) Prostate cancer stem cells and their potential roles in metastasis. *J Surg Oncol.* **103**, 558-562.

Li, L., Dong, X., Peng, F., Shen, L. (2018) Integrin  $\beta 1$  regulates the invasion and radioresistance of laryngeal cancer cells by targeting CD147. *Can. cell inter.*, **18**, 80.

Lima, A. R., Araújo, A. M., Pinto, J., Jerónimo, C., Henrique, R., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, M., Guedes de Pinho, P. (2018) Discrimination between the human prostate normal and cancer cell exometabolome by GC-MS. *Sci.Rep.* **8**, 5539.

Lin, F., Yu, Y.P., Woods, J. i sur. (2001) Myopodin, a synaptopodin homologue, is frequently deleted in invasive prostate cancers. *Am. J. Pathol.* **159**, 1603-1612.

Linder, S. (2009) Invadosomes at a glance. *J Cell Sci.* **122**, 3009-3013.

Lo, S. H. (2004) Tensin. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**, 31–34.

Lo, S. H., Lo, T. B. C. (2002) A COOH-terminal tensin-like protein with prostate restricted expression, is down-regulated in prostate cancer. *Cancer Res.* **62**, 4217–4221.

Lock, J. G., Jones, M. C., Askari, J. A., Gong, X., Oddone, A., Olofsson, H., Goransson, S., Lakadamyali, M., Humphries, M. J., Stromblad, S. (2018) Reticular adhesions are a distinct class of cell-matrix adhesions that mediate attachment during mitosis. *Nature Cell. Biol.* **20**, 1290-1302.

López-Colomé, A. M, Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., López, E. (2017) Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. *J. Hematol.Oncol.* **10**, 50.

Mahajan, K., Mahajam, N. P. (2012) PI3K-Independent AKT activation in Cancers: A Treasure Trove for Novel Therapeutics. *J. Cell Physiol.* **227**, 3178–3184.

McCabe, N. P., De, S., Vasanji, A., Brainard, J., Byzova, T. V. (2007) Prostate cancer specific integrin  $\alpha v \beta 3$  modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene* **26**, 6238–43.

Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M., Kloareg, B. (2010) The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *The New Phytologist.* **188**, 82–97.

Mitra, S. K., Schlaepfer, D. D. (2006) Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* **18**, 516-523.

Miyazaki, T., Kato, H., Nakajima, M., Sohda, M., Fukai, Y., Masuda, N., Manda, R., Fukuchi, M., Tsukada, K., Kuwano, H. (2003) FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer.* **89**, 140-145.

Monkley, S. J., X.-H., Zhou, S. J., Kinston, S. M., Giblett, L., Hemmings, H., Priddle, J. E., Brown, C. A., Pritchard, D. R., Critchley, Fässler, R. (2000) Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev. Dyn.* **219**, 560–574.

Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bösl, M., Zent, R., Moser, M., Fässler, R. (2008) Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* **22**, 1325–1330.

Morse, M. E., Brahme, N. N., Calderwood, A. D. (2014) Integrin Cytoplasmic Tail Interactions. *Biochem.* **53**, 810–820.

Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., Fässler, R. (2008) Kindlin3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med.* **14**, 325–330.

Nag, S., Beyer, D., Friedland, J., Grimm, P., Nath, R. (1999) American Brachytherapy Society (ABS) recommendations for transperineal permanent brachytherapy of prostate cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **44**, 789–799.

Nobes, C. D., Hall, A. (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 456-459.

Otey, C., Vasquez, G., Burridge, K., Erickson, B. W. (1993) Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **28**, 21193–21197.

Paradžik, M., Humphries, J. D., Stojanović, N., Nestića, D., Majhen, D., Dekanić, A., Samaržija, I., Seddaa, D., Weber, I., Humphries, J. M., Ambriović-Ristov, A. (2020) KANK2 links  $\alpha$ V $\beta$ 5 focal adhesions to microtubules and regulates sensitivity to microtubule poisons and cell migration. *Front. Cell Devel. Biol.* **8**, 1-29.

Peitzsch, C., Cojoc, M., Hein, L., i sur. (2016) An Epigenetic Reprogramming Strategy to Resensitize Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **76**, 2637-2651.

Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J., Ginsberg, M. H. (1998) Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 6104–6109.

Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30–33.

Plotnikov, S. V., Pasapera, A. M., Sabass, B., Waterman, C. M. (2012) Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell.* **151**, 1513–1527.

Plow, F. E., Das, M., Bialkowska, K., Sossey-Alaoui, K. (2016) Of Kindlins and Cancer. *Discov.* **4**.

Raab-Westphal, S., Marshall, J. F., Goodman, S. L. (2017) Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers. *Cancers* **9**, 110.

Rice, G. P., Hartung, H. P., Calabresi, P. A. (2005) Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology*. **64**, 1336–1342.

Robson, M., Dawson, N. (1996) How is androgen-dependent metastatic prostate cancer best treated? *Hematol Oncol Clin N*. **10**, 727–747.

Röselová, P., Obr, A., Holoubek, A., Grebeňová, D., Kuželová, K. (2017) Adhesion structures in leukemia cells and their regulation by Src family kinases. *Cell Adh Migr*. **12**, 286–298.

Rottner, K., Krause, M., Gimona, M., Small, J. V., Wehland, J. (2001) Zyxin is not colocalized with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) at lamellipodial tips and exhibits different dynamics to vinculin, paxillin, and VASP in focal adhesions. *Mol. Biol. cell* **12**, 3103–3113.

Ryu, S., Park, K. M., Lee, S. H. (2016) Gleditsia Sinensis Thorn Attenuates the Collagen-Based Migration of PC3 Prostate Cancer Cells through the Suppression of Integrin Expression. *Int. J. Mol. Sci*. **17**, 328.

Sakamoto, S., McCann, R., Kyprianou, N. (2009) Talin1 Promotes Prostate Cancer Invasion and Metastasis via AKT Signaling and Anoikis Resistance. *Nat. Prec*. **23**,

Saunders, R. M. i sur. (2006) Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur J Cell Biol*. **85**, 487–500.

Schaller, M. D. (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*. **20**, 6459-6472.

Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B., Parsons, J. T. (1992) pp125FAK, a structurally distinct protein tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci*. **89**, 5192–5196.

Schoenwaelder, S. M., Burridge, K. (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol*. **11**, 274–286.

Sedgwick, S. G., Smerdon, S. J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem*. **24**, 311-316.

Seetharaman, S., Etienne-Manneville, S. (2019) Microtubules at focal adhesions – a double-edged sword. *J. Cell Sci*. **132**.

Seifert, M., Peitzsch, C., Gorodetska, I., Borner, C., Klink, B., Dubrovskaja, A. (2019) Networkbased analysis of prostate cancer cell lines reveals novel marker gene candidates associated with radioresistance and patient relapse. *PLoS Comput. Biol*. **15**.



Sen, A., De Castro, I., Defranco, D. B., Deng, F. M., Melamed, J., Kapur, P., Raj, G.V., Rossi, R., Hammes, S. R. (2012) Paxillin mediates extranuclear and intranuclear signaling in prostate cancer proliferation. *J Clin Invest.* **122**, 2469-2481.

Shi, X., Guo, X., Li, X., Wang, M., Qin, R. (2018) Loss of Linc01060 induces pancreatic cancer progression through vinculin-mediated focal adhesion turnover. *Cancer Lett.* **433**, 76-85.

Shi, X., Ma, Y. Q., Tu, Y., Chen, K., Wu, S., Fukuda, K., Qin, J., Plow, E. F., Wu, C. (2007) The MIG2/integrin interaction strengthens cell-matrix adhesion and modulates cell motility. *J Biol. Chem.* **282**, 20455–20466.

Short, S. M., Yoder, B. J., Tarr, S. M., Prescott, N. L., Laniauskas, S., Coleman, K. A., Downs-Kelly, E., Pettay, J. D., Choueiri, T. K., Crowe, J. P., Tubbs, R. R., Budd, T. G., Hicks, D. G. (2007) The expression of the cytoskeletal focal adhesion protein paxillin in breast cancer correlates with HER2 overexpression and may help predict response to chemotherapy: a retrospective immunohistochemical study. *Breast J.* **13**, 130-139.

Siciliano, J. C., Toutant, M., Derkinderen, P., Sasaki, T., Girault, J. A. (1996) Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase b (PYK2/CAKb) and pp125FAK by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *J. Biol. Chem.* **271**, 28942–28946.

Sleeboom, J. J. F., Amirabadi H. A., Nair P., Sahlgren C. M., den Toonder, J. M. J. (2018) Metastasis in context: modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. *Dis Model Mech.* **16**,11.

Soler, D., Chapman, T., Yang, L. L., Wyant, T., Egan, R., Fedyk, E. R. (2009) The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti- $\alpha 4\beta 7$  integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 864–875.

Sossey-Alaoui, K., Plow, E. F. (2016) miR-138-Mediated Regulation of KINDLIN-2 Expression Modulates Sensitivity to Chemotherapeutics. *Mol. Cancer Res.* **14**, 228-238.

Stojanović, N., Dekanić, A., Paradžik, M., Majhen, D., Ferenčak, K., Ruščić, J. i sur. (2018) Differential effects of integrin  $\alpha v$  knockdown and cilengitide on sensitization of triple-negative breast cancer and melanoma cells to microtubule poisons. *Mol. Pharmacol.* **94**, 1334-1351.

Stojanović, N., Brozović, A, Majhen, D., Herak Bosnar, M., Fritz, G., Osmak M., Ambriović-Ristov, A. (2016) Integrin  $\alpha\beta 3$  expression in tongue squamous carcinoma cells

Cal27 confers anticancer drug resistance through loss of pSrc(Y418). *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**, 1969-1978.

Subauste, M. C. i sur. (2004) Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol.* **165**, 371–381.

Sumigray, K. D., Lechler, T. (2015) Cell Adhesion in Epidermal Development and Barrier Formation. *Curr. Topics in Devel. Biol.* **112**, 383–414.

Sun, Z., Lambacher, A., Fässler, R. (2014) Nascent Adhesions: From Fluctuations to a Hierarchical Organization. *Dispatch.* **24**, 801-803.

Sun, Z., Tseng, H.Y., Tan, S., Senger, F., Kurzawa, L., Dedden, D., Mizuno, N., Wasik, A.A., Thery, M., Dunn, A. R., Fassler, R. (2016) Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nature Cell. Biol.* **18**, 941-953.

Takagi, J., Erickson, H., Springer, T. (2001) C-terminal opening mimics ‘inside–out’ activation of integrin alpha5beta1. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 412–416.

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., Karamano, K. N. (2016) Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 24–27.

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Tzanakakis, G. N., Karamanos, N. K. (2010) Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J.* **277**, 3904–3923.

Thiery, J. P., Sleeman, J. P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–142.

Thievensen, I. i sur. (2013) Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *J Cell Biol.* **202**, 163–177.

Todorović, V., Desai, B. V., Eigenheer, R. A., i sur. (2010) Detection of differentially expressed basal cell proteins by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* **9**, 351-361.

Toivanen, R., Shen, M. M. (2017) Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Devel.* **15**, 1382-1398.

Trulsson, M., Yu, H., Gisselsson, L., Chao, Y., Urbano, A., Aits, S., Mossberg, A. K., Svanborg, C. (2011) HAMLET binding to  $\alpha$ -actinin facilitates tumor cell detachment. *PLoS One.* **8**.

Tu, Y., Li, F., Goicoechea, S., Wu, C. (1999) The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2425-2434.

- Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., Wu, C. (2003) Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell* **113**, 37–47.
- Turner, C. E. (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol.* **2**, 231-236.
- Turner, C. E., Glenney, J. R., Jr., Burridge, K. (1990) Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* **111**, 1059-1068.
- Ussar, S., Wang, H. V., Linder, S., Fassler, R., Moser, M. (2006) The kindlins: Subcellular localization and expression during murine development. *Exp. Cell Res.* **312**, 3142–3151.
- Van Assche, G., Van Ranst, M., Sciot, R., i sur. (2005) Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **353**, 362–8.
- Velasco-Velázquez, M. A., Salinas-Jazmín, N., Mendoza-Patiño, N., Mandoki, J. J. (2008) Reduced paxillin expression contributes to the antimetastatic effect of 4-hydroxycoumarin on B16-F10 melanoma cells. *Cancer Cell Int.* **20**, 8.
- Vellon, L., Menendez, J. A., Lupu, R. (2005) AlphaVbeta3 integrin regulates heregulin (HRG)-induced cell proliferation and survival in breast cancer. *Oncogene.* **26**, 3759-3773.
- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E. i sur. (2002) A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) “inside–out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* **110**, 587–597.
- Walko, G., Castañón, J. M., Wiche, G. (2015) Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* **360**, 529–544.
- Wang, Q., Cao, T., Guo, K., Zhou, Y., Liu, H., Pan, Y., Hou, Q., Nie, Y., Fan, D., Lu, Y., Zhao, X. (2020) Regulation of Integrin Subunit Alpha 2 by miR-135b-5p Modulates Chemoresistance in Gastric Cancer. *Front Oncol.* **10**, 308. doi:10.3389/fonc.2020.00308.
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., Johnson, K. R. (2008) Cadherin switching. *J. Cell Sci.* **121**, 727–735.
- Winograd-Katz S. E., Fässler, R., Geiger, B., Legate, K. R. (2014) The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 273-288.
- Wu, C. (1999) Integrin-linked kinase and PINCH: partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J. Cell Biol.* **112**, 4485-4489.
- Wu, C., Keightley, S. Y., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Coppolino, M., Goicoechea, S., McDonald, J. A., Dedhar, S. (1998) Integrin-linked protein kinase regulates

fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* **273**, 528-536.

Wu, V. Gunst, S. J. (2015) Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) Regulates Actin Polymerization and Contraction in Airway Smooth Muscle by a Vinculin-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **290**, 11403–11416.

Wu, W. M., Liao, Y. C. (2018) Downregulation of C-Terminal Tensin-Like Protein (CTEN) Suppresses Prostate Cell Proliferation and Contributes to Acinar Morphogenesis. *Int J Mol Sci.* **16**, 19.

Xue, G., Hemmings, B. A. (2013) PKB/Akt-Dependent Regulation of Cell Motility. *J Natl. Cancer Inst.* **105**, 393–404.

Yang, J., Weinberg, R. A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* **14**, 818–829.

Yan-Qing, Ma. , Jun, Qin. , Chuanyue, Wu., Plow, E. F. (2008) Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of 3 integrins. *J. Cell Biol.* **181**, 439–446.

Yanyuan, Wu., Sarkissyan, M., V. Vadgama, V. J., Grant-Kels, J. (2016) Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med.* **5**, 13.

Yeldag, G., Rice, A., del Río Hernández, A. (2018) Chemoresistance and the Self-Maintaining Tumor Microenvironment. *Cancers.* **10**, 471. doi:10.3390/cancers1012047.

Yurchenco, P. D. (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 3.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., Geiger, B. (2003) Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* **116**, 4605-4613.

Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., Geiger, B. (2004) Hierarchical assembly of cell–matrix adhesion complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 416-20.

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell. Biol.* **9**, 858-867.

Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B., Kam, Z. (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* **112**, 1655-1669.

Zheng, D. Q., Woodard, A. S., Fornaro, M., Tallini, G., Languino, L. R. (1999) Prostatic carcinoma cell migration via alpha(v)beta3 integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res.* **59**,1655–1664.

Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C-C., LeBleu, V. S., Kalluri, R. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. **527**, 525–530.

Zhu J, Carman C, Kim M, Shimaoka M, Springer T, Luo, B. H. (2007) Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood* **110**, 2475–2483.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

---

ime i prezime studenta