

# Uloga proteina uključenih u adheziju u otpornosti stanica karcinoma prostate DU145 na ionizirajuće zračenje

---

**Tomić, Marija**

**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:159:012363>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020

Marija Tomić

1316/MB

**ULOGA PROTEINA UKLJUČENIH  
U ADHEZIJU U OTPORNOSTI  
STANICA KARCINOMA  
PROSTATE DU145 NA  
IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice te uz pomoć neposredne voditeljice projekta dr. sc. Ivane Samaržija, poslijedoktorandice u istom laboratoriju.

Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta „Udruživanjem temeljnih i kliničkih znanstvenih istraživanja do poboljšanja tretmana i povećane društvene osviještenosti o raku prostate“ (Moj Zaba Start 2019)

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Andreji Ambriović Ristov na strpljivosti, ljubaznosti i vremenu koje je uložila u ovaj diplomski rad. Posebno hvala na prenesenoj motivaciji za učenje i napredak.

Zahvaljujem dr. sc. Ivani Samaržiji na svemu što me je naučila tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala na svim savjetima i poticajnim riječima.

Zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala na njihovoj nesebičnoj pomoći i kolegijalnosti. Hvala vam na predivnoj radnoj atmosferi i prilici da učim od vas.

## 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 KARCINOMA PROSTATE DU145 NA IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE

*Marija Tomić, 1316/MB*

**Sažetak:** *Karcinom prostate jedan je od najčešćih zloćudnih tumora u muškaraca, a uspješno se liječi radioterapijom, odnosno zračenjem. Razvitak otpornosti stanica karcinoma na ionizirajuće zračenje ograničava uspjeh terapije, a jedan od mogućih mehanizama pojave ove otpornosti posredovan je promjenama u adheziji stanice posredovanoj integrinima. Cilj ovog rada bio je uspostaviti metodu za usporedbu kompleksa adhezije integrina stanične linije karcinoma prostate DU145 i sublinije otporne na zračenje DU145 RR. Izolirani kompleksi adhezije integrina analizirani su metodom western blot, a zamijećena je povećana ekspresija talina i  $\alpha$ -aktinina u staničnoj liniji DU145 RR u odnosu na roditeljsku staničnu liniju DU145. Ovi rezultati upućuju na promjene u sastavu kompleksa adhezije integrina koji bi mogli biti povezani s otpornošću na radioterapiju. Na temelju rezultata ovog rada pripremit će se uzorci kompleksa adhezije integrina korištenog staničnog modela i analizirati spektrometrijom masa i moguće identificirati proteini promijenjeni u otpornoj staničnoj liniji koji bi mogli biti potencijalne mete za povećanje osjetljivosti stanica na radioterapiju.*

**Ključne riječi:** *karcinom prostate, otpornost na radioterapiju, adhezija stanica, adhesom, integrin*

**Rad sadrži:** 55 stranica, 8 slika, 5 tablica, 122 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. Doc. dr. sc. *Marina Cyjetko Bubalo*
2. Izv. prof. dr. sc. *Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica*
3. Dr. sc. *Ivana Samaržija, znanstvena suradnica*
4. Izv. prof. dr. sc. *Kristina Radošević (zamjena)*

**Datum obrane:** 16. srpanj 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 DU145 TO IONIZING RADIATION**

*Marija Tomić, 1316/MB*

**Abstract:** *Prostate cancer is one of the most common malignant tumors in men and it is successfully treated with radiotherapy. The development of radioresistance of cancer cells limits the therapy's success and one of the possible mechanisms of this resistance is mediated by changes in integrin-mediated cell adhesion. The aim of this study was to establish a method for comparing the integrin adhesion complex of the prostate cancer cell line DU145 and the radioresistant subline DU145 RR. Isolated integrin adhesion complexes were analyzed by the western blot method and an increased expression of talin and  $\alpha$ -actinin was observed in the DU145 RR cell line relative to the parental DU145 cell line. These results suggest changes in the composition of integrin adhesion complexes that could be associated with radioresistance. Based on the results of this work, samples of integrin adhesion complexes of this cell model will be prepared and analyzed by mass spectrometry and it will be possible to identify proteins altered in the resistant cell line that could be potential targets for increasing cell susceptibility to radiotherapy.*

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

**Thesis contains:** 55 pages, 8 figures, 5 tables, 122 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. PhD. *Marina, Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
2. PhD. *Andreja, Ambriović Ristov*, Associate professor, Senior Scientist
3. PhD. *Ivana, Samaržija*, Research Associate
4. PhD. *Kristina, Radošević*, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 16 July 2020



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. TUMORI .....	2
2.1.1. Zloćudni tumori prostate .....	2
2.1.2. Dijagnoza i liječenje karcinoma prostate .....	4
2.1.3. Otpornost stanica karcinoma prostate na zračenje .....	6
2.1.4. Stanične linije karcinoma prostate kao model za istraživanje .....	7
2.2. ADHEZIJA STANICA .....	8
2.2.1. Izvanstanični matriks .....	9
2.2.2. Integrini .....	9
2.2.3. Kompleks adhezije integrina .....	11
2.2.4. Adhesom integrina .....	14
2.2.5. Adhesom integrina kao potencijalna meta u liječenju tumora .....	17
2.3. ADHESOM STANICA KARCINOMA PROSTATE .....	20
2.3.1. Promjena ekspresije proteina adhesoma u stanicama karcinoma prostate .....	21
<b>3. ESKPERIMENTALNI DIO</b> .....	24
3.1. MATERIJALI .....	24
3.1.1. Stanice karcinoma prostate .....	24
3.1.2. Osnovne kemikalije .....	24
3.1.3. Otopine .....	26
3.1.4. Protutijela i spojevi korišteni u metodi western blot .....	28
3.1.5. Uređaji i laboratorijski pribor .....	29
3.2. METODE .....	31
3.2.1. Kultura stanica .....	31
3.2.2. Izolacija IAC-a .....	32
3.2.3. Utvrđivanje optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om za izolaciju proteina IAC-a .....	33
3.2.4. Analiza ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot .....	33
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	45
<b>6. LITERATURA</b> .....	46

# 1. UVOD

Karcinom prostate među najčešćim je zloćudnim tumorima u muškaraca i jedan je od vodećih uzroka smrti od zloćudnih tumora (Ferlay i sur., 2018). Radioterapija ili zračenje u kombinaciji s hormonskom terapijom, kada je to moguće, ključni je pristup liječenju karcinoma prostate. Glavni ograničavajući faktor radioterapije je pojava otpornosti čiji mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (Seifert i sur., 2019). Adhezija stanica na izvanstanični matriks i susjedne stanice nužna je za normalan rad stanice, a posredovana je različitim membranskim receptorima među kojima važnu ulogu imaju integrini (Geiger i Yamada, 2011). Kompleksi adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complexes*, IACs) imaju važnu ulogu u regulaciji proliferacije, diferencijacije, preživljenja i migracije stanica (Horton i sur., 2015). Ovi multimolekularni kompleksi nastaju aktivacijom integrina te nakupljanjem velikog broja proteina oko njihove citoplazmatske domene (Winograd-Katz i sur., 2014). Svi proteini IAC-a, zajedno s integrinima, nazivaju se adhesom (Geiger i Yamada, 2011). Jedan od mehanizama otpornosti tumorskih stanica na zračenje posredovan je promjenama u adheziji stanica (Dickreuter i Cordes, 2017). Točnije, pokazano je da promjena ekspresije nekih proteina adhesoma mijenja osjetljivost stanica tumora na zračenje. Stoga su ti proteini potencijalne molekularne mete za dokidanje ove otpornosti i potrebno ih je detaljnije istražiti (Dickreuter i Cordes, 2017). Za ovakva istraživanje pogodni su stanični modeli dobiveni izlaganjem tumorske stanične linije zračenju i izdvajanjem otporne populacije stanica, čije se karakteristike onda uspoređuju sa roditeljskom staničnom linijom. Jedan od mogućih staničnih modela koji može pridonijeti tom cilju je model stanica karcinoma prostate DU145 i od njih dobivena sublinija otporna na zračenje DU145 RR (Seifert i sur., 2019, Cojoc i sur., 2015).

Cilj ovog diplomskog rada je usporediti adhesome stanične linije karcinoma prostate DU145 i odgovarajuće sublinije otporne na zračenje DU145 RR pomoću metoda western blot i masene spektrometrije. Usporedba adhesoma trebala bi doprinijeti razumijevanju uloge proteina uključenih u adheziju u otpornosti karcinoma prostate na zračenje. Rezultati ovog istraživanja mogli bi otkriti nove potencijalne mete za terapiju.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. TUMORI

Tumori predstavljaju nakupinu stanica sa svojstvom učestale i nekontrolirane stanične diobe. Razlog pojave tumora su mutacije u „tumor-kritičnim“ genima uključenim u regulaciju staničnog ciklusa i popravka DNA. Glavne grupe gena koje su ključne za pojavu tumorskog fenotipa su proto-onkogeni i tumor supresorski geni, a sve tumore karakterizira genetička nestabilnost i raznolikost (Alberts i sur., 2013). Specifična obilježja većine tumora su neovisnost o signalima rasta, neosjetljivost na inhibitore rasta, izbjegavanje apoptoze, neograničena replikacija, poticanje angiogeneze, sposobnost invazije i metastaziranja, sposobnost modifikacije metabolizma te izbjegavanje imunskog odgovora (Hanahan i Weinberg, 2011). Ovisno o karakteristikama stanica, tumori se dijele na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne) tumore. Osnova razlika je što stanice zloćudnog tumora imaju sposobnost invazije u okolna tkiva, dok stanice dobroćudnog tumora ostaju sjedinjene u masi. Invazivnost tumora podrazumijeva sposobnost prodiranja tumorskih stanica u krvotok ili limfne žile i formiranje sekundarnih tumora, zvanih metastaze, na drugim mjestima u tijelu (Alberts i sur., 2002). Klasifikacija zloćudnih tumora vrši se prema vrsti tkiva i stanica iz kojih potječu. Zloćudni tumori koji potječu iz epitelnih stanica nazivaju se karcinomi, a oni koji nastaju iz vezivnog tkiva ili mišićnih stanica nazivaju se sarkomi. Zloćudni tumor koji se ne uklapaju ni u jednu od ove dvije široke kategorije su tumori hematopoetskih stanica, stanica živčanog sustava te melanocita (Barbet i sur., 2020, Alberts i sur., 2002). Vjerojatnost obolijevanja od zloćudnog tumora prije 75 godine života iznosi 20 %, dok je vjerojatnost za smrtnost 10 %. Najnoviji globalni statistički podaci govore da je u 2018. godini zabilježeno 18,1 milijuna novih slučajeva malignih oboljenja, a 9,6 milijuna smrti uzrokovanih zloćudnim tumorima (Ferlay i sur., 2018).

#### 2.1.1. Zloćudni tumori prostate

Prostata je mišićno-žljezdani organ muškog spolnog sustava i ima ulogu stvaranja i izlučivanja ejakulata. Glavne građevne jedinice prostate su tubuloalveolarne žlijezde i fibromuskularna stroma. Tubuloalveolarne žlijezde građene su od epitelnih stanica, dok je fibromuskularna stroma građena od glatkih mišićnih stanica i mezenhimalnih stanica.

Zloćudne promjene uglavnom zahvaćaju epitelne stanice prostate, stoga govorimo o karcinomu prostate (Harryman i sur., 2016, Juretić i sur., 2010).

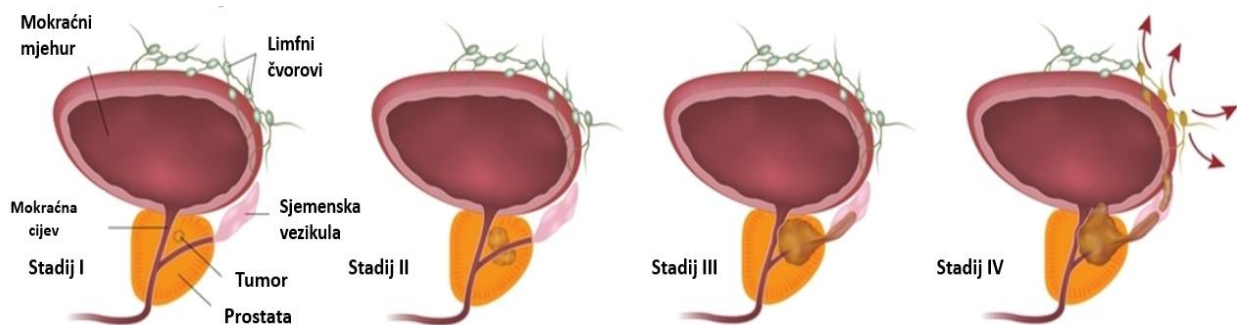
Karcinom prostate je drugi vodeći uzrok smrti od zloćudnih tumora u muškaraca (Testa i sur., 2019, Ferlay i sur., 2018). Nepredvidivo ponašanje i specifična biologija čine karcinom prostate najvarijabilnijim oblikom zloćudnog tumora u čovjeka (Šamija, 2010). Noviji podaci govore da se u više od 95 % dijagnosticiranih karcinoma prostate radi o acinarnom adenokarcinomu (Testa i sur., 2019, Đorđević i sur., 2017). Adenokarcinom je vrsta karcinoma, koji je građen od atipičnih epitelnih stanica koje stvaraju tumorske žljezdane tvorbe, a pojavljuje se u žlijezdama ili njihovim izvodnim kanalima i sluznicama (Struna, 2020).

Različiti faktori uključeni su u razvoj karcinoma prostate. Promjene epitelnih stanica i stanica strome prostate, gubitak epitelno-stromalne homeostaze te poremećena interakcija stanica i izvanstaničnog matriksa potiču razvoj karcinoma prostate (Juretić i sur., 2010). Posebno važnu ulogu u progresiji karcinoma prostate imaju androgeni hormoni. Aktivnost žljezdanih epitelnih stanica prostate ovisi o stimulaciji androgenim hormonima. Glavni androgeni hormoni su testosteron i dihidrotosteron, a njihovi učinci u stanici očituju se vezanjem na specifične androgene receptore epitelnih stanica (Nevedomskaya i sur., 2018). Aktivirani androgeni receptori odgovorni su za pokretanje transkripcije gena i sintezu proteina potrebnih za spolnu diferencijaciju u pubertetu, ali i održavanje funkcija prostate u kasnijoj dobi. Budući da je proces karcinogeneze sličan dediferencijaciji stanica, utjecaj androgenih hormona u razvoju i progresiji karcinoma sličan je utjecaju androgenih hormona u procesu razvoja prostate (Juretić i sur., 2010). Razlikujemo karcinome prostate koji su ovisni i one koji su neovisni o androgenim hormonima, a neovisnost se javlja kao posljedica nakupljanja mutacija i prilagodbe stanica na niske razine androgenih hormona. Delecije i translokacije velikih dijelova kromosoma kao i učestale točkaste mutacije, male insercije i promjene broja kopija gena karakteristične su za karcinom prostate i doprinose njegovom razvoju i velikoj genetičkoj nestabilnosti. Epigenetske promjene, kao metilacija kromatina, posebice uzrokuju inaktivaciju ključnih gena uključenih u popravak DNA i regulaciju staničnog ciklusa (Testa i sur., 2019). Geni koji su najviše podložni promjenama su tumor supresorski geni, primjerice BRCA1, BRCA 2 (engl. *breast cancer gene*), p53 i onkogeni kao što su MYC i FOXA1 (Testa i sur., 2019, Levanat i Levačić-Cvok, 2010).

Progresiju malignih bolesti karakterizira pojava metastaza. Za razliku od metastaza ostalih karcinoma, za koje se smatra da nastaju od jedne stanice, dokazi upućuju da stanice karcinoma prostate tvore kohezivne nakupine koje uspješno prolaze stromu i cirkuliraju neurovaskularnim sustavom. Stanice karcinoma prostate metastaziraju u različita tkiva i organe, ali najčešće u kosti i limfne čvorove (Harryman i sur., 2016).

### 2.1.2. Dijagnoza i liječenje karcinoma prostate

Dijagnostički postupci otkrivanja karcinoma prostate su digitorektalni pregledi, PSA (prostata specifični antigen) test, magnetska rezonanca, transrektalni ultrazvuk, biopsija prostate, CT te određivanje Gleasonovog zbroja (Đorđević i sur., 2017, Krušlin i Tomas, 2010). Uz prethodno spomenute gene (BRCA1, BRCA 2, p53, MYC), gen za androgeni receptor (AR) i gen za stanični proliferacijski faktor Ki67 istražuju se kao potencijalni molekularni biomarkeri u procesu dijagnostike karcinoma prostate, dok je test temeljen na genu PCA3 (engl. *prostate cancer gene 3*) već u upotrebi (Đorđević i sur., 2017). Nakon postavljanja dijagnoze i utvrđivanja radi li se o lokaliziranom karcinomu prostate (stadij I i II), lokalno proširenom karcinomu (stadij III) ili agresivnom metastatskom karcinomu prostate (stadij IV) (Error! Reference source not found.), liječenje se odvija na nekoliko niže navedenih načina (NIH, 2020).



**Slika 1.** Prikaz četiri stadija karcinoma prostate (preuzeto iz NIH, 2020).

Mogućnosti za liječenje karcinoma prostate uključuju radioterapiju, kirurško uklanjanje prostate, hormonsku terapiju, krioterapiju, kemoterapiju, imunoterapiju ili kombinaciju spomenutih metoda (Evans, 2018). Radioterapija i kirurško otklanjanje, s hormonskom terapijom ili bez nje, ključne su metode za liječenje oboljelih od karcinoma

prostate (Seifert i sur., 2019). Radioterapija se može primijeniti na dva različita načina. Prvi način je zračenje vanjskim snopom gdje se visokoenergetske X-zrake usmjeravaju na tumor i prostor koji ga neposredno okružuje. Drugi, češće korišteni, način radioterapije je brahiterapija gdje se točkasti izvor ionizirajućeg zračenja uvodi izravno u prostatu (Evans, 2018). Prednost brahiterapije nad vanjskim snopom zračenja je isporuka energije zračenja izravno u prostatu što smanjuje oštećenje okolnog tkiva i organa. Privremene nuspojave zračenja su krvarenje, oštećenje kože i erektilna disfunkcija (Ružić i Knežević, 2018). Pacijenti također mogu biti podvrgnuti kirurškom uklanjanju prostate (radikalna prostatektomija). Radikalnom prostatektomijom uklanja se prostata s kapsulom, ponekad zajedno s okolnim tkivom, sjemenim mjehurićima i limfnim čvorovima (Đorđević i sur., 2017). Potencijalne komplikacije radikalne prostatektomije uključuju impotenciju (gubitak spolne funkcije) i rjeđe inkontinenciju (gubitak kontrole mokrenja) (Ružić i Knežević, 2018). Kao što je već spomenuto, neki karcinomi prostate su hormon-ovisni i mogu se liječiti hormonskom terapijom koja smanjuje aktivnost stanica osjetljivih na androgen i tako dovodi do zaustavljanja rasta karcinoma (Testa i sur., 2019). Terapija djeluje tako da sprječava sekreciju androgenih hormona ili onemogućuje njihovo vezanje na androgene receptore. Sekrecija androgenih hormona sprječava se kirurškom metodom ili primjenom LH-RH agonista ili antagonista (engl. *luteinizing hormone-releasing hormone*). Vezanje androgena onemogućuje se korištenjem, strukturno sličnih molekula, antiandrogena, koji se natječu za vezanje na androgene receptore. Najčešće se hormonska terapija koristi u kombinaciji s drugim terapijama i to kod pacijenata s metastatskim oblikom karcinoma prostate (Evans, 2018), a moguće nuspojave su erektilna disfunkcija, kardiotsičnost i hepatotsičnost (Ružić i Knežević, 2018). Krioterapija je rjeđe korištena metoda liječenja, a provodi se zamrzavanjem stanica raka prostate (-40 °C) uvođenjem tekućih plinova pomoću igle izravno u prostatu (Evans, 2018). Kod agresivnog metastatskog karcinoma prostate, koji ne odgovara na spomenute terapije, primjenjuje se kemoterapija protutumorskim lijekovima, primjerice docetakselom i kabazitakselom te imunoterapija monoklonskim protutijelom ipilimumabom koji cilja protein CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) ili protutumorskim personaliziranim cjepivom sipuleucel-T. Sipuleucel-T sastoji se od antigen prezentirajućih stanica pacijenta, dobivenih leukoferezom, koje se nakon *ex vivo* inkubacije s rekombinantnim antigenom za protein PAP (engl. *prostatic acid phosphatase*) i GM-CSF (engl. *human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) aktiviraju i natrag vraćaju u krv pacijenta, gdje potiču njegov imunski odgovor prema stanicama karcinoma prostate (Evans, 2018, Nevedomskaya i sur., 2018).

### 2.1.3. Otpornost stanica karcinoma prostate na zračenje

Ovisno o stupnju razvoja karcinoma te vrsti i jačini primijenjene radioterapije, do 90 % bolesnika s karcinomom prostate može se trajno izliječiti. Pojava otpornosti stanica karcinoma na zračenje ograničavajući je faktor pri liječenju i vodi prema ponovnoj tvorbi karcinoma prostate kod već liječenih pacijenata (Seifert i sur., 2019).

Stanični mehanizmi otpornosti na zračenje nisu u potpunosti razjašnjeni, a sama pojava je zasad nepredvidiva zbog velike heterogenosti unutar populacije tumorskih stanica (Peitzsch i sur., 2016). Tijekom radioterapije dolazi do promjene tumorskog mikrokoliša kao i promjene stanica karcinoma. Zračenje uzrokuje dvostruke lomove DNA i u stanicama se aktiviraju popravci DNA skloni pogreškama (engl. *error-prone repair*) (Mateo i sur., 2017). Posljedično dolazi do značajnih genetskih promjena i umjesto željene stanične smrti, može doći do razvoja otpornosti na zračenje (Seifert i sur., 2019). U taj proces su u stanicama karcinoma prostate uključeni signalni putevi odgovorni za popravak oštećenja DNA, autofagiju te epitelno-mezenhimalnu tranziciju (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), a poznato je da su signalni putevi PI3K/Akt i MAPK/ERK (Ras/Raf/Mek/Erk) ključni putevi u kontroli stanične otpornosti na zračenje (Chebotarev i sur., 2019, Zhao i sur., 2013). Važno je spomenuti da ponovnoj tvorbi karcinoma prostate doprinosi i manja subpopulacija tumorskih matičnih stanica (engl. *cancer stem cell*, CSC) dokazano otpornih na zračenje (Chang i sur., 2014). Tumorske matične stanice bitno se razlikuju od ostalih stanica tumora. Povećana sposobnost diobe i diferencijacije, kao i visoka ekspresija gena uključenih u popravak DNA čine tumorske matične stanice izuzetno otpornima na radioterapiju. Istraživanje na staničnim linijama dobivenim izlaganjem stanica zračenju pokazalo je da otporne stanične linije karcinoma prostate dijele mnoga svojstva s tumorskim matičnim stanicama, a to su povećana ekspresija CSC markera (CD133, CXCR4, ABCG2, OCT4, NANOG, ALDH1A1), indukcija EMT-a i uspješniji popravak lomova DNA (Cojoc i sur., 2015). Peitzsch i sur. (2016) pokazali su da zračenje uzrokuje i epigenetske promjene stanica karcinoma prostate, a primjer je povećana metilacija histona H3 koja dovodi do pojačane ekspresije CSC marker gena ALDH1A1. Inhibicija spomenute metilacije histona H3 u regulatornoj regiji spomenutog gena kao i inhibicija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*), citokrom P450 CYP17A1 enzima i mTOR kinaze dovode do pojačane osjetljivosti stanica prema radioterapiji (Seifert i sur., 2019, Palacios i sur., 2013).

Proteini uključeni u adheziju stanica također posreduju u razvitku otpornosti prema zračenju. Adhezija na komponente izvanstaničnog matriksa posredovana integrinima nužna je za razvoj i preživljenje karcinoma, a prekomjerna ekspresija i promjena proteina uključenih u adheziju doprinosi razvoju otpornosti karcinoma prostate na zračenje (Eke i Cordes, 2015). Poseban izazov u liječenju predstavlja agresivni metastatski karcinom prostate s otpornim fenotipom (Harryman i sur., 2016). Dokazano je da ciljanje integrina i ostalih adaptornih i signalnih proteina koji tvore IAC, primjerice, PINCH-a i FAK-a (opisanih u sljedećim poglavljima) povećava osjetljivost stanica prema zračenju te sprječava progresiju i metastaziranje (Dickreuter i Cordes, 2017, Storch i Cordes, 2015, Eke i sur., 2010)

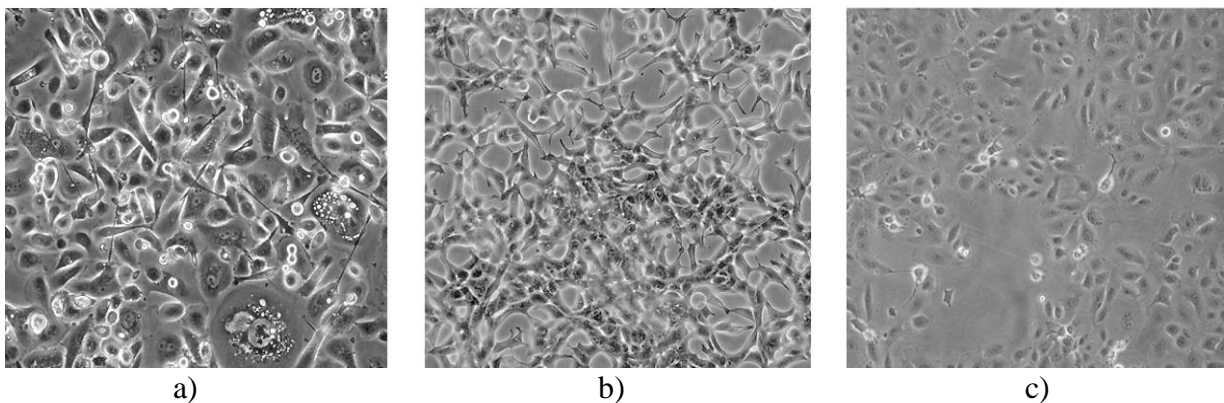
Boljem razumijevanju genotipa i fenotipa stanica otpornih na zračenje doprinose *in vitro* istraživanja staničnih linija karcinoma prostate i od njih dobivenih sublinija otpornih na zračenje. Analiza ekspresije gena i ekspresije proteina roditeljskih i otpornih staničnih linija važna je za definiranje gena/proteina uključenih u otpornost. Ova istraživanja doprinijet će uspješnijem postavljanju dijagnoze, predviđanju ishoda liječenja, ali i omogućiti razvoj ciljane terapije karcinoma prostate koji bi mogli doprinijeti potpunom izlječenju pacijenata (Seifert i sur., 2019).

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

Dostupnost staničnih linija različitih vrsta tumora potakla je biomedicinska istraživanja tumora i unaprijedila razumijevanje bolesti te omogućila razvoj učinkovitih terapijskih pristupa (Badal i sur., 2019). Otkriće novih specifičnih biomarkera i terapijskih meta karcinoma prostate nužno je radi bržeg prepoznavanja i uspješnijeg liječenja bolesnika. U istraživanju karcinoma prostate koristi se veći broj različitih staničnih linija (Lima i sur., 2018). Trenutno ih je dostupno preko 30, a dostupne su od ATCC (American Type Culture Collection) ili ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). Važno je napomenuti da je direktna nabava staničnih linija važna kako bi se istraživanje radilo na autenticiranim staničnim linijama što omogućuje usporedbu rezultata istraživanja različitih istraživačkih grupa. Većina staničnih linija karcinoma prostate uspostavljena je uzrokovanjem tkiva od muškaraca bijele rase europskog podrijetla (Badal i sur., 2019). Pregledom dostupne literature, za istraživanja karcinoma prostate najčešće se koriste PC3, LNCaP i DU145 stanične linije (Slika 2) (Seifert i sur., 2019, Eke i sur., 2018, Lima i sur., 2018, Peitzsch i sur., 2016, Cojoc i sur., 2015). Spomenute stanične linije uspostavljene su



1970-ih godina izolacijom metastatskih lezija karcinoma prostate iz kosti (PC3), limfnog čvora (LNCaP) te mozga (DU145). Međusobno, ove tri stanične linije imaju vrlo različite karakteristike. LNCaP je hipotetraploidna stanična linija karcinoma prostate s ekspresijom androgenih receptora, dok su PC3 i DU145 hipotriploidne, androgen-neovisne stanične linije (ATCC, 2020). Osim toga, PC3 je stanična linija s izrazito visokim metastatskim potencijalom, dok DU145 stanična linija ima umjereni, a LNCaP niski metastatski potencijal (Lima i sur., 2018). Uzevši u obzir da se otpornost karcinoma prostate na zračenje javlja u značajnom broju oboljelih od velike važnosti je uspostavljanje i analiza odgovarajućih sublinija stanica karcinoma prostate otpornih na zračenje (Cojoc i sur., 2015).



**Slika 2.** Mikroskopski prikaz staničnih linija karcinoma prostate PC3 (a), LNCaP (b) i DU145 (c) (preuzeto iz ATCC, 2020).

## 2.2. ADHEZIJA STANICA

Adhezija stanica temeljno je obilježje svih višestaničnih organizama. Različiti mehanizmi adhezije stanica omogućuju im da se pričvršćuju za izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) i za druge stanice, stvarajući jedinstvenu, čvrstu cjelinu (Geiger i Yamada, 2011). Stanice se s okolinom povezuju tvorbom čvrstih, komunikacijskih i pričvrstnih veza. Čvrste veze povezuju membrane susjednih stanica kako bi stvorile kontinuiranu, nepropusnu ili polupropusnu barijeru za protok molekula. Komunikacijske veze prijenosom signala između stanica omogućuju usklađeni rad svih tkiva i organa, a dijele se na tijesne spojeve i kemijske sinapse. Pričvrstne veze povezuju i omogućuju komunikaciju stanica međusobno kao i s izvanstaničnim matriksom, a dijele se na adherentne veze, dezmosome, fokalne adhezije i hemidezmosome. Adherentne veze i dezmosomi povezuju stanice zajedno, a formiraju ih proteini kadherini, dok fokalne adhezije i hemidezmosomi

povezuju stanice s izvanstaničnim matriksom i formiraju ih integrini. Osim spomenutih kadherina i integrina, stanica se povezuje s okolinom i drugim transmembranskim adhezijskim molekulama (engl. *cell-adhesion molecules*, CAMs) kao što su imunoglobulini i sindekani. Sve CAMs, osim veze s izvanstaničnim ligandima, karakterizira citoplazmatska domena povezana s citoskeletom stanice (Alberts i sur., 2013, Alberts i sur., 2002). Osim što povezuju stanice zajedno u funkcionalna tkiva i organe, stanične adhezije sudjeluju u prijenosu izvanstaničnih informacija koje utječu na sve aspekte života stanice. Za one veze posredovane integrinima isto vrijedi i u suprotnom smjeru jer stanice pomoću tih adhezija mogu aktivno preuređivati i restrukturirati izvanstanični matriks. Tvorba i regulacija integrin posredovanih adhezija presudna je za proces embriogeneze, rad imunološkog sustava i zarastanje rana, ali isto tako ima ulogu u raznim bolestima, kao što su imunološke bolesti i posebice zloćudni tumori (Geiger i Yamada, 2011).

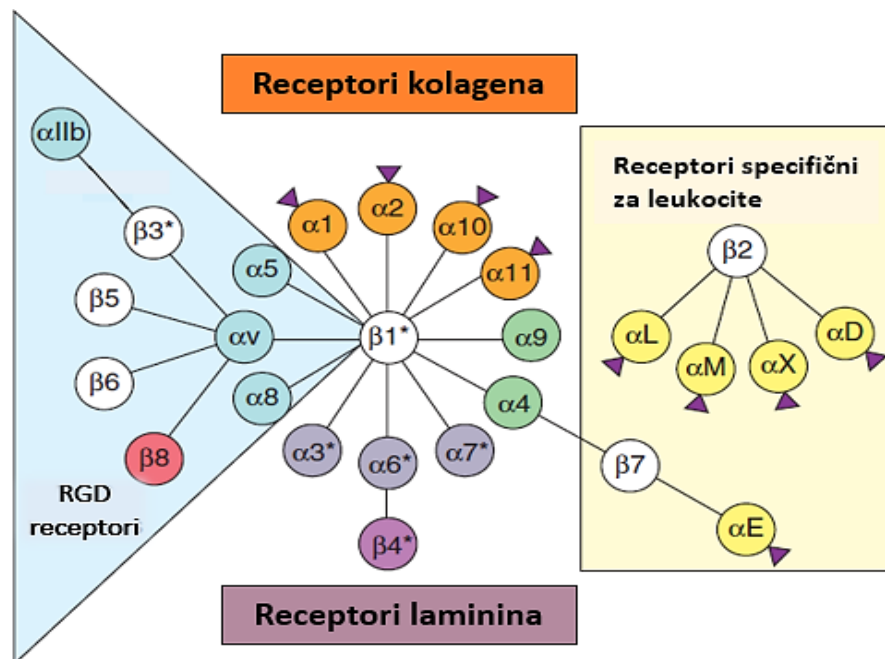
### 2.2.1. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks je kompleksna i dinamična strukturna tvorba smještena između stanica u organizmu. Komponente izvanstaničnog matriksa služe stanicama kao supstrati za vezanje te tvore stabilnu mehaničku potporu tkivima (Mecham i sur., 2012). Glavne makromolekulske sastavnice izvanstaničnog matriksa su kolageni, adhezijski glikoproteini (fibronektin i laminin), proteoglikani i elastična vlakna. Izvanstanični matriks je također izvor faktora rasta i bioaktivnih molekula, a ima ključnu ulogu u regulaciji proliferacije, adhezije, migracije, polariteta, diferencijacije i apoptoze stanica (Yue, 2014). Osim toga, komponente izvanstaničnog matriksa utječu i na osnovne procese u stanici poput regulacije energije i ekspresije gena. Na ovaj način promjene u mikrookolišu mogu utjecati na sve aspekte fenotipa stanice (Humphries i sur., 2019). Stanice se vežu na izvanstanični matriks putem raznih receptora kao što su sindekani (Afratis i sur., 2017), proteoglikan CD44, mucini, imunoglobulini, kinazni receptori s domenom za diskoidin DDR1 i DDR2 (engl. *discoidin domain receptor*) i najzastupljeniji integrini (Hynes i Naba, 2012).

### 2.2.2. Integrini

Integrini su heterodimerni transmembranski proteini sastavljeni od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. U stanicama sisavaca nalazi se 18  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica koje se povezuju nekovalentnim vezama u 24 različita integrina. Obje podjedinice,  $\alpha$  i  $\beta$ , su transmembranski proteini sastavljeni od više

domena. Svaka podjedinica građena je od kratke nestrukturirane citoplazmatske domene (citoplazmatski rep), jedinstvene spiralne membranske domene i velike izvanstanične domene (Yue, 2014). Veličina podjedinice varira ovisno o podtipu, a uglavnom je sastavljena od 750 do 1000 aminokiselina. Obje podjedinice imaju mjesta za vezanje dvovalentnih kationa magnezija, mangana i kalcija ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) koji imaju važnu ulogu u aktivaciji integrina, konformacijskim promjenama izvanstaničnih domena te vezanju liganda (Campbell i Humphries, 2011). Integrinski receptori se ovisno o preferenciji vezanja na komponente izvanstaničnog matriksa mogu podijeliti u četiri grupe: receptori laminina ( $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$  i  $\alpha6\beta4$ ), receptori specifični za leukocite ( $\alpha L\beta2$ ,  $\alpha M\beta2$ ,  $\alpha X\beta2$ ,  $\alpha D\beta2$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha4\beta7$  i  $\alpha E\beta7$ ), receptore kolagena ( $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha10\beta1$ ,  $\alpha11\beta1$ ) i RGD-receptore ( $\alpha v\beta1$ ,  $\alpha v\beta3$ ,  $\alpha v\beta5$ ,  $\alpha v\beta6$ ,  $\alpha v\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  i  $\alpha IIb\beta3$ ) koji prepoznaju slijed arginin-glicin-aspartat (RGD), motiv pronađen u raznim proteinima izvanstaničnog matriksa kao što su fibronektin, vitronektin i kolagen (Slika 3) (Hynes i Naba, 2012). Ekspresija integrina razlikuje se ovisno o vrsti stanica kao i o sastavu izvanstaničnog matriksa pojedinih tkiva (Campbell i Humphries, 2011).

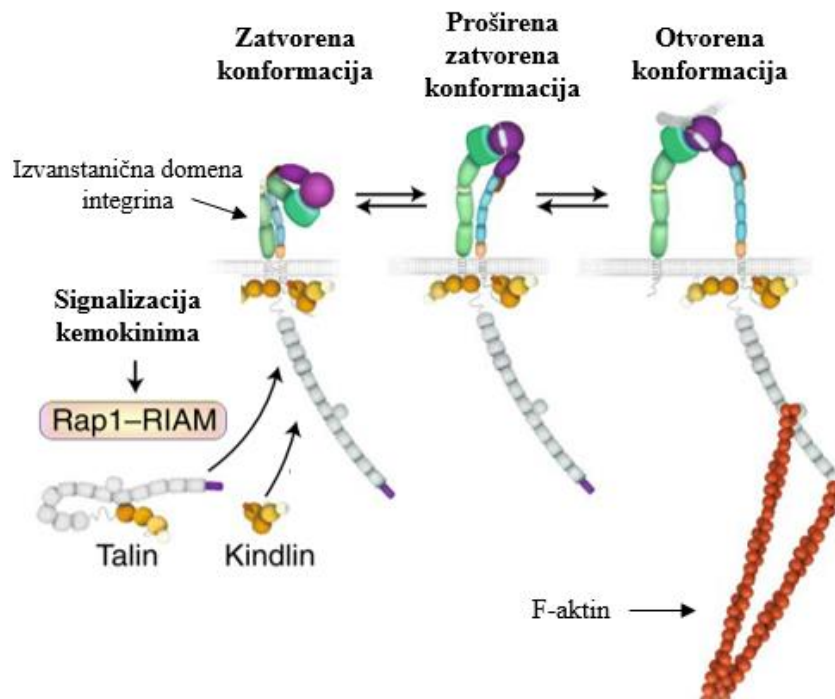


**Slika 3.** Prikaz vezanja podjedinica integrina  $\alpha$  i  $\beta$  te grupiranje heterodimera integrina prema vezanju na komponente izvanstaničnog matriksa (preuzeto iz Hynes i Naba, 2012).

### 2.2.3. Kompleks adhezije integrina

Adhezije posredovane integrinima imaju ključnu strukturnu ulogu u morfogenezi tkiva i organa (Geiger i Yamada 2011), ali i važnu signalnu ulogu između komponenti izvanstaničnog matriksa i citoskeleta stanice (Humphries i sur., 2019). Nakon aktivacije i nakupljanja integrina, na njihov citoplazmatski rep vežu se mnogi proteini i formiraju multimolekularni kompleks adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complex*, IAC) koji tvori vezu između integrina i aktinskog citoskeleta (Horton i sur., 2015, Winograd-Katz i sur., 2014). Važno je napomenuti da, osim s aktinom, IAC stupa u interakciju s mikrotubulima putem proteinskog kompleksa CMSC-a (engl. *cortical microtubule stabilization complex*) (Paradžik i sur., 2020, Bouchet i sur., 2016). Osim vezanja na stanični citoskelet, IAC je ključan u procesu prijenosa signala između stanice i izvanstaničnog matriksa (Humphries i sur., 2019).

Prijenos signala kompleksa adhezije integrina odvija se u dva smjera. Signalizacija „izvana“ (engl. *outside in*) započinje vezanjem komponenti izvanstaničnog matriksa i aktivacijom integrina što dovodi do konformacijskih promjena citoplazmatskih repova integrina i pokretanja signalnih kaskada koje utječu na staničnu proliferaciju, diferencijaciju, polaritet, kontraktilnost i ekspresiju gena (Yue, 2014). Suprotno tome unutarstanični signali, procesom signalizacije „iznutra“ (engl. *inside out*) aktiviraju integrine i omogućuju stvaranje stanične adhezije. Prijenos unutarstaničnih signala putem kemokina potiče povezivanje RIAM-a (engl. *Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*) s talinima i posljedično njihovu aktivaciju. Vezanje aktiviranih talina i kindlina na citoplazmatski rep integrina nužno je za promjenu konformacije integrina iz zatvorene (engl. *bent-closed*), preko proširene zatvorene (engl. *extended-closed*) u otvorenu (engl. *extended-open*) konformaciju koja ima najviši afinitet za vezanje na izvanstanični matriks (Slika 4) (Sun i sur., 2019).



**Slika 4.** Prikaz aktivacije integrina procesom signalizacije „iznutra“ (preuzeto iz Sun i sur., 2019).

Detaljne funkcionalne i morfološke analize definirale su glavne oblike IAC-a, a to su nascentne adhezije (NA), fokalni kompleksi (FC), fokalne adhezije (FA), fibrilarne adhezije (FB) (Humphries i sur., 2019, Burrridge, 2017), hemidezmosomi (Walko i sur., 2015), podosomi i invadopodiji (Murphy i Courtneidge, 2011) te retikularne adhezije (RA) (Lock i sur., 2018).

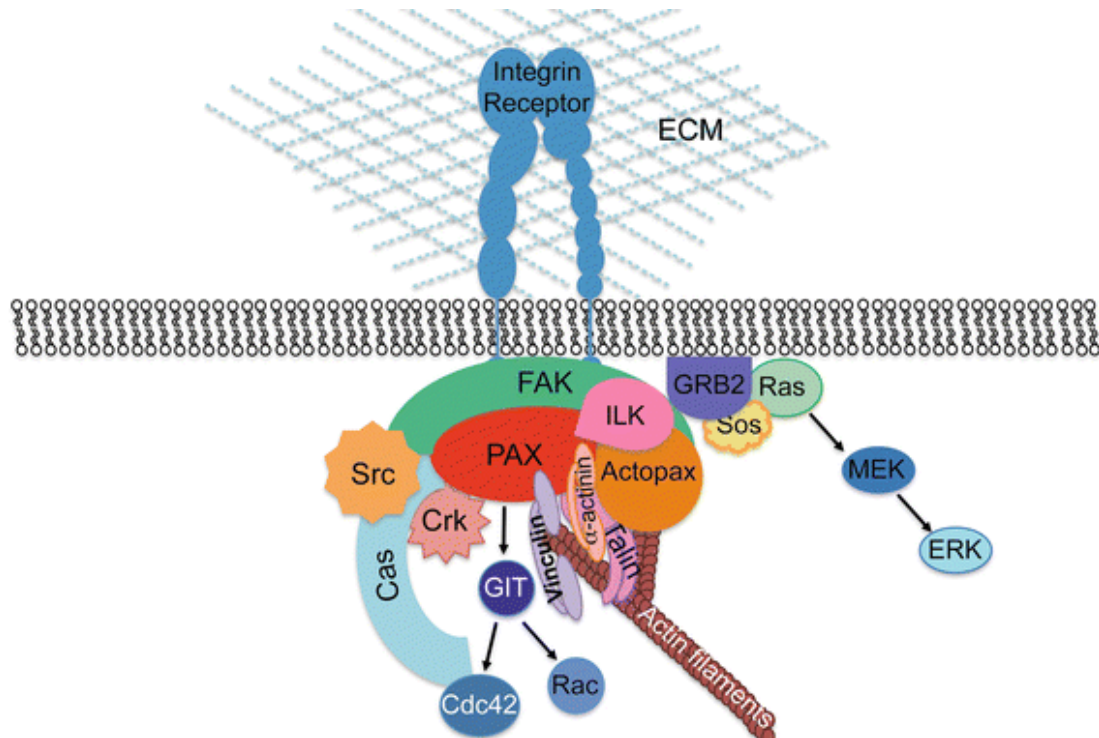
NA su najmanje stanične adhezije, čijim sazrijevanjem nastaju nešto veći FC. Ove prolazne strukture sastavljene su od svega nekoliko stotina proteina, uključujući integrine, taline i paksilin (engl. *paxilin*, PAX) (Geiger i Yamada, 2011). Njihova uloga, prilikom adhezije stanica, je vezanje i „pipanje“ izvanstaničnog matriksa te rastavljanje ili prelazak u stabilnije FA (Burrridge, 2017). Transformacija FC u FA potaknuta je fosforilacijom paksilina te vezanjem proteina ziksina (Zaidel-Bar i sur., 2007). FA su dinamične strukture, veličine nekoliko mikrometara, a nužne su za snažnu adheziju stanice na matriks te prijenos mehaničkih i kemijskih signala u oba smjera (Burrridge, 2017). Vezanje integrina na komponente izvanstaničnog matriksa potiče autofosforilaciju kinaze fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) i vezanje tirozin kinaze Src. Stvoreni FAK/Src kompleks fosforilira tirozinske i serinske ostatke proteina paksilina, markera FA. Spomenuta

fosforilacija ključan je događaj za formiranje FA jer fosforilirani paksilin pokreće spajanje ostalih proteina kao što su talini, vinkulin, tenzin, FAK i drugi (López-Colomé i sur., 2017). Talini i vinkulin, vezanjem na F-aktin uspostavljaju vezu između integrina i citoskeleta stanice (Slika 5) (Burrige, 2017). Posljedično dolazi do aktivacije signalnih proteina kao što su mitogen aktivirana kinaza (MAP) i Rho GTPaze (RhoA, Rac i Cdc42), a aktivirani signalni putevi utječu na stanično kretanje, proliferaciju, diferencijaciju i ekspresiju gena (López-Colomé i sur., 2017, Yue, 2014). Vezanjem stanica putem integrina  $\alpha 5 \beta 1$  na fibronektin, čestu komponentu izvanstaničnog matriksa formiraju se FB. FB uglavnom nastaju sazrijevanjem FA, a obogaćene su proteinom tenzinom (Burrige, 2017).

Druge dvije vrste IAC-a su podosomi i invadopodiji, male prstenaste adhezije formirane oko aktinskog citoskeleta, povezujući ga sa staničnom membranom. Obje strukture razgrađuju izvanstanični matriks i pospješuju invaziju stanica, a razlikuju se u dinamici i proteinskom sastavu. Invadopodiji se formiraju uglavnom u invazivnim tumorskim stanicama, a podosomi u mišićnim i endotelnim stanicama (Murphy i Courtneidge, 2011).

Keratinska vlakna citoskeleta povezuju se sa staničnom membranom putem hemidezmosoma. U stanici pronalazimo dvije vrste hemidezmosoma, tip 1 i 2, a središnje komponente su integrin  $\alpha 6 \beta 4$  i protein plektin (Walko i sur., 2015).

Nedavno su Lock i sur. (2018) otkrili RA, nove IAC strukture povezane s klatrinskom mašinerijom stanice. RA su kao i FA stabilne strukture, bogate integrinom  $\alpha v \beta 5$ , a nastaju neovisno o talinu i F-aktinu. Za razliku od FA koje se rastavljaju tijekom stanične diobe i ponovno tvore u interfazi, RA ostaju postojeane tijekom cijelom staničnog ciklusa, što omogućava učinkovitu diobu stanice (Lock i sur., 2018).



**Slika 5.** Pojednostavljeni prikaz osnovnih komponenti fokalne adhezije, aktopaksin (actopax), regulator staničnog ciklusa 42 (Cdc42), izvanstanično regulirana kinaza (ERK), kinaza fokalne adhezije (FAK), receptor faktora rasta 2 (GRB2), G-protein vezani receptor (GIT) integrin vezujuća kinaza (ILK), mitogen-aktivirajuća protein kinaza (MEK), paksilin (PAX) (preuzeto iz López-Colomé i sur., 2017).

#### 2.2.4. Adhesom integrina

Pojam adhesom integrina označava sve proteine koji uz integrine čine IAC (Jones i sur., 2015, Winograd-Katz i sur., 2014). Izolacija dinamične i nestabilne strukture IAC-a bez nepoželjnog staničnog materijala nije u potpunosti moguća. Međutim, u posljednjem desetljeću razvijane su različite tehnike za izolaciju IAC-a i analizu adhesoma iz 2D kulture stanica. Većina objavljenih izolacija provedena je iz staničnih kultura uzgajanih na fibronektinu i analizirana masenom spektrometrijom (Humphries i sur., 2019). Bioinformatičkom analizom svih podataka došlo se do 2412 proteina nazvanih fibronektin-inducirani „meta adhesom“, a dodatnom selekcijom identificirano je 60 najučestalijih proteina nazvanih „konsenzus adhesom“ (Horton i sur., 2015). Konsenzus adhesom određen je iz stanica uzgajanih na fibronektinu i stoga njegov sastav odgovara adhesomima fibronektinskih receptora  $\alpha\beta3$  i  $\alpha5\beta1$  (Horton i sur., 2016, Robertson i sur., 2015, Ng i sur.,

2014), a međusobne interakcije komponenti konsenzus adhesoma otkrivene su metodama proteomike i super-rezolucijske mikroskopije (Humphries i sur., 2015).

Integrini su transmembranski heterodimeri koji vezanjem na ligande potiču nakupljanje ostalih proteina koji čine IAC i koji se dijele na skeletne i signalne proteine. Skeletne proteine, koji tvore vezu integrina s aktinom, čine dvije obitelji citoplazmatskih proteina, a to su aktin-vezujući proteini te adaptorni proteini. Podskupinu aktin-vezujućih proteina izravno vezanih na integrine čine filamini, talini,  $\alpha$ -aktinini, plektin, i tenzin. Adaptorni proteini, vežu se aktin-vezujućim proteinima, integrinima kao i međusobno te tako stvaraju kompleksnu mrežu proteina (Horton i sur., 2016, Anderson i sur., 2014). Signalni proteini u adhesomu uključuju tirozin i serin/treonin protein-kinaze i fosfataze, Rho GTPaze i njihove regulatore (Sun i sur., 2019, Horton i sur., 2015). Osim sa aktinskim citoskeletom integrini su povezani i s mikrotubulima. Primjerice Kank proteini (engl. *KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein*), koji do sada nisu smatrani važnim komponentama adhesoma, stupaju u interakciju s talinom (Slika 6) i predstavljaju ključnu poveznicu IAC-a i spomenutog CMSC-a, tj. vežu IAC sa mikrotubulima (Paradžik i sur., 2020, Bouchet i sur., 2016).

Unutar stanice, proteini konsenzus adhesoma organizirani su oko četiri međusobno povezane osi, a to su ILK-PINCH-parvin-kindlin, FAK-paksilin, talin-vinkulin i  $\alpha$ -aktinin-ziksin-VASP (Slika 6) (Humphries i sur., 2019). Glavni proteini spomenutih osi su integrin vezujuća kinaza (engl. *integrin-linked kinase*, ILK), serin/treonin kinaza koja aktivira nekoliko signalnih puteva nizvodno od integrina, zatim adaptorni protein PINCH (engl. *interesting new cysteine-histidine-rich protein*), aktin-vezujući protein parvin (Wickström i sur., 2010) te kindlini (kindlin 1, 2 i 3), proteini koji se izravno vežu na citoplazmatski rep  $\beta$  podjedinice i aktiviraju integrine (Sun i sur., 2019).

Drugu os čini citoplazmatska nереceptorska kinaza FAK i protein paksilin. Nakon autofosforilacije FAK fosforilira protein paksilin koji predstavlja sidrište za vezanje skeletnih proteina (López-Colomé i sur., 2017).

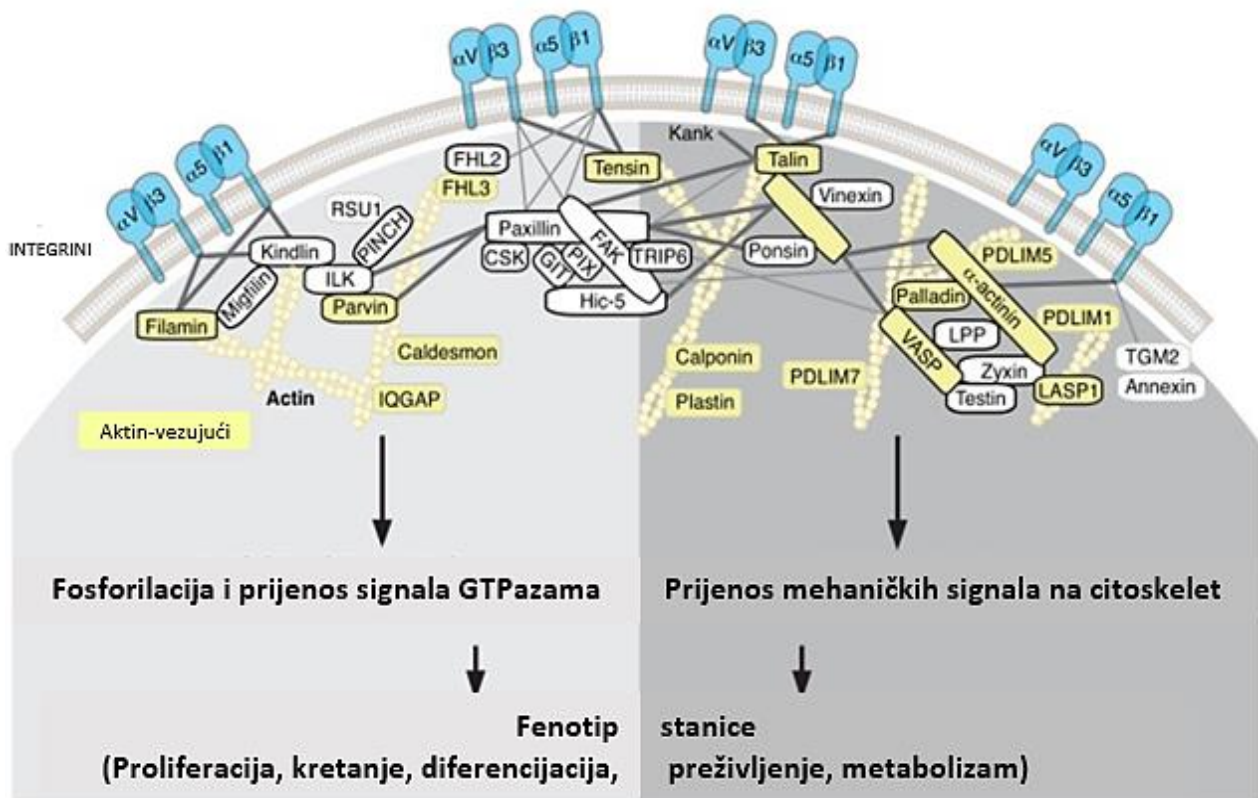
Talini 1 i 2, proteini treće osi, veliki su adaptorni proteini, izravno se vežu na citoplazmatski rep integrina i aktiviraju vinkulin, adaptorni protein odgovoran za prijenos sile od talina do aktinskog citoskeleta (F-aktina) (Sun i sur., 2019, Atherton i sur., 2015).

Zadnju os čine skeletni aktin-vezujući proteini  $\alpha$ -aktinini (Sjöblom i sur., 2008) te fosfoproteini ziksin i VASP (engl. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) (Legerstee i sur., 2019) koji su uključeni u organizaciju citoskeleta.



Osim nakon uzgoja stanica na fibronektinu, moguća je i analiza adhesoma nakon dugotrajnog uzgoja stanica u kulturi, gdje stanice izlučuju komponente izvanstaničnog matriksa. Pokazano je da se neke stanice u kulturi preferencijalno vežu integrinom  $\alpha\beta5$ , koji osim fokalnih adhezija stvara i retikularne adhezije (Paradžik i sur., 2020, Lock i sur., 2018). Međutim, to ne znači da isto vrijedi za sve stanice (Ambriović-Ristov i sur., neobjavljeni rezultati).

Osim izolacije adhesoma (Jones i sur., 2015), posljednjih godina koristeći metodu masene spektrometrije u sprezi s blizinski-ovisnom tehnikom biotiliranja (BioID) otkriven je sastav adhesoma hemidezmosoma tipa 2 iz epitelnih stanica bubrega (Myllymäki i sur., 2019) kao i do sad nepoznate bliske interakcije proteina adhesoma (Humphries i sur., 2019).



**Slika 6.** Shematski prikaz prijenosa signala u stanici putem proteina adhesoma (preuzeto iz Humphries i sur., 2019).

### 2.2.5. Adhesom integrina kao potencijalna meta u liječenju tumora

Adhezije posredovane integrinima imaju važnu ulogu u migraciji, preživljenju i diferencijaciji stanica, ali i u procesima narušavanja homeostaze, odnosno razvoja bolesti (Horton i sur., 2015). Aktivacija integrina potaknuta vezanjem na izvanstanični matriks i tvorba IAC-a predstavljaju složen i vrlo dinamičan mehanizam odgovoran za staničnu sudbinu (Horton i sur., 2016). Razumijevanje sastava i regulacije adhesoma te mehanizma prenošenja informacija putem IAC-a, koji utvrđeno ima ključnu ulogu u diferencijaciji i proliferaciji stanica, doprinijet će boljem shvaćanju procesa karcinogeneze (Humphries i sur., 2019). U proces razvoja zloćudnih tumora uključena su čak 32 proteina konsenzus adhesoma (Horton i sur., 2016), a najviše je istraživana uloga integrina.

Tijekom karcinogeneze događaju se mnoge promjene u stanici koje utječu na repertoar i razinu ekspresije integrina. Stanice tumora mijenjaju ekspresiju integrina tako da obično gube integrine koji osiguravaju njihovo vezanje na bazalnu membranu i pomažu im da ostanu u mirujućem, diferenciranom stanju, ali zadržavaju ili povećano ekspimiraju integrine koji pospješuju migraciju i proliferaciju tumora (Stojanović i sur., 2016). Promjene u integrin-posredovanim signalnim putevima dovode do invazivnog rasta, metastaziranja te moguće pojave otpornosti stanica karcinoma na protutumorske lijekove (Aoudjit i Vuori, 2012) i radioterapiju (Eke i sur., 2018). Spomenute pojave otpornosti tumorskih stanica ograničavaju uspjeh terapija i velika su prepreka koju treba prevladati u klinici. Stoga su se razvila dva područja istraživanja, a to su otpornost na radioterapiju tumorskih stanica posredovana staničnom adhezijom (engl. *cell adhesion-mediated radioresistance*, CAM-RR) i otpornost na lijekove posredovane staničnom adhezijom (engl. *cell adhesion-mediated drug resistance*, CAM-DR).

Ciljanje integrina, kao i proteina koji grade IAC, može povećati osjetljivost tumorskih stanica na postojeće protutumorske lijekove i radioterapiju (Dickreuter i Cordes, 2017). Upravo je zato kombinacija klasične terapije s utišavanjem integrina siRNA (engl. *small interfering RNA*) molekulama (Malric i sur., 2019, Stojanović i sur., 2018), inhibitornim protutijelima (Hoffmann i sur., 2019, Dickreuter i sur., 2016) ili malim peptidima poput cilengitida (Mas-Moruno i sur., 2010), strategija s velikim potencijalom u borbi protiv zloćudnih tumora (Dickreuter i Cordes, 2017). Primjerice, integrinska podjedinica  $\beta 1$  prisutna je u polovici poznatih kombinacija heterodimera integrina (Slika 3), a komponentne  $\beta 1$  integrinskih signalnih puteva su faktori rasta koji imaju važnu ulogu u proliferaciji i preživljenju zloćudnih tumora (Eke i sur., 2018) kao i pojavi otpornosti na terapiju (Aoudjit i

Vuori, 2001).  $\beta 1$  integrini uključeni su u popravak dvolančanih lomova uzrokovanih zračenjem, stoga ciljanje  $\beta 1$  integrina s inhibitornim protutijelima povećava osjetljivost na ionizirajuće zračenje i usporava rast tumora (Eke i sur., 2012). Mnogi  $\beta 1$  integrini uspješno su ciljani u pretkliničkim istraživanjima terapije tumora, uključujući  $\alpha \nu \beta 1$  (Reed i sur., 2015),  $\alpha 2 \beta 1$  (Yoshimura i sur., 2009)  $\alpha 5 \beta 1$  (Sawada i sur., 2008) i  $\alpha 6 \beta 1$  (Landowski i sur., 2016). Nažalost, samo su lijekovi specifični za  $\alpha 5 \beta 1$  napredovali u kasnijim fazama ispitivanja i to u terapiji karcinoma pluća (Raab-Westphal i sur., 2017). Isto tako, pretpostavljalo se da je inaktivacija podjedinice  $\beta 1$  u kombinaciji s kemoterapijom dobar pristup za liječenje karcinoma dojke, ali podaci dobiveni *in vivo* u miševima pokazali su da njegova inaktivacija povećava neželjeno metastaziranje karcinoma. Zanimljivo je da je povećano metastaziranje posljedica aktivacije mehanizma koji se naziva „integrin crosstalk“ u kojemu promjena ekspresije i/ili aktivacije jednog integrina (u ovom slučaju  $\beta 1$ ) dovodi do promjene u drugom integrinu (povećanje ekspresije integrina  $\alpha \nu \beta 3$ ) (Truong i sur., 2014). S druge strane, ciljanje  $\beta 1$  integrina u 3D modelima tumora glave i vrata pospješuje ishode radioterapije (Eke i sur., 2012). Osim kao mete u liječenju nekih tumora,  $\beta 1$  integrini smatraju se potencijalnim biomarkerima progresije i lokalizacije tumora (Ahmedah i sur., 2017). Za razliku od  $\beta 1$  podjedinice,  $\beta 4$  integrinska podjedinica veže se isključivo na  $\alpha 6$  podjedinicu, tvoreći lamininski receptor ključan za adheziju stanica na bazalnu membranu putem hemidezmosoma. Pokazano je da prekomjerna ekspresija integrina  $\beta 4$  potiče metastaziranje, dok je gubitak ove podjedinice povezan sa smanjenjem rasta zloćudnih tumora (Eke i sur., 2018). Nedavna istraživanja različitih vrsta karcinoma, poput karcinoma pluća i debelog crijeva, pokazala su da inhibicija interakcije  $\alpha 6 \beta 4$  integrina s lamininom smanjuje rast stanica, invaziju i metastaziranje (Juan-Rivera i Martínez-Ferrer, 2018). Važnu ulogu u procesu progresije i metastaziranja tumora ima  $\alpha \nu$  podjedinica, a posebna pažnja posvetila se proučavanju uloge  $\alpha \nu \beta 3$  i  $\alpha \nu \beta 5$  integrina (Ahmedah i sur., 2017, Brozović i sur., 2008; Christmann i sur., 2017, Juan-Rivera i Martínez-Ferrer, 2018; Stojanović i sur., 2016). Osim što su eksprimirani u stanicama tumora,  $\alpha \nu \beta 3$  i  $\alpha \nu \beta 5$  integrini nužni su za proliferaciju i diferencijaciju endotelnih stanica krvnih žila u procesu angiogeneze. Ciljanje ovih integrina, primjerice cilengitidom, u kombinaciji s klasičnom terapijom, zaustavlja proces angiogeneze te spriječava metastaziranje karcinoma dojke i prostate (Alva i sur., 2012), ali se pokazalo neuspješno u kombiniranoj terapiji karcinoma gušterače (Raab-Westphal i sur., 2017) i glioblastoma (Stupp i sur., 2005). Povećana ekspresija integrina  $\alpha \nu \beta 3$  karakteristična je za mnoge tumore, uključujući tumore glave i vrata (Stojanović i sur., 2016), karcinoma gušterače (Hosotani i sur., 2002), prostate (McCabe i sur., 2007), dojke (Felding-Habermann

i sur., 2001), grlića maternice (Gruber i sur., 2005) kao i kod melanoma, gdje ima središnju ulogu u rastu (Mitjans i sur., 2000). Utišavanje  $\alpha v$  podjedinice pokazalo se kao dobra strategija u povećanju osjetljivosti stanica melanoma na postojeće kemoterapeutike kao što su paklitaksel i vinkristin (Stojanović i sur., 2018). Zanimljivo, primijećeno je da kombinirano ciljanje  $\alpha v$  i  $\beta 1$  podjedinice siRNA molekulama pospješuje radioterapiju i djeluje na smanjenje progresije u preko 80 % ispitivanih uzoraka sarkoma i melanoma, što daje uvid u novi pristup kombiniranog utišavanjem integrina i integrinskih podjedinica (Haeger i sur., 2020). Integrinska podjedinica  $\beta 8$  prekomjerno je eksprimirana u glioblastomu, agresivnom tumoru mozga, a njeno ciljano utišavanje povećava osjetljivost tumora na zračenje i kemoterapiju (Malric i sur., 2019). Uz spomenute, znanstvenici su tijekom godina razvili niz molekula, posebice protutijela, koja ciljaju integrine i integrinske podjedinice s ciljem uspješnije terapije tumora (Raab-Westphal i sur., 2017). Primjer su protutijela koja ciljaju integrin  $\alpha\beta 6$  (Van Aarsen i sur., 2008),  $\alpha L$  integrine (Qualls i sur., 2010), integrin  $\alpha 1\beta 1$  (Mattila i sur., 2005) i mnoga druga, a većina ih je u procesu istraživanja (Raab-Westphal i sur., 2017).

Promjena u ekspresiji ostalih proteina adhesoma također ima ulogu u razvoju zloćudnih tumora. Primjerice, prekomjerna ekspresija proteina paksilina (López-Colomé i sur., 2017) i PINCH-a (Storch i Cordes, 2012) povezana je s progresijom karcinoma prostate, pluća, debelog crijeva, dojke i drugih. Protein FAK odgovoran je za proces razvoja i prekomjerno je eksprimiran u raznim tumorima (Tai i sur., 2015). Aktivacija FAK-a nakon vezanja integrina  $\beta 1$  za izvanstanični matriks osigurava preživljenje melanoma prilikom izlaganja protutumorskom lijeku, BRAF (engl. *isoform B of RAF kinase*; RAF, *rapidly accelerated fibrosarcoma*) inhibitoru, *in vivo* (Hirata i sur., 2015), a kod tumora glave i vrata te karcinoma pluća i debelog crijeva doprinosi razvitku otpornosti na zračenje (Dickreuter i Cordes, 2017). Osim toga postoje istraživanja koja su zabilježila nekinaznu aktivnost FAK-a tijekom invazivnosti stanica tumora dojke. Specifično ciljanje FAK-a kao i sprječavanje njegove fosforilacije trebalo bi doprinijeti uspješnijoj kombiniranoj terapiji tumora (Tai i sur., 2015). Paradžik i sur. (2020) dokazali su da je protein adhesoma KANK2 dobra molekularna meta za smanjenje migracije stanica melanoma kao i za povećanje osjetljivosti stanica na postojeće protutumorske lijekove paklitaksel i vinkristin. Osim FAK-a, ključne kinaze adhesoma, Src i ILK, smatraju se izvrsnim metama za terapiju karcinoma, same ili u kombinaciji s drugim terapijama (Harburger i Calderwood, 2009). Ciljana inhibicija Src-a, primjerice dasatinibom, inhibitorom fosforilacije Src-a, pospješuje terapiju leukemije (Lindauer i Hochhaus, 2018), ali s druge strane Stojanović i sur. (2016) pokazali su da

smanjenje koncentracije Src-a i fosforiliranog Src-a [pSrc (Y418)] dovodi do smanjene osjetljivosti stanica karcinoma jezika i neuspješne kombinirane terapije sa nekoliko različitih protutumorskih lijekova. Inhibicija fosforilacije FAK-a također može dovesti do smanjene osjetljivosti na protutumorski lijek paklitaksel (Stojanović i sur., 2018). Povećana ekspresija ILK-a zabilježena je u nekoliko vrsta tumora kao što su glioblastom te karcinomi prostate, debelog crijeva, želudca i dojke (Dickreuter i Cordes, 2017). Pokazano je da ciljanje ILK-a pogoduje terapiji glioblastoma (Hausmann i sur., 2015) i leukemije (de la Puente i sur., 2015), međutim povećava CAM-RR i CAM-DR kod karcinoma pluća (Cordes i van Beuningen, 2003). Iz navedenog je vidljivo da je vrsta tumora jako važna u konačnom odgovoru na terapiju i potrebno je pristupiti liječenju svakog zloćudnog tumora zasebno (Dickreuter i Cordes, 2017), a daljnja analiza adhesoma integrina od velike je važnosti za bolje razumijevanje procesa karcinogeneze i poboljšanja ishoda liječenja (Horton i sur., 2016).

### 2.3. ADHESOM STANICA KARCINOMA PROSTATE

Trenutno dostupne terapije karcinoma prostate koje se koriste u klinici nisu učinkovite u svim slučajevima, a pogotovo kod bolesnika s uznapredovalim metastatskim oblikom karcinoma. Prijenos signala putem integrina i ostalih proteina adhesoma utječe na migraciju, proliferaciju, metastaziranje karcinoma prostate, kao i na razvitak otpornosti prema radioterapiji i kemoterapiji. Smatra se da bi kombinirano liječenje s malim peptidima, monoklonskim protutijelima, siRNA molekulama i drugim spojevima, koji ciljaju adhesom integrina, moglo biti učinkovito u terapiji, pogotovo kod pacijenata čiji su tumori postali otporni na postojeću terapiju (Juan-Rivera i Martínez-Ferrer, 2018, Eke i sur., 2018, Dickreuter i Cordes, 2017). Upravo se zato intenzivno istražuju načini za specifično ciljanje proteina IAC-a koji su prepoznati kao dobra meta u terapiji karcinoma prostate (Poglavlje 2.3.1.). U literaturi je do sada opisana uspješna izolacija IAC-a iz raznih staničnih modela, kao što su primjerice stanice fibroblasta (Ng i sur., 2014), melanoma (Paradžik i sur., 2020, Robertson i sur., 2015) i leukemije (Byron i sur., 2012, Humphries i sur., 2009). Premda je zasebno proučavana uloga raznih proteina adhesoma u procesu kancerogeneze prostate (Poglavlje 2.3.1.), izolacija IAC-a iz zdravih stanica prostate, kao i stanica karcinoma prostate, prema našim saznanjima, nije provedena.

### 2.3.1. Promjena ekspresije proteina adhesoma u stanicama karcinoma prostate

Promjene u ekspresiji integrina značajno doprinose razvoju mnogih vrsta malignih oboljenja, uključujući karcinom prostate. Dokazano je da u stanicama karcinoma prostate, u odnosu na zdrave stanice prostate, dolazi do deregulacije signalnih puteva koje okidaju integrini što doprinosi njegovoj progresiji i metastaziranju kao i razvoju otpornosti na zračenje (Eke i sur., 2018). Trenutno se istražuje sposobnost različitih spojeva, poput prirodnih komponenti, monoklonskih protutijela, statina, peptida i aminokiselina, da ciljaju integrine i njihove podjedinice u stanicama karcinoma prostate (Juan-Rivera i Martínez-Ferrer, 2018). Povećana ekspresija  $\beta 1$  integrina zabilježena je u 65 % analiziranih karcinoma prostate, a aktivacija  $\beta 1$  integrinske podjedinice ima ključnu ulogu u metastaziranju i preživljenju (Lee i sur., 2013). Primjerice, receptor kolagena, integrin  $\alpha 2\beta 1$ , dominantan je integrin u stanicama karcinoma prostate PC3, a njegova aktivacija je povezana s progresijom karcinoma. Zanimljivo, nedavna istraživanja pokazala su da vodeni ekstrakt biljke *Gleditsia sinensis* inhibira ekspresiju integrina  $\alpha 2\beta 1$  te sprječava fosforilaciju FAK-a i posljedično značajno smanjuje migraciju i staničnu adheziju u stanicama PC3 (Ryu i sur., 2016). Kao što je već spomenuto, povećana ekspresija integrina  $\alpha \nu\beta 3$  i  $\alpha \nu\beta 5$  povezana je s progresijom mnogih karcinoma, pa tako i karcinoma prostate (Ahmedah i sur., 2017). Povećana ekspresija integrina  $\alpha \nu\beta 3$  u stanicama karcinoma prostate, u odnosu na zdrave stanice prostate, promiče preživljavanje i metastaziranje karcinoma te razvika otpornosti na zračenje i protutumorske lijekove. Provedena *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su da utišavanje integrina  $\alpha \nu\beta 3$  siRNA molekulom pogoduje terapiji metastatskog oblika karcinoma prostate (Cancer i sur., 2011), a nedavno su Wang i sur. (2019) dokazali da smanjenje ekspresije ovog integrina pomoću shRNA (engl. *small hairpin RNA*) molekule povećava osjetljivost stanica karcinoma LNCaP i PC3 na zračenje. Osim toga, izlaganjem stanica monoklonskom protutijelu abituzumabu, koji cilja  $\alpha \nu$  podjedinicu, inhibiraju se signalni putevi potaknuti integrinima  $\alpha \nu\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$ ,  $\alpha \nu\beta 5$  i  $\alpha \nu\beta 8$ , te se smanjuje migracija i invazija karcinoma prostate (Juan-Rivera i Martínez-Ferrer, 2018, Raab-Westphal i sur., 2017). Zanimljivo, u istraživanim stanicama karcinoma prostate nije zabilježena ekspresija integrina  $\alpha \nu\beta 6$  (Hussain i sur., 2016).

Eke i sur. (2018) proučavali su ekspresiju integrina u stanicama karcinoma prostate DU145, LNCaP i PC3 nakon izlaganja X-zračenju. Pokazali su da je ekspresija integrina promijenjena u svim korištenim staničnim linijama. U DU145 staničnoj liniji uočena je povećana ekspresija integrinskih podjedinica  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  i  $\beta 4$ , kod PC3 stanica povećala se

ekspresija podjedinica  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  i  $\beta 5$ , dok je kod LNCaP stanica došlo do prekomjerne ekspresije podjedinica  $\alpha v$ ,  $\alpha 7$  i  $\beta 5$ , a smanjenja ekspresije podjedinica  $\beta 4$  i  $\alpha 3$ . Iako je u spomenutom radu proučavana isključivo ekspresija pojedinačnih integrinskih podjedinica, treba uzeti u obzir da se integrini na površini stanice eksprimiraju isključivo kao heterodimeri  $\alpha$  i  $\beta$  integrinskih podjedinica. Općenito, ova otkrića upućuju na mogućnost kombinirane terapije ciljanjem tih molekula i zračenja. Primjerice, povećanje ekspresije  $\beta 1$  i  $\beta 4$  integrinskih podjedinica nakon izlaganja tumorskih stanica zračenju, može se ciljati inhibitornim protutijelima na spomenute integrine što dovodi do povećane stanične smrti u kombinaciji sa zračenjem. Stoga se ovaj kombinirani terapijski pristup možda može primijeniti na primarne tumore, metastaze i tumore koji su razvili otpornost na radioterapiju (Eke i sur., 2018).

Osim promjene ekspresije integrina, u karcinomu prostate, u odnosu na zdrave stanice prostate, dolazi i do promjene ekspresije ostalih proteina adhesoma. Talin 1 je protein FA koji zajedno s kindlinima, u procesu signalizacije iznutra, aktivira integrine i omogućuje vezanje s izvanstaničnim matriksom (Atherton i sur., 2015). Sakamoto i sur. (2010) pokazali su da talin 1, preko kinaza FAK, Src i AKT, ima značajan utjecaj u metastaziranju, odnosno progresiji karcinoma prostate *in vitro* i *in vivo*. Prekomjerna ekspresija talina 1 pospješuje adheziju, migraciju i invaziju stanica karcinoma prostate aktivirajući signalne puteve uključene u preživljenje stanica. Inhibicija talina 1 dovodi do značajne inhibicije migracije i invazije stanica karcinoma prostate *in vitro* i *in vivo*. Primjerice, u stanicama karcinoma prostate DU145 zabilježena je visoka ekspresija talina 1. Utišavanje talina 1 u ovim stanicama dovelo je do smanjenje sposobnosti vezanja na različite komponente izvanstaničnog matriksa i posljedično do značajnog smanjenja migracijskog potencijala. Osim talina, u stanicama karcinoma prostate dolazi i do promjene u ekspresiji kindlina. Smanjenja sinteza kindlina dovodi do pojačane osjetljivosti stanica karcinoma prostate na kemoterapeutik docetaksel (Plow i sur., 2016). Isto tako, povećano metastaziranje karcinoma prostate je povezano s prekomjernom ekspresijom i nizom promjena proteina paksilina (López-Colomé i sur., 2017) te adaptornog proteina plektina (Harryman i sur., 2016). Ekspresija adaptornog proteina PINCH-a također je povećana u stanicama karcinoma prostate, a smanjenje njegove aktivnosti pospješuje ishode radioterapije i kemoterapije karcinoma (Eke i sur., 2010). Osim toga, aktivacijom glavnih onkogenih putova, prekomjerno eksprimirani FAK promiče rast, preživljavanje, migraciju, metastaziranje i androgen-neovisnost karcinoma prostate *in vitro* i *in vivo* (Figel i Gelman, 2011), a njegova inhibicija pospješuje radioterapiju (Storch i sur.,

2015). Zanimljivo, protein ziksin u zdravim stanicama prostate, ulazeći u interakciju s proteinom miopodinom, djeluje kao tumor supresor, a odsutnost ove interakcije karakteristična je za karcinom prostate i doprinosi njegovoj invaziji (Kotb i sur., 2018).

Do sada su znanstvenici, s ciljem pronalaska gena i proteina uključenih u razvitak otpornosti karcinoma prostate na radioterapiju, uspoređivali razne stanične linije i njihove sublinije otporne na zračenje. Chebotarev i sur. (2019) uspjeli su povezati promjene u ekspresiji raznih miRNA molekula (engl. *microRNA*) s razvitkom otpornosti na zračenje kod stanične linije DU145. S druge strane, Chang i sur. (2013) usredotočili su se na proučavanje razlike između proteina PI3/Akt signalnog puta, a Peitzsh i sur. (2016) na ekspresiju gena ALDH1A1 kod staničnih linija karcinoma prostate i njihovih sublinija otpornih na zračenje, međutim uloga proteina adhesoma integrina do sad nije bila tema ovakvih istraživanja. Za sada je pokazano da kod otpornih stanica karcinoma prostate (LNCaP i DU145), u odnosu na izvorne stanice, dolazi do povećane ekspresije više desetaka gena uključenih u sintezu proteina IAC-a (FA), pogotovo kod stanične linije DU145 s višim metastatskim potencijalom, što odgovara prethodno spomenutim otkrićima. Uz to, dolazi i do smanjenje ekspresije manjeg broja gena uključenih u sintezu FA, ali ovi navodi nisu detaljnije istraženi (Seifert i sur., 2019). Stoga je za optimalne ishode molekularnog ciljanja potrebno detaljnije razumijevanje uloge proteina adhesoma u otpornosti karcinoma na zračenje (Dickreuter i Cordes, 2017), a tome će zasigurno pridonijeti usporedba adhesoma staničnih linija karcinoma prostate i njihovih sublinija otpornih na zračenje.



### 3. ESKPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Stanice karcinoma prostate

U radu je korištena stanična linija karcinoma prostate DU145 i stanična sublinija otporna na zračenje DU145 RR koju je razvio tim pod vodstvom prof. dr. Anne Dubrovske (Technische Universitat Dresden, Dresden). Prof. dr. Dubrovska omogućila je korištenje navedenih staničnih linija za ovo istraživanje.

##### 3.1.2. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije korištene u radu navedene su u Tablici 1.

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

Kemikalija	Kataloški broj	Proizvođač
aceton	650501	Sigma-Aldrich, SAD
amido crno (engl. <i>amido black</i> )		Kemika, Hrvatska
beta-merkaptotanol	63690	Fluka, Njemačka
bromfenol plavo (engl. <i>bromophenol blue</i> )	15375	Serva, Njemačka
DMEM (Dulbeccova modifikacija Eaglov 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, kompleksal 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
metanol	P140501	GramMol, Hrvatska
mlijeko u prahu, nemasno	F145.1	Carl Roth, Njemačka
NaCl	P148590	GramMol, Hrvatska
natrijev deokiskolat (engl. <i>sodium deoxycholate</i> )	D6750	Sigma-Aldrich, SAD
penicilin 10 000 u/mL /streptomycin 10 000 µg/mL	15140-122	Gibco, SAD
pufer RIPA (engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> )	89901	Thermo Fisher Scientific, SAD
SDS (natrij-dodecil sulfat)	L5750	Sigma-Aldrich, SAD
serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum, FBS</i> )		Sigma-Aldrich, SAD
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

Korištene otopine, njihova priprema i temperatura čuvanja navedeni su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Otopine korištene u radu.

Ime otopine	Priprema	Čuvanje
5 %-tno mlijeko u TBST	5 % mlijeko u 1× TBS s 0,1 % Tween, priprema se netom prije korištenja	-
ARS (engl. <i>adhesion recovery solution</i> )	125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % SDS (w/V), 150 mM DTT, otopina se priprema netom prije pokusa	-
DMEM-FSB	DMEM s 10 %-tnim serumom fetusa goveda s 50 u/mL penicilina i 50 µg/mL streptomicina	4 °C
DMEM-HEPES	25 mM	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 se netom prije korištenja	-
NaCl	4 M	4 °C
otopina boje amido crno	0,1 % amido black, 10 % octene kiseline, 7,5 % MetOH	sobna temperatura
otopina za odbojavanje	40% MetOH, 7% octene kiseline	sobna temperatura
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> HPO <sub>4</sub> . Otopina II: Smiješati 3 mM CaCl <sub>2</sub> x	4 °C

	2H <sub>2</sub> O i MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O. Autoklavirati zasebno. Pomiješati 80 mL Otopine I i 100 mL otopine II pH 7,2.	
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> HPO <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, (engl. <i>sample buffer</i> , SB), 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) β- merkaptoetanol	-20 °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
pufer za uklanjanje vezanih protutijela za membranu (engl. <i>stripping buffer</i> )	100 mM otopina glicina pH 2,8	4 °C
pufer za lizu stanica, RIPA (engl. <i>radioimmunoprecipitation buffer</i> )	RIPA (89901, Thermo Fischer Scientific, SAD) s dodatkom 1× inhibitora fosfataza i proteaza iz Halt Protease Inhibitor Cocktail Kita i 50 μM EDTA, priprema se netom prije korištenja	-
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	4 °C

	NaCl, diH <sub>2</sub> O do 500 mL	
TBST	1× TBS, 0,1 % Tween	4 °C
Tris-HCl, pH 7,6	1 M, pH 7,6	4 °C
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM, pH 6,8	4 °C
Tris-HCl, pH 8	1 M, pH 8	4 °C

### 3.1.4. Protutijela i spojevi korišteni u metodi western blot

Za određivanje ekspresije proteina metodom western blot korištena su protutijela navedena u Tablici 3.

**Tablica 3.** Primarna i sekundarna protutijela korištena u metodi western blot.

Specifičnost	Uzgojeno u	Kataloški broj	Proizvođač	Razrjeđenje
α-aktinin 1, 4 (engl. <i>alpha actinin</i> )	miš	sc-17829, Lot J0117	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:500
protumišji imunoglobulin, obilježen peroksidazom iz hrena	ovca	NA931	GE Healthcare, SAD	1:5000
Talin 1, 2	miš	ab11188, lot GR3177481-1,	Abcam, UK	1:1000
Paksilin (engl. <i>paxilin</i> , PAX)	zec	ab2264, lot GR276544-1	Abcam, UK	1:1000
protuzečji imunoglobulin, obilježen peroksidazom iz hrena	koza	31466	Thermo Fischer Scientific, SAD	1:10.000

### 3.1.5. Uređaji i laboratorijski pribor

Korišteni uređaji navedeni su u Tablici 4, a korišteni laboratorijski pribor u Tablici 5.

**Tablica 4.** 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 i transfer proteina	BioRad, SAD
kupelj JB Nova	Grant Instruments, UK
magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija
pH metar PH3 Sension+	Hach, SAD
pingvini za led	-
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 na membranu, Trans-Blot Turbo Transfer	BioRad, SAD
vaga	Tehnica, Slovenija

**Tablica 5.** Laboratorijski pribor korišten 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
automatska pipeta	Integra Biosciences, 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 % (Mini-PROTEAN TGX)	BioRad, SAD
membrana za prijenos proteina, nitrocelulozna, Trans-Blot Turbo Transfer Pack	BioRad, SAD
mikroepuvete, plastične od 1,5 ili 2 mL	Falcon, SAD
mikropipete	Eppendorf, Njemačka
nastavci za mikropipete, razne zapremnine	Brand, Njemačka
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
strugač za stanice	TPP Techno Plastic Products AG, Švicarska

## 3.2. METODE

Većina korištenih metoda u ovom radu opisana je u priručniku Metode u molekularnoj biologiji (Ambriović Ristov i sur., 2007).

### 3.2.1. Kultura stanica

Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM s dodatkom FBS-a (10 % v/v) i antibiotika. Uzgoj se provodio u inkubatoru u T-bocama i Petrijevim zdjelicama pri temperaturi od 37 °C i atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Ovisno o popunjenosti podloge na kojoj rastu, stanice su rasađivane dva do tri puta tjedno. Nakon uklanjanja hranjive podloge stanice su ispirane s 3 mL PBS-a, a potom tripsinizirane s 1 mL tripsina. Za potpuno odvajanje stanica od površine, tripsinizacija se provodila u inkubatoru pri 37 °C tijekom par minuta. Proces odvajanja stanica praćen je svjetlosnim mikroskopom, a zaustavljanje djelovanja tripsina radilo se dodatkom četiri puta većeg volumena hranjive podloge. Većina uzgoja provodila se u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm, a broj nasađenih stanica iznosio je 1 – 1,3 x 10<sup>6</sup> stanica po Petrijevoj zdjelici.

Radi osiguravanja dovoljnih zaliha stanica, tijekom ranih pasaža stanice su zamrzavane i čuvane u tekućem dušiku pri -196 °C. Stanice uzgajane u T-25 bocama odvajane su od podloge i centrifugirane 10 minuta pri 1000 x g, skupljeni talog stanica resuspendiran je u 900 µL DMEM-FBS-a i prebačen u ampule za smrzavanje. Zamrzavanje se provodilo polagano, stanice su inkubirane pola sata na ledu prije dodatka 100 µL krioprotektora DMSO-a, a potom su ampule prebačene na stalak spremnika za tekući dušik u pare tekućeg dušika (-80 °C). Nakon 24 sata ampule su prebačene u tekući dušik pri -196 °C gdje su čuvane do daljnjeg. Odmrzavanje stanica provodilo se naglim i kratkim uranjanjem ampule u vodenu kupelj zagrijanu na 37 °C, nakon čega su odmrznute stanice prebačene u T-25 boce ili Petrijeve zdjelice (promjera 10 cm) s odgovarajućim volumenom podloge tako da se stanice razrijede najmanje 8-10 puta. Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu tijekom 24 sata, stanicama je potrebno zamijeniti hranjivu podlogu, čime se istovremeno i uklanja DMSO koji u većim količinama može biti toksičan za stanice.



### 3.2.2. Izolacija IAC-a

Izolacija IAC-a provedena je prema metodi opisanoj u Jones i sur. (2015). Stanice su nasadene u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm, u empirijski određenom broju od  $1,3 \times 10^6$  stanica, da bi nakon 48 sati popunjenost površine na kojoj rastu bila 80 – 90 %. Izolacija IAC-a provedena je, ovisno o potrebnoj količina uzorka za daljnju analizu, iz tri, četiri ili šest Petrijevih zdjelica. Svaka izolacija IAC-a provodila se s jednakim brojem Petrijevih zdjelica kontrolne skupine (negativne kontrole) i skupina izloženih kemijskom umreživaču. Radi određivanja broja stanica u Petrijevoj zdjelici na dan izolacije, kao i skupljanja staničnog lizata, potrebno je prilikom nasadivanja nasaditi dvije dodatne Petrijeve zdjelice s jednakim brojem stanica kao i u zdjelicama za izolaciju. Na dan izolacije IAC-a broj stanica je u prosjeku bio  $3 \times 10^6$  stanica po Petrijevoj zdjelici.

Nakon uklanjanja tekuće hranjive podloge stanice su isprane s 3 mL ugrijanog 25 mM DMEM-HEPES (pri 37 °C) kako bi se uklonile neadherentne stanice. Potom su stanice izložene djelovanju 6 mM umreživača DTBP-a (5 mL) određeno vrijeme pri 37 °C. Umrežavanje je zaustavljeno dodavanjem 150 µL 1 M Tris-HCl pufera (pH 8), tijekom dvije minute pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja tekućine, Petrijeve zdjelice sa stanicama su postavljene na pingvine (ohlađeni na -20 °C) i isprane s 5 mL hladnog PBS-a. Zatim su stanice lizirane s 5 mL 1 x RIPA pufera tijekom dvije do tri minute pri sobnoj temperaturi. Proces lize praćen je svjetlosnim mikroskopom. Ostatci stanica u Petrijevim zdjelicama isprani su jakim mlazom vodovodne vode iz slavine u horizontalnom i vertikalnom smjeru i zatim kružnim pokretima iz sredine prema rubovima i obrnuto. Petrijeve zdjelice su potom isprane s 5 mL hladnog PBS-a. Svjetlosnim mikroskopom provjerena je uspješnost uklanjanja stanica. Dobro ocijeđene Petrijeve zdjelice postavljene su na hladne pingvine. Uzorak IAC-a svake skupine Petrijevih zdjelica skupljen je u 800 µL ARS-a tako da je u prvu Petrijevu zdjelicu skupine dodano 400 µL ARS-a nakon čega su proteini IAC-a sastrugani strugačem za stanice. ARS iz prve Petrijeve zdjelice sa skupljenim proteinima prenesen je pipetom u iduću Petrijevu zdjelicu i isti postupak je ponovljen na svim zdjelicama skupine. Nakon prenošenja skupljenih uzoraka iz zadnje Petrijeve zdjelice u mikroepruvetu, dodano je preostalih 400 µL ARS-a u zadnju zdjelicu skupine i postupak je ponovljen u obrnutom smjeru. Skupljeni uzorak također je prebačen u mikroepruvetu i čuvan na ledu. Kako bi se skupljeni proteini istaložili u uzorak je dodan četiri puta veći volumen acetona ohlađenog na -20 °C, a uzorak je pohranjen na -80 °C do daljnje analize.

### 3.2.3. Utvrđivanje optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om za izolaciju proteina IAC-a

Utvrđivanje optimalnog vremena umrežavanja kemijskim umreživačem DTBP-om ključno je za uspješnu izolaciju IAC-a te daljnju analizu adhesoma. Uzorci su skupljeni kao što je opisano u poglavlju 3.2.3., a svaka skupina od tri ili četiri Petrijeve zdjelice imala je različito vrijeme umrežavanja. Nakon izolacije, analiza uzoraka provedena je metodama SDS-PAGE i western blot (Poglavlje 3.2.5). Western blot analiza provedena je s protutijelima specifičnim za protein koji se očekuju i za one koji se ne očekuju u adhesomu.

### 3.2.4. Analiza ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot

#### 3.2.4.1. Natrijev dodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) metoda

SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) je vrsta denaturirajuće elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u kojoj se proteini u gelu razdvajaju isključivo na temelju njihove molekulske mase. Denaturacija proteina postiže se reakcijom anionskim detergentom natrij dodecil sulfatom (SDS) koji se u točno određenom omjeru (1.4 g SDS na 1 g proteina) veže na hidrofobne regije proteina i razmata protein. Na ovaj način svi su proteini negativno nabijeni i djelovanjem električnog polja kreću se u istom smjeru u gelu. U puferu za pripremanje uzorka nalazi se i reducirajući agens (ditiotreitol ili 2-merkaptoetanol) koji cijepa eventualne disulfidne veze u proteinima uzorka (Ambriović Ristov i sur., 2007).

SDS-PAGE izoliranih uzoraka prvi je korak u metodi western blot. Proteini istaloženi u acetonu centrifugirani su 20 minuta pri 16000 x g i temperaturi od 4 °C, supernatant je pažljivo uklonjen, a talog je dodatno osušen u digestoru tijekom 15 minuta. Uzorci su zatim resuspendirani u 40 µL 1 x reducirajućeg SDS pufera za nanošenje uzorka) i zagrijavani u termobloku tijekom 20 minuta pri 1000 rpm i 70 °C. SDS-PAGE izoliranih uzoraka IAC-a provodila se u vertikalnom komercijalno dostupnom gradijentnom poliakrilamidnom gelu (4 - 15 %) (BioRad, SAD). Prethodno pripremljeni gelovi su umetnuti u aparaturu za elektroforezu (BioRad, SAD) s dodatnim pufer za elektroforezu. Osim nanesenih uzoraka, na gel je u početnu jažicu nanoseno i 3 µL standarda za određivanje molekularne mase proteina, PageRuler Prestained Protein Ladder, 26616 (Thermo Fisher Scientific, SAD). SDS-PAGE je

provedena pri konstantnom naponu od 80 V i zaustavljena prije nego bromfenol plava boja iz SB pufera izađe iz gela, nakon od prilike dva sata.

#### 3.2.4.2. *Western blot metoda*

Western blot je metoda detekcije specifičnih proteina unutar mješavine više proteina, a sastoji se od nekoliko koraka. Prvi korak je SDS-PAGE, nakon čega slijedi prijenos proteina na membranu, a potom imunodetekcija proteina specifičnim primarnim i sekundarnim protutijelima (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Nakon razdvajanja izoliranih proteina adhesoma, proveden je polusuhi prijenos (engl. *semi-dry transfer*) na komercijalnu nitroceluloznu membranu (BioRad, SAD). Gradijentni gel s razdvojenim proteinima potrebno je uroniti u pufer za prijenos proteina tijekom pet minuta. Zatim se gel polaže na membranu i slaže u „sendvič” između filter papira i to tako da je bliže negativno nabijenoj anodi u odnosu na membranu koja je bliže pozitivnoj nabijenoj katodi. Tako složena konstrukcija umetnuta je u uređaj za prijenos proteina (BioRad, SAD). Prijenos traje 10 minuta pri 1.3 A i 25 V. Uspješnost prijenosa proteina na membranu određen je bojanjem membrane amido crnom bojom u tri koraka. Nakon vizualizacije proteina uklanja se amido crna boja, otopinom za odbojavanje, a membrana se blokira 5 %-tnom otopinom mlijeka u prahu kroz sat vremena na zibalici. Blokiranje je nužan korak da bi se izbjeglo nespecifično vezanje proteina na membranu. Potom se na membranu dodaje otopina primarnog protutijela, a vezanje se provodi tijekom noći pri 4 °C ili dva sata pri sobnoj temperaturi. Membrana se nakon vezanja ispiri i dodaje se otopina odgovarajućeg sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom hrena. Vezanje sekundarnog protutijela vizualizirano je metodom kemiluminiscencije uz pomoć kemiluminiscentnog reagensa prema uputama proizvođača i uređaja Uvitec (Cambridge, UK). Na istoj membrani moguće je napraviti imunodetekciju više različitih proteina s tim da se prije ponovnog korištenja membrane uklone vezana protutijela pomoću glicinskog pufera („stripping” pufera), a sljedeća imunodetekcija započinje ponovnim blokiranjem membrane.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Svrha provedenog istraživanja je odrediti ulogu proteina uključenih u adheziju u otpornosti stanica karcinoma prostate na ionizirajuće zračenje. Radioterapija je učestala i izuzetno uspješna terapija za liječenje većine muškaraca oboljelih od karcinoma prostate (Peitzsch i sur., 2016). Razvitak otpornosti stanica karcinoma na zračenje jedna od najvećih prepreka uspješne terapije kao i jedan od razloga ponovne pojave karcinoma (Sefiert i sur., 2019, Cojoc i sur., 2015). Jedan od mogućih, ali slabo istraženih, mehanizama kako stanice tumora prostate mogu steći otpornost na zračenje su promjene u proteinima uključenim u adheziju stanica. Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Instituta Ruđer Bošković, gdje je provedeno ovo istraživanje, dugi niz godina proučava signalne puteve potaknute integrinima u odgovoru tumorskih stanica na protutumorske lijekove i metastaziranje (Ambriović-Ristov i sur., 2004; Brozović i sur., 2008; Stojanović i sur., 2016; 2018), a istraživanja su odnedavno proširena i na analizu sastava adhesoma (Paradžik i sur., 2020). Pregledom literature ustanovljeno je da do sada ni jedna grupa znanstvenika nije proučavala razlike u adhesomu stanica karcinoma prostate i od njih dobivene sublinije otporne na zračenje. U suradnji s prof. dr. sc. Annom Dubrovskom koja je razvila model stanica karcinoma prostate DU145 i otporne sublinije DU145 RR, odlučili smo provesti izolaciju i analizu adhesoma.

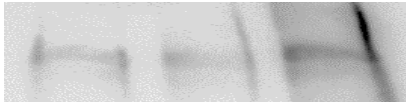
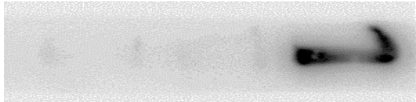

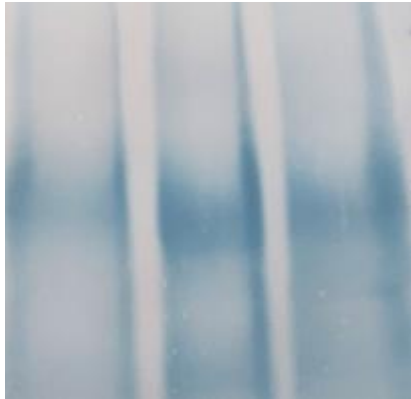
Do sada je većina podataka o sastavu adhesoma dobivena iz staničnih kultura uzgajanih na fibronektinu. Poznato je da se stanice na fibronektin vežu preferencijalno integrinima  $\alpha\beta3$  i  $\alpha5\beta1$  te stoga ovi podaci odgovaraju adhesomima spomenutih integrina (Winograd-Katz i sur., 2014, Horton i sur., 2015). Nedostatak ovog pristupa je unaprijed određen sastav izvanstaničnog matriksa i samim time mogućnost istraživanja isključivo adhesoma fibronektinskih receptora  $\alpha\beta3$  i  $\alpha5\beta1$ . Drugi mogući način je istraživanje adhesoma stanica nakon dužeg (48 sati) uzgoja u kulturi gdje stanice same izlučuju komponente izvanstaničnog matriksa i na njih se vežu raspoloživim heterodimerima integrina na površini stanica. Ovo je pristup koji, po našim saznanjima, nije opisan u literaturi sve do rada Lock i sur. (2018), iako se u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala ovaj pristup počeo koristiti i prije objave spomenutog rada, a prvi rezultati ovako analiziranog adhesoma su nedavno objavljeni (Paradžik i sur., 2020). Prednosti ovakvog pristupa su mogućnost analize matrisoma, odnosno sastavnica izvanstaničnog matriksa kojeg je stanica izlučila te mogućnost analize adhesoma onih integrina kojima se stanica preferencijalno veže

u ovim uvjetima. Korištenjem spomenute metode pokazano je da se stanice melanoma (Paradžik i sur. 2020) i osteosarkoma (Lock i sur. 2018) u dugotrajnoj kulturi preferencijalno vežu integrinom  $\alpha\beta5$  dok je količina integrinskih podjedinica  $\alpha5$ ,  $\beta3$  i  $\beta1$ , u uzorku adhesoma, niska. U radu Paradžik i sur. (2020) otkriveno je više proteina izvanstaničnog matriksa koje su stanice izlučile kao što su vitronektin, fibronektin, tenascin, trombospondin, periostin i drugi. Kako je cilj ovog rada provesti usporedbu DU145 i DU145 RR staničnih linija karcinoma s ciljem detekcije onih proteina adhesoma koji bi potencijalno doprinijeli razvitku i održavanju otpornog fenotipa DU145 RR stanica, smatramo da je ova metoda izvrstan izbor.





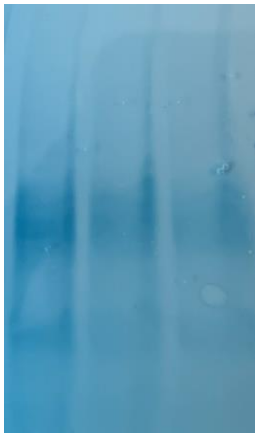

Istraživanje je započeto određivanjem optimalne koncentracije stanica koju je potrebno nasaditi u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm da bi nakon 48 sati uzgoja imali željenu popunjenost površine na kojoj stanice rastu za izolaciju IAC-a (80 – 90 %). Treba uzeti u obzir da svaka stanična linija ima svojstvene karakteristike rasta stoga optimalna početna koncentracija stanica u Petrijevoj zdjelici ovisi o vrsti stanica, brzini prihvaćanja za podlogu kao i brzini diobe koja u prosjeku iznosi 24 sata (Alberts i sur., 2002). Korištena stanična linija karcinoma prostate čovjeka DU145 uspostavljena je 1976. godine izolacijom lezije metastatskog karcinoma prostate iz mozga muškarca bijele rase nakon smrti u dobi od 69 godina. DU145 su epitelne, adherentne stanice te su pogodne za uzgoj u Petrijevim zdjelicama kao i u suspenzijskoj kulturi na mekom agaru, a prosječno vrijeme udvostručavanja broja DU145 stanica tijekom uzgoja u Petrijevoj zdjelici iznosi 34 sata (Stone i sur., 1978). Usporedbom nekoliko koncentracija, određena je optimalna početna koncentracija od  $1,3 \times 10^6$  stanica po Petrijevkici za obje stanične linije. Nakon 48 sati uzgoja prosječan broj stanica iznosio je oko  $3 \times 10^6$  stanica po Petrijevkici, a nisu zamijećene bitne razlike u brzini rasta između DU145 i DU145 RR stanične linije.

Sljedeći korak za uspješnu izolaciju IAC-a i analizu adhesoma je određivanje optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om pomoću metode western blot. Da bi izolacija izrazito dinamične strukture IAC-a iz 2D kulture stanica bila što uspješnija potrebno je provesti njenu stabilizaciju, primjerice kemijskim umreživačem. Do sada su u literaturi opisani različiti protokoli za izolaciju IAC-a bez korištenja umreživača, čime se izolacija otežava, a količina proteina koje ne očekujemo u adhesomu je povećana. Primjerice, Todorović i sur. (2010) predstavili su metodu izolacije proteina uključenih u staničnu adheziju iz 2D kulture stanica keratinocita PG i stanica karcinoma jezika UM-SCC-1 i CAL33, uzgajanih na fibronektinu, gdje su pomoću amonijevog hidroksida ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) i

višestrukog ispiranja vodom uklonjeni stanični organeli i proteini citosola, a zadržani su proteini staničnih adhezija. Metoda zahtijeva probir proteina od interesa u posebno razvijenim epruvetama s ciljem odvajanja proteina staničnih adhezija od ostalih proteina. Izdvojeni i denaturirani proteini dalje su proučavani tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom, a ovim protokolom identificirano je, ovisno o staničnoj liniji, od 111 do 165 proteina povezanih sa staničnim adhezijama na izvanstanični matriks, ali i adhezijama s drugim stanicama. Ubrzo nakon njih Kuo i sur. (2011) predstavili su metodu izolacije IAC-a iz stanica fibroblasta HFF1 uzgajanih u fibronektinom obloženim Petrijevim zdjelicama. Stanice su prvo lizirane hipotoničnim šokom, a stanični organeli i većina citoskeleta uklonjena je ispiranjem mlazom vode. Metoda je dodatno otežana jer je potrebno ukloniti višak aktina i fibronektina specifičnim protutijelima. Izolirani i denaturirani proteini dalje su analizirani masenom spektrometrijom, a identificirano je 905 proteina FA. Uzimajući u obzir kompleksnost spomenutih metoda, u ovom radu korištena je jednostavnija i preciznija metoda koju su predstavili Jones i sur. (2015). Za razliku od prethodnih, ova se metoda temelji na stabilizaciji IAC-a DTBP-om čime se povećava vjerojatnost izolacije proteina od interesa. Usporedbe radi, koristeći navedenu metodu, Lock i sur., (2018) identificirali su 214, a Paradžik i sur. (2020) 153 proteina adhesoma, a ključan korak za uspješnu izolaciju je određivanje vremena djelovanja DTBP-a. DTBP je kemijski umreživač koji prolazi kroz staničnu membranu živih stanica uzgajanih u 2D kulturi te povezuje proteine u bliskoj interakciji i tako stabilizira strukturu IAC-a. Ograničeno vrijeme djelovanja DTBP-a omogućuje izolaciju proteina adhesoma bez nepoželjnog staničnog materijala što je potrebno za uspješnu analizu izoliranih proteina masenom spektrometrijom (Jones i sur., 2015). Kako bi se utvrdilo optimalno vrijeme umrežavanja, uzorci IAC-a stanica DU145 i DU145 RR izolirani su nakon nekoliko različitih vremena umrežavanja (5, 10, 15 i 20 minuta). Uzorci su analizirani metodom western blot s primarnim protutijelima za odabrane proteine IAC-a, a to su talin 1 i 2,  $\alpha$ -aktinini 1 i 4 i paksilin (Horton i sur, 2015). Iako je fosforilirani paksilin ključna komponenta adhesoma, on se također u nefosforiliranoj formi nalazi u stanici, stoga se nefosforilirani paksilin, kojeg smo odredili, može promatrati kao specifični, ali i nespecifični protein adhesoma (López-Colomé i sur., 2017). Važno je napomenuti da se ovaj dio istraživanja provodio u dva neovisno provedena pokusa, odnosno dvije izolacije IAC-a s različitim uvjetima uzgoja stanica, što će i biti prikazano na slici 7 i 8. U konačnici, usporedbom svih vremena umrežavanja (5, 10, 15, 20 minuta), izabrano je optimalno vrijeme umrežavanja od 10 minuta za obje stanične linije.

Protein/kDA		Izolirani proteini IAC-a		
		Vrijeme umrežavanja DTPB-om/min		
		0	10	20
Specifični proteini IAC-a	Talin 1, 2 /271			
	$\alpha$ -aktinin 1, 4/100			
	Paksilin/68			
Membrana obojena amido crnom bojom				

**Slika 7. SDS-PAGE i western blot analiza izdvojenih proteina IAC-a u stanicama DU145 za potvrdu uspješne izolacije i odabir optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om.** Izolirani IAC-i nakon tri različita vremena umrežavanja DTBP-om razdvojeni su pomoću SDS-PAGE, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je zatim obojana amido crnom bojom kako bi se provjerila uspješnost prijenosa i kako bi se provjerila relativna količina materijala nanesenog na gel. Membrana je inkubirana s primarnim protutijelima specifičnim za talin 1, 2,  $\alpha$ -aktinin 1, 4 i paksilin te nakon toga sekundarnim protutijelima obilježenim enzimom peroksidazom iz hrena. Signal je razvijen kemiluminiscentnim reagensom i očitao na uređaju Uvitec Alliance Q9 mini. Uzorci IAC-a prikupljeni su iz tri Petrijeve zdjelice promjera 10 cm za svaku vremensku skupinu nakon 48 sati uzgoja, a broj nasadenih stanica iznosio je  $2 \times 10^6$  po Petrijevoj zdjelici.

Protein/kDA		Izolirani proteini IAC-a					
		Stanične linije					
		DU145			DU145 RR		
		Vrijeme umrežavanja DTPB-om/min					
		5	10	15	5	10	15
Specifični proteini IAC-a	Talin 1, 2 /271						
	$\alpha$ -aktinin 1, 4/100						
Membrana obojena amido crnom bojom							

**Slika 8. SDS-PAGE i western blot analiza izdvojenih proteina IAC-a u stanicama DU145 i DU145 RR za odabir optimalnog vremena umrežavanja DTBP-om.** Izolirani IAC-i nakon tri različita vremena 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. Membrana je inkubirana s primarnim protutijelima specifičnim za talin 1, 2 i  $\alpha$ -aktinin 1, 4 te nakon toga sekundarnim protututijelima obilježenim enzimom peroksidazom iz hrena. Signal je razvijen kemiluminiscentnim reagensom i očitana na uređaju Uvitec Alliance Q9 mini. Uzorci IAC-a



prikupljeni su iz četiri Petrijeve zdjelice za svaku vremensku skupinu nakon 48 sati uzgoja, a broj nasađenih stanica iznosio je  $1,3 \times 10^6$  po zdjelici.

Uvidom u sliku 7 vidljivi su rezultati izolacije IAC-a iz DU145 stanične linije nakon 0, 10 i 20 minuta djelovanja DTBP-a. Talini 1, 2,  $\alpha$ -aktinin 1 i 4 i paksilin ključni su proteini konsenzus adhesoma i očekujemo ih u uzorcima izoliranih IAC-a (Horton i sur., 2015). Usporedbom dobivenih kemiluminiscentnih signala nakon inkubacije membrane s odgovarajućih primarnih i sekundarnim protutijelima pokazano je da u uzorcima IAC-a koji su izolirani nakon 20 minuta djelovanja DTBP signal talina i  $\alpha$ -aktinina znatno jači nego u uzorcima gdje nije bilo DTBP i onoga u kojem je DTBP djelovao 10 minuta. Proteine adhesoma je moguće izolirati i bez umrežavanja, baš kao što je to vidljivo za uzorak bez dodanog DTBP, ali je jasno da umrežavanje obogaćuje uzorak specifičnim proteinima adhesoma (20 minuta umrežavanja). Primijećeni signal bez umrežavanja uputio nas je na potrebu jačeg ispiranja uzorka nakon lize stanica. Razlika između intenziteta proteina u uzorku nakon 10 i 20 minuta umrežavanja je velika te je na temelju dobivenih rezultata, s ciljem da se poveća količina specifičnih proteina, a da se pritom izolira što manje nespecifičnih proteina, odlučeno da se analiziraju uzorci u manjim vremenskim intervalima tj. nakon umrežavanja 5, 10 i 15 minuta (Slika 8). Iako nisu određivani proteini koje ne očekujemo u izoliranim uzorcima IAC-a, pretpostavljeno je da bi nakon 20 minuta umrežavanja oni zasigurno bili prisutni i na taj bi način otežali daljnju analizu masenom spektrometrijom.

Uvidom u sliku 8 vidljivi su rezultati izolacije IAC-a iz DU145 i DU145 RR stanične linije nakon 5, 10 i 15 minuta djelovanja DTPB-a. U ovom slučaju provjerena je prisutnost talina 1, 2 i  $\alpha$ -aktinina 1,4. Kratko vrijeme umrežavanja od 5 minuta, zajedno s boljim ispiranjem uzorka rezultiralo je vrlo slabim ili odsutnim signalom za ove proteine u obje stanične linije. Osim toga, analizom tri vremena vidi se kako se količina talina 1, 2 i  $\alpha$ -aktinina 1,4 povećava s vremenom umrežavanja, a da je pri tom ukupna količina proteina nanesenih na gel slična što upućuje da umrežavanje obogaćuje uzorak proteinima IAC. Tijekom interpretacije ovih rezultata treba uzeti u obzir da je prvo korišteno protutijelo specifično za talin 1 i 2, a drugo protutijelo za  $\alpha$ -aktinin 1 i 4, čime se ne može odrediti dolazili li do povećane ekspresije jedne ili obje izoforme proteina. Kao što je već rečeno, talini i  $\alpha$ -aktinini izgrađuju IAC-a, a već je otprije zabilježena njihova uloga u procesu razvoja i progresije karcinoma prostate stoga su oni vrlo dobar odabir i za usporedbu

korištenih staničnih linija. Prekomjerna ekspresija adaptornog proteina talina 1 zabilježena je u DU145 stanicama u usporedbi sa zdravim stanicama prostate, a doprinosi adheziji, migraciji i invaziji stanica karcinoma prostate (Sakamoto i sur., 2010). S druge strane, u nekoliko staničnih linija karcinoma prostate, u odnosu na zdrave epitelne stanice prostate, zabilježena je smanjena ekspresija  $\alpha$ -aktinina 4, a pokazano je da promjena u njegovoj koncentraciji u stanici utječe na ekspresiju različitih membranskih receptora i u konačnici doprinosi razvoju karcinoma (Hara i sur., 2007). Rezultati prikazani na slici 8 pokazuju da je količina detektiranih proteina adhesoma nakon 10 i 15 minuta djelovanja DTBP-a kod DU145 RR stanica jednaka, stoga je odlučeno da će prilikom izolacije IAC-a za kasniju analizu masenom spektrometrijom vrijeme djelovanja umreživača biti 10 minuta. Da bi uistinu bili sigurni u odluku, potrebno je u daljnjem istraživanju napraviti još dodatnih provjera izoliranih IAC proteina i to s protutijelima za proteine koji se ne nalaze u IAC-u, ali su zastupljeni u stanici. U konačnici svaki pojedinačni pokus izolacije IAC i masene spektrometrije potrebno je provesti barem tri puta kako bi se mogla napraviti statistička analiza rezultata i zaključiti o eventualnim razlikama između uspoređivanih uzoraka.

Osim spomenutog, rezultati slike 8 pokazuju i razliku u ekspresiji proteina adhesoma između parentalne stanične linije DU145 i sublinije otporne na zračenje DU145 RR. DU145 RR stanična linija dobivena je izlaganjem roditeljske stanične linije DU145 višestrukom X-zračenju od 4 Gy do ukupne doze od 56 Gy. Preživjele stanice okarakterizirane su kao otporne na zračenje usporedbom sa stanicama DU145 (Cojoc i sur., 2015). Ovaj stanični model korišten je u istraživanju Seifert i sur. (2019) koji su analizirali razliku u ekspresiji i broju kopija gena između DU145 i DU145 RR stanica. Pokazali su da stanična linija DU145 RR pokazuje značajne promjene u broju kopija gena u usporedbi sa staničnom linijom DU145. Od ukupno 24 625 gena u genomu, kod DU 145 RR, 6 109 gena (24,8 %) ima smanjen broj kopija, a 9 498 gena (38,6 %) ima povećan broj kopija. Osim promjene broja kopija gena, ekspresija 857 gena je smanjena, dok je ekspresija 835 gena povećana kod otpornih stanica DU145 RR. Očekivano, tumor supresorski geni su u DU145 RR staničnoj subliniji slabije eksprimirani, dok su prekomjerno eksprimirani geni povezani s migracijom stanica i komunikacijom među stanicama. Zanimljivo, uspoređujući genske promjene unutar otporne podlinije, samo 7,3 % gena s promijenjenim brojem kopija pokazuje promjenu u ekspresiji. Geni koji su u ovom modelu izdvojeni kao ključni u procesu razvoja otpornosti su tumor supresorski geni (SERPINB, PTRO), geni koji kodiraju za membranske proteine (RHBDL2, FZD7, SEMA5A, IL7R, STAB2, GPR124, NGFR, CAV1), regulatori

transkripcije (ETV7, FOS, ATXN1, LEF1) te geni za transkripcijski faktor SOX17 i neuroendokrini faktor VGF. Ekspresija gena za VGF i SOX17 povezana je s brzinom ponovne tvorbe karcinoma prostate kod pacijenata nakon terapije. Otkriće koje je posebno vezano uz ovaj rad je promjena ekspresije gena koji kodiraju za proteine fokalnih adhezija. Navedeni podatak govori da u stanicama DU145 RR dolazi do povećane ili smanjene ekspresije više desetaka gena uključenih u sintezu proteina fokalnih adhezija, međutim ti geni nisu navedeni u istraživanju. Otkriće se podudara s rezultatima prikazanim na slici 8 gdje pri istim uvjetima uzgoja i izolacije imamo povećanu ekspresiju talina i  $\alpha$ -aktinina kod sublinije otporne na zračenje, stoga možemo pretpostaviti da uistinu dolazi do povećane količine proteina adhesoma kod stanica s otpornim fenotipom. No važno je napomenuti da su Seifert i sur. (2019) promatrali transkriptom stanice, odnosno količinu sintetizirane mRNA molekule, a poznato je da količina mRNA u stanici koja nosi informaciju za određeni protein nije nužno dovoljna kako bi se zaključilo o količini sintetiziranog proteina. Primjerice, u stanicama karcinoma prostate, u odnosu na zdrave stanice prostate, zabilježena je smanjena količina mRNA molekula za integrinske podjedinice  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 6$  i  $\beta 8$ , ali povećana količina samih podjedinica (Arun i sur., 2018). Isto tako, u stanici je funkcija većine proteina adhesoma (FAK-a, Src-a, kindlina, talina itd.) onemogućena sve do trenutka formiranja različitih IAC-a kada se oni vežu na citoplazmatski rep integrina pri čemu se neki fosforiliraju na specifičnim tirozinima (Src i FAK) te posreduju vezanje na citoskelet i okidaju signalne puteve. Tako da je u ovom slučaju proteomika, odnosno spomenute metode analize izoliranih proteina, najbolji način za proučavanje uloge adhesoma u procesu razvitka otpornosti na zračenje. Kao što je već spomenuto, Eke i sur. (2018) zabilježili su razne promjene u ekspresiji integrinskih podjedinica nakon izlaganja DU145 stanica ionizirajućem zračenju. Stoga je za pretpostaviti da ako dolazi do promjene u ekspresiji integrina nakon izlaganja zračenju, posljedično dolazi i do promjene ostalih proteina adhesoma. Samim time može se zaključiti da su spomenuti proteini vjerojatno uključeni i u mehanizam razvoja otpornosti na zračenje ili da promjena njihove ekspresije nakon zračenja stanicama omogućuje bržu i bolju prilagodbu na nove stresne uvjete. Rasvjetljavanje ovih nepoznanica doprinijet će boljem razumijevanju otpornosti stanice na zračenje, a samim time bit će okarakterizirane nove potencijalne molekularne mete u terapiji karcinoma prostate.

Metoda western blot korištena je kako bi se utvrdili optimalni uvjeti za izdvajanje više uzoraka adhesoma no analiza sastava adhesoma staničnih linija DU145 i DU145 RR određuje se metodom masene spektrometrije. Masena spektrometrija analitička je tehnika kojom se

može odrediti sastav proteinske smjese. U tu svrhu proteini u smjesi cijepaju se tripsinom, a zatim se dobiveni peptidi ioniziraju te tako dobiveni ioni razdvajaju se na temelju omjera mase i naboja. Ioni prolaze kroz analizator, potom se detektiraju na masenom detektoru, a dobiveni rezultat je maseni spektar, odnosno prikaz relativnog udjela iona kao funkcije omjera mase i naboja (Han i sur., 2008). Proteini se identificiraju uspoređivanjem eksperimentalno određenih masa peptida s teoretski izračunatim masama pohranjenim u bazama podataka. Cijepanjem proteina specifičnom proteinazom nastaje jedinstveni skup peptida, pa je dovoljno samo nekoliko točno određenih masa peptida za identifikaciju proteina (Galić i Cindrić, 2008). Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, mentorica ovog diplomskog rada, te dr. sc. Ivana Samaržija, voditeljica projekta u sklopu kojeg se ovo istraživanje odvijalo iz Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, Instituta Ruđer Bošković, aktivno surađuju s prof. dr. sc. Martin-om J. Humphries-om i Jonathan-om D. Humphries-om sa Sveučilišta u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Sveučilište u Manchesteru, Ujedinjeno Kraljevstvo). U okviru ove suradnje uzorci se pripremaju u Zagrebu, spektrometrija masa se izrađuje u Manchesteru, a daljnja statistička obrada i validacija opet u Zagrebu. Zbog pandemije COVID-19 uzrokovane virusom SARS-CoV-2 nismo mogli završiti eksperimentalni dio ovog istraživanja jer je i nakon relativne normalizacije života i rada u Hrvatskoj, suradna institucija u Manchesteru još uvijek zatvorena. U protivnom, analiza izoliranih proteina provela bi se na masenom detektoru Orbitrap Elite, a prethodio bi proces ionizacije uzorka metodom elektroraspršenja (engl. *electrospray ionization*, ESI). Dobiveni spektri identificirali bi se pomoću programa Mascot Daemon (Matrix science, inačica 2.5.1) pretragom baze podataka čovjeka Swissprot (inačica 2018\_01). Dopusštena tolerancija mase iznosila bi 0,50 Da za fragmente iona, a 5 ppm za molekulski ion. Identificirani peptidi te broj spektara svakog proteina analizirali bi se i dodatno potvrdili programom Scaffold (Proteome Software). Ovaj program omogućio bi prikaz svih 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. Ovom pouzdanom i preciznom metodom odredio bi se cjelokupan sastav adhesoma kao i potencijalna razlika u količini proteina između parentalne stanične linije i sublinije otporne na zračenje. Validacija dobivenih rezultata provela bi se metodom western blot, gdje bi se provjerila ekspresija identificiranih proteina od interesa te metodom imunofluorescencije uz konfokalnu mikroskopiju, gdje bi se željene komponente IAC-a vizualizirale različitim fluorescentnim bojama. Očekivani rezultat provedenih analiza je značajnija promjena u ekspresiji jednog ili više proteina adhesoma između uspoređivanih

staničnih linija DU145 i DU145 RR. Takav ishod potaknuo bi daljnje istraživanje uloge tih proteina u otpornosti na zračenje, primjerice pratila bi se osjetljivost otporne stanične linije karcinoma na zračenje nakon utišavanja prekomjerno eksprimiranih proteina adhesoma. Pozitivni rezultat ovakvog istraživanja istaknuo bi nove potencijalne mete čija bi se modulacija možda mogla koristiti za kombiniranu terapiju sa zračenjem za poboljšanje ishoda terapije.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Optimalna količina stanica DU145 i DU145 RR koju je potrebno nasaditi u Petrijevu zdjelicu za izolaciju IAC-a, kako bi nakon 48 sati popunjenost bila između 80 i 90 %, iznosi  $1,3 \times 10^6$ .
2. Vrijeme umrežavanja stanica DU145 i DU145 RR kemijskim umreživačem DTBP-om, koje daje optimalnu količinu proteina koje očekujemo u IAC-u, iznosi 10 minuta.
3. Povećana količina adaptornog proteina talina 1 i/ili 2 zabilježena je u staničnoj liniji otpornoj na zračenje DU145 RR u usporedbi s izvornom staničnom linijom DU145.
4. Povećana količina aktin-vezujućih proteina  $\alpha$ -aktinina 1 i/ili 4 zabilježena je u staničnoj liniji otpornoj na zračenje DU145 RR u usporedbi s izvornom staničnom linijom DU145.

## 6. LITERATURA

Afratis, N. A., Nikitovic, D., Mulhaupt, H. A. B., Theocharis, A. D., Couchman, J. R., Karamanos, N. K. (2017) Syndecans – key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J.* **284**, 27-41.

Ahmedah, H. T., Patterson, L. H., Shnyder, S. D., Sheldrake, H. M. (2017) RGD-Binding Integrins in Head and Neck Cancers. *Cancers.* **9**, 56. doi:10.3390/cancers9060056

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2013) *Essential Cell Biology*, 4.izd., Garland Science, New York.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4.izd., Garland Science, New York.

Alva, A., Slovin, S., Daignault, S., Carducci, M., Dipaola, R., Pienta, K., Agus, D., Cooney, K., Chen, A., Smith, D. C., Hussain, M. (2012) Phase II study of cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in patients with non-metastatic castration resistant prostate cancer, NCI-6735. A study by the DOD/PCF prostate cancer clinical trials consortium. *Invest. New Drugs.* **30**, 749-757.

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

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

Anderson, L. R., Owens, T. W., Naylor, M. J. (2014) Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys. Rev.* **6**, 203-213.

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

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

Arun, A. S., Tepper, C. G., & Lam, K. S. (2018) Identification of integrin drug targets for 17 solid tumor types. *Oncotarget.* **9**, 30146-30162.

ATCC (2020) Prostate cancer cell lines. ATCC - American Type Culture Collection, <[https://www.atcc.org/search?geo\\_country=us#q=prostate%20cancer%20cell%20lines&sort=relevancy](https://www.atcc.org/search?geo_country=us#q=prostate%20cancer%20cell%20lines&sort=relevancy)>. Pristupljeno 14. travnja 2020.

Atherton, P., Stutchbury, B., Wang, D. Y., Jethwa, D., Tsang, R., Meiler-Rodriguez, E., Wang, P., Bate, N., Zent, R., Barsukov, I. L., Goult, B. T., Critchley, D. R., Ballestrem, C. (2015) Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat. Commun.* **6**, 10038. doi:10.1038/ncomms10038

Badal, S., Campbell, K. S., Valentine, H., Ragin, C. (2019) The need for cell lines from diverse ethnic backgrounds for prostate cancer research. *Nat. Rev. Urol.* **16**, 691-692.

Barbet, J., Fouquier, A., Yves Thomas, Y. (2020) *Therapeutic Progress in Oncology: Towards a Revolution in Cancer Therapy?*, Wiley, New Jersey.

Bouchet, B. P., Gough, R. E., Ammon, Y. C., van deWillige, D., Post, H., Jacquemet, G. i sur. (2016) Talin-KANK1 interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to focal adhesions. *Elife.* **5**, e18124. doi:10.7554/eLife.18124

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

Burridge, K. (2017) Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J.* **284**, 3355-3361.

Campbell, I. D., Humphries, M. J. (2011) Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004994. doi:10.1101/cshperspect.a004994

Cancer, H.P., Heckmann, B., Feyen, J., Pujuguet, P., Blaque, R. (2011) Targeting of  $\alpha$  v-Integrins in Stem/Progenitor Cells and Supportive Microenvironment Impairs Bone Metastasis in. *Neoplasia.* **13**, 516-525.

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.

Chang, L., Graham, P., Hao, J. et al. (2013) Acquisition of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis.* **4**, e875. doi:10.1038/cddis.2013.407

Chebotarev, 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

Christmann, M., Diesler, K., Majhen, D., Steigerwald, C., Berte, N., Freund, H., Stojanović, N., Kaina, B., Osmak, M., Ambriović-Ristov, A., Tomicic, M. T. (2017) Integrin



$\alpha$ V $\beta$ 3 silencing sensitizes malignant glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair. *Oncotarget*. **8**, 27754-27771.

Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Trautmann, F., Kunz-Schughart, L. A., Telegeev, G. D., i sur. (2015) Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by b-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res*. **75**, 1482-1494.

Cordes, N., van Beuningen, D. (2003) Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving integrin-linked kinase (ILK) and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) in vitro. *Br. J. Cancer*. **88**, 1470-1479.

de la Puente, P., Weisberg, E., Muz, B., Nonami, A., Luderer, M., Stone, R.M., Melo, J. V, Griffin, J.D., and Azab, A.K. (2015) Identification of ILK as a novel therapeutic target for acute and chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res*. **39**, 1299-1308.

Dickreuter, E., Cordes, N. (2017) The cancer cell adhesion resistome: Mechanisms, targeting and translational approaches. *Biol. Chem*. **398**, 21-35.

Đorđević, G., Štifter, S., Štemberger, C. (2017) Patohistološka dijagnostika karcinoma prostate. *Med. Flum*. **53**, 252-263.

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

Eke, I., Deuse, Y., Hehlhans, S., Gurtner, K., Krause, M., Baumann, M. Sandfort, V., Cordes, N. (2012) Head and neck cancer resistance to radiotherapy  $\beta$ 1 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. i sur. (2010.) PINCH1 regulates Akt1 activation and enhances radioresistance by inhibiting PP1alpha. *J. Clin. Invest*. **120**, 2516-2527.

Eke, I., Makinde, A. Y., Aryankalayil, M. J., Sandfort, V., Palayoor, S. T., Rath, B. H., i sur. (2018) Long-term Tumor Adaptation after Radiotherapy: Therapeutic Implications for Targeting Integrins in Prostate.Cancer. *Mol. Cancer Res*. **16**, 1855-1864.

Evans, A. J. (2018). Treatment effects in prostate cancer. *Mod. Pathol.*, **31**, 110-121.

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

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.

Figel, S., Gelman, I. H. (2011) Focal Adhesion Kinase Controls Prostate Cancer Progression Via Intrinsic Kinase and Scaffolding Functions. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **11**, 607-616.

Galić, N., Cindrić, M. (2008). Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kemija u industriji*, **57**, 231-243.

Geiger, B., Yamada, K. M. (2011) Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005033. doi:10.1101/cshperspect.a005033

Gruber, G., Hess, J., Stiefel, C., Aebersold, D. M., Zimmer, Y., Greiner, R.H., Studer, U., Altermatt, H. J., Hlushchuk, R., Djonov, V. (2005) Correlation between the tumoral expression of  $\beta$ 3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy. *Br. J. Cancer*. **92**, 41-46.

Haeger, A., Alexander, S., Vullings, M., Kaiser, F. M. P., Veelken, C., Flucke, U. i sur. (2020) Collective cancer invasion forms an integrin-dependent radioresistant niche. *J. Exp. Med.* **217**, e20181184. doi:10.1084/jem.20181184

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**, 646-674.

Han, X., Aslanian, A., Yates, J. R. 3rd. (2008) Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. **12**, 483-490.

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.

Harburger, D. S., Calderwood, D. A. (2009) Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 159-163.

Harryman, W. L., Hinton, J. P., Rubenstein, C. P., Singh, P., Nagle, R. B., Parker, S. J., Knudsen, B. S., Cress, A. E. (2016) The Cohesive Metastasis Phenotype in Human Prostate Cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. **1866**, 221-231.

Hausmann, C., Temme, A., Cordes, N., Eke, I. (2015) ILKAP, ILK and PINCH1 control cell survival of p53-wildtype glioblastoma cells after irradiation. *Oncotarget*. **6**, 34592-34605.

Hirata, E., Girotti, M. R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., Sahai, E. (2015) Intravital imaging reveals how BRAF inhibition

generates drug-tolerant microenvironments with high integrin  $\beta 1$ /FAK Signaling. *Cancer Cell*. **27**, 574-588.

Hoffmann, A., Lannert, H., Brischwein, K., Pipp, F. C., Reindl, J., Groll, K., Zuehlsdorf, M., Pfaff, O., Raab, S., Dau, U., Destenaves, B. (2019) Anti-alpha-v integrin antibody for the treatment of prostate cancer. US Patent 2019/0263913 A1.

Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Fremillon, 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.

Hosotani, R., Kawaguchi, M., Masui, T., Koshiba, T., Ida, J., Fujimoto, K., Wada, M., Doi, R., Imamura, M. (2002) Expression of Integrin  $\alpha V\beta 3$  in Pancreatic Carcinoma: Relation to MMP-2 Activation and Lymph Node Metastasis. *Pancreas*. **25**, 30-35.

Humphries, J. D., Byron, A., Bass, M. D., Craig, S. E., Pinney, J. W., Knight, D., Humphries, M. J. (2009) Proteomic analysis of integrin-associated complexes identifies RCC2 as a dual regulator of Rac1 and Arf6. *Sci. Signal.* **2**, ra51.

Humphries, J. D., Chastney, M., Askari, J., Humphries, M. J. (2019) Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Bio.* **56**, 14-21.

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, M. 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.

Hynes, R. O., Naba, A. (2012) Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a004903–a004903. doi:10.1101/cshperspect.a004903

Jones, M. C., Humphries, J. D., Byron, A., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Paul, N. R., Ng, D. H. J., Askari, J. A., Humphries, M. J. (2015). Isolation of integrin-based adhesion complexes. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **66**, 9.8.1-9.8.15.

Juan-Rivera, M.C., Martínez-Ferrer, M. (2018) Integrin Inhibitors in Prostate Cancer. *Cancers* **10**, 44. doi:10.3390/cancers10020044

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. 3-19.

Kotb, A., Hyndman, M. E., Patel, T. R. (2018) The role of zyxin in regulation of malignancies. *Heliyon*. **4**, e00695. doi:10.1016/j.heliyon.2018. e00695

Krušlin, B., Tomas, D. (2010) Patologija raka prostate, U: RAK PROSTATE-najvarijabilniji zloćudni tumor, (Šamija, M., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 41-52.

Kuo, J., Han, X., Hsiao, C., Yates, J. R. 3<sup>rd</sup>, 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.

Landowski, T. H., Gard, J., Pond, E., Pond, G. D., Nagle, R. B., Geffre, C.P., Cress, A. E. Targeting integrin  $\alpha 6$  stimulates curative-type bone metastasis lesions in a xenograft model. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 1558-1566.

Lee, Y. C., Jin, J. K., Cheng, C. J., Huang, C. F., Song, J. H., Huang, M., Brown, W.S. i sur. (2013) Targeting Constitutively Activated  $\beta 1$  Integrin Inhibits Prostate Cancer Metastasis. *Mol. Cancer Res.* **11**, 405-418.

Legerstee, K., Geverts, B., Slotman, J.A., Houtsmuller, A. B. (2019) Dynamics and distribution of paxillin, vinculin, zyxin and VASP depend on focal adhesion location and orientation. *Sci. Rep.* **9**, 10460. doi:10.1038/s41598-019-46905-2

Levanat, S., Levačić-Cvok, M. (2010) Stanična i molekularna biologija raka prostate, U: RAK PROSTATE-najvarijabilniji zloćudni tumor, (Šamija, M., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 53-65.

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. doi:10.1038/s41598-018-23847-9

Lindauer M., Hochhaus A. (2018) Dasatinib. U: Small Molecules in Hematology (Martens, U., ured.), 3. izd, Springer, Cham, str. 29-68.

Lock, J. G., Jones, M. C., Askari, J. A., Gong, X., Oddone, A., Olofsson, H., Göransson, S., Lakadamyali, M., Humphries, M. J., Strömblad, S. (2018) Reticular adhesions are a distinct class of cell-matrix adhesions that mediate attachment during mitosis. *Nat. 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. doi:10.1186/s13045-017-0418-y

Malric, L., Monferran, S., Delmas, C., Arnauduc, F., Dahan, P., Boyrie, S. i sur. (2019) Inhibiting Integrin  $\beta 8$  to Differentiate and Radiosensitize Glioblastoma-Initiating Cells. *Mol. Cancer Res.* **17**, 384-397.

Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F., Kessler, H. (2010) Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **10**, 753-768.

Mateo, J., Boysen, G., Barbieri, C. E., Bryant, H. E., Castro, E., Nelson, P. S., Olmos, D., Pritchard, C. C., Rubin, M. A., de Bono, J. S. (2017) DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. *Eur. Urol.* **71**, 417-421.

Mattila, E., Pellinen, T., Nevo, J., Vuoriluoto, K., Arjonen, A., Ivaska, J. (2005) Negative regulation of EGFR signalling through integrin- $\alpha 1\beta 1$ -mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat. Cell Biol.* **7**, 78-85.

McCabe, N., De, S., VasANJI, A., Brainard, J., Byzova, T. V. (2007) Prostate cancer specific integrin  $\alpha \beta 3$  modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene.* **26**, 6238-6243.

Mecham, R. O. (2012) Overview of extracellular matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **57**, 10.1.1-10.1.16.

Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S., Jonczyk, A., Marshall, J. F., Reyes, G., Piulats, J. (2000) In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of  $\alpha v$  integrins. *Int. J. Cancer.* **87**, 716-723.

Murphy, D. A., Courtneidge, S. A. (2011) The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 413-426.

Myllymäki, S. M., Kämäräinen, U. R., Liu, X., Cruz, S.P., Miettinen, S., Vuorela, M., Varjosalo, M., Manninen, A. (2019) Assembly of the  $\beta 4$ -Integrin Interactome Based on Proximal Biotinylation in the Presence and Absence of Heterodimerization. *Mol. Cell Proteomics.* **18**, 277-293.

Nevedomskaya, E., Baumgart, S. J., Haendler, B. (2018) Recent advances in prostate cancer treatment and drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(5), 1359. doi:10.3390/ijms19051359

Ng, D. H. J., Humphries, J. D., Byron, A., Millon-Frémillon, A., Humphries, M. J. (2014) Microtubule-Dependent Modulation of Adhesion Complex Composition. *PLoS ONE.* **9**, e115213. doi:10.1371/journal.pone.0115213

NIH (2020) Prostate cancer. NIH - U.S. National Library of Medicine, Genetics Home Reference, <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/prostate-cancer>>. Pristupljeno 18. travnja 2020.

Palacios, D. A., Miyake, M., Rosser, C. J. (2013) Radiosensitization in prostate cancer: mechanisms and targets. *BMC Urol.* **13**, 4. doi:10.1186/1471-2490-13-4

Paradžik, M., Humphries, J. D., Stojanović, N., Nestić, D., Majhen, D., Dekanić, A., Samaržija, I., Sedda, D., Weber, I., Humphries, M. J., 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 Dev. Biol.* **8**, 125. doi:10.3389/fcell.2020.00125

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

Plow, E. F., Das, M., Bialkowska, K., Sossey-Alaoui, K. (2016) Of Kindlins and Cancer. *Discoveries (Craiova)*, **4**, e59. doi:10.15190/d.2016.6

Qualls, J. E., Murray, P. J. (2010) A double agent in cancer: Stopping macrophages wounds tumors. *Nat. Med.* **16**, 863-864.

Raab-Westphal, S., Marshall, J. F., Goodman, S. L. (2017) Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers. *Cancers.* **9**, 110. doi:10.3390/cancers9090110

Reed, N. I., Jo, H., Chen, C., Tsujino, K., Arnold, T. D., DeGrado, W. F., Sheppard, D. (2015) The alphavbeta1 integrin plays a critical in vivo role in tissue fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **7**, 288ra279.

Robertson, J., Jacquemet, G., Byron, A. Jones, M. C., Warwood, S., Selley, J. N., Knight, D., Humphries, J. D., Humphries, M. J. (2015) Defining the phospho-adesome through the phosphoproteomic analysis of integrin signalling. *Nat. Commun.* **6**, 6265. doi: 10.1038/ncomms7265

Ružić, B., Knežević, M. (2015) Karcinom prostate. *Medicus.* **24**, 45-50.

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. O., Dhir, R., Kyprianou, N. (2010) Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. *Cancer Res.* **70**, 1885-1895.

Sawada, K., Mitra, A.K., Radjabi, A.R., Bhaskar, V., Kistner, E.O., Tretiakova, M. i sur. (2008) Loss of e-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* **68**, 2329-2339.

Seifert, M., Peitzsch, C., Gorodetska, I., Börner, 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**, e1007460. doi:10.1371/journal.pcbi.1007460

Sjöblom, B., Salmazo, A. Djinović-Carugo, K. (2008)  $\alpha$ -Actinin structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2688. doi: 10.1007/s00018-008-8080-8

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.

Stojanović, N., Dekanić, A., Paradžik, M., Majhen, D., Ferenčak, K., Ruščić, J., Bardak, I. 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.

Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H., Paulson, D. F. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer.* **21**, 274-281.

Storch, K., Cordes, N. (2012) Focal Adhesion-Chromatin Linkage Controls Tumor Cell Resistance to Radio- and Chemotherapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 319287. doi:10.1155/2012/319287

Storch, K., Sagerer, A., Cordes, N. (2015) Cytotoxic and radiosensitizing effects of FAK targeting in human glioblastoma cells in vitro. *Oncol. Rep.*, **33**, 2009-2016.

Struna (2020) Adenokarcinom, Struna - Hrvatsko strukovno nazivlje. <<http://struna.ihjj.hr/naziv/adenokarcinom/16888/#naziv>> Pristupljeno 30. ožujka 2020.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K. i sur. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987-996.

Sun, Z., Costell, M., & Fässler, R. (2019). Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat. Cell Biol.* **21**, 25-31.

Šamija, M. (2010) RAK PROSTATE-najvarijabilniji zloćudni tumor, Medicinska naklada, Zagreb.

Tai, Y., Chen, L., Shen, T. (2015) Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1-13.

Testa, U., Castelli, G., Pelosi, E. (2019) Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines.* **6**, 82. doi:10.3390/medicines6030082

Todorović, V., Desai, B. V., Eigenheer, R. A., Amargo, E. V., Mrksich, M., Green, K. J., Schroeder Patterson, M. J. (2010) Detection of differentially expressed basal cell proteins by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.* **9**, 351-361.

Truong, H. H., Xiong, J., Ghotra V. P., Nirmala, E., Haazen, L., Le Dévédec, S. E. i sur. (2014)  $\beta 1$  integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGF $\beta$ -miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer. *Sci. Signal.* **7**, ra15.

Van Aarsen, L. A., Leone, D. R., Ho, S., Dolinski, B. M., McCoon, P. E., LePage, D. J. i sur. (2008) Antibody-mediated blockade of integrin  $\alpha v \beta 6$  inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor-beta-regulated mechanism. *Cancer Res.* **68**, 561-570.

Walko, G., Castañón, M. J., Wiche, G. (2015) Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* **360**, 363-378.

Wang, T., Huang, J., Vue, M., Alavian, M. R., Lal Goel, H., Altieri, D. C., Languino, L. R., FitzGerald, T. J. (2019)  $\alpha v \beta 3$  Integrin Mediates Radioresistance of Prostate Cancer Cells through Regulation of Survivin. *Mol. Cancer Res.* **17**, 398-408.

Wickström, S. A., Lange, A., Montanez, E., Fässler, R. (2010) The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase!. *EMBO J.* **29**, 281-291.

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.

Yoshimura, K., Meckel, K. F., Laird, L. S., Chia, C. Y., Park, J. J., Olino, K. L. i sur. (2009) Integrin  $\alpha 2 \beta 1$  mediates selective metastasis to the liver. *Cancer Res.* **69**, 7320-7328.

Yue, B. (2014) Biology of the extracellular matrix: An overview. *J. Glaucoma.* **28**, 20-23.

Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., Geiger, B. (2007) A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **120**, 137-148.

Zhao, L., Lu, X., Cao, Y. (2013) MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response, *Cell Signal.*, **25**, 1625-1634.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

H. Tomić

Ime i prezime studenta