

# Uloga proteina Kank1 i Kank2 u osjetljivosti stanica melanoma RPMI-7951 na paklitaksel

---

Acman, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:082828>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2021.

Marta Acman

1313/MB

**ULOGA PROTEINA KANK1 I  
KANK2 U OSJETLJIVOSTI  
STANICA MELANOMA RPMI-7951  
NA PAKLITAKSEL**

Rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Integrin  $\alpha V\beta 5$ -povezane fokalne i retikularne adhezije u melanomu“ (IP-2019-04-1577) i uz pomoć dr. sc. Ivane Samaržije, poslijedoktorandice u istom laboratoriju.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### ULOGA PROTEINA KANK1 I KANK2 U OSJETLJIVOSTI STANICA MELANOMA RPMI-7951 NA PAKLITAKSEL

*Marta Acman, 1313/MB*

**Sažetak:** *Integrini, receptori za izvanstanični matriks, tvore multimolekularne komplekse koji povezuju izvanstanični matriks i aktinski citoskelet te koji se posredstvom Kank proteina povezuju s mikrotubulima. Integrini  $\alpha V$ , posebice  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$ , uključeni su u rast tumora, angiogenezu i metastaziranje i oba su povezana sa lošim prognozama u melanomu. Naša dosadašnja istraživanja su pokazala da utišavanje integrina  $\alpha V$  povećava osjetljivost stanica melanoma, MDA-MB-435S i RPMI-7951, na protutumorski lijek paklitaksel koji djeluje putem mikrotubula. Analizom adhesoma otkriveno je da ove stanice preferencijalno koriste integrin  $\alpha V\beta 5$  te je, uz brojne druge proteine, otkrivena prisutnost proteina Kank1 i Kank2 u MDA-MB-435S odnosno Kank2 u RPMI-7951 adhesomu. Utišavanje Kank2 u stanicama MDA-MB-435S imitira učinak utišavanja integrina  $\alpha V$  i povećava osjetljivost na paklitaksel. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu proteina Kank1 i 2 u osjetljivosti stanica RPMI-7951 na paklitaksel. Pokazano je da stanice RPMI-7951 eksprimiraju oba Kank proteina te da utišavanje Kank1 i/ili 2 nema ulogu u osjetljivosti stanica RPMI-7951 na paklitaksel ukazujući na različite mehanizme povećanja osjetljivosti nakon utišavanja integrina  $\alpha V$  u stanicama melanoma.*

**Ključne riječi:** *melanom, adhesom, integrin  $\alpha V$ , paklitaksel, Kank proteini*

**Rad sadrži:** 50 stranica, 8 slika, 12 tablica, 97 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

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

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

**Datum obrane:** 8. ožujka 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

### THE ROLE OF KANK1 AND KANK2 PROTEINS IN SENSITIVITY OF MELANOMA CELLS RPMI-7951 TO PACLITAXEL

*Marta Acman, 1313/MB*

**Abstract:** *Integrins are receptors for extracellular matrix that form multimolecular integrin adhesion complexes thus connecting extracellular matrix and actin cytoskeleton. These integrin adhesion complexes connect with microtubules through Kank proteins.  $\alpha V$  integrins, in particular  $\alpha V\beta 3$  and  $\alpha V\beta 5$ , are known to be involved in tumor growth, angiogenesis and formation of metastases, and have both been associated with poor prognosis in melanoma. Our previous studies have shown that integrin  $\alpha V$  knockdown enhances sensitivity of MDA-MB-435S and RPMI-7951 melanoma cells to antitumor drug paclitaxel. Adhesion analyses have shown that these cell lines preferentially use integrin  $\alpha V\beta 5$  for adhesion. Among others, Kank1 and Kank2 proteins have been identified in MDA-MB-435S and Kank2 in RPMI-7951 integrin adhesion complexes. Knockdown of Kank2 in MDA-MB-435S cells mimics the effect of integrin  $\alpha V$  knockdown and enhances sensitivity to paclitaxel. The goal of this research was to define the role of Kank1 and 2 in sensitivity of RPMI-7951 melanoma cells to paclitaxel. Here, we demonstrate that RPMI-7951 cells express both Kank1 and Kank2 proteins and that knockdown of any or both does not affect the sensitivity of RPMI-7951 to paclitaxel thus pointing to different mechanisms of sensitisation of melanoma cells to paclitaxel upon integrin  $\alpha V$  knockdown.*

**Keywords:** *melanoma, cell adhesion, integrin  $\alpha V$ , paclitaxel, Kank proteins*

**Thesis contains:** 50 pages, 8 figures, 12 tables, 97 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, Associate professor*

**Technical support and assistance:** *Ivana Samaržija, PhD*

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** 8<sup>th</sup> March 2021

<b>Sadržaj</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1. TUMORI	2
2.1.1. Melanom	3
2.1.2. Liječenje melanoma	4
2.2. ADHEZIJA STANICA	7
2.2.1. Adhezija posredovana integrinima	8
2.2.2. Izvanstanični matriks	9
2.2.3. Integrini	10
2.2.4. Adhesom integrina	11
2.2.5. Adhesom integrina kao potencijalna meta u liječenju tumora	13
2.3. OBITELJ PROTEINA KANK	14
2.3.1. Kank proteini povezuju integrine s mikrotubulima	16
2.3.2. Kank proteini kao mete za povećanje osjetljivosti stanica melanoma na paklitaksel	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Stanice melanoma	18
3.1.2. Osnovne kemikalije	18
3.1.3. Otopine	19
3.1.4. Male interferirajuće RNA korištene u pokusima prolazne transfekcije	20
3.1.5. Protutumorski lijek	21
3.1.6. Kompleti kemikalija i standardi	21
3.1.7. Protutijela korištena u metodi western blot	22
3.1.8. Uređaji i laboratorijski pribor	22
3.2. METODE	24
3.2.1. Kultura stanica	24
3.2.2. Utišavanje gena transfekcijom siRNA	24
3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTT testom	25
3.2.4. Tumačenje utjecaja utišavanja integrinske podjedinice $\alpha V$ ili proteina Kank na djelovanje paklitaksela pomoću 2-way ANOVA-e	26
3.2.5. Određivanje ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot	26

3.2.5.1.	<i>Priprema staničnih lizata</i>	26
3.2.5.2.	<i>SDS-PAGE</i>	27
3.2.5.3.	<i>Western blot</i>	27
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>42</b>



# 1. UVOD

Melanom je maligni tumor koji nastaje uslijed nekontrolirane proliferacije melanocita. Iako čini manje od 5 % tumora kože, melanom je najsmrtonosniji tumor kože te uzrokuje čak 90 % smrti povezanih sa tumorom kože. Sklon je metastaziranju, što otežava njegovo liječenje (Matthews i sur., 2017; Srivastava i sur., 2019). Terapija metastatskog melanoma, koji ne odgovara na ciljanu terapiju niti na terapiju onkolitičkim virusom T-VEC, i dalje je moguća jedino klasičnim protutumorskim lijekovima čiji je utjecaj na ukupno preživljenje slab (Mishra i sur., 2018). U otpornosti na protutumorske lijekove mogu posredovati integrini koji sudjeluju i u kontroli mikrookoliša tumora (Samaržija i sur., 2020). Integrini su heterodimeri nekovalentno povezanih  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica i ključni su posrednici u staničnoj adheziji i interakciji s receptorima na membrani drugih stanica ili okolnim izvanstaničnim matriksom (Winograd-Katz i sur., 2014; Anderson i sur., 2014). Imaju bitnu ulogu u migraciji, adheziji, proliferaciji, preživljenju, diferencijaciji, metabolizmu i smještaju stanica te sastavu izvanstaničnog matriksa, ekspresiji gena i provođenju signala (Samaržija i sur., 2020). Integrini  $\alpha V$  uključeni su u staničnu migraciju, rast tumora, angiogenezu i metastaziranje (Desgrosellier i Cheresch, 2010; Seguin i sur., 2015). Osim integrina ulogu u razvoju zloćudnih bolesti pokazuju i drugi proteini adhesoma integrina. Kank proteini (engl. *KN motif and ankyrin repeat domain-containing proteins*) regulatori su dinamike adhezije koordinirajući prijenos sile posredovan integrinima i regrutaciju mikrotubula na integrine (Tadijan i sur., 2021). Stojanović i sur. (2018) pokazali su da utišavanje integrinske podjedinice  $\alpha V$  povećava osjetljivost staničnih linija melanoma, MDA-MB-435S i RPMI-7951, na protutumorski lijek paklitaksel koji djeluje na mikrotubule. Daljnjim istraživanjem Paradžik i sur. (2020) su pokazali da se isti učinak postiže i utišavanjem proteina Kank2 u stanicama melanoma MDA-MB-435S.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi ulogu proteina Kank1 i Kank2 u osjetljivosti stanica melanoma RPMI-7951 na protutumorski lijek paklitaksel. Uloga Kank proteina u osjetljivosti stanica utvrdit će se utišavanjem ekspresije mRNA koje kodiraju za proteine Kank1 i Kank2 te mjerenjem osjetljivost stanica na paklitaksel MTT testom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. TUMORI

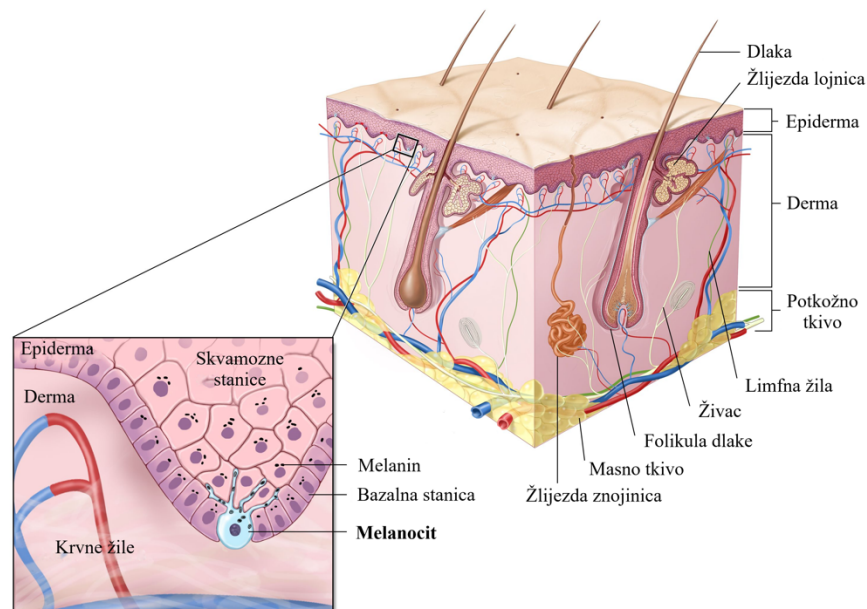
Tumor je abnormalna nakupina tkiva koja je posljedica nekontroliranog rasta stanica uslijed mutacija. Mutacije mogu biti naslijeđene, potaknute okolišnim faktorima ili rezultat pogreške prilikom replikacije DNA. Mutacije mogu biti: zamjena jedne baze drugom (točkaste mutacije); insercije ili delecije malih ili velikih odsječaka DNA; translokacije; povećanje ili smanjenje broja kopija nekog gena (duplikacije i delecije) (Stratton i sur., 2009). Mutacije koje dovode do nekontroliranog rasta stanica uglavnom mijenjaju ekspresiju protoonkogeni, tumor supresorskih gena i gena uključenih u mehanizam popravka DNA. Protoonkogeni su regulatori proliferacije i diferencijacije stanica, njihovom mutacijom, amplifikacijom ili kromosomskom translokacijom nastaju onkogeni koji potiču stanice da rastu i dijele se brže nego uobičajeno. Na primjer, KRAS je gen koji djeluje kao on/off prekidač u kontroli proliferacije stanica, no mutiran dovodi do kontinuirane proliferacije stanice. Tumor supresori utječu na diobu stanica, odnosno koče diobu stanica kada dođe do oštećenja DNA. Uslijed mutacije tumor supresora gubi se inhibicija i stanice se dijele unatoč pogreškama u DNA. Na primjer, mutacija tumor supresora p53 pronađena je u više od 50 % tumora kod čovjeka. Geni uključeni u mehanizam popravka DNA značajno doprinose nastanku tumora. Na primjer nasljedni ne polipozni rak debelog crijeva uzrokovan je mutacijom u jednom od gena za popravak DNA poput MLH1, MLH2 i PMS2 (Shukla i sur., 2019).

Tumore dijelimo na zloćudne (maligne) i dobroćudne (benigne). Zloćudni tumori imaju potencijal širenja, na mjesta udaljena od primarnog tumora, kroz limfne i krvne žile što dovodi do metastaza, odnosno stvaranja sekundarnih tumora.

Razlikujemo više od 100 vrsta tumora. Tumore razlikujemo s obzirom na vrstu stanica iz kojih nastaju, a neki od njih su: karcinom (razvija se iz epitelnih stanica), sarkom (razvija se iz stanica vezivnog tkiva), leukemija (razvija se iz krvotvornih stanica u koštanoj srži), limfom (razvija se u limfocitima), multipli mijelom (razvija se u plazma stanicama), melanom (razvija se iz melanocita) (National Cancer Institute, 2015).

### 2.1.1. Melanom

Melanom je maligni tumor koji nastaje uslijed nekontrolirane proliferacije melanocita uslijed genetičke mutacije. Melanociti su stanice koje proizvode pigment, a nalazimo ih u oku, unutarnjem uhu te bazalnom sloju kože (Matthews i sur., 2017). Melanociti se nalaze u donjem dijelu epiderme (slika 1) te su porijeklom iz neuralnog grebena (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2020). Melanom uzrokuje 90 % smrti povezanih sa tumorom kože, što ga čini najsmrtonosnijim, iako čini manje od 5 % svih tumora kože. Agresivna je vrsta tumora sklona metastaziranju što otežava njegovo liječenje (Matthews i sur., 2017; Srivastava i sur., 2019). Od melanoma najčešće obolijeva starija populacija, no također je i među najučestalijim vrstama tumora kod adolescenata i mladih odraslih (Matthews i sur., 2017; PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2020).



**Slika 1.** Shematski prikaz građe kože i smještaja melanocita. Melanocit je smješten na bazalnoj membrani u donjem dijelu epiderme gornjeg sloja kože. (Prilagođeno prema PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2020).

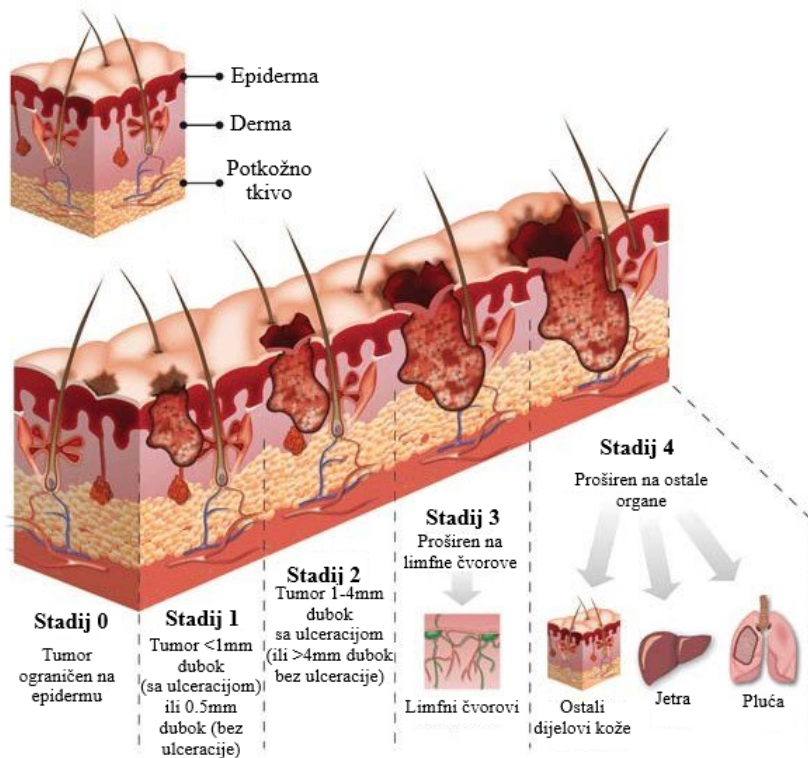
Melanom se može razviti bilo gdje na koži i ne mora se nužno raditi o dijelovima koji su direktno izloženi suncu, no smatra se kako je upravo izlaganje ultraljubičastom zračenju jedan od ključnih faktora za njegov nastanak. Melanom može zahvatiti i oko te ostale mukozne površine uključujući i moždane ovojnice (Srivastava i sur., 2019).

Uvid u genetiku melanoma otkrio je njegovu heterogenost i somatske mutacije u genima BRAF (engl. *V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), NRAS (engl. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*) i KRAS (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) u 43 %, 20 % i 2 % melanoma. Većina metastatskih melanoma ima (V600) mutaciju u genu BRAF čiji genski produkt daje konstitutivno aktivirani BRAF protein, koji potiče prijenos signala nizvodne mitogen-aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) potrebne za proliferaciju, diobu stanice, preživljenje i progresiju melanoma (Kim i Cohen, 2016).

### 2.1.2. Liječenje melanoma

S obzirom na uznapređovalost bolesti razlikuje se nekoliko stadija melanoma (slika 2) (Moqadam i sur., 2018). Početni stadij melanoma je tumor ograničen samo na epidermu. Prvi stadij je tumor dubok <1 mm sa ili bez ulceracija, te ovisno o postojanju ulceracija razlikujemo podskupinu A i B. Drugi stadij je tumor dubok 1-4 mm sa ulceracijom ili >4 mm dubok bez ulceracija, a ovisno o dubini tumora i postojanju ulceracija razlikujemo 3 podskupine. U treći stadij ubrajaju se melanomi koji su se proširili na limfne čvorove, a ovisno o postojanju ulceracija i proširenosti na limfne čvorove razlikujemo 3 podskupine. U četvrti stadij melanoma ubrajaju se melanomi koji su metastazirali u druge organe (Moqadam i sur., 2018; Thompson i sur., 2005).

Ukoliko se otkrije u ranoj fazi melanom se može uspješno izliječiti kirurškim postupkom no ukoliko je otkriven u uznapređovaloj fazi prognoze izlječenja su loše. Terapija koja se prilagođava pacijentu ovisi o histopatološkim karakteristikama melanoma (Srivastava i sur., 2019). Ovisno o karakteristikama (lokalizacija, stadij i genetički profil) melanom se može liječiti kirurškim postupkom, radioterapijom, kemoterapijom, fotodinamičkom terapijom (PDT), imunoterapijom i ciljanom terapijom (Domingues i sur., 2018).



**Slika 2.** Stadiji melaanoma. (Prilagođeno prema Moqadam i sur., 2018).

**Kirurški postupak** je primarna terapija za melanome stadija I-IIIb. Tijekom kirurškog postupka precizno se uklanjanja melanom te se vrši odgovarajuća ekscizija oko njegovog ruba kako bi se smanjio rizik od lokalnog recidiva. Jedan od ciljeva operacije je i histološka potvrda dijagnoze (Domingues i sur., 2018).

Iako se melanom smatra relativno otpornim na **radioterapiju**, ona se i dalje koristi kod inoperabilnih melanoma te se primjenjuje za ublažavanje simptoma metastatskog melanoma uznapredovale faze. Također igra ulogu u kombinaciji sa ciljanom terapijom poput BRAF inhibitora te imunoterapijom kako bi se postigao aditivni ili čak sinergistički učinak (Srivastava i sur., 2019).

**Kemoterapija** je jedna od terapija za melanom u uznapredovalom stadiju. Iako nije pokazala veliki utjecaj na povećanje stope preživljenja kod oboljelih i dalje se koristi kao terapija u palijativnom liječenju recidiva te agresivnih i otpornih melanoma. Pretpostavlja se kako je glavni uzrok otpornosti na kemoterapiju otpornost stanica melanoma na apoptozu (Domingues i sur., 2018). Najčešće se koriste alkilirajući agensi dakarbazin i temozolomid. Skromniju aktivnost pokazuju vinka alkaloid vinkristin, inhibitor sastavljanja mikrotubula, i taksan paklitaksel, inhibitor rastavljanja mikrotubula (Bhatia i sur., 2009). Također se koristi elektrokemoterapija koja kombinira citostatike bleomicin i cisplatinu sa električnim impulsima

visokog intenziteta koji olakšavaju ulazak protutumorskog lijeka u stanicu (Domingues i sur., 2018).

**Fotodinamička terapija** koristi svjetlost točno određene valne duljine koja uz pomoć fotosenzibilatora prevodi molekule kisika, u metabolički aktivnim stanicama, u reaktivni oblik kroz fotokemijsku reakciju. Reaktivni kisik zatim izaziva ireverzibilnu štetu na stanicama tumora i pridruženim žilama te aktivira protutumorski, protuupalni i imunosni odgovor. Iako se terapija pokazala učinkovitom kod ostalih vrsta tumora, kod melanoma ima ograničenu upotrebu zbog zaštitnih mehanizama poput pigmentacije i otpornosti na oksidativni stres. Kombinacija fotodinamičke terapije i kemoterapije dakarbazinom pokazala je pozitivni učinak u smanjenju otpornosti pigmentiranih i nepigmentiranih malignih melanoma, a učinak kombinacije fotodinamičke terapije i imunoterapije još uvijek se istražuje (Domingues i sur., 2018).

**Imunoterapija** se temelji na stimulaciji imunosnog odgovora čovjeka na antigene tumorskih stanica. Koristi se za liječenje pacijenata s uznapredovalim stadijem malignog melanoma. Jedna od imunoterapija koja se koristi je imunoterapija inhibitorima kontrolnih točaka, kao što su protutijela na protein programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed cell-death protein 1*, PD-1), pembrolizumab ili nivolumab, te protutijelo na citotoksični antigen 4 povezan s T-limfocitima (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*, CTLA-4), ipilimumab. PD-1 djeluje kao ko-inhibitorna molekula T-stanica i koči njihovu aktivaciju. CTLA-4 je inhibicijski receptor koji blokira aktivaciju T-stanica i inducira imunosnu toleranciju. Među imunoterapeutike ubraja se i T-VEC, prvi odobreni onkolitički virus za terapiju melanoma (Domingues i sur., 2018). To je genetički modificiran herpes simplex virus koji sadrži dvije kopije ljudskog *GM-CSF* (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) gena koji kada je eksprimiran privlači dendritičke stanice i potiče njihovo sazrijevanje. T-VEC se injicira direktno u melanom, a replicira se samo u tumorskim stanicama. Dovodi do lize tumorskih stanica i oslobađanja antigena specifičnih za tumor što pokreće lokalni imunosni odgovor koji dodatno pojačava lokalna ekspresija GM-CSF (Bommareddy i sur., 2017).

U **ciljanoj terapiji** se koriste male molekule koje služe kao inhibitori ili protutijela koja blokiraju mutirane proteine karakteristične za melanom. Ukoliko melanom sadrži mutaciju V600E/K u kinazi BRAF, koja se pojavljuje u ~ 60 % metastatskih melanoma (Kim i Cohen, 2016), mogu se primijeniti specifični BRAF-inhibitori kao što su vemurafenib ili dabrafenib. Istraživanja su pokazala da je u 90 % pacijenata koji su primili terapiju vemurafenibom došlo do regresije melanoma (Domingues i sur., 2018). Međutim, kod 50 % pacijenata se unutar 7

mjeseci razvije otpornost na terapiju vemurafenibom, a samo 10-15 % pacijenata ne razvije otpornost u periodu od 18-36 mjeseci. Kako bi se smanjila pojava otpornosti kombiniraju se BRAF i MEK inhibitori (Garbe i sur., 2014), uočena je poboljšana klinička učinkovitost, te je FDA 2015. godine odobrila upotrebu kombinacije BRAF i MEK inhibitora u terapiji melanoma (Kim i Cohen, 2016).

Terapija metastatskog melanoma, koji ne odgovara na ciljanu terapiju niti na terapiju onkolitičkim virusom T-VEC, i dalje je moguća jedino klasičnim protutumorskim lijekovima čiji je utjecaj na ukupno preživljenje slab (Mishra i sur., 2018). Sve navedeno upućuje na važnost pronalaska novih meta za novu terapiju, poboljšanje odgovora na postojeću ili kombinaciju postojećih terapija.

## 2.2. ADHEZIJA STANICA

Sposobnost stanica da adheriraju na druge stanice i/ili proteine izvanstaničnog matriksa temeljni je uvjet za normalan razvoj, homeostazu te imunosne funkcije stanica. Adhezija stanica je potrebna za normalan razvoj različitih tkiva, u kontekstu stvaranja specifičnih odjeljaka, održavanja funkcijske barijere i kontrole pokretljivosti stanica. Adhezijske strukture nisu statične, već prolaze dinamičke promjene u sastavu i strukturi kako bi stanice mogle reagirati na promjenu izvanstaničnih signala (Costa i Parson, 2010). Različiti mehanizmi adhezije omogućuju stanicama vezanje za izvanstanični matriks i za druge stanice (Geiger i Yamada, 2011).

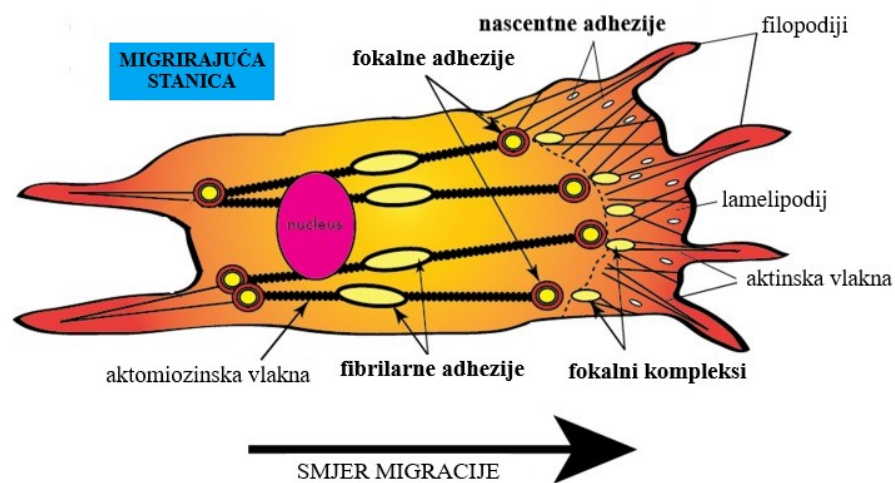
Adhezija između stanica ključna je za stvaranje slojeva epitelnih i endotelnih stanica *in vivo* i osigurava kritičnu mehaničku stabilnost i polarnost u složenoj 3D strukturi tkiva (Caplan i sur., 2008). Adhezije između stanica posredovane su različitim tipovima kompleksa za vezanje, uključujući čvrste, adherentne i tijesne veze, te desmosome. Te veze čine transmembranski proteini čije izvanstanične domene posreduju interakcije između susjednih stanica i unutarstaničnih površina te olakšavaju interakciju signalnih molekula s citoskeletnim proteinima (Costa i Parson, 2010). Adhezije između stanica većinom su posredovane kadherinima (Horton i sur., 2016).

Adhezija stanica na izvanstanični matriks posredovana je preko integrinskih receptora, te diskoidina i sindekana (Frantz i sur., 2010). Njihova uloga nije samo vezanje komponenti izvanstaničnog matriksa već i prijenos signala (Hynes i Naba, 2012). Citoplazmatske domene integrinskih receptora okupljaju velike i dinamičke komplekse proteina koji reguliraju

sastavljanje citoskeleta i aktiviraju mnoge signalne puteve unutar stanica (Geiger i Yamada 2011). Integrinski receptori reguliraju preživljenje, proliferaciju i diferencijaciju stanica, kao i adhezivne i fizičke veze uključene u oblik, organizaciju, polaritet i pokretljivost stanica (Hynes i Naba, 2012).

### 2.2.1. Adhezija posredovana integrinima

Integrini imaju glavnu ulogu u stvaranju brojnih staničnih adhezija (Geiger i Yamada, 2011). Nakon aktivacije integrina, na njihov citoplazmatski rep vežu se mnogi proteini stvarajući kompleks adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complex*, IAC) koji tvori vezu između integrina i aktinskog citoskeleta (Winograd-Katz i sur., 2014), a putem Kank proteina povezuju se i s mikrotubulima (Paradžik i sur., 2020; Bouchet i sur., 2016). Funkcionalne i morfološke analize definirale su nekoliko glavnih oblika IAC-a: nascentne adhezije (NA), fokalne komplekse (FC), fokalne adhezije (FA), fibrilarne adhezije (FB) (slika 3) (Costa i Parsons, 2010; Zaidel-Bar i sur., 2004), hemidesmosome (HD) (Walko i sur., 2015), a nedavno su otkrivene i retikularne adhezije (RA) (Lock i sur., 2018).



**Slika 3.** Prikaz smještaja adhezijskih struktura unutar migrirajuće stanice. (Prilagođeno prema Anderson i sur., 2014).

NA i FC sastoje se od nakupina heterodimera integrinskih molekula te se stvaraju ispod lamelipodija ili filopodija gdje olakšavaju mehaničko vezanje napredujućeg citoskeleta F-aktina na izvanstanični matriks. Većinom se nalaze na rubu lamelipodija te su točkaste morfologije, a s vremenom se mogu raspasti ili sazrijeti u veće FA ili FB (Anderson i sur., 2014). NA sadrže oko 50 integrina te im je životni vijek oko 1 min (Henning Stumpf i sur.,



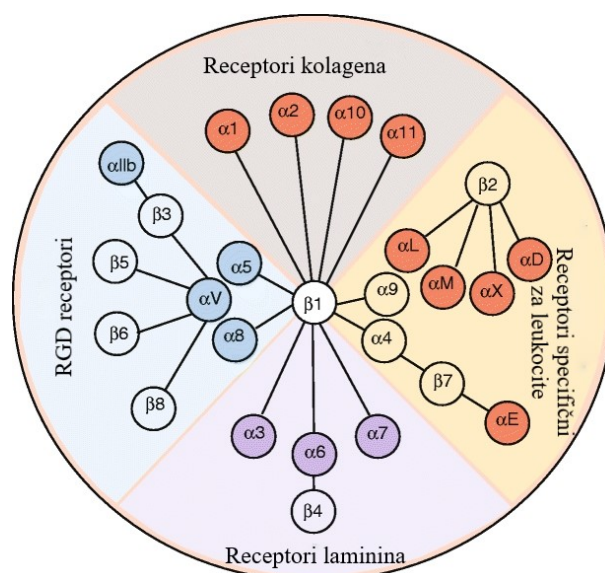
2020). NA i FC obično sadrže sve komponente fokalnih adhezija (Anderson i sur., 2014), a njihova transformacija u FA potaknuta je fosforilacijom paksilina te vezanjem proteina ziksina (Zaidel-Bar i sur., 2007). FA se uspostavljaju povezivanjem izvanstaničnog matriksa i aktinskog citoskeleta (Henning Stumpf i sur., 2020). Stvaraju se u bazi lamelipodija, izdužene su, ovalne morfologije, te su veće u usporedbi sa NA i FC (Anderson i sur., 2014). FB se razlikuju od FA po svojoj karakterističnoj izduženoj morfologiji te po smještaju ispod središnjih dijelova stanica. Glavni integrinski receptor koji stvara FB je  $\alpha 5\beta 1$  koji veže stanice na fibronektinska vlakna (Zaidel-Bar i sur., 2004). Integrin  $\alpha 6\beta 4$  je receptor za laminin te ima ulogu u formiranju malih adhezivnih struktura HD-a odgovornih za čvrsto prijanjanje stanica na bazalnu membranu sa mrežom keratinskih vlakana otpornih na stres (Walko i sur., 2015). Nedavno su otkrivene RA koje imaju jedinstven sastav te se stvaraju oko integrina  $\alpha V\beta 5$  tijekom interfaze u odsutnosti F-aktina. RA opstaju tijekom mitoze osiguravajući usidrenje stanice u izvanstanični matriks nužno za uspješnu podjelu stanice, što daje odgovor na paradoks vezanja stanice u mitozu na izvanstanični matriks. RA su brojnije od FA te su lokalizirane dalje od periferije stanice (Lock i sur., 2018).

### 2.2.2. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks nestanična je komponenta prisutna u svim tkivima i organima (Frantz i sur., 2010). Osim što pruža mehaničku potporu tkivu odgovoran je za pokretanje ključnih biokemijskih i biomehaničkih signala potrebnih za staničnu migraciju, morfogenezu, diferencijaciju i homeostazu tkiva (Naba i sur., 2016). Svako tkivo ima izvanstanični matriks jedinstvenog sastava i topologije koji nastaje tijekom razvoja tkiva dinamičnim i uzajamnim biokemijskim i biofizičkim interakcijama između različitih staničnih komponenti i staničnog i/ili proteinskog mikrokoliša u razvoju. Izvanstanični matriks određuje biokemijska i mehanička svojstva svakog organa. Uz to, usmjerava bitnu morfološku organizaciju i fiziološku funkciju vezivanjem čimbenika rasta i interakcijom s receptorima na staničnoj površini kako bi izazvao prijenos signala i regulirao ekspresiju gena (Frantz i sur., 2010). Sastavljen je od proteoglikana, kolagena, elastina, fibronektina i laminina. Adhezija stanica za izvanstanični matriks posredovana je receptorima, poput integrina, diskoidina i sindekana (Yue, 2014).

### 2.2.3. Integrini

Integrini su heterodimeri nekovalentno povezanih  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. Kod kralježnjaka postoji 18  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica koje grade 24 različita receptora sa različitim svojstvima i različitom rasprostranjenošću u tkivima (Hynes, 2002; Barczyk i sur., 2010).  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice su transmembranski receptori tipa I te dijele strukturne sličnosti, poput velike izvanstanične domene, jedne transmembranske domene i citoplazmatskog repa (Anderson i sur., 2014). Specifičnost vezanja integrina za različite proteine izvanstaničnog matriksa pripisuje se izvanstaničnim domenama  $\alpha$ - i  $\beta$ - podjedinica (Barczyk i sur., 2010). Integrini su ključni posrednici u interakciji s receptorima na membrani drugih stanica ili okolnim izvanstaničnim matriksom (Winograd-Katz i sur., 2014; Anderson i sur., 2014). Mogu utjecati na širok spektar staničnih funkcija, uključujući adheziju, migraciju, proliferaciju, preživljenje, diferencijaciju, odgovor na mehaničke signale i organizaciju citoskeleta, iz čega proizlazi da su integrini uključeni u procese kao što su razvoj i zarastanje rana, angiogeneza, imunski odgovor i hemostaza (Anderson i sur., 2014). Direktno vežu komponente izvanstaničnog matriksa i osiguravaju vučne sile neophodne za pokretljivost i invaziju stanica (Desgrosellier i Cheresh, 2010). Integrinski receptori se ovisno o sposobnosti vezanja na komponente izvanstaničnog matriksa mogu podijeliti u četiri grupe (slika 4): 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  $\alpha IIb\beta3$ ). RGD receptori prepoznaju slijed arginin-glicin-aspartat (RGD) koji je pronađen u raznim proteinima izvanstaničnog matriksa poput fibronektina, vitronektina i kolagena (Hynes i Naba, 2012; Li i sur., 2016). Sparivanje integrina u heterodimere događa se u endoplazmatskom retikulumu dok se višak nesparenih  $\alpha$  ili  $\beta$  podjedinica razgrađuje. Ova strategija ograničava kombinaciju sparivanja  $\alpha$ - i  $\beta$ - podjedinica i dinamički se regulira tako da se sastav integrina na površini stanice može brzo promijeniti (Anderson i sur., 2014). Integrini su jedinstveni među transmembranskim receptorima po svojoj sposobnosti da signal provode dvosmjerno integrirajući tako izvanstanični i unutarstanični okoliš (Hynes, 2002). S obzirom na svoja svojstva i ulogu u angiogenezi, pokretljivosti stanica i invaziji, integrini predstavljaju potencijalne mete za terapiju tumora (Raab-Westphal i sur., 2017).



**Slika 4.** Prikaz vezanja podjedinica integrina  $\alpha$  i  $\beta$  te grupiranje heterodimera integrina prema vezanju na komponente izvanstaničnog matriksa. (Prilagođeno prema Barczyk i sur., 2010).

$\alpha$ V integrini uključeni su u migraciju stanica, rast tumora, angiogenezu i metastaziranje (Desgrosellier i Cheresh, 2010; Seguin i sur., 2015). Heterodimer  $\alpha$ V $\beta$ 3 povezuje se sa slabim prognozama melanoma (Raab-Westphal, 2017), povećanom invazijom i metastaziranjem (Albelda i sur., 1990), dok je  $\alpha$ V $\beta$ 5 uključen u visoko agresivan fenotip stanica melanoma koje eksprimiraju neuropilin1 (Ruffini i sur., 2015) te je povećano eksprimiran u metastazama u mozgu (Vogetseder i sur., 2013).  $\alpha$ V $\beta$ 5 integrin identificiran je kao glavni integrin koje stanice melanoma MDA-MB-435S koriste prilikom rasta u kulturi (Paradžik i sur., 2020). Isto je pokazano i za stanične linije melanoma RPMI-7951 (Dekanić, doktorska disertacija, 2019; neobjavljeni rezultati) i A375 (Lock i sur., 2018) te staničnu liniju trostruko negativnog tumora dojke MDA-MB-231 (Ambriović-Ristov, neobjavljeni rezultati) i stanice osteosarkoma U2OS i karcinoma pluća A549 (Lock i sur., 2018).

#### 2.2.4. Adhesom integrina

Adhesom je izraz koji opisuje sastav kompleksa adhezije integrina (prethodno definiran kao IAC), odnosno naziv za skupinu proteina koja posreduje kompleksnu interakciju između mehaničke uloge staničnih adhezija i njihove uloge u prijenosu signala koja se očituje aktiviranjem širokog spektra signalnih puteva. Usklađena aktivnost komponenti adhesoma u osnovi utječe na sve stanične funkcije, uključujući morfogenezu, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje (Zaidel-Bar i Geiger, 2010). Vjeruje se da su interakcije između

različitih komponenata adhezije odgovorne za dvije glavne funkcije mjesta adhezije: (i) uloga „skele“ u potpori fizičkoj integraciji izvanstaničnog matriksa vezane stanice i citoskeleta, što dovodi do sklapanja tkiva određene strukture i mehaničkih svojstava; (ii) „signalna“ aktivnost koja omogućava stanicama da osjete kemijska i mehanička svojstva vanjskog okruženja i da reagiraju aktiviranjem signalnih mreža koje reguliraju staničnu strukturu, dinamiku, ponašanje i sudbinu stanica (Winograd-Katz i sur., 2014). Kako bi se razumjelo kako nastaju mehaničke veze između izvanstaničnog matriksa i unutrašnjosti stanice opsežno je proučavan molekularni sastav IAC-a mikroskopskim i biokemijskim metodama kao i metodom masene spektrometrije (Horton i sur., 2016). U svrhu daljnjih analiza računski je integrirano nekoliko IAC proteoma koji su dobiveni iz više tipova stanica uzgajanih na fibronektinu u više laboratorija. Kao rezultat dobivena je baza podataka „meta adhesoma“ koja sadrži 2412 proteina, a daljnom analizom identificirano je 60 najučestalijih proteina te su nazvani „konsenzus adhesom“ (Horton i sur., 2015).

Konsenzus adhesom određen je iz stanica uzgajanih na fibronektinu te predstavlja sastav adhesoma fibronektinskih receptora  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha 5\beta 1$  (Horton i sur., 2016). Proteine koji čine IAC djelimo na: 1) katalitičke adaptore, 2) strukturne adaptore 3) skeletne adaptore. Katalitički adaptori odgovorni su za prijenos signala od adhezijskih mjesta do odgovarajućeg nizvodnog signalnog puta, a uključuju nereceptorsku tirozin kinazu Src, integrin vezanu kinazu (engl. *integrin linked kinase*, ILK) i kinazu fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) (Anderson i sur., 2014). Strukturni adaptori, među koje spadaju filamin, tenzin,  $\alpha$ -aktinin, plektin i talin, vežu F-aktin čime stvaraju izravnu vezu između integrina i aktinskog citoskeleta (Anderson i sur., 2014; Zaidel-Bar i Geiger, 2010). Skeletni adaptori, poput paksilina i kindilina, osiguravaju vezna mjesta za ostale proteine FA (Anderson i sur., 2014). Analizom mreže interakcija proteina i proteina konsenzus adhesoma identificirane su četiri međusobno povezane osi koje čine strukturnu vezu integrin-aktin. Te osi čine kindlin-ILK-PINCH (cys-his protein 1), FAK-paksilin, talin-vinkulin i  $\alpha$ -aktinin-zyxin-VASP (fosfoprotein stimuliran vazodilatatorom) (Horton i sur., 2016; Humphries i sur., 2019).

Osim sa aktinskim citoskeletom, integrini su povezani i sa mikrotubulima. Plektin je u izravnoj interakciji sa vimentinom i paksilinom koji osiguravaju direktnu vezu sa mikrotubulima (Zaidel-Bar i Geiger, 2010). U interakciju s talinom stupaju Kank proteini koji koordiniraju stvaranje kortikalnog kompleksa za stabilizaciju mikrotubula (engl. *cortical microtubule stabilizing complex*, CMSC) (Humphries i sur., 2019; Paradžik i sur., 2020; Bouchet i sur., 2016). CMSC sadrži liprine  $\alpha$  i  $\beta$ , ELKS (engl. *protein rich in the amino acids*

*glutamic acid (E), leucine (L), lysine (K) and serine (S)*, tj. protein bogat aminokiselinama E (glutaminska kiselina), L (leucin), K (lizin) i S (serin)) i MACF1 (engl. *microtubule actin cross-linking factor 1*, tj. faktor umrežavanja mikrotubula i aktina 1) (Chen i sur., 2018).

Talin i kindlin odgovorni su za aktivaciju integrina. Talin je bitan za stvaranje veze  $\alpha 5\beta 1$  integrina vezanih za fibronektin, dok kindlin stabilizira  $\alpha 5\beta 1$  integrine u njihovoj aktivnoj konformaciji (Sun i sur., 2019).

Vinkulin je ključan u povezivanju citoskeleta i mjesta adhezije na izvanstanični matriks. Stupa u interakciju sa drugim struktunim adaptorima, između ostalog sa talinom,  $\alpha$ -kateninom,  $\alpha$ -aktininom na području domene glave, te s aktinom i paksilinom na domeni repa (Li i sur., 2016). Veže se na talin te dodatno regrutira F-aktin čime pojačava i osnažuje talin-aktin veze (Seetharaman i Etienne-Manneville, 2018). Fosforilacija paksilina potrebna je za regrutaciju vinkulina kod nezrelih adhezija (Horton i sur., 2016), a inducirana je signalima koje provode integrini (Seetharaman i Etienne-Manneville, 2018).

Integrini također aktiviraju kinaze, poput FAK i Src, koje tako postaju sastavni dio fokalnih adhezija. Te kinaze mogu kontrolirati više signalnih puteva, uključujući transkripcijske koaktivatore YAP/TAZ za regulaciju proliferacije i diferencijacije (Seetharaman i Etienne-Manneville, 2018).

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

S obzirom na ulogu integrina u migraciji, adheziji, proliferaciji, preživljenju i diferencijaciji stanica ne iznenađuje činjenica da upravo oni predstavljaju važne molekule u nastanku, progresiji i metastaziranju tumora. Pokazano je da integrini mogu posredovati u otpornosti na protutumorske lijekove, a mogu i kontrolirati mikrookoliš tumora. Onkogeni transformacija, izravno ili neizravno, mijenja repertoar integrina na površini stanica tumora (Samaržija i sur., 2020).

Brojna istraživanja ukazala su na regulatornu funkciju integrina u preživljenju i otpornosti na protutumorske lijekove i zračenje kod više tipova čvrstih tumora, uključujući tumore dojke, pluća, prostate, jajnika, gušterače i debelog crijeva, kao i hematoloških zloćudnih bolesti (Aoudjit i Vuori, 2012; Eke i Cordes, 2015; Seguin i sur., 2015). Na primjer, Brozović i sur. (2008) i Stojanović i sur. (2016) pokazali su da *de novo* ekspresija integrina  $\alpha V\beta 3$  osigurava otpornost stanica karcinoma grkljana i karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka na više protutumorskih lijekova, dok povećanje ekspresije integrina  $\beta 1$  povećava otpornost stanica

tumora pluća na inhibitor tirozin kinaze gefitinib (Ju i sur., 2010). Suprotno tome utišavanje  $\beta 1$  integrina povećava učinkovitost radioterapije na stanice tumora gušterače (Goel i sur., 2013), utišavanje  $\alpha V$  integrina povećava osjetljivost stanica melanoma na protutumorski lijek paklitaksel (Stojanović i sur., 2018), dok utišavanje integrina  $\beta 3$  povećava učinkovitost temozolomida u stanicama glioblastoma (Christmann i sur., 2017).

Osim integrina, ulogu u razvoju zloćudnih bolesti pokazuju i ostali proteini adhesoma integrina. Prekomjerna ekspresija FAK (Kanteti i sur., 2016) i PINCH (Storch i Cordes, 2012) povezana je s progresijom melanoma, karcinoma pluća, debelog crijeva, dojke i drugih, dok se paksilin povezuje sa malignim promjenama u brojnim tumorima uključujući tumor dojke, pluća i melanom (Kanteti i sur., 2016). Inhibicija FAK povećava osjetljivost stanica karcinoma jajnika na paklitaksel (Kang i sur., 2013), ali se suprotan, nepoželjni učinak na terapiju postiže u stanicama melanoma i trostruko negativnog tumora dojke (Stojanović i sur., 2018). Utišavanje proteina PINCH utječe na pojačanu osjetljivost stanica na zračenje, ali i na protutumorski lijek cisplatin (Eke i sur., 2010), dok utišavanje proteina Kank2 povećava osjetljivost stanica na protutumorski lijek paklitaksel (Paradžik i sur., 2020).

Iz svega proizlazi da su integrini (Seguin i sur., 2015) i proteini adhesoma integrina (Dickreuter i Cordes, 2017) potencijalna meta u liječenju tumora u kombinaciji sa klasičnim terapijama.

### 2.3. OBITELJ PROTEINA KANK

Gen za protein Kank1 čovjeka prvi put je opisan u karcinomu bubrega kao tumor supresor (Sarkar i sur., 2002). Ubrzo su pronađeni i ostali članovi obitelji proteina Kank (Kank2, Kank3 i Kank4) (Zhu i sur., 2008). Obitelj proteina Kank je evolucijski konzervirana, a nastala je umnažanjem i diverzifikacijom gena. Karakterizira ih pet sačuvanih ankirinskih ponavljanja na C-kraju, najmanje jedan motiv zavojnice blizu N-kraja, i KN motiv na N-kraju (Kakinuma i sur., 2009). Kank proteini uglavnom su smješteni na staničnoj membrani (Bouchet i sur., 2016; Guo i sur., 2021; Paradžik i sur., 2020; Stubb i sur., 2019) i to u rubnom pojasu fokalne adhezije (engl. *FA belt*) (Chen i sur., 2018; Sun i sur., 2016) te se nalaze na granici FA regije bogate integrinom  $\beta 1$ , no ne i u jezgri FA (Stubb i sur., 2019), a pronađeni su i u adhesomu integrina  $\alpha V\beta 5$  (Paradžik i sur., 2020). Rekrutiranje Kank proteina u FA pojas posredovano je specifičnom vezom između KN motiva i talina (Sun i sur., 2016). U FA pojasu Kank

destabilizira vezu između integrina i aktomiozina te posreduje povezivanje integrina i mikrotubula (Chen i sur., 2018).

Ulogu proteina obitelji Kank u tumorima nedavno su sažeto opisali u preglednom radu Tadijan i sur. (2021). Oni pokazuju specifični uzorak ekspresije u različitim stanicama, koji se rijetko preklapa, što sugerira na njihove potencijalne specifične funkcije tijekom razvoja sisavaca, postnatalne homeostaze i bolesti (Guo i sur., 2021). Recessivne mutacije u genima koji kodiraju za Kank1, Kank2 i Kank4 povezane su s nefrotskim sindromom (Gee i sur., 2015), a Kank1 se povezuje i s neurodegenerativnim bolestima poput cerebralne paralize (Lerer i sur., 2005).

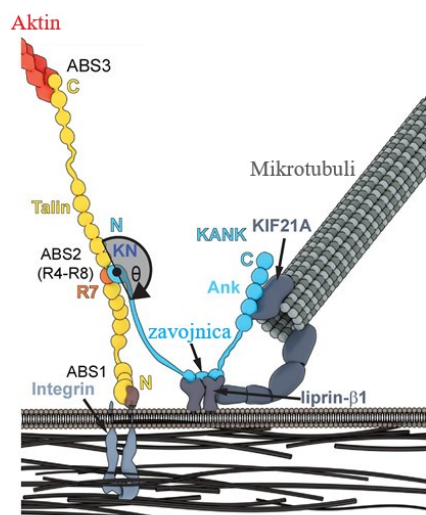
Protein Kank1 je identificiran kao tumor supresor u stanicama tumora bubrega (Sarkar i sur., 2002), a delecije u lokusu gena za protein Kank1 pronađene su i u karcinomu vrata maternice, karcinomu mokraćnog mjehura, hepatocelularnom karcinomu, karcinomu gušterače, pluća i dojke te akutnoj limfocitnoj leukemiji. Iz navedenog proizlazi da je moguća povezanost smanjene ekspresije proteina Kank1 i karcinogeneze (Kakinuma i sur., 2009). O povezanosti ekspresije proteina Kank1 i karcinogeneze da se naslutiti i iz utjecaja Kank1 proteina na migraciju stanice. Protein Kank1 inhibira vezanje supstrata inzulinskog receptora p53 (IRSp53) za Rac1 čime je inhibirano inzulinom inducirano formiranje lamelipodija (Roy i sur., 2009). Također negativno regulira stvaranje aktinskih stresnih vlakana i staničnu migraciju putem inhibicije RhoA aktivnosti (Kakinuma i sur., 2008), a smanjeno stvaranje aktinskih stresnih vlakana primijećeno je i prilikom ekspresije ostalih proteina obitelji Kank (Zhu i sur., 2008).

Manjak podataka o proteinima Kank2, Kank3 i Kank4 otežava zaključak o njihovoj ulozi u tumorima. Prema podacima iz atlasa proteina čovjeka (The human protein atlas, 2020) Kank2 je identificiran kao nepovoljan prognostički marker u karcinomu bubrežnih stanica, Kank3 kao povoljan prognostički marker dok nije pronađena korelacija između ekspresije proteina Kank4 i tumora (The human protein atlas, 2020). Navedeni podatci se ne poklapaju u potpunostima sa rezultatima istraživanja, koje su proveli Kim i sur. (2018), u kojem nije pronađena povezanost između ekspresije gena koji kodiraju za Kank2 i preživljenja pacijenta ni u jednom od deset proučavanih vrsta tumora, no primijećeno je da je ekspresija gena koji kodiraju za Kank3 smanjena kod hepatocelularnog karcinoma te u još pet od devet tumora. Suprotno tome, niska ekspresija Kank4 povezuje se s boljim preživljavanjem karcinoma skvamoznih stanica glave i vrata, adenokarcinoma gušterače i kolorektalnog adenokarcinoma.

### 2.3.1. Kank proteini povezuju integrine s mikrotubulima

Dinamični životni ciklus različitih kompleksa adhezije integrina potreban je za kretanje stanica, a reguliran je koordiniranim djelovanjem aktomiozina i citoskeleta mikrotubula. Kank proteini reguliraju dinamiku adhezije stanica koordinirajući prijenos sile posredovan integrinima i mobilizaciju mikrotubula na integrine (Tadijan i sur., 2021).

Kank proteini stupaju u interakciju sa talinom i liprinom  $\beta 1$ . Talin se veže za KN domenu Kank proteina, dok se lipirin  $\beta 1$  veže za N-kraj zavojnice (slika 5) (Bouchet i sur., 2016; Yu i sur., 2019). Iz slike je također vidljivo da talin veže citoplazmatski rep  $\beta$  integrina i F-aktin s jedne strane te MT s druge strane. Kompleks Talin-Kank1 je mehanički jak i sposoban podržati međudjelovanje, što možda i nije najbolji prijevod engleskog izraza *crosstalk* te ćemo u daljnjem tekstu koristiti upravo izraz *crosstalk*, između citoskeleta aktina i MT-a, a istežanje smičnom silom pospješuje lokalizaciju Kank1 u FA pojasu (Tadijan i sur., 2021). Protein liprin  $\beta 1$  dio je CMSC-a koji povezuje MT s integrinima i aktinskim citoskeletom te organizira rastuće krajeve MT oko zrelih FA (Bouchet i sur., 2016; Chen i sur., 2018; Rafiq i sur., 2019; Sun i sur., 2016). U odsutnosti Kank-a CMSC komponente su raspršene no još uvijek se nalaze u blizi FA (Chen i sur., 2018). Kank proteini imaju dvostruku ulogu u FA: kontroliraju aktivnost integrina aktivirajući talin i smanjuju vezanje talina za aktomiozin što vodi do smanjenog prijenosa sile, povećanog proklizavanja adhezije i smanjene brzine migracije stanica (Sun i sur., 2016).



**Slika 5.** Ilustracija interakcija talina i proteina Kank u FA. (Prilagođeno prema Yu i sur., 2019).



### 2.3.2. Kank proteini kao mete za povećanje osjetljivosti stanica melanoma na paklitaksel

Paklitaksel je protutumorski lijek vrste taksana, inhibitor je rastavljanja mikrotubula (Bhatia i sur., 2009). Iako ima dobra terapijska svojstva u brojnim tumorima, njegovu upotrebu ograničava otpornost tumorskih stanica na lijekove (Orr i sur., 2003). Ciljanje integrina, kao i proteina koji grade IAC, može povećati osjetljivost tumorskih stanica na postojeće protutumorske lijekove, uključujući paklitaksel (Dickreuter i Cordes, 2017).

Stojanović i sur. (2018) su pokazali da je utišavanje integrinske podjedinice  $\alpha V$  povećalo osjetljivost stanične linije melanoma, MDA-MB-435S, na protutumorske lijekove paklitaksel i vinkristin, ali je isti učinak pokazan i u drugoj staničnoj liniji melanoma RPMI-7951. Kako bi razjasnili mehanizam, Paradžik i sur. (2020), usporedili su adhesom MDA-MB-435S stanične linije sa adhesom stanica u kojima je utišana integrinska podjedinica  $\alpha V$ . Primijetili su da je u stanicama u kojima je utišana integrinska podjedinica  $\alpha V$  smanjena ekspresija proteina Kank1 i Kank2. S obzirom na prethodno pokazanu ulogu Kank proteina u povezivanju mikrotubula i IAC (Chen i sur., 2018), te na temelju podataka o adhesomu integrina ovih stanica, odabrali su Kank2 kao mogući protein koji povezuje integrin  $\alpha V\beta 5$  FA, koje ove stanice preferencijalno koriste, za adheziju na proteine CMSC također pronađenih u adhesomu. Daljnjim istraživanjima pokazali su da utišavanje proteina Kank2 imitira utišavanje integrina  $\alpha V$  tj. povećava osjetljivost stanica melanoma MDA-MB-435-S, na paklitaksel, ali i na vinkristin, protutumorski lijek koji također djeluje putem mikrotubula (Paradžik i sur., 2020). Jedini podatak u literaturi koji povezuje Kank proteine i osjetljivost tumorskih stanica na paklitaksel je istraživanje Pu i sur. (2020) koji su analizirali metilaciju DNA u stanicama adenokarcinoma otpornim na djelovanje paklitaksela te su identificirali *Kank1* gen kao jedan od tri hipermetilirana gena koji imaju nisku ekspresiju. Daljnjom analizom su pokazali da se utišavanjem ekspresije mRNA za Kank1 protein u stanicama adenokarcinoma pluća smanjila njihova osjetljivost na paklitaksel i povećala sposobnost migracije. Također su primijetili da je smanjenje apoptoze mehanizam smanjene osjetljivosti stanica nakon utišavanja ekspresije Kank1.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Stanice melanoma

U radu je korištena komercijalno dostupna stanična linija melanoma čovjeka RPMI-7951 (ATCC HTB- 66) kupljena od tvrtke ATCC (engl. *American Type Culture Collection, SAD*) koja raste pričvršćena za podlogu.

##### 3.1.2. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije korištene u radu navedene su u tablici 1.

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

<b>Kemikalija</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Proizvođač</b>
Amido crno (engl. <i>amido black</i> )		Kemika, Hrvatska
Beta-merkaptetanol	63690	Fluka, Njemačka
Bromfenol plavo (engl. <i>bromophenol blue</i> )	15375	Serva, Njemačka
DMEM-high glucose (Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> ))	D5796	Sigma-Aldrich, SAD
DMSO (dimetilsulfoksid) za smrzavanje stanica	D8418	Sigma-Aldrich, SAD
DMSO (dimetilsulfoksid) za otapanje kristala formazana u testu MTT	P120601	GramMol, Hrvatska
EDTA (etilendiamin tetraoctena kiselina, kompleksal III)	1136808	GramMol, Hrvatska
Kemiluminiscentni reagens za western blot (engl. <i>western lightning plus-ECL</i> )	NEL104001EA	Perkin Elmer, SAD
Mlijeko u prahu, nemasno	F145.1	Carl Roth, Njemačka

Opti-MEM (engl. <i>minimum essential media</i> )	11058-021	Gibco, 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
RNA iMAX Lipofectamine®	13778	Invitrogen, SAD
Natrij-dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate, SDS</i> )	L5750	Sigma-Aldrich, SAD
Serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum, FBS</i> )		Sigma-Aldrich, SAD
Trypsin-EDTA	T4049	Sigma-Aldrich, SAD

### 3.1.3. Otopine

Korištene otopine, načini njihove pripreme 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	-
DMEM-FBS	DMEM s 10 %-tnim serumom fetusa goveda	4 °C
EDTA otopina	0,5 M, pH 8	4 °C
Hranjiva podloga za zamrzavanje stanica	900 µL DMEM-FBS + 100 µL DMSO, priprema se netom prije korištenja	-
MTT otopina (12,1 mM, 10×)	5 mg MTT-a se otapa u 1 mL fosfatnog pufera (PBS), filtrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci	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 2H <sub>2</sub> O i MgCl <sub>2</sub> x 6	4 °C

	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 SDS-PAGE	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-merkaptotanol	-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 Fisher Scientific, SAD) s dodatkom 1× inhibitora fosfataza i proteaza iz Halt Protease Inhibitor Cocktail Kita i 50 μM EDTA, priprema se netom prije korištenja	-

#### 3.1.4. Male interferirajuće RNA korištene u pokusima prolazne transfekcije

Popis malih interferirajućih siRNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) korištenih u radu navedene su u tablici 3. Kontrolna siRNA i integrin αV-specifična siRNA su nabavljene od proizvođača (Ambion, SAD) u liofiliziranom obliku, otopljene su u diH<sub>2</sub>O do koncentracije matične otopine od 100 μM. Za Kank1 i 2 su ciljne sekvence preuzete iz rada Bouchet i sur. (2016) na temelju kojih su naručene siRNA od tvrke Sigma-Aldrich (SAD). Sintetizirane siRNA dolaze liofilizirane i otapaju se na isti način kao što je to opisano za αV. Daljnjim razrjeđivanjem u diH<sub>2</sub>O pripremljene su radne otopine od 10 μM. Matične i radne otopine čuvane su pri -20 °C.

**Tablica 3.** Korištene siRNA molekule

Specifičnost	Kataloški broj/ciljni slijed	Identifikacijska oznaka
Nespecifična	4390844	Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA, Ambion, SAD
$\alpha V$	4390826	S7568, Ambion, SAD
Kank1	5' CAGAGAAGGACATGCGGAT 3'	custom-made siRNA, Sigma-Aldrich, SAD
Kank2	5' ATGTCAACGTGCAAGATGA 3'	custom-made siRNA, Sigma-Aldrich, SAD

### 3.1.5. Protutumorski lijek

U radu je korišten protutumorski lijek Paklitaksel proizvođača Sigma-Aldrich (SAD) kataloškog broja T7191, koncentracija matične otopine pripremljene u DMSO je 6 mg/mL.

### 3.1.6. Kompleti kemikalija i standardi

U tablici 4 i tablici 5 popisani su kompleti kemikalija i standardi za određivanje duljine odsječaka DNA i veličine proteina.

**Tablica 4.** Kompleti kemikalija korišteni u radu

Primjena	Naziv	Sastojci	Proizvođač	Kataloški broj
Za mjerenje koncentracije proteina: BCA test	BCA Protein Assay Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>•BCA reagens A</li> <li>•BCA reagens B</li> <li>•albuminski standard, 2 mg/mL</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, SAD	23227

**Tablica 5.** Standardi za elektroforezu proteina korišteni u radu

Upotreba	Standard	Proizvođač
Za SDS-PAGE proteina	Standard za određivanje molekularne mase proteina PAGERULER Prestained Protein Ladder, 26616	Thermo Fisher Scientific, SAD

### 3.1.7. Protutijela korištena u metodi western blot

U tablici 6 navedena su korištena protutijela za određivanje ekspresije proteina metodom western blot.

**Tablica 6.** Protutijela korištena u metodi western blot

Specifičnost	Proizvedeno u	Kataloški broj	Proizvođač	Razrijeđenje
Kank1	Zec	HPA005539	Sigma-Aldrich, SAD	1:500
Kank2	Zec	HPA015643	Sigma-Aldrich, SAD	1:1000
Protuzečji imunoglobulini, obilježen peroksidazom (hren)	Koza	31466	Thermo Fisher Scientific, SAD	1:5 000

### 3.1.8. Uređaji i laboratorijski pribor

Korišteni uređaji navedeni su u tablici 7, a korišteni laboratorijski pribor u tablici 8.

**Tablica 7.** Uređaji korišteni u radu

Uređaj	Proizvođač
Aparatura za vertikalnu elektroforezu proteina i gradijentni poliakrilamidni gel 4 – 15 % Mini-PROTEAN® <i>Tetra Cell Systems</i>	BioRad, SAD
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
Frižider 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
Spektrofotometar StatFax 2100	Awareness Technology INC, SAD
Spremnik za tekući dušik 35VHC	Taylor-Wharton, SAD
Svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka

Termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
Tresilica za pločice Vibromix 301EVT	Tehtnica, Slovenija
Uređaj za polu-suhi prijenos proteina s gela na membranu i nitrocelulozna membrana, Trans-Blot Turbo Transfer	BioRad, SAD
Uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom Ultrasonic Processor	ColeParmer, SAD
Uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala Uvitec Alliance Q9 mini	Cambridge, UK
Vorteks EV 102	Tehtnica, Slovenija
Zibalica Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija

**Tablica 8.** Pribor korišten u radu

<b>Laboratorijski pribor</b>	<b>Proizvođač</b>
Ampule za smrzavanje stanica	Nunc, SAD
Bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75	Falcon, SAD
Čaše, staklene različitih zapremina	Kimble, SAD
Epruvete, plastične 15 mL	Falcon, SAD
Erlenmeyer staklene tikvice različitih zapremina	VWR, SAD
Filtar papir za prijenos proteina u western blot	BioRad, SAD
Mikroepuvete, plastične od 1,5 ili 2 mL	Falcon, SAD
Mikropipete	Eppendorf, Njemačka
Nastavci za mikropipete, razne zapreminne	Brand, Njemačka
Nastavci za mikropipete s filtrom, razne zapreminne	Thermo Fisher Scientific, SAD
Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 i 3.5 cm	Falcon, SAD
Pingvini za led	-
Pipete, staklene, različitih zapremina: 1, 2, 5, 10 i 25 mL	Bellco, SAD i Hirschmann, Njemačka
Pločice za uzgoj kulture stanica s 96/6 bunarića	Falcon, SAD
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). Uzgoj se provodio u inkubatoru u T-bocama ili Petrijevim zdjelicama pri temperaturi od 37 °C i atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Stanice su presađivane dva puta tjedno, odvajanjem od površine pomoću tripsina zagrijanog na 37 °C. Na taj način stanice su održavane u eksponencijalnoj fazi rasta. Odvajanje stanica od površine praćeno je svjetlosnim mikroskopom, nakon čega je dodana hranjiva podloga DMEM-FBS kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Većina uzgoja provodila se u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm, a broj nasađenih stanica iznosio je 6 – 8 x 10<sup>5</sup> stanica po Petrijevoj zdjelici.

Radi osiguravanja dovoljnih zaliha stanica, tijekom ranih pasaža stanice su zamrzavane. Stanice uzgajane u T-25 bocama odvajane su od podloge i centrifugirane 10 minuta pri 1100 x g, skupljeni talog stanica resuspendiran je u 900 µL DMEM-FBS-a nakon čega je u ampulu za smrzavanje prebačeno 900 µL. Zamrzavanje se provodilo polagano, stanice su inkubirane pola sata na ledu prije dodatka 100 µL krioprotektora DMSO-a, a potom su ampule pohranjene u škrinju na -80 °C i sutradan spremljene u spremnik sa tekućim dušikom.

Odmrzavanje stanica provodilo se naglim i kratkim uranjanjem ampule u vodenu kupelj zagrijanu na 37 °C, nakon čega su odmrznute stanice centrifugirane tijekom 10 minuta na 1000 x g, resuspendirane u novom mediju i prebačene u T-25 boce ili Petrijeve zdjelice (promjera 10 cm) s odgovarajućim volumenom podloge.

### 3.2.2. Utišavanje gena transfekcijom siRNA

Kako bi se utišala ekspresija gena, stanice su transficirane sa siRNA uz pomoć komercijalno dostupnog transfekcijskog reagensa Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, SAD). Kontrola transfekcije je nespecifična siRNA. Stanice (6,5 × 10<sup>5</sup>) su dan ranije nasađene u pločice za uzgoj stanica sa 6 bunarića u 1.75 mL DMEM-FBS kako bi na dan transfekcije popunjenost površine bila 60-80 %. Na stanice je dodano 250 µL transfekcijske smjese (otopina



A + otopina B) pripremljene prema uputama proizvođača i opisane u tablici 9. Konačne koncentracije siRNA bile su 30 nM. Stanice su dan nakon transfekcije odvojene od podloge pomoću tripsina nasadene u pločice za uzgoj sa 96 bunarića za potrebe daljnjeg pokusa, a dio stanica je ostavljen u pločici za uzgoj stanica sa 6 bunarića kako bi se provjerila uspješnost utišavanja metodom western blot.

**Tablica 9.** Sastav transfekcijske smjese za utišavanje gena za integrinske podjedinice transfekcijom specifičnih siRNA.

Konačna koncentracija siRNA	30 nM
Otopine	
A	6 $\mu$ L siRNA 150 $\mu$ L Opti-MEM
B	2 $\mu$ L Lipofectamine RNAiMax 150 $\mu$ L Opti-MEM

### 3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTT testom

Preživljenje stanica mjereno je kolorimetrijskom metodom MTT. U pločice za uzgoj sa 96 bunarića nasadeno je  $9 \times 10^3$  stanica u volumenu od 180  $\mu$ L DMEM-FBS, te su stanice sljedeći dan izložene djelovanju protutumorskog lijeka paklitaksela. U svaki bunarić je dodano 20  $\mu$ L paklitaksela (7 različitih koncentracija 10 puta veće od željene koncentracije + 1 red čista hranjiva podloga). Nakon 72 sata iz bunarića je uklonjena hranjiva podloga naglim okretanjem pločice naopako i laganim udaranjem po staničevini kako bi se u potpunosti odstranila tekućina. U svaki bunarić sa stanicama i u jedan bunarić bez nasadenih stanica (slijepa proba) dodano je po 40  $\mu$ L 1 x MTT otopine u DMEM-FBS nakon čega je slijedila inkubacija pri 37 °C tijekom tri sata u inkubatoru za uzgoj stanica. Tijekom inkubacije, žive, metabolički aktivne stanice pomoću mitohondrijskih reduktaza reduciraju žuti MTT u ljubičaste kristale formazana. Nakon inkubacije se ljubičasti kristali formazana otapaju dodatkom 170  $\mu$ L DMSO tijekom 30 minuta na tresilici za pločice. Nakon što su svi kristali otopljeni mjereno je intenzitet obojenja (apsorbancija) spektrofotometrijski pri valnoj duljini 600 nm.

### 3.2.4. Tumačenje utjecaja utišavanja integrinske podjedinice $\alpha V$ ili proteina Kank na djelovanje paklitaksela pomoću 2-way ANOVA-e

Značaj kombiniranog učinka utišavanja integrinske podjedinice  $\alpha V$  ili proteina Kank i paklitaksela na preživljenje stanica određen je statističkim testom 2-way ANOVA-e s Bonferroni post-testom uz program GraphPad Prism. Korištene su vrijednosti apsorbancije očitane pomoću spektrofotometra umanjene za vrijednost slijepe probe. P-vrijednost manja od 0,05 (S ili R u tablicama rezultata) je upućivala na međudjelovanje dvaju tretmana, dok je vrijednost iznad 0,05 upućivala na nedostatak međudjelovanja (NI u tablicama rezultata). Bonferroni post-testom je određen smjer zabilježenog međudjelovanja: 1. smanjenje osjetljivosti na lijek (u tablicama označeno kao R; ukoliko se statistički značajna razlika u preživljenju, između stanica transficiranih nespecifičnom i specifičnom siRNA, smanjila s dozom lijeka); 2. povećanje osjetljivosti na lijek (u tablicama označeno kao S; ukoliko se statistički značajna razlika u preživljenju, između stanica transficiranih nespecifičnom i specifičnom siRNA, povećala s dozom lijeka); 3. slučaj kada nije pronađeno međudjelovanje, ali je samo utišavanje integrinske podjedinice ili Kank proteina neovisno o lijeku izazvalo smanjeno preživljenje stanica, označen je kao povoljni aditivni učinak na djelovanje lijeka.

### 3.2.5. Određivanje ekspresije proteina metodama SDS-PAGE i western blot

#### 3.2.5.1. Priprema staničnih lizata

Nakon uklanjanja hranjive podloge sa stanica koje rastu u pločici za uzgoj sa 6 bunarića, pločica sa stanicama postavljena je na pingvine (engl. *ice pack*) ohlađene pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stanice su dva puta isprane hladnim PBS-om nakon čega je dodano  $150\text{ }\mu\text{L}$  pufera za lizu RIPA (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon 5 minuta stanice su sastrugane strugačem za stanice te je uzorak prebačen u mikroeprevetu, nastavljen postupak ili je uzorak pohranjen pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

Lizati u mikroeprevetama su pomoću uređaja za razbijanje stanica djelovanjem ultrazvuka izloženi djelovanju ultrazvučnih valova ( $2 \times 5$  sekundi s 30 % amplitude), nakon čega su centrifugirani 15 minuta pri  $14\ 000 \times g$ , a supernatant s proteinima je odvojen u nove mikroeprevete. Tako dobivenim lizatima je određena koncentracija proteina pomoću BCA testa (Thermo Fisher Scientific, SAD) izvedenog prema uputama proizvođača. Lizati su čuvani pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.

### 3.2.5.2. SDS-PAGE

Proteini u staničnim lizatima razdvojeni su denaturirajućom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) tijekom koje se proteini u gelu razdvajaju isključivo na temelju molekulske mase. Denaturacija proteina postiže se vezanjem anionskog detergenta natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) koji se na proteine veže u točno određenom omjeru (1,4 g SDS-a po 1 g proteina) čime se neutralizira utjecaj naboja na razdvajanje proteina. SDS se veže na hidrofobne regije proteina, razara vodikove veze, sekundarnu i tercijarnu strukturu čime denaturira protein. U puferu za pripremu uzoraka nalazi se i reducirajući agens (2-merkaptoetanol) koji cijepa disulfidne veze u proteinima (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Stanični lizati odmrznuti su u ledu te je volumen koji odgovara 30 µg proteina pomiješan s 5 x koncentriranim puferom za nanošenje uzoraka te je sve skupa razrijeđeno do 1 × koncentriranog pufera. Zatim su uzorci grijani 5 minuta pri 96 °C, kratko centrifugirani kako bi se tekućina skupila na dno epruvete i nanaseni u jažice gela. U prvu jažicu gela nanaseno je 3 µL standarda za određivanje molekulske mase proteina (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za provođenje SDS-PAGE gel elektroforeze korišten je komercijalno dostupan gradijentni poliakrilamidni gel (4-15 %) (BioRad, SAD). Gel elektroforeza provedena je pri 80 V tijekom otprilike 2 sata (zaustavljena je prije nego što je bromfenol plava boja iz SB pufera izašla iz gela).

### 3.2.5.3. Western blot

Western blot je metoda imunodetekcije proteina specifičnim primarnim protutijelima. Vezanje primarnih protutijela otkriva se sekundarnim protutijelima koja su za njih specifična. Nakon razdvajanja proteina metodom SDS-PAGE proteini se prenose na nitroceluloznu membranu nakon čega slijedi imunodetekcija proteina (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Nakon razdvajanja proteina, proveden je polusuhi prijenos proteina na komercijalno dostupu nitroceluloznu membranu (BioRad, SAD). Najprije je gel uronjen u pufer za prijenos proteina tijekom 5 min nakon čega se polaže na membranu i slaže u „sendvič” između filter papira na način da je gel bliže negativno nabijenoj anodi, a membrana bliže pozitivnoj nabijenoj

katodi. Tako složena konstrukcija umetnuta je u uređaj za prijenos proteina (BioRad, SAD). Prijenos je trajao 10 minuta pri 1,3 A i 25 V. Kako bismo bili sigurni da je prijenos proteina bio uspješan, membrana je obojana amido crnom bojom. Nakon vizualizacije proteina amido crna boja je uklonjena otopinom za odbojavanje te je membrana blokirana s 5 %-tnom otopinom mlijeka u prahu tijekom sat vremena na zibalici. Blokiranje membrane je nužan korak kako bi se izbjeglo nespecifično vezanje protutijela na membranu. Nakon blokiranja na membranu je dodana otopina primarnih protutijela, a vezanje je provedeno tijekom noći pri 4 °C uz zibanje. Membrana se nakon vezanja ispiri i inkubira u otopini odgovarajućeg sekundarnog protutijela obilježenog enzimom peroksidaza tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Vezanje sekundarnog protutijela vizualizirano je metodom kemiluminiscencije uz pomoć kemiluminiscentnog reagensa prema uputama proizvođača i uređaja Uvitec (Cambridge, UK).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu proteina Kank1 i Kank2 u osjetljivosti stanica melanoma RPMI-7951 na protutumorski lijek paklitaksel.

Terapija metastatskog melanoma, koji ne odgovara na ciljanu terapiju niti na terapiju onkolitičkim virusom T-VEC, i dalje je moguća jedino klasičnim protutumorskim lijekovima čiji je utjecaj na ukupno preživljenje slab (Mishra i sur., 2018). Budući da su stanice melanoma slabo osjetljive na protutumorske lijekove (Helmbach i sur., 2001), ciljanje integrina, kao i proteina koji grade IAC, moglo bi povećati osjetljivost stanica i poboljšati uspješnost terapije (Dickreuter i Cordes, 2017). U tumorskim stanicama integrini imaju ulogu u nastanku, progresiji i metastaziranju tumora (Desgrosellier i Cheresh, 2010; Cooper i Giancotti, 2019), a pokazano je i da posreduju u otpornosti na protutumorske lijekove i zračenje (Aoudjit i Vuori, 2012; Eke i Cordes, 2015; Seguin i sur., 2015; Cooper i Giancotti, 2019). Ciljanje integrina  $\beta 8$  u stanicama karcinoma jetre (Wang i sur., 2015), integrina  $\beta 1$  u stanicama karcinoma pločastih stanica jednjaka (Mori i sur., 2008), integrina  $\alpha V$  u stanicama melanoma i stanicama tumora dojke (Stojanović i sur., 2018), integrina  $\alpha 5$  u stanicama glioma (Janouskova i sur., 2012) i integrina  $\alpha 4$  u stanicama limfoblastične leukemije (Hsieh i sur., 2013) povećava osjetljivost stanica na protutumorske lijekove. Ciljanje integrina moguće je korištenjem malih peptida poput cikličkog RGD pentapeptida cilengitida, monoklonskih protutijela na heterodimere integrina ili siRNA specifičnih za podjedinice integrina. Cilengitide inhibira prijenos signala putem integrina  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$  i  $\alpha 5\beta 1$  (Mas-Moruno i sur., 2010). Inhibicijom integrina pomoću cilengitida povećana je osjetljivost stanica melanoma miša B16 na temozolomid (Tentori i sur., 2008). Unatoč početnim obećavajućim rezultatima cilengitide se u III. fazi kliničkih ispitivanja pokazao neučinkovit u kombinaciji s radioterapijom u glioblastomu (Stupp i sur. 2014). Utišavanjem  $\alpha V$  podjedinice korištenjem siRNA povećana je osjetljivost stanica melanoma MDA-MB-435S i RPMI-7951 na protutumorski lijek paklitaksel (Stojanović i sur., 2018). Smanjenjem aktivacije i ekspresije integrina  $\alpha V\beta 3$  uz makrovipecetin, lektin-nalik protein tipa C (engl. *C-type lectin-like proteins, snaclecs*), izoliran iz otrova zmijske, povećala se osjetljivost stanica melanoma čovjeka SK-MEL-28 na cisplatinu (Hammouda i sur., 2018). Suprotno tome, aktiviranjem integrinske podjedinice  $\beta 1$  monoklonskim protutijelom TS2/16 povećala se osjetljivost stanica melanoma čovjeka M21 na citozin arabinozid (Schwartz i sur., 2008), a ista skupina znanstvenika je pokazala da pentavalentni fibronektin (FN-COMP), koji veže i aktivira  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha 5\beta 1$ , povećava osjetljivost stanica melanoma M21 i VMM18 na cisplatinu

(Andarawewa i sur., 2015). Iz navedenog se može zaključiti da još uvijek nije u potpunosti razjašnjena uloga integrina u osjetljivosti stanica na protutumorske lijekove.

Integrini djeluju putem molekularnog kompleksa koji se zove adhesom (Zaidel-Bar i Geiger, 2010). Molekularni sastav adhesoma proučavan je mikroskopskim i biokemijskim metodama kao i metodom masene spektrometrije (Horton i sur., 2016). Humphries i sur. (2009) objavili su prvi rad koji je analizirao sastav IAC-a metodom masene spektrometrije. Stanice su inkubirali s paramagnetnim kuglicama na koje su prethodno vezali ligande vaskularnog adhezijskog proteina 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM1) i fibronektina. Nakon adhezije stanica na ligande na kuglicama, proteini su umreženi pomoću DTBP (dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat), stanice zatim lizirane, a analizom vezanih i umreženih proteina je identificirano njih 620 (Byron i sur., 2011). Napredak u izdvajanju IAC-a je postignut u radu Schiller i sur. (2011), gdje je metoda modificirana na način da su proteini adhesoma izolirani iz stanica nasadenih u Petrijeve zdjelice za uzgoj stanica koje su bile obložene fibronektinom. Na taj način identificirano je oko 2000 proteina u IAC-u. U svrhu daljnjih analiza računski je integrirano više adhesoma sakupljenih iz 7 različitih radova na 5 različitih vrsta stanica uzgajanih na fibronektinu. Kao rezultat dobivena je baza podataka „meta adhesoma“ koja sadrži 2412 proteina, a daljnom analizom identificirano je 60 najučestalijih proteina te su nazvani „konsenzus adhesom“ (Horton i sur., 2015). Budući da je konsenzus adhesom određen iz stanica uzgajanih na fibronektinu on predstavlja sastav adhesoma fibronektinskih receptora  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha 5\beta 1$  (Horton i sur., 2016).

Laboratorij u kojem je izrađen ovaj diplomski rad među prvima je objavio istraživanje koje uspoređuje adhesom na način da se stanice ne nasađuju na neki od proteina izvanstaničnog matriksa već se uzgajaju u kulturi 48 sati kako bi stanice same tijekom rasta stvorile vlastite proteine izvanstaničnog matriksa i na njega se vezale. Prethodno su na taj način radili samo Lock i sur. (2018), no oni su se u svojem radu usredotočili na otkrivene RA. Paradžik i sur. (2020) tim su načinom uzgoja dobili podatke i o adhesomu i matrisomu (proteinima izvanstaničnog matriksa) i pokazali da stanice melanoma MDA-MB-435S za adheziju prvenstveno koriste integrin  $\alpha V\beta 5$  te je identificirani adhesom zapravo adhesom integrina  $\alpha V\beta 5$ . U adhesomu su između ostalih otkriveni proteini koji vežu aktin te neki proteini koji vežu mikrotubule. Usporedbom adhesoma stanica MDA-MB-435S i od njih dobivenih klonova u kojima je stabilno utišan integrin  $\alpha V$  identificirani su proteini za koje je statističkom analizom pokazano da su manje zastupljeni nakon utišavanja  $\alpha V$ , a čine ih većinom proteini koji vežu aktin (plektin, talin 1 i 2, filamin A i B,  $\alpha$ -aktinin 1 i 4, vinkulin, liprin  $\beta 1$ , tensin 3). Brojni

radovi do sada su otkrivali potencijalne mete za terapiju usporedbom ekspresije mRNA (Wang i sur., 2015; Pu i sur., 2020; Ju i sur., 2010; Eke i sur., 2010; Chen i sur., 2017) ili usporedbom proteina 2D elektroforezom i masenom spektrometrijom (Ju i sur., 2010; Humphries i sur., 2009). Paradžik i sur. (2020) do sada je jedini rad u kojem su uspoređeni adhesomi stanica, s različitim odgovorom na protutumorski lijek, s ciljem otkrivanja proteina koji su uključeni u osjetljivost. Rad je nastavak istraživanja Stojanović i sur. (2018) u kojem je pokazano da su integrini uključeni u osjetljivost stanica MDA-MB-453S na protutumorske lijekove. Analizom manje zastupljenih proteina u klonovima 2 $\alpha$ V i 3 $\alpha$ V u kojima je utišan integrin  $\alpha$ V u odnosu na stanice MDA-MB-435S pokazano je da su u adhesomu manje zastupljeni proteini CMSC kompleksa (lipirin  $\beta$ 1, lipirin  $\alpha$ 1, ERC1 (engl. *ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1*), MACF1, Kank1, Kank2 i LL5 $\beta$  (drugi naziv za taj protein je engl. *Pleckstrin homology-like domain family B member 2*, PHLDB2). Usporedbom brojeva spektara vidljivo je da je smanjena zastupljenost svih proteina CMSC kompleksa nakon utišavanja  $\alpha$ V integrina (tablica 10). Budući da je poznato da se CMSC kompleks preko Kank proteina veže na talin i time čini poveznicu s mikrotubulima (Bouchet i sur., 2016), postavljena je teorija da je povećana osjetljivost na paklitaksel i vinkristin (oba djeluju na mikrotubule) posljedica promijenjene dinamike mikrotubula. Kako bi to dokazali Paradžik i sur. su utišali Kank2 i stvarno pokazali da utišavanje Kank2 imitira utišavanje integrina  $\alpha$ V i povećava osjetljivost MDA-MB-435S stanica na paklitaksel i vinkristin, vrlo vjerojatno remeteći dinamiku mikrotubula iako to nije direktno dokazano. Kank2 je odabran zato jer je primjećeno veće smanjenje broja spektara za Kank2 nego za Kank1 u stabilnim klonovima transficiranim sa shRNA (engl. *Small Hairpin RNA*) specifičnom za integrin  $\alpha$ V. Međutim, potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo ima li Kank1 istu ulogu (Paradžik i sur., 2020).

**Tablica 10.** Broj spektara CMSC proteina iz adhesoma stanica MDA-MB-435S i od njih izdvojenih klonova sa stabilno utišanim integrinom  $\alpha$ V (2 $\alpha$ V i 3 $\alpha$ V) (Paradžik i sur., 2020).

Protein	MDA-MB-435S			2 $\alpha$ V		3 $\alpha$ V		
lipirin $\beta$ 1	10	8	9	4	2	5	5	5
lipirin $\alpha$ 1	4	1	4	2	0	1	1	0
ERC1	6	3	1	2	0	6	0	1
MACF1	14	3	5	2	1	3	3	3
Kank1	7	3	5	5	1	2	5	3
Kank2	6	2	3	0	0	1	1	1
LL5 $\beta$	6	2	1	1	0	0	0	1

U istom Laboratoriju izoliran je i adhesom stanica melanoma RPMI-7951 te je uspoređen s adhesom stanica u kojima je prolazno utišan integrin  $\alpha V$  transfekcijom specifičnom siRNA (Dekanić, doktorska disertacija, 2019). I u ovoj staničnoj liniji je prethodno pokazana povećana osjetljivost na paklitaksel nakon prolaznog utišavanja integrina  $\alpha V$  (Stojanović i sur., 2018). Analizom adhesoma ustanovljeno je da stanice RPMI-7951 također preferencijalno koriste integrinski heterodimer  $\alpha V\beta 5$  za adheziju, a mnogi proteini za koje je potvrđen manji broj spektara nakon utišavanja integrina  $\alpha V$  pronađeni su i u modelu stanica MDA-MB-435S. Za potrebe ovog istraživanja usredotočili smo se u adhesomu stanica RPMI-7951 na proteine koji su sastavni dio CMSC. U tablici 11 prikazani su brojevi spektara za CMSC proteine u stanicama RPMI-7951 transficiranim kontrolnom i integrin  $\alpha V$ -specifičnom siRNA. Za razliku od rezultata dobivenih za stanice MDA-MB-435S u kojima je broj spektara također bio nizak što otežava donošenje zaključka o količini proteina, u stanicama RPMI-7951 možemo na temelju sličnih vrijednosti spektara pretpostaviti da se samo dio CMSC komponenti mijenja nakon utišavanja integrina  $\alpha V$ . Prema broju spektara možemo zaključiti da se liprini  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  te ERC1 ne mijenjaju, dok bi se za MACF1 i LL5 $\beta$  moglo pretpostaviti da utišavanje integrina  $\alpha V$  smanjuje njihovu količinu. Za razliku od stanica MDA-MB-435S u stanicama RPMI detektiran je samo Kank2 što upućuje na zaključak da je Kank1 prisutan u manjoj količini ili je u potpunosti odsutan. S obzirom da je Kank1 identificiran kao mogući tumor supresor (Tadijan i sur., 2021), a stanice melanoma RPMI-7951 su agresivnije od MDA-MB-435S sudeći po sposobnosti migracije i invazije, ovaj rezultat ne iznenađuje. Broj spektara za Kank2 nakon utišavanja  $\alpha V$  u stanicama RPMI-7951, je ukupno nešto manji, ali nam ne omogućuje donošenje zaključaka. Na temelju svih ovih podataka postavljena je hipoteza da bi u stanicama RPMI-7951 Kank2 mogao imati istu ulogu kao u MDA-MB-435S stanicama. Iako nisu detektirani spektri specifični za Kank1 to ne znači da ga u ovim stanicama nema. Od tuda i proizlazi cilj ovog rada da se istraži utjecaj utišavanja Kank1 i Kank2 na osjetljivost stanica na paklitaksel.



**Tablica 11.** Broj spektara CMSC proteina iz adhesoma stanica RPMI-7951 transficiranih kontrolnom (si (-)) i integrin  $\alpha$ V-specifičnom siRNA (si ( $\alpha$ V)) (Dekanić, doktorska disertacija, neobjavljeni rezultati).

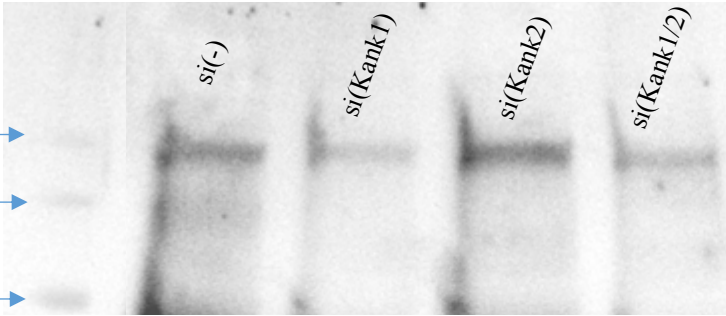

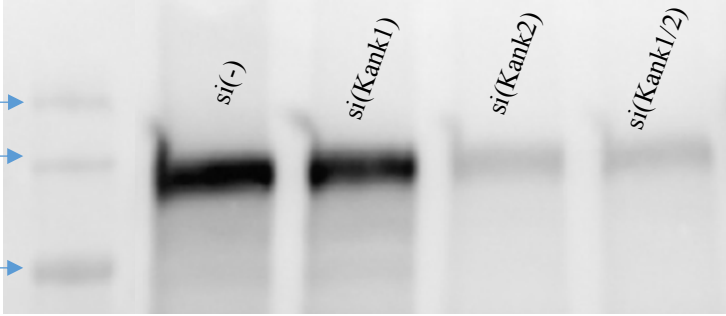

Protein	si(-)			si( $\alpha$ V)		
lipirin $\beta$ 1	7	5	2	4	4	0
lipirin $\alpha$ 1	0	3	0	3	0	0
ERC1	2	0	0	2	0	2
MACF1	20	7	8	5	5	3
Kank1	-	-	-	-	-	-
Kank2	9	2	3	3	2	2
LL5 $\beta$	6	3	0	0	2	0

U ovom radu prvo je istražena ekspresija Kank1 i 2 u stanicama RPMI-7951 metodom Western blot. Kako bi bila nanesena jednaka količina proteina u svim uzorcima mjerena je njihova koncentracija BCA testom, a kao pozitivnu kontrolu korišteni su prethodno pripremljeni lizati stanica MDA-MB-435S. Preliminarnim eksperimentima potvrđeno je da RPMI-7951 stanice ekspimiraju Kank1 i Kank2 proteine, no na temelju usporedbe jačine signala za ova dva proteina u WB dobivenim koristeći različita protutijela teško je zaključiti o nivou ekspresije. Ipak, na temelju usporedbe sa stanicama MDA-MB-435S može se zaključiti da je ekspresija Kank2 u ove dvije stanične linije slična po intenzitetu, dok je ekspresija Kank1 u stanicama RPMI-7951 znatno manja od one zabilježene u MDA-MB-435S (rezultati nisu prikazani).

Nakon toga istražena je uspješnost utišavanja Kank1 i Kank2 proteina te njihova kombinacija. U svim uzorcima analizirana je ekspresija oba proteina kako bi se provjerilo mijenja li se ekspresija jednog nakon utišavanja drugog proteina s obzirom na njihovu strukturnu sličnost. Sličnost strukture Kank1 i Kank2 proteina prikazana je na slici 6. Oba proteina lokalizirana su u rubnom pojasu fokalne adhezije (Chen i sur., 2018; Sun i sur., 2016) te se nalaze na granici FA regije bogate integrinom  $\beta$ 1, no ne i u jezgri FA (Stubb i sur., 2019). Rezultati WB analize prikazani su na slici 7. Vidljivo je da su utišavanja Kank1 i Kank2 proteina bila uspješna te da utišavanje jednog proteina ne utječe na ekspresiju drugog. Za utišavanje proteina korištena je koncentracija siRNA od 30 nM, dok je kod kombinacije utišavanja Kank1/2 korištena polovica te količine. Iz rezultata je vidljivo kako je utišavanje proteina jednako učinkovito i sa pola primijenjene koncentracije siRNA, odnosno sa koncentracijom od 15 nM.



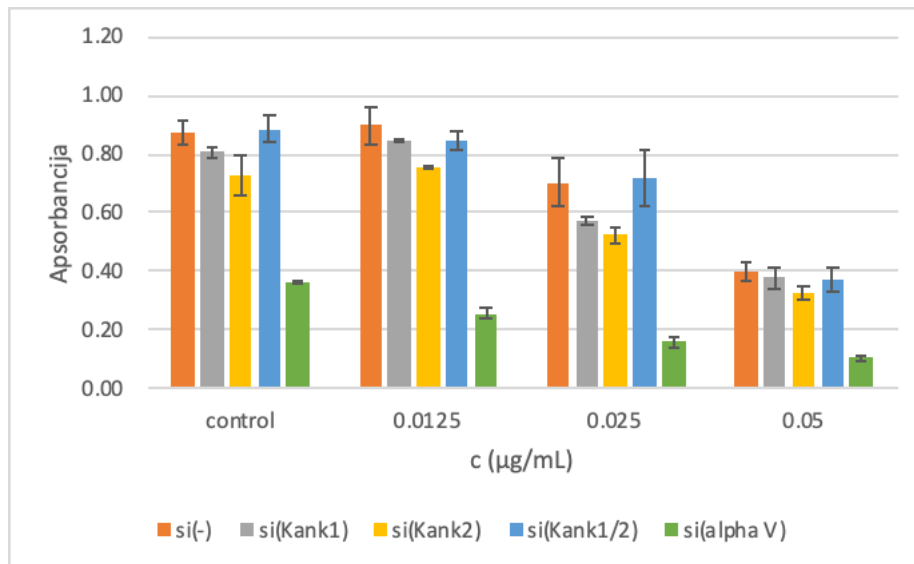
**Slika 6.** Struktura Kank1 i Kank2 proteina. Elipsa označava KN domenu, šesterokut motiv zavojnice, a pravokutnicima su označena ankrinska ponavljanja. (Preuzeto iz Tadijan i sur., 2021)

Primarna protutijela za KANK1	
Membrana obojana amido crnom bojom	
Primarna protutijela za KANK2	
Membrana obojana amido crnom bojom	

**Slika 7. SDS-PAGE i western blot analiza proteina Kank1 i Kank2 u stanicama RPMI-7951 potvrđuje uspješnost utišavanja transfekcijom specifičnim siRNA.** Nakon transfekcije stanica RPMI-7951 Kank1, Kank2 ili Kank1/2 specifičnim siRNA, stanice su

lizirane, određena je koncentracija proteina te su oni razdvojeni pomoću SDS-PAGE. Nakon razdvajanja proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu koja je zatim obojana amido crnom bojom kako bi se provjerila uspješnost prijenosa i ukupna količina proteina u uzorcima. Membrana je prvo inkubirana primarnim protutijelima za Kank1 ili Kank2, nakon čega je inkubirana sekundarnim protutijelima obilježenim enzimom peroksidazom iz hrena. Signal je razvijen kemiluminiscentnim reagensom, a intenzitet očitao na uređaju Uvitec Alliance Q9 mini (Cambridge, UK). Prikazan je jedan od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

Nakon što je utvrđeno da je utišavanje mRNA za Kank1 i Kank2 proteine uspješno, pojedinačno i u kombinaciji, te da utišavanje jednog proteina ne utječe na ekspresiju drugoga, proveden je MTT test kako bi se utvrdilo utječu li Kank1 i Kank2 proteini na osjetljivost stanica na protutumorski lijek paklitaksel. Kao pozitivna kontrola u samom MTT testu provedeno je utišavanje podjedinice integrina  $\alpha V$ , za kojeg su prethodno Stojanović i sur. (2018) pokazali da povećava osjetljivost MDA-MB-435S i RPMI-7951 stanica na paklitaksel. Na slici 8 prikazani su rezultati MTT testa. Prikazane su apsolutne vrijednosti apsorbancije nakon što je oduzeta vrijednost slijepe probe. Vidljivo je da utišavanje proteina Kank1 i Kank2, bez izlaganja paklitakselu, malo smanjuje proliferaciju stanica. Međutim ovaj učinak nije bio aditivan nakon utišavanja Kank1/2. U većini pokusa koji su provedeni uglavnom je bio sličan kontroli. S obzirom da se stanice nakon utišavanja odvajaju tripsinom i nasaduju u pločice sa 96 bunarića, moguće je da učinak na proliferaciju posljedica netočnog brojenja stanica. Za potvrdu smanjenja proliferacije nakon utišavanja Kank1 i Kank2 i odsutnosti ovog učinka nakon utišavanja oba Kank proteina, potrebno je mjeriti proliferaciju stanica što u ovom slučaju nije učinjeno i što treba učiniti u daljnjim istraživanjima. Međutim, eventualne pogreške u brojenju stanica nimalo ne utječu na konačni zaključak u svakom od pojedinih eksperimenata na osjetljivost stanica na paklitaksel. Utišavanje integrina  $\alpha V$  snažno smanjuje proliferaciju što se u potpunosti slaže sa prethodno objavljenim rezultatima (Stojanović i sur., 2018).



**Slika 8. Uloga proteina Kank u osjetljivosti stanica RPMI-7951 na protutumorski lijek paklitaksel.** Stanice su dan nakon transfekcije specifičnom siRNA i kontrolnom siRNA nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. 24 sata nakon nasadivanja izložene su djelovanju različitih koncentracija protutumorskog lijeka paklitaksela. Nakon tri dana, preživljenje stanica je mjereno testom MTT, a na grafovima su prikazane vrijednosti apsorbancije umanjene za apsorbanciju slijepe probe. Sivi stupići predstavljaju stanice transficirane kontrolnom siRNA (si (-)), a stupići u boji stanice transficirane integrin  $\alpha$ -specifičnom siRNA (si ( $\alpha$ )). Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama jednog od tri pokusa sa sličnim rezultatima. Podatci su analizirani 2-way ANOVA-om s Bonferroni post-testom.

Za procjenu učinka utišavanja i paklitaksela potrebno je statističkim metodama dokazati o kakvom se zajedničkom učinku radi. Koristi se statistički test 2-way ANOVA budući da stanice izlažemo prvo transfekciji kontrolnom siRNA ili protein-specifičnoj siRNA nakon čega se stanice izlažu djelovanju protutumorskog lijeka paklitaksela. Ova statistička metoda procjenjuje sve rezultate objedinjeno kako bi se procjenio njihov zajednički učinak u svakoj od primjenjenih koncentracija paklitaksela. Rezultati tako provedene statističke analize prikazani su u tablici 12 te pokazuju da nema utjecaja utišavanja Kank1, Kank2 ili Kank1/2 na osjetljivost na paklitaksel, dok stanice nakon utišavanja integrina  $\alpha$ V pokazuju veću osjetljivost na paklitaksel što se slaže sa prethodno objavljenim rezultatima Stojanović i sur. (2018).

**Tablica 12. Utjecaj utišavanja integrinske podjedinice  $\alpha V$  i proteina Kank1 i Kank2 na osjetljivost stanica RPMI-7951 na paklitaksel.** Tablica predstavlja rezultat statističke obrade rezultata testa MTT prikazanih na slici 8 s testom 2-way ANOVA-e. R (engl. *resistance*), smanjenje osjetljivost; NI (engl. *no interaction*), nema međudjelovanja; S (engl. *sensitisation*), povećanje osjetljivosti.

<b>RPMI-7951</b>	<b>Paklitaksel</b>
si (Kank1)	NI
si (Kank2)	NI
si (Kank1/2)	NI
si ( $\alpha V$ )	S

Iako je za stanice RPMI-7951 i MDA-MB-435S prethodno pokazano da se utišavanjem  $\alpha V$  integrina povećava njihova osjetljivost na paklitaksel (Stojanović i sur., 2018), ovim istraživanjem je utvrđeno da Kank1 i Kank2 proteini nemaju ulogu u osjetljivosti stanica melanoma RPMI-7951 na paklitaksel za razliku od rezultata dobivenih u stanicama MDA-MB-435S u kojima utišavanje Kank2 imitira učinak utišavanja integrina  $\alpha V$  i povećava njihovu osjetljivost (Paradžik i sur., 2020). U obje stanične linije je pokazano da se uzgojem u staničnoj kulturi preferencijalno vežu integrinom  $\alpha V\beta 5$ . Analizom sastava adhesoma ovih staničnih linija u uvjetima rasta tijekom 48 sati pokazana je sličnost u proteinima koji tvore  $\alpha V\beta 5$  adhezije kao što su talini 1 i 2, filamini A i B,  $\alpha$ -aktinini 1 i 4 te plektin, no analiza proteina koji tvore CMSC je pokazala različite rezultate. U stanicama MDA-MB-435S je primijećeno smanjenje svih proteina koji tvore CMSC, usporcos malom broju spektara, što nije bio slučaj u stanicama RPMI-7951 (Paradžik i sur., 2020; Dekanić, doktorska disertacija, neobjavljeni rezultati). Na temelju tih rezultata pretpostavljena je i dokazana uloga Kank2 u osjetljivosti stanica MDA-MB-435S na paklitaksel (Paradžik i sur., 2020). U ovom je radu postavljena hipoteza da se slično događa u stanicama RPMI-7951 te je pokazano da u ovim stanicama proteini Kank1 i Kank2 nemaju tu ulogu. Ovaj zaključak se slaže sa manjim brojem proteina iz CMSC koji su pokazali tendenciju smanjivanja nakon utišavanja integrina  $\alpha V$  (Dekanić, doktorska disertacija, neobjavljeni rezultati). Prema tome, iako se radi o dvije stanične linije melanoma, i istom učinku nakon utišavanja integrina  $\alpha V$  što je povećanje osjetljivosti na paklitaksel, jasno je da mehanizam povećanja osjetljivosti nije jednak.

U literaturi ima vrlo malo podataka s kojim bi mogli usporediti ove rezultate, no ipak postoje podatci koji upućuju da Kank1, ali ne i Kank2, imaju ulogu u osjetljivosti stanica tumora na protutumorske lijekove. Pu i sur. (2020) su analizirali metilaciju DNA u stanicama

adenokarcinoma pluća otpornim na djelovanje paklitaksela. Za razliku od Paradžik i sur. (2020) koji su kao početnu staničnu liniju koristili stanice melanoma otporne na paklitaksel te utišavanjem integrinske podjedinice  $\alpha V$  dobili stanice osjetljive na paklitaksel, Pu i sur. (2020) su kao početnu staničnu liniju koristili stanice osjetljive na paklitaksel te su sami uzgojili stanice otporne na paklitaksel. Stanice otporne na djelovanje paklitaksela dobili su na način da su tijekom 6 mjeseci stanicama adenokarcinoma pluća A549 postupno povećavali koncentraciju paklitaksela u mediju za uzgoj. Usporedbom metilacije gena u stanicama osjetljivim i onima otpornim na paklitaksel identificirali su *Kank1* gen kao jedan od tri hipermetilirana gena koji imaju nisku ekspresiju u stanicama otpornim na paklitaksel te time pokazali da protein Kank1 ima ulogu u osjetljivosti stanica adenokarcinoma pluća na paklitaksel. Utišavanjem Kank1 proteina smanjila se osjetljivost stanica adenokarcinoma pluća na paklitaksel (Pu i sur., 2020). Ista ulogu Kank1 proteina u otpornosti stanica, ali u ovom slučaju na cisplatinu, pokazana je na stanicama karcinoma pločastog epitela jezika (Wang i sur., 2020). Upravo različito djelovanje Kank proteina u otpornosti stanica na protutumorske lijekove ukazuje na njihovu različitu ulogu u stanicama.

Protein Kank1 identificiran je kao tumor supresor u stanicama tumora bubrega (Sarkar i sur., 2002), a delecije u lokusu gena za protein Kank1 pronađene su i u karcinomu vrata maternice, tumoru mokraćnog mjehura, hepatocelularnom karcinomu, karcinomu gušterače, tumoru pluća, akutnoj limfocitnoj leukemiji i tumoru dojke (Kakinuma i sur., 2009). Dok povezanost između ekspresije Kank2 i preživljenja pacijenta ni u jednom od deset proučavanih vrsta tumora nije pronađena (Kim i sur., 2018). Međutim treba uzeti u obzir da se o Kank proteinima još vrlo malo zna te njihova uloga u stanicama tek treba biti otkrivena.

Ostaje otvoreno pitanje ima li Kank1 protein ulogu u osjetljivosti stanica MDA-MB-435S na paklitaksel. Također nije poznato smanjuju li se Kank1 i 2 u stanicama RPMI-7951 nakon utišavanja  $\alpha V$ , što iz malih brojeva spektara dobivenim u analizi adhesoma nije moguće zaključiti. Ako se to i potvrdi trebat će istražiti postoji li učinak na migraciju stanica nakon utišavanja Kank1 i 2 u stanicama RPMI-7951 budući da je utišavanje podjedinica integrina  $\alpha V$  ili  $\beta 5$  imalo dramatičan učinak na smanjenje migracije dok učinka nije bilo nakon utišavanja integrinske podjedinice  $\beta 3$  (Dekanić, doktorska disertacija, 2019).

Kank proteini tek su se nedavno počeli intenzivnije istraživati te su prepoznati kao ključni proteini koji služe za vezu između aktina u FA i mikrotubula putem CMSC, fenomen koji se naziva *crostalk* aktina i MT (Tadijan i sur., 2021). Iako paklitaksel ostvaruje skromne rezultate u terapiji metastatskog melanoma koji ne odgovara na ciljnu terapiju ili na terapiju onkolitičkim

virusima, postoji mogućnost da se ovakvim tipom istraživanja pronađu temelji za kombiniranu terapiju kako bi se prevladala otpornost stanica melanoma na protutumorske lijekove koji djeluju putem mikrotubula. Međutim, ono što je puno važnije je istražiti proteine adhesoma i njihovu međusobnu povezanost i funkciju što onda može biti temelj za osmišljavanje novih terapija u budućnosti.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Stanice RPMI-7951 eksprimiraju proteine Kank1 i Kank2, a usporedbom ekspresije pomoću metode WB sa staničnom linijom MDA-MB-435S zaključujemo da je ekspresija Kank2 u obje stanične linije slična dok je ekspresija Kank1 u staničnoj liniji RPMI-7951 puno manja od one u MDA-MB-435S.
2. Prolazno utišavanje Kank1 ili Kank2, pomoću specifičnih siRNA je uspješno te nije uočena promjena Kank1 nakon utišavanja Kank2 i obrnuto.
3. Prolazno, zajedničko utišavanje Kank1 i Kank2 je jednako uspješno kao i utišavanje pojedinačnih proteina iako je koncentracija siRNA u pojedinačnim utišavanjima dvostruko veća nego u kombinaciji.
4. Utišavanje Kank1 ili Kank2 ima slabi inhibitorni učinak na proliferaciju stanica RPMI-7951. Učinak istovremenog utišavanja Kank1 i Kank2 na proliferaciju nije zabilježen.
5. Utišavanje Kank1 i/ili Kank2 ne utječe na osjetljivost stanica RPMI-7951 na protutumorski lijek paklitaksel. Istovremeno je potvrđen utjecaj utišavanja integrina  $\alpha V$  na povećanje osjetljivosti na paklitaksel upućujući na činjenicu da Kank1 i Kank2 nisu nizvodni proteini integrina  $\alpha V$  ključni u mehanizmu povećanja osjetljivosti na ovaj protutumorski lijek.

## 6. LITERATURA

- Albelda, S. M., Mette, S.A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., Buck, C. A. (1990) Integrin distribution in malignant melanoma: association of the  $\beta 3$  subunit with tumor progression. *Cancer Res.* **50**, 6757-6764
- Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrovic Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007) Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Anderson, L. R., Owens, T. W., Naylor, M. J. (2014) Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys. Rev.* **6**, 203–213.
- Andarawewa, K. L., Moissoglu, K., Sup Lee, C., Ando, Y., Yu, M., Debnath, P., Shannon, J. D., Sirinivasan, S., Conaway, M. R., Weber, M. J., Schwartz, M. A. (2015) Integrin adjunct therapy for melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 114–116.
- Aoudjit, F., Vuori, K. (2012) Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 1–16.
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res.* **339**, 269–280.
- Bhatia, S., Tykodi, S. S., Thompson, J. A. (2009) Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. **23**, 488–496.
- Bommareddy, P. K., Patel, A., Hossain, S., Kaufman, H. L. (2017) Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *Am. J. Clin. Dermatol.* **18**, 1–15.
- Bouchet, B. P., Gough, R. E., Ammon, Y. C., van de Willige, D., Post, H., Jacquemet, G., Altelaar, A. M., Heck, A. J., Goult, B. T., Akhmanova, A. (2016) Talin-KANK1 interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to focal adhesions. *eLife*. **5**, e18124.
- 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.
- Byron, A., Humphries, J. D., Bass, M. D., Knight, D., Humphries, M. J. (2011) Proteomic analysis of integrin adhesion complexes. *Sci. Signal.* **4**, pt2.
- Caplan, M. J., Seo-Mayer, P., Zhang, L. (2008) Epithelial junctions and polarity: complexes and kinases. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 506–512.

- Chen, N. P., Sun, Z., Fässler, R. (2018). The Kank family proteins in adhesion dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **54**, 130–136.
- Chen, T., Kun, W., Xianzhou, T. (2017) In vivo and in vitro inhibition of human gastric cancer progress by upregulating Kank1 gene. *Oncol. Rep.* **38**, 1663–1669.
- 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.
- Cooper, J., Giancotti, F. G. (2019) Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell.* **35**, 347–367.
- Costa, P., Parsons, M. (2010) New Insights into the Dynamics of Cell Adhesions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **283**, 57–91.
- Dekanić, A. (2019) Utjecaj utišavanja integrinskih podjedinica  $\alpha$  u stanicama melanoma čovjeka na osjetljivost na protutumorske lijekove i pokretljivost (doktorska disertacija), Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Desgrosellier, J. S., Cheresch, D. A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer.* **10**, 9-22.
- Dickreuter, E., Cordes, N. (2017) The cancer cell adhesion resistome: mechanisms, targeting and translational approaches. *Biol. Chem.* **398**, 721–735.
- Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P., Pópulo, H. (2018) Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther.* **7**, 35–49.
- Eke, I., Cordes, N. (2015) Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **31**, 65–75.
- Eke, I., Koch, U., Hehlhans, S., Sandfort, V., Stanchi, F., Zips, D., Baumann, M., Shevchenko, A., Pilarsky, C., Haase, M., Baretton, G. B., Calleja, V., Larijani, B., Fässler, R., Cordes, N. (2010) PINCH1 regulates Akt1 activation and enhances radioresistance by inhibiting PP1alpha. *J. Clin. Invest.* **120**, 2516–2527.
- Frantz, C., Stewart, K. M., Weaver, V. M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195-4200.
- Garbe, C., Abusaif, S., Eigentler, T. K. (2014) Vemurafenib. *Recent Results Cancer Res.* **201**, 215–225.

- Gee, H. Y., Zhang, F., Ashraf, S., Kohl, S., Sadowski, C. E., Vega-Warner, V., Zhou, W., Lovric, S., Fang, H., Nettleton, M., Zhu, J. Y., Hoefele, J., Weber, L. T., Podracka, L., Boor, A., Fehrenbach, H., Innis, J. W., Washburn, J., Levy, S., Lifton, R. P., Otto, E. A., Han, Z., Hildebrandt, F. (2015) KANK deficiency leads to podocyte dysfunction and nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* **125**, 2375–2384.
- Geiger, B., Yamada, K. M. (2011) Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **3**, a005033.
- Goel, H. L., Sayeed, A., Breen, M., Zarif, M. J., Garlick, D. S., Leav, I., Davis, R. J., Fitzgerald, T. J., Morrione, A., Hsieh, C. C., Liu, Q., Dicker, A. P., Altieri, D. C., Languino, L. R. (2013)  $\beta 1$  integrins mediate resistance to ionizing radiation in vivo by inhibiting c-Jun amino terminal kinase 1. *J. Cell Physiol.* **228**, 1601–1609.
- Guo, S. S., Seiwert, A., Szeto, I., Fässler, R. (2021) Tissue distribution and subcellular localization of the family of Kidney Ankyrin Repeat Domain (KANK) proteins. *Exp. Cell Res.* **398**, 112391.
- Hammouda, M. B., Riahi-Chebby, I., Souid, S., Othman, H., Aloui, Z., Srairi-Abid, N., Karoui, H., Gasmi, A., Magnenat, E. M., Wells, T., Clemetson, K. J., Rodríguez-López, J. N., Essafi-Benkhadir, K. (2018) Macrovipecetin, a C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits proliferation migration and invasion of SK-MEL-28 human melanoma cells and enhances their sensitivity to cisplatin. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* **1862**, 600–614.
- Helmbach, H., Rossmann, E., Kern, M. A., Schadendorf, D. (2001) Drug-resistance in human melanoma. *Int. J. Cancer.* **93**, 617–622.
- Henning Stumpf, B., Ambriović-Ristov, A., Radenovic, A., Smith, A. S. (2020) Recent Advances and Prospects in the Research of Nascent Adhesions. *Front. Physiol.* **11**, 574371.
- Horton, E. R., Astudillo, P., Humphries, M. J., Humphries, J. D. (2016) Mechanosensitivity of integrin adhesion complexes: role of the consensus adhesome. *Exp. Cell Res.* **343**, 7–13.
- Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D., Humphries, M. J. (2015) Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1577–1587.
- Hsieh, Y. T., Gang, E. J., Geng, H., Park, E., Huantes, S., Chudziak, D., Dauber, K., Schaefer, P., Scharman, C., Shimada, H., Shojaee, S., Klemm, L., Parameswaran, R., Loh, M.,

- Kang, E. S., Koo, H. H., Hofmann, W. K., Andrade, J., Crooks, G. M., Willman, C. L., Müschen, M., Papayannopoulou, T., Heisterkamp, N., Bönig, H., Kim, Y. M. (2013) Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy. *Blood*. **121**, 1814–1818.
- 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. R., Askari, J. A., Humphries, M. J. (2019) Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol*. **56**, 14–21.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. **110**, 673–687.
- 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.
- Janouskova, H., Maglott, A., Leger, D. Y., Bossert, C., Noulet, F., Guerin, E., Guenot, D., Pinel, S., Chastagner, P., Plenat, F., Entz-Werle, N., Lehmann-Che, J., Godet, J., Martin, S., Teisinger, J., Dontenwill, M. (2012) Integrin  $\alpha5\beta1$  plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res*. **72**, 3463–3470.
- Ju, L., Zhou, C., Li, W., Yan, L. (2010) Integrin beta1 over-expression associates with resistance to tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer. *J. Cell. Biochem*. **111**, 1565–1574.
- Kakinuma, N., Zhu, Y., Wang, Y., Roy, B.C., Kiyama, R. (2009) Kank proteins: Structure, functions and diseases. *Cell. Mol. Life Sci*. **66**, 2651–2659.
- Kakinuma, N., Roy, B. C., Zhu, Y., Wang, Y., Kiyama, R. (2008) Kank regulates RhoA-dependent formation of actin stress fibers and cell migration via 14-3-3 in PI3K-Akt signaling. *J. Cell. Biol*. **181**, 537–549.
- Kanteti, R., Batra, S. K., Lennon, F. E., Salgia, R. (2016) FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget*. **7**, 31586–31601.
- Kang, Y., Hu, W., Ivan, C., Dalton, H. J., Miyake, T., Pecot, C. V., Zand, B., Liu, T., Huang, J., Jennings, N. B., Rupaimoole, R., Taylor, M., Pradeep, S., Wu, S. Y., Lu, C., Wen, Y., Huang, J., Liu, J., Sood, A. K. (2013) Role of focal adhesion kinase in regulating YB-1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. **105**, 1485–1495.
- Kim, A., Cohen, M. S. (2016) The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert Opin. Drug Discov*. **11**, 907–916.

- Kim, I., Kang, J., Gee, H. Y., Park, J. W. (2018) A novel HIF1AN substrate KANK3 plays a tumor-suppressive role in hepatocellular carcinoma. *Cell Biol. Int.* **42**, 303–312.
- Lerer, I., Sagi, M., Meiner, V., Cohen, T., Zlotogora, J., Abeliovich, D. (2005) Deletion of the ANKRD15 gene at 9p24.3 causes parent-of-origin-dependent inheritance of familial cerebral palsy. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3911–3920.
- Li, Z., Lee, H., Zhu, C. (2016) Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion. *Exp. Cell Res.* **349**, 85–94.
- 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.
- Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F., Kessler, H. (2010) Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med. Chem.* **10**, 753–768.
- Matthews, N. H., Li, W. Q., Qureshi, A. A., Weinstock, M. A., Cho, E. (2017) Epidemiology of Melanoma. U: *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy* (Ward WH, Farma JM, ured.) Codon Publications, Brisbane, 3-23.
- Mishra, H., Mishra, P. K., Ekielski, A., Jaggi, M., Iqbal, Z., Talegaonkar, S. (2018) Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **144**, 2283-2302.
- Moqadam, S. M., Grewal, P. K., Haeri, Z., Ingledew, P. A., Kohli, K., Golnaraghi, F. (2018) Cancer detection based on electrical impedance spectroscopy: A clinical study, *J. Electr. Bioimpedance.* **9**, 17-23.
- Mori, R., Ishiguro, H., Kuwabara, Y., Kimura, M., Mitsui, A., Tomoda, K., Mori, Y., Ogawa, R., Katada, T., Harata, K., Fujii, Y. (2008) Targeting beta1 integrin restores sensitivity to docetaxel of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **20**, 1345–1351.
- Naba, A., Clauser, K. R., Ding, H., Whittaker, C. A., Carr, S. A., Hynes, R. O. (2016) The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix. Biol.* **49**, 10–24.
- National Cancer Institute (2015) What is cancer? < <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>> Pristupljeno: 4. prosinca 2020.
- Orr, G. A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., Horwitz, S. B. (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene.* **22**, 7280–7295.

- 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.
- PDQ Adult Treatment Editorial Board (2020) Melanoma treatment (PDQ®): Health professional version. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US). <<https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq>>. Pristupljeno: 8. prosinca 2020.
- Pu, J., Shen, J., Zhong, Z., Yanling, M., Gao, J. (2020) KANK1 regulates paclitaxel resistance in lung adenocarcinoma A549 cells. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **48**, 639–647.
- Raab-Westphal, S., Marshall, J. F., Goodman, S. L. (2017) Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers. *Cancers.* **9**, 110.
- Rafiq, N. B. M., Nishimura, Y., Plotnikov, S. V., Thiagarajan, V., Zhang, Z., Shi, S., Natarajan, M., Viasnoff, V., Kanchanawong, P., Jones, G. E., Bershadsky, A. D. (2019) A mechano-signalling network linking microtubules, myosin IIA filaments and integrin-based adhesions. *Nat. Mater.* **18**, 638–649.
- Roy, B. C., Kakinuma, N., Kiyama, R. (2009) Kank attenuates actin remodeling by preventing interaction between IRSp53 and Rac1. *J. Cell Biol.* **184**, 253–267.
- Ruffini, F., Graziani, G., Levati, L., Tentori, L., D'Atri, S., Lical, P. M. (2015). Cilengitide downmodulates invasiveness and vasculogenic mimicry of neuropilin 1 expressing melanoma cells through the inhibition of  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin. *Int. J. Cancer.* **136**, E545–E558.
- Samaržija, I., Dekanić, A., Humphries, J. D., Paradžik, M., Stojanović, N., Humphries, M. J., Ambriović-Ristov, A. (2020) Integrin Crosstalk Contributes to the Complexity of Signalling and Unpredictable Cancer Cell Fates. *Cancers.* **12**, 1910.
- Sarkar, S., Roy, B. C., Hatano, N., Aoyagi, T., Gohji, K., Kiyama, R. (2002) A novel ankyrin repeat-containing gene (Kank) located at 9p24 is a growth suppressor of renal cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* **277**, 36585–36591.
- Schiller, H. B., Friedel, C. C., Boulegue, C., Fässler, R. (2011) Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep.* **12**, 259–266.
- Schwartz, M. A., McRoberts, K., Coyner, M., Andarawewa, K. L., Frierson, H. F., Jr, Sanders, J. M., Swenson, S., Markland, F., Conaway, M. R., Theodorescu, D. (2008) Integrin agonists as adjuvants in chemotherapy for melanoma. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6193–6197.

- Seetharaman, S., Etienne-Manneville, S. (2018) Integrin diversity brings specificity in mechanotransduction. *Biol. Cell.* **110**, 49–64.
- Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M., Cheresh, D. A. (2015) Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.* **25**, 234–240.
- Shukla, K. K., Sankanagoudar, S., Sanganeria, B. S., Pareek, P., Ram, J., Misra, S., Sharma, P. (2019) Recent Advances in Molecular Diagnostic Approaches for Cancer. U: *Molecular Diagnostics in Cancer Patients* (Shukla, K., Sharma, P., Misra, S., ured.) Springer, Singapore, 1-11.
- Srivastava, A., Srivastava, P., Pant, A. B. (2019) Molecular Diagnostics in Melanoma: An Update. U: *Molecular Diagnostics in Cancer Patients* (Shukla, K., Sharma, P., Misra, S., ured.) Springer, Singapore, 1-11.
- Stojanović, N., Brozovic, A., Majhen, D., Bosnar, M. H., Fritz, G., Osmak, M., Ambriović-Ristov, A. (2016) Integrin  $\alpha\beta3$  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., Supina, C., Tomicic, M. T., Christmann, M., Osmak, M., Ambriović-Ristov, A. (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.
- Storch, K., Cordes, N. (2012) Focal Adhesion-Chromatin Linkage Controls Tumor Cell Resistance to Radio- and Chemotherapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 319287.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Gorlia, T., Erridge, S. C., Perry, J., Hong, Y. K., Aldape, K. D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujicic, D., Steinbach, J. P., Wick, W., Tarnawski, R., Nam, D. H., Hau, P., Weyerbrock, A., Taphoorn, M. J., Shen, C. C., Rao, N., Thurzo, L., Herrlinger, U., Gupta, T., Kortmann, R.D., Adamska, K., McBain, C., Brandes, A.A., Tonn, J.C., Schnell, O., Wiegel, T., Kim, C.Y., Nabors, L.B., Reardon, D.A., van den Bent, M.J., Hicking, C., Markivskyy, A., Picard, M., Weller, M.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC); Canadian Brain Tumor Consortium; CENTRIC study team. (2014) Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC



- EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 1100–1108.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., Futreal, P. A. (2009) The cancer genome. *Nature.* **458**, 719–724.
- Stubb, A., Guzmán, C., Närvä, E., Aaron, J., Chew, T.L., Saari, M., Miihkinen, M., Jacquemet, G., Ivaska, J. (2019) Superresolution architecture of cornerstone focal adhesions in human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **10**, 4756.
- Sun, Z., Costell, M., Fässler, R. (2019) Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nature Cell Biol.* **21**, 25–31.
- Sun, Z., Tseng, H. Y., Tan, S., Senger, F., Kurzawa, L., Dedden, D., Mizuno, N., Wasik, A. A., They, M., Dunn, A. R., Fässler, R. (2016) Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nature Cell Biol.* **18**, 941–953.
- Tadijan, A., Samaržija, I., Humphries, J. D., Humphries, M. J., Ambriović-Ristov, A. (2021) KANK family proteins in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **131**, 105903.
- Tentori, L., Dorio, A. S., Muzi, A., Lacal, P. M., Ruffini, F., Navarra, P., Graziani, G. (2008) The integrin antagonist cilengitide increases the antitumor activity of temozolomide against malignant melanoma. *Oncol. Rep.* **19**, 1039–1043.
- The human protein atlas (2020) The human protein atlas, verzija 19, <<https://www.proteinatlas.org>>. Pristupljeno: 15. prosinca 2020
- Thompson, J. F., Scolyer, R. A., Kefford, R. F. (2005) Cutaneous melanoma. *Lancet.* **365**, 687–701.
- Vogetseder, A., Thies, S., Ingold, B., Roth, P., Weller, M., Schraml, P., Goodman, S. L., Moch, H. (2013).  $\alpha$ v-Integrin isoform expression in primary human tumors and brain metastases. *Int. J. Cancer.* **133**, 2362–2371.
- 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., Goel, H. L., 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.
- Wang, W. W., Wang, Y. B., Wang, D. Q., Lin, Z., Sun, R. J. (2015) Integrin beta-8 (ITGB8) silencing reverses gefitinib resistance of human hepatic cancer HepG2/G cell line. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 3063–3071.

- 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.
- Yue, B. (2014) Biology of the extracellular matrix: an overview. *J. Glaucoma.* **23**, S20–S23.
- Yu, M., Le, S., Ammon, Y. C., Goult, B. T., Akhmanova, A., Yan, J. (2019) Force-Dependent Regulation of Talin-KANK1 Complex at Focal Adhesions. *Nano Lett.* **19**, 5982–5990.
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., Geiger, B. (2004) Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 416-420.
- Zaidel-Bar, R., Geiger, B. (2010) The switchable integrin adhesome. *J. Cell Sci.* **123**, 1385-1388.
- 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.
- Zhu, Y., Kakinuma, N., Wang, Y., Kiyama, R. (2008) Kank proteins: a new family of ankyrin-repeat domain-containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**, 128-133.

Izjava o izvornosti

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

*Marta Acman*

Ime i prezime studenta