

Proteini talini i KANK u fokalnim i retikularnim adhezijama posredovanim integrinom $\alpha V\beta 5$ u stanicama melanoma MDA-MB-435S

Lončarić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:236:680373>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Doctoral School, Josip Juraj University in Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Marija Lončarić

**Proteini talini i KANK u fokalnim i retikularnim adhezijama
posredovanim integrinom $\alpha V\beta 5$
u stanicama melanoma MDA-MB-435S**

Doktorski rad

Osijek, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Biologija, Temeljne medicinske znanosti

Proteini talini i KANK u fokalnim i retikularnim adhezijama posredovanim integrinom $\alpha V\beta 5$ u stanicama melanoma MDA-MB-435S

Marija Lončarić

Doktorski rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković

Mentor/i: Izv. prof. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, izvanredna profesorica, znanstvena savjetnica u trajnom izboru, voditeljica laboratorija

Kratki sažetak doktorskog rada:

Stanice melanoma MDA-MB-435S tvore fokalne (FA) i retikularne adhezije (RA) posredovane integrinom $\alpha V\beta 5$. Utišavanje integrina αV povećava osjetljivost stanica melanoma MDA-MB-435S na protutumorski lijek paklitaksel te smanjuje učinkovitost migracije. U ovom radu pokazali smo da je prekid funkcionalne veze proteina talina 2 iz FA i KANK2 iz kortikalnog kompleksa za stabilizaciju mikrotubula mehanizam kojim stanice postaju osjetljivije na paklitaksel, upućujući da su talin 2 i KANK2 potencijalne mete u liječenju melanoma. Analizirali smo RA stanica MDA-MB-435S i utvrdili da je KANK2, uz talin2, sastavnica RA.

Broj stranica: 199

Broj slika: 32

Broj tablica: 16

Broj literaturnih navoda: 268

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fokalne adhezije, retikularne adhezije, talin, KANK, paklitaksel, melanom

Datum javne obrane: 3. srpanj 2024.

Povjerenstvo za javnu obranu:

1. Prof. dr. sc. Igor Weber, naslovni profesor, znanstveni savjetnik u trajnom izboru, voditelj laboratorija
2. Izv. prof. dr. sc. Maja Herak Bosnar, naslovna izvanredna profesorica, znanstvena savjetnica u trajnom izboru
3. Izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, izvanredna profesorica
4. Dr. sc. Helena Četković, znanstvena savjetnica, voditeljica laboratorija (zamjena člana)
5. Doc. dr.sc. Dragomira Majhen, docentica, znanstvena savjetnica (zamjena člana)

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek; Knjižnici Instituta Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science

Scientific Fields: Biology, Basic medical sciences

Talin and KANK proteins in integrin $\alpha V\beta 5$ mediated focal and reticular adhesions in melanoma cell line MDA-MB-435S

Marija Lončarić

Thesis performed at: Laboratory for Cell Biology and Signalling, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute

Supervisor/s: Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Scientist with Tenure, Associate Professor, Head of Laboratory

Short abstract:

Melanoma cell line MDA-MB-435S forms integrin $\alpha V\beta 5$ mediated focal (FA) and reticular adhesions (RA). Knockdown of integrin αV increases the sensitivity of MDA-MB-435S cells to the microtubule-targeting antitumor drug paclitaxel and reduces migration. In this work, we showed that the mechanism of these effects is mediated by the binding of talin 2 from FA and KANK2 from the cortical microtubule stabilizing complex. We identified talin 2 as a potential target in tumor therapy. We analyzed RA in MDA-MB-435S cells and discovered KANK2 as a new component of RA.

Number of pages: 199

Number of figures: 32

Number of tables: 16

Number of references: 268

Original in: Croatian

Key words: Focal Adhesion, Reticular Adhesion, Talin, KANK, Paclitaxel, Melanoma

Date of the thesis defense: 3rd July 2024.

Reviewers:

1. Igor Weber, PhD, Senior Scientist with Tenure, Professor, Head of Laboratory
2. Maja Herak Bosnar, PhD, Senior Scientist with Tenure, Associate Professor
3. Martina Mihalj, PhD, Associate Professor
4. Helena Četković, PhD, Senior Scientist, Head of Laboratory (substitute member)
5. Dragomira Majhen, PhD, Senior Scientist, Docent (substitute member)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek; Ruđer Bošković Institute Library, Bijenička cesta 54, Zagreb

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice u trajnom izboru u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2019-04 „Integrin α V β 5-povezane fokalne i retikularne adhezije u melanomu (AdMeFoRe)“.

Veliko hvala mojoj mentorici dr.sc. Andreji Ambriović Ristov na prilici da budem dio njezine grupe. Hvala na neizmjernej potpori, strpljenju i ohrabrenju tijekom rada. Ponajviše hvala na prenesenom znanju, motivaciji i entuzijazmu za istraživanje. Bilo mi je zadovoljstvo raditi i napredovati uz uzornu mentoricu i voditeljicu grupe.

Hvala svim članicama Integrin tima što ste bile divne kolegice. Hvala vam na svim savjetima, poticajnim riječima i što ste uvijek bile spremne pomoći. Uz vas je svaki izazov bio lakši, a svaki uspjeh vrjedniji.

Hvala mojim kolegama i prijateljima iz Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala. Hvala vam na podijeljenom znanju i iskustvu, nesebičnoj pomoći i predivnoj radnoj atmosferi. Bio je užitak raditi uz vas!

Hvala Stručnom povjerenstvu za ocjenu doktorskog rada na uloženom vremenu. Vaši prijedlozi i ispravci učinili su ovaj rad kvalitetnijim.

Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima što ste uvijek uz mene. Posebno hvala mom suprugu na ljubavi i potpori.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Adhezija stanica	1
1.1.1. Integrini	2
1.1.2. Izvanstanični matriks	4
1.2. Integrinski adhezijski kompleks	5
1.2.1. Istraživanje integrinskog adhezijskog kompleksa	8
1.3. Fokalne adhezije	11
1.3.1. Talin	12
1.3.2. KANK	15
1.3.3. Međusobna komunikacija (engl. <i> Crosstalk</i>) aktina i mikrotubula	17
1.4. Retikularne adhezije	18
1.5. Integrini u tumorima	22
1.6. Melanom	25
1.6.1. Liječenje melanoma	27
1.6.2. Repertoar integrina i glavnih proteina FA u melanomu	29
1.7. Cilj istraživanja	32
2. MATERIJALI I METODE	33
2.1. Materijali	33
2.1.1. Stanice melanoma čovjeka	33
2.1.2. Osnovne kemikalije	33
2.1.3. Otopine	34
2.1.4. Protutijela i spojevi korišteni u metodama western blot (WB) i imunofluorescencija (IF) ...	36
2.1.5. Male interferirajuće RNA (siRNA) korištene u pokusima prolazne transfekcije	38
2.1.6. Kompleti kemikalija i standardi	39
2.1.7. Uređaji i laboratorijski pribor	40

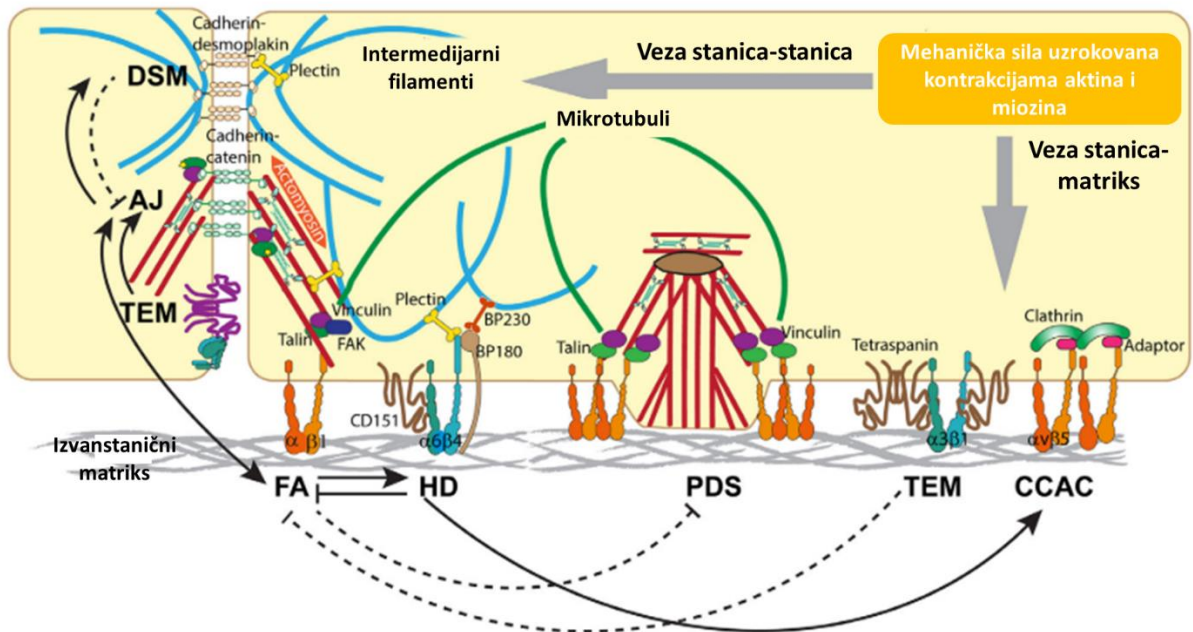
2.1.8. Računalni programi	42
2.2. Metode	42
2.2.1. Kultura stanica	42
2.2.2. Izolacija integrinskog adhezijskog kompleksa	43
2.2.3. Analiza količine proteina metodom natrij-dodecil sulfat elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulphate PoliAcrylamide Gel Electrophoresis</i> , SDS-PAGE) i WB	44
2.2.4. Prolazno utišavanje proteina siRNA molekulama.....	45
2.2.5. Analiza proteina metodom spektrometrije masa (MS).....	46
2.2.6. Analiza lokalizacije proteina metodom imunofluorescencije	48
2.2.7. Analiza proteina imunofluorescencijom i super-rezolucijskom mikroskopijom.....	48
2.2.8. Određivanje proliferacije stanica	49
2.2.9. Mikroskopija živih stanica	50
2.2.10. Određivanje migratorne sposobnosti stanica	50
2.2.11. Statistička analiza	51
3. REZULTATI.....	52
3.1. Talin 1, talin 2 i KANK2 dio su FA α V β 5 u stanicama melanoma MDA-MB-435S	52
3.2. Talin 1 je neophodan za stvaranje FA α V β 5 u stanicama melanoma MDA-MB-435S	55
3.3. Talin 2 i KANK2 stvaraju funkcionalnu interakciju u stanicama MDA-MB-435S.....	59
3.4. Utišavanje talina 1 i talina 2 različito utječe na aktinski citoskelet i mikrotubule u stanicama MDA-MB-435S	65
3.5. Prekid veze između FA i CMSC-a dovodi do povećanja brzine rasta mikrotubula, povećane osjetljivosti na PTX i smanjene učinkovitosti migracije stanica MDA-MB-435S.....	67
3.6. Prekid veze između proteina talina 2 i KANK2 dovodi do povećanja FA i količine stresnih niti u stanicama MDA-MB-435S	73
3.7. Prekid veze između proteina talina 2 i KANK2 u stanicama MDA-MB-435S dovodi do povećanja FA s povećanom količinom motornog proteina miozina IIA.....	77
3.8. Stanice MDA-MB-435S tvore RA α V β 5	78

3.9. KANK2 je dio RA $\alpha V\beta 5$ u stanicama MDA-MB-435S	84
3.10. Utišavanjem proteina talina 2 ili KANK2 dolazi do promjena u RA.....	87
4. RASPRAVA	94
5. ZAKLJUČCI	113
6. LITERATURA	115
7. SAŽETAK.....	143
8. SUMMARY	145
9. PRILOZI	147
9.1. Rezultati MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom FA i RA u stanicama MDA-MB-435S	147
9.2. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom FA i RA u stanicama MDA-MB-435S	164
9.3. Rezultati MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2	167
9.4. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2	181
9.5. Popis korištenih kratica u radu	191
10. ŽIVOTOPIS I POPIS RADOVA.....	198

1. UVOD

1.1. Adhezija stanica

Adhezija stanica je osnovno svojstvo svih višestaničnih organizama. Stanice ostvaruju interakciju s drugim stanicama i/ili proteinima izvanstaničnog matriksa putem različitih receptora. Adhezija stanica osigurava tvorbu funkcionalnih tkiva i organa, ali isto tako omogućuje prijenos signala iz okoline u stanicu te obrnuto (Geiger i Yamada, 2011.). Stanica se povezuje s okolinom putem čvrstih (engl. *tight junctions*), pričvrstnih (engl. *adherens junctions*) i komunikacijskih (engl. *gap junctions*) spojeva. Čvrsti spojevi povezuju membrane susjednih stanica putem receptora kladina te stvaraju nepropusni ili polupropusni sloj kako bi spriječili protok molekula. Pronalazimo ih u epitelnim i endotelnim slojevima stanica (Steed i sur., 2010.). Komunikacijski spojevi omogućuju prijenos molekula i električnih signala između stanica, a tvore ih receptori koneksini. Možemo ih pronaći u mnogim stanicama u tijelu (Nielsen i sur., 2012.). Pričvrstni spojevi nalaze se gotovo u svim stanicama, a dijele se na veze stanice sa stanicom (engl. *cell-cell adhesion*) te stanice sa izvanstaničnim matriksom (engl. *cell-matrix adhesion*). Adherentni spojevi i dezmosomi povezuju stanice zajedno, a izgrađuju ih proteini kadherini (Pannekoek i sur., 2019.). Ostali pričvrstni spojevi povezuju stanice s različitim sastavnicama izvanstaničnog matriksa, a tvore ih proteini integrini. Spojevi posredovani integrinima, koje ćemo u daljnjem tekstu zvati adhezijama, dijele se na fokalne adhezije (nastaju iz manjih, nezrelih nascentnih adhezija), fibrilarne adhezije, hemidezmosome, podosome, invadopodije i retikularne adhezije (drugi naziv: klatrinom posredovane adhezije). Pokazana je dinamična i složena interakcija svih pričvrstnih spojeva u stanici. Za sad je poznato da sve ove adhezije, osim retkularnih, ostvaruju interakciju s citoskeletom stanice te sudjeluju u prijenosu mehaničkih sila, što omogućuje stanicama da osjete, procesiraju i odgovore na podražaje iz okoline (slika 1) (Zuidema i sur., 2020.).



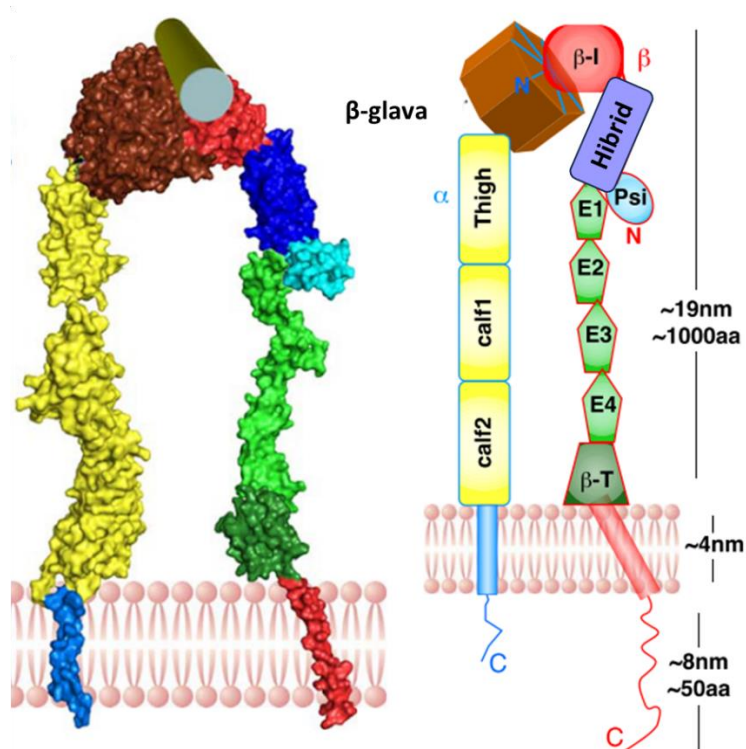
Slika 1. Prikaz adhezija u stanici, osnovnih proteina koji ih grade te njihove međusobne dokazane i pretpostavljene regulacije.

DSM-dezmosomi; AJ-adherentne veze; TEM-tetraspaninom obogaćene mikrodomene (engl. tetraspanin enriched microdomains); FA-fokalne adhezije, PDS-podosomi; CCAC-klatrinom posredovane adhezije (engl. clathrin containing adhesion complexes). Pune linije predstavljaju međusobnu regulaciju adhezija koja doprinosi pravilnoj raspodjeli mehaničkih sila u stanici. Isprekidane linije predstavljaju regulacije adhezija koje nisu dovoljno istražene (preuzeto iz Zuidema i sur., 2020. i dorađeno).

1.1.1. Integrini

Integrini su transmembranski heterodimerni glikoproteini otkriveni 1987. godine (Hynes, 1987.). U sisavaca predstavljaju glavnu skupinu receptora za stvaranje adhezija stanice sa izvanstaničnim matriksom ili drugim stanicama. Integrini su građeni od podjedinica α i β povezanih nekovalentnim vezama. U stanicama sisavaca možemo pronaći 18 α i 8 β podjedinica koje mogu tvoriti 24 različita heterodimera (Hynes, 2002.). Svi heterodimeri imaju jedinstvenu ulogu u stanicama, vežu se na različite ligande te se eksprimiraju na membranama stanica u različitim tkivima. Integrini su građeni od velike izvanstanične domene kojom se vežu na ligande u okolini stanice, spiralne transmembranske domene te kratke nestrukturirane citoplazmatske domene. Veličina podjedinica varira i većinom su građene od 750 do 1000 aminokiselina, a podjedinice α i β se značajno razlikuju u svojoj građi (Campbell i Humphries, 2011.). Podjedinica α se sastoji od četiri ili pet izvanstaničnih domena: β -glave (engl. *β -propeller head*), jedne domene pod nazivom *thigh* i dvije domene pod nazivom *calf*, a 9 podjedinica α ima i domenu α -I umetnutu između podjedinica β -glave. S druge strane, podjedinica β se sastoji od domene PSI (pleksin-

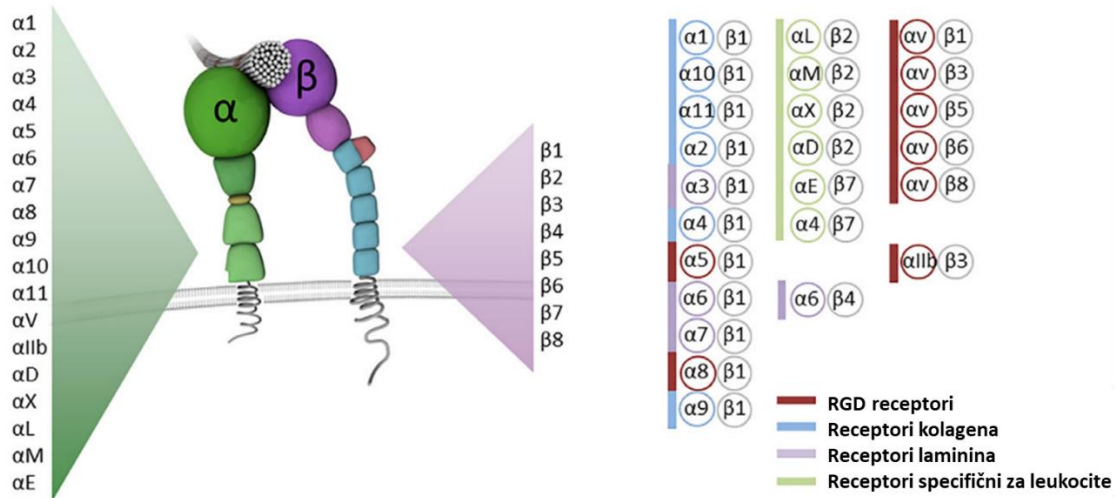
semaforin-integrin), hibridne domene u kojoj je umetnuta podjedinica β -I, četiri modula bogata cisteinom (domene E) te domene β -rep. Obje podjedinice sastoje se od transmembranskih domena te fleksibilnih citoplazmatskih domena (slika 2). Važno je napomenuti da podjedinica β ima gotovo dvostruko veću citoplazmatsku domenu, te konzervirane NPXY motive na koje se vežu aktivatori integrina, poput proteina talina i kindlina (Anthis i Campbell, 2011.).



Slika 2. Prikaz strukture integrinskih podjedinica α i β (preuzeto iz Anthis i Campbell, 2011. i doradeno).

Integrinske receptore možemo podijeliti u četiri osnovne skupine, ovisno o ligandu s kojim ostvaruju interakciju (slika 3): receptori laminina, receptori kolagena, receptori specifični za leukocite i receptori RGD koji se vežu na peptidni slijed arginin-glicin-aspartat (R-G-D) (Hynes i Naba, 2012.). Većina integrina nije konstitutivno aktivna, te se mogu nalaziti na membrani stanice u inaktivnoj formi u kojoj ne vežu ligande. Aktivacija integrina može se odvijati na dva načina, aktivacijom „izvana“ (engl. *outside-in*) te aktivacijom „iznutra“ (engl. *inside-out*). Aktivacija „izvana“ započinje vezanjem komponenti izvanstaničnog matriksa na izvanstaničnu domenu integrina čime se mijenja konformacija integrina. Posebno je važno vezanje proteina talina na integrinsku podjedinicu β što omogućuje vezanje aktinskog citoskeleta na talin kako bi se stvorila potrebna mehanička sila za stvaranje funkcionalne adhezije

(Chastney i sur., 2021.; Yue, 2014.). Suprotno tome, aktivacijom „iznutra“ signali iz stanice aktiviraju integrine i omogućuju stvaranje adhezije. Točnije, različiti kemokini u stanici potiču povezivanje proteina RIAM (engl. *Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*) s talinima. Vezanje aktiviranih talina i kindlina na citoplazmatski rep integrina nužno je za promjenu konformacije integrina iz zatvorene (engl. *bent-closed*), preko proširene zatvorene (engl. *extended-closed*), u otvorenu (engl. *extended-open*) konformaciju koja ima najveći afinitet za vezanje na izvanstanični matriks. Unatoč razlikama, obje aktivacije i prijenos signala provode se putem integrinske podjedinice β (Sun i sur., 2019.; Anthis i Campbell, 2011.). Nakon aktivacije integrina dolazi do nakupljanja većeg broja heterodimera i aktivacije niza signalnih puteva koji reguliraju proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i polaritet stanice (Humphries i sur., 2019.).



Slika 3. Prikaz vezanja integrinskih podjedinica α i β te grupiranje heterodimera integrina prema vezanju na sastavnice izvanstaničnog matriksa (preuzeto iz Arias-Mejias i sur., 2020. i dorađeno).

1.1.2. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) je kompleksna i dinamična struktura smještena između stanica na koju se stanice vežu adhezijskim molekulama. Prema studijama provedenim na uzorcima čovjeka i miša *in vivo* i *in silico*, 278 gena okarakterizirano je kao dio ECM-a, čineći 1 % ukupnog proteoma (Naba i sur., 2012.). Sastavnice ECM-a možemo podijeliti u dvije osnovne skupine: vlaknaste proteine i glikozaminoglikane. Vlaknastim proteinima pripadaju kolagen, fibronektin, elastin i laminin, dok su glikozaminoglikani hijaluronska kiselina, hondroitin sulfat, keratin sulfat i heparan sulfat.

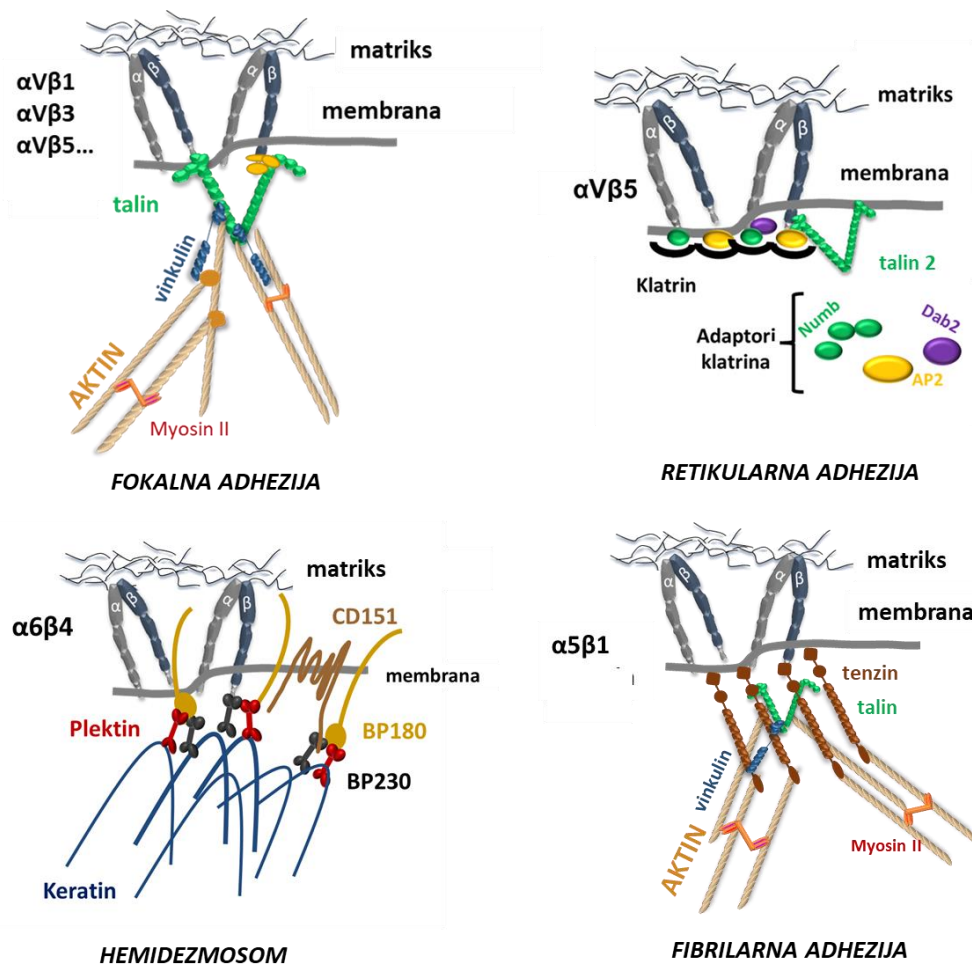
Organizacija ECM-a značajno se razlikuje u tkivima, od rijetkog i mekanog vezivnog tkiva pa sve do gusto pakiranih čvrstih bazalnih membrana. Primjerice, tetive imaju veliki udio kolagena I s malim udjelom drugih sastavnica, dok se u bazalnim membranama nalazi velika količina kolagena IV, laminina i perlekana. Osim toga, u ECM-u možemo pronaći različite enzime koji prerađuju matriks, poput kolagenaza i matriks metaloproteinaza (MMP), te raznovrsne faktore rasta (Huang i sur., 2021.). U organizmu možemo pronaći različite tipove organizacije ECM-a u prostoru poput „ravnog“ dvodimenzionalnog (2D) tipa, primjerice bazalne membrane, i trodimenzionalnog (3D) tipa kojeg pronalazimo u vezivnom tkivu i organima. Zadnje svojstvo prema kojem možemo razlikovati tipove ECM-a u organizmu su njihova mehanička svojstva poput čvrstoće, elastičnosti, poroznosti i umreženosti. Primjerice, ECM tumora je učestalo vrlo čvrst i rigidan u usporedbi sa zdravim tkivom, a ondje je prisutna i velika količina kolagena i hijaluronske kiseline (Geiger i Yamada, 2011.). Glavni „proizvođači“ ECM-a su fibroblasti u koštanoj srži, limfnim čvorovima i jajnicima te periciti koje pronalazimo u krvnim žilama. Osim u zdravom tkivu, fibroblasti u tumorima predstavljaju glavnu sastavnicu tumorskog mikrookoliša gdje, osim izlučivanja sastavnica ECM-a, reorganiziraju matriks izlučivanjem enzima poput MMP-a (MMP-2 i MMP-9) i lizil oksidaze. Unazad nekoliko godina ECM tumora je postao nova meta u liječenju pacijenata s ciljem smanjenja proliferacije i učinkovitosti migracije stanica tumora te angiogeneze, a pritom bez utjecaja na zdravo tkivo (Huang i sur., 2021.; Nazemi i Rainero., 2020.).

1.2. Integrinski adhezijski kompleks

Nakon aktivacije i nakupljanja integrina, na njihov citoplazmatski rep vežu se mnogi proteini stvarajući multimolekularni integrinski adhezijski kompleks (engl. *integrin adhesion complex*, IAC). IAC predstavlja vezu između ECM-a, integrina i citoskeleta stanice, a grade ga adaptorni proteini, signalni proteini te proteini koji se vežu na sastavnice citoskeleta, aktin, intermedijarne filamente ili mikrotubule. Svi proteini IAC-a, izvanstanični, membranski i citoplazmatski proteini zajedno tvore adhesom (Horton i sur., 2015., Winograd-Katz i sur., 2014.). Detaljne funkcionalne i morfološke analize definirale su glavne oblike IAC-a, a to su nascentne adhezije (NA), fokalni kompleksi (FC), fokalne adhezije (FA), fibrilarne adhezije (FB) (Humphries i sur., 2019.), hemidezmosomi (HD) (Walko i sur., 2015.), podosomi i invadopodiji (Murphy i Courtneidge, 2011.) te retikularne adhezije (RA) (slika 4) (Lock i sur., 2018.).

NA su prve adhezije koje se stvaraju na vodećem rubu migrirajuće stanice. Sastoje se od samo pedesetak integrina, imaju promjer manji od 0,5 μm i obogaćene su proteinima talinom, kindlinom, α -aktininom, kinazom fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) i paksilinom. Sazrijevanjem NA

nastaju veći FC, koji su za razliku od NA povezani s aktinskim citoskeletom. Povećana kontraktilnost aktinskog citoskeleta dovodi do sazrijevanja FC u FA, najbolje proučenu vrstu IAC-a. FA su dinamične, izdužene strukture veličine 2 – 5 μm , a nužne su za snažnu adheziju stanice na ECM te prijenos mehaničkih i kemijskih signala (Kanchanawong i Calderwood, 2023.). Vezanjem stanica putem integrina $\alpha 5\beta 1$ na fibronektin, čestu komponentu ECM-a, formiraju se FB, izdužene adhezije veličine 1 – 10 μm . FB uglavnom nastaju sazrijevanjem FA, nalaze se u sredini stanice, obogaćene su proteinom tenzinom te interagiraju s aktinskim citoskeletom (Burrige, 2017.). FB sudjeluju u remodeliranju fibronektina (engl. „*fibronectin fibrillogenesis*“) i doprinose stvaranju fibrila na koje se vežu druge komponente ECM-a, poput kolagena, fibrilina, fibulina i tenascina C. FB su osjetljive na mehaničke promjene u okolini, te povećanjem tvrdoće ECM-a dolazi do njihovog rasta (Barber-Pérez i sur., 2020.). Za razliku od FC i FA, koje su povezane s aktinskim citoskeletom, HD predstavljaju glavnu vezu integrina i intermedijarnih filamenata, a pronalazimo ih uglavnom u bazalnim epitelnim stanicama. Postoje dvije vrste HD, tipovi 1 i 2, a središnje komponente HD tipa 1 i 2 su integrin $\alpha 6\beta 4$ i plektin, dok su BP180 (kolagen XVII, engl. *bullous pemphigoid antigen 2*), BP230 (engl. *bullous pemphigoid antigen 1*) i CD151 prisutni u HD tipa 1 (Tadijan i sur., 2021.; Walko i sur., 2015.). HD se mogu stvarati u blizini FA, a njihova međusobna komunikacija putem mehaničkih podražaja i prijenosa signala regulira stabilnu adheziju i migraciju stanica (Zuidema i sur., 2020.). Druge dvije vrste IAC-a su podosomi i invadopodiji, male prstenaste adhezije veličine do 2 μm formirane oko dijelova aktinskog citoskeleta, čime ga povezuju sa staničnom membranom. Invadopodiji se formiraju uglavnom u invazivnim tumorskim stanicama, a podosomi u zdravim stanicama, primjerice u mišićnim i endotelnim stanicama. Grade ih proteini karakteristični za FA i FB uz regulatore aktina poput proteina Arp 2/3 (engl. *actin related protein 2/3*) i (N)-WASP (engl. *neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*) (Kanchanawong i sur., 2023.; Murphy i Courtneidge, 2011.). RA predstavljaju nedavno otkrivenu netipičnu vrstu adhezija posredovanu integrinom $\alpha V\beta 5$. RA nastaju kao posljedica zaustavljene endocitoze, pod uvjetima male stanične površinske napetosti. Za razliku od FA, RA nisu vezane na aktinski citoskelet te opstaju tijekom cijelom staničnog ciklusa omogućavajući učinkovitu diobu stanice (Lock i sur., 2018.).



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz osnovnih sastavnica FA, FB, RA i HD (vlastiti prikaz).

Unutar stanice, proteini adhesoma mogu se podijeliti u četiri grupe organizirane oko četiri međusobno povezane funkcionalne osi, a to su grupe ILK-PINCH-parvin-kindlin (IPP kompleks), FAK-paksilin, talin-vinkulin i α -aktinin-ziksin-VASP (Kanchanawong i Calderwood, 2023.; Humphries i sur., 2019.). Glavni proteini IPP kompleksa su kinaza vezana na integrine (engl. *integrin-linked kinase*, ILK), njezini vezni partneri adaptorni proteini PINCH 1 ili 2 (engl. *interesting new cysteine-histidine-rich protein*) te parvini α , β i γ koji se vežu na aktin (Kadry i Calderwood, 2020.). Iako je ILK klasificirana kao serin/treonin kinaza, istraživanja strukture proteina upućuju da ILK nema funkcionalnu katalitičku domenu te mehanizam prijenosa signala nije poznat (Górska i Mazur, 2022.). IPP kompleks veže druge adaptorne proteine poput kindlina 1, 2 i 3, koji se izravno vežu na citoplazmatski rep integrinske podjedinice β i aktiviraju integrine (Sun i sur., 2019.). Drugu os čine centralna tirozin kinaza FAK i paksilin. Nakon

autofosforilacije, FAK fosforilira paksilin koji predstavlja sidrište za vezanje adaptornih i proteina koji se vežu na aktin (López-Colomé i sur., 2017.; Sulzmaier i sur., 2014.). Talini 1 i 2 su adaptorni proteini treće osi koji se nakon dimerizacije izravno vežu na citoplazmatski rep integrinske podjedinice β i potiču aktivaciju integrina. Veliki broj domena talina veže aktin te vinkulin, adaptorni protein odgovoran za prijenos sile od talina do aktinskog citoskeleta (Gough i Goult, 2018.). Zadnju os čine proteini koji se vežu na aktin, α -aktinini 1 i 4 (Sjöblom i sur., 2008.) te fosfoproteini ziksin i VASP (engl. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) (Legerstee i sur., 2019.) koji su uključeni u organizaciju aktinskog citoskeleta.

1.2.1. Istraživanje integrinskog adhezijskog kompleksa

Sposobnost stanice da osjeti, veže i mijenja ECM ključna je za regulaciju oblika stanice, odgovora na mehaničke podražaje, prijenos signala i kretanje. Od prve karakterizacije adhezije stanica na ECM 1970-ih godina, proveden je niz biokemijskih, biofizičkih i bioloških istraživanja s ciljem određivanja sastava adhezija, organizacije molekula i prijenosa signala (Chastney i sur., 2021.; Bachmann i sur., 2019.). S obzirom na njihovu dinamičnu i nestabilnu prirodu, izolacija IAC-a bez dodatnog nepoželjnog materijala iz stanice nije u potpunosti moguća. Plopper i Ingber (1993.) objavili su prvu metodu izolacije IAC-a koristeći magnetne kuglice obložene fibronektinom ili RGD-peptidom (najviše istraženim peptidom za vezanje integrina $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta6$, $\alpha\beta8$ i $\alpha\beta1$), kako bi potaknuli vezanje stanica i stvaranje IAC-a. Izolaciju su proveli 15 – 30 minuta nakon dodatka kuglica u suspenziju stanica te su prvi dobili uzorke obogaćene proteinima adhesoma bez ostalih proteina stanice. Uzorke su analizirali metodom natrij-dodecil sulfat elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) i metodom western blot (WB). Humphries i sur. (2009.) unaprijedili su prethodno opisanu metodu kako bi izolirane proteine uspješno analizirali spektrometrijom masa (MS). Nakon dodatka magnetnih kuglica obloženih fibronektinom u suspenziju stanica eritroleukemije čovjeka K562, izložili su suspenziju djelovanju kemijskog umreživača dimetil 3,3'-ditiobispropionimidata (DTBP) kako bi stabilizirali dinamičnu strukturu IAC-a te povećali uspješnost vezanja i izolacije željenih proteina. Umrežavanje je zaustavljeno dodatkom Tris-HCl pufera, a stanice su lizirane neionskim deterdžentima i primjenom ultrazvuka. Dodatno poboljšanje izdvajanja IAC-a postignuto je u radu Schiller i sur. (2011.), gdje je korištena modificirana metoda izdvajanja IAC-a bez upotrebe magnetnih kuglica. IAC-i su izolirani iz stanica fibroblasta miša nasađenih na Petrijeve zdjelice obložene fibronektinom. Autori su stanice umrežavali pomoću ditiobis sukcinimidil propionata (DSP) i 1,4-Bis [3-(2-piridilditio) propionamido] butana (DPDPB) tijekom 30 minuta. Umrežavanje su zaustavili dodatkom Tris-HCl pufera (pH 7,5), a stanice

lizirali dodatkom pufera RIPA (engl. *radioimmunoprecipitation assay*), te su na kraju isprali Petrijeve zdjelice pod jakim mlazom vodovodne vode kako bi se uklonili svi neumreženi proteini. Umrežene proteine IAC-a eluirali su dodatkom pufera koji sadrži reducirajući agens ditioneitol (DTT). Ovom metodom, Schiller i sur. (2013.) analizirali su IAC stanica fibroblasta bubrega miša koji ekspimiraju integrine $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ i $\alpha V\beta 5$ kako bi istražili razlike u vezanju različitih integrina za fibronektin.

Kuo i sur. (2011.; 2012.) predstavili su drugačiji pristup istraživanju proteina adhesoma fibroblasta prepucija čovjeka (engl. *human foreskin fibroblast cells*, HFF) uzgajanih na fibronektinu. Stanice su lizirali hipotoničnim šokom, a proteine adhesoma, vezane na podlogu, skupili su u puferu RIPA s dodatkom deterdženta SDS. Fibronektin i aktin su iz uzoraka uklonili imunoprecipitacijom pomoću specifičnih protutijela. Zanimljivo je da su, osim izolacije i analize uzoraka IAC-a metodom MS, proteine adhesoma u liziranim stanicama analizirali i metodom imunofluorescencije, tako da su stanice fiksirali nakon hipotoničnog šoka i obojili specifičnim fluorescentno obilježenim protutijelima. Istom metodom Huang i sur. (2014.) analizirali su sastav IAC-a mezenhimalnih matičnih stanica MSC-3A6, dok su Yue i sur. (2014.) analizirali sastav IAC-a stanica kože čovjeka HaCaT, ali iz neobloženih Petrijevih zdjelica. Ng i sur. (2014.) izolirali su IAC-e iz stanica HFF nakon izlaganja nokodazolu, inhibitoru polimerizacije mikrotubula, koristeći sličan pristup kao i Schiller i sur. (2011.), a kao umreživač su koristili DTBP. Nadalje, koristeći ovu metodu, Robertson i sur. (2015.) izolirali su IAC-e iz stanica melanoma čovjeka A375 nasađenih na fibronektin te su analizirali proteine i fosfoproteine adhesoma koristeći MS.

Jones i sur. (2015.) objavili su dva protokola za izolaciju IAC-a temeljena na prethodno spomenutim pristupima. Prvi protokol uključuje korištenje obloženih magnetnih kuglica za izolaciju IAC-a iz stanica koje rastu u suspenziji. Drugi protokol se temelji na izolaciji IAC-a iz stanica nasađenih na zdjelice obložene proteinima ECM-a, koje se potom izlažu djelovanju kemijskog umreživača, liziraju te se neumreženi proteini ispiru jakim mlazom vodovodne vode, a proteini adhesoma se struganjem skupljaju u otopinu s velikom količinom DTT-a i SDS-a. Koristeći drugi protokol, Horton i sur. (2016b.) izolirali su IAC-e iz stanica HFF s ciljem određivanja uloge proteina FAK, dok su Ajeian i sur. (2016.) izolirali IAC-e iz mezenhimalnih matičnih stanica uzgajanih na fibronektinu i poli-D-lizinu. Nasađivanjem stanica na određene komponente ECM-a unaprijed se odabiru integrini kojima će stanica stvoriti adhezije. Stoga pristup u kome se izoliraju IAC-i iz stanica uzgajanih na neobloženim Petrijevim zdjelicama omogućuje da stanice tijekom višednevnog uzgoja u kulturi same izluče proteine ECM-a i na njih se vežu. Na ovaj način pristupilo se izdvajanju adhezija u više vrsta stanica, primjerice stanica osteosarkoma U2OS, što je dovelo do otkrića RA (Lock i sur., 2018.), te stanica melanoma čovjeka MDA-MB-435S u kojima su osim FA, primjećene i RA (Paradžik i sur., 2020.). Isti pristup korišten je i za analizu IAC-a karcinoma pločastog

epitela jezika Cal27, koje za adheziju preferencijalno koriste HD, iako je pokazano da stvaraju i FA (Tadijan i sur., 2021.). Slično je pokazano i u stanicama dukalnog adenokarcinoma gušterače SUIT-2 (Humphries i sur., 2022.). Ovaj pristup izolacije proteina adhesoma i analiza tako dobivenih uzoraka pomoću metoda SDS-PAGE i WB, pokazao se vrlo pogodnim za analizu promjena u sastavu FA nakon utišavanja pojedinih proteina adhesoma u stanicama melanoma čovjeka MDA-MB-435S, što je nemoguće učiniti analizom ukupnih staničnih proteina (Lončarić i sur., 2023.).

Objavljeni podaci o proteinima adhesoma u različitim staničnim modelima uzgajanim na fibronektinu (Jones i sur., 2015.; Robertson i sur., 2015.; Ng i sur., 2014.; Schiller i sur., 2013.; Kuo i sur., 2012.; Schiller i sur., 2011.; Humphries i sur., 2009.) omogućili su bioinformatičku analizu tih rezultata i definiranje adhesoma. Predstavljeno je 2412 proteina „meta adhesoma“ induciranog vezanjem stanica na fibronektin, a dodatnim odabirom identificirano je 60 najučestalijih proteina koji tvore „konsenzualni adhesom“ (Horton i sur., 2015.). S obzirom na to da je konsenzualni adhesom određen u stanicama uzgajanim na fibronektinu, njegov sastav odgovara adhesomima fibronektinskih receptora $\alpha\beta3$ i $\alpha5\beta1$ (Horton i sur., 2016a., Robertson i sur., 2015., Ng i sur., 2014.).

Iako metode izolacije i analize sastava adhesoma metodom MS pružaju uvid u sastav IAC-a, njihovim korištenjem ne mogu se odrediti interakcije pojedinih proteina. Kako bi se razumjela organizacija i regulacija kompleksa, nekoliko grupa započelo je koristiti MS u sprezi s metodom identifikacije interakcija pomoću biotinizacije ovisne o međusobnoj blizini proteina (engl. *proximity-dependent biotin identification*, BioID) (Chastney i sur., 2020.; Myllymäki i sur., 2019.; Dong i sur., 2016.). U metodi se kao mamac koriste proteini čije se interakcije istražuju, fuzionirani s biotin ligazom. Biotin ligaza je enzim koji, uz dodatak biotina u hranjivu podlogu za uzgoj stanica, biotinizira proteine u neposrednoj blizini mamca (15 – 25 nm). Na ovaj način uspješno se mogu pretpostaviti bliske interakcije proteina (Humphries i sur., 2019.). Korištenjem višestruke BioID metode, tj. obilježavanjem većeg broja proteina adhesoma, mogu se dobiti mape čijom se analizom mogu s većom točnošću pretpostaviti interakcijski partneri i odnosi između proteina. Primjerice, Chastney i sur. (2020.) predstavili su rezultate BioID analize čak 16 proteina adhesoma od kojih je svaki bio dio jedne od četiri organizacijske osi adhesoma, primjerice vinkulina, paksilina, kindlina i ziksina.

Osim klasičnim metodama molekularne i stanične biologije kao što su imunofluorescencija i rjeđe korištena koimunoprecipitacija, te karakterističnim metodama izolacije ili obilježavanja proteina adhesoma, adhezije se mogu proučavati i metodama biofizike. S obzirom na svoju dinamiku te svojstvo prijenosa i odgovora na mehaničke podražaje, adhezije možemo proučavati koristeći super-rezolucijsku mikroskopiju, mikroskopiju živih stanica s fluorescentno obilježenim proteinima adhesoma (engl. „*Single-*

molecule tracking“), fotoaktivaciju fluorescentno obilježenih proteina u živim stanicama (engl. „*Fluorescent recovery upon fotoactivation*“), mikroskopiju atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*), metodu magnetske pincete (engl. *magnetic tweezers*) i slične metode (Tapia-Rojo, 2024.; Kanchanawong i Calderwood, 2023.).

1.3. Fokalne adhezije

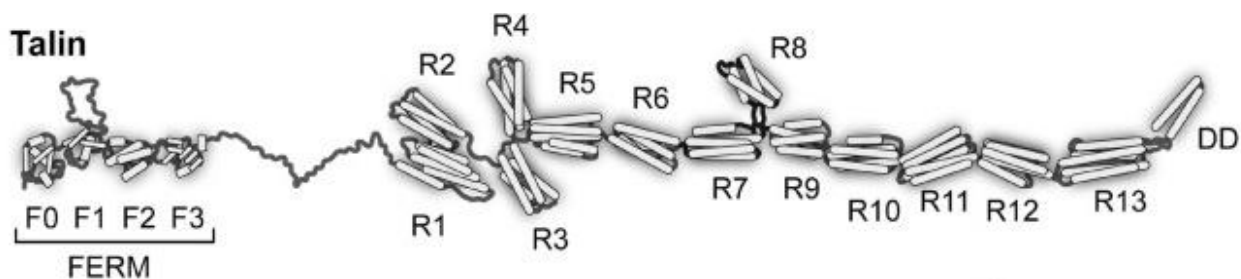
FA su prvi put uočene 1971. godine elektronskom mikroskopijom (Abercrombie i sur., 1971.) i od tada su najviše istraživana vrsta IAC-a, a uključene su u pretvorbu izvanstaničnih kemijskih i mehaničkih signala u biokemijske signale (Geiger i Yamada., 2011.). Kao što je već spomenuto, FA nastaju sazrijevanjem manjih adhezijskih struktura, NA i FC, sastavljenih od svega nekoliko proteina adhesoma, poput integrina, talina, paksilina, kindlina i α -aktinina, a formiraju se na lamelipodijima na vodećem rubu stanice. Integrini koji mogu stvarati NA, FC i FA su $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alpha9\beta1$, $\alpha11\beta1$, $\alphaV\beta1$, $\alphaV\beta3$, $\alphaV\beta5$, $\alphaV\beta6$ i $\alphaV\beta8$ (Mishra i Manavathi, 2021.). Ključan korak u sazrijevanju adhezija u FA je vezanje aktinskog citoskeleta i miozina II, koji potiču prijenos mehaničke sile na proteine adhezije te uzrokuju konformacijske promjene adaptornih proteina, posebice talina, što dovodi do vezanja drugih sastavnica FA, primjerice proteina PINCH 1/2 i ziksina (Mishra i Manavathi, 2021.; Burridge, 2017.). Aktinska vlakna vezana s FA nazivaju se stresna vlakna i predstavljaju posebnu strukturu sastavljenu od usnopljenog filamentoznog aktina (F-aktin) vezanog na kontraktilne filamente miozina II. F-aktin nastaje polimerizacijom monomera globularnog aktina (G-aktina). F-aktin je polariziran, tj. ima tzv. plus i minus krajeve, što je važno prilikom umrežavanja vlakana te za određivanje smjera kretanja miozina (Cooper, 2000.). Stresna vlakna se uglavnom sastoje od 10 do 30 aktinskih filamenata usnopljenih proteinima koji se vežu na aktin poput α -aktinina, filamina i fascina (Legerstee i Houtsmuller, 2021.; Truong i sur., 2015.; Elkhatib i sur., 2014.; Ciobanasu i sur., 2012.) Mehanička sila nastaje kretanjem filamenata miozina po aktinskim vlaknima, što rezultira kontrakcijama u FA. Poznate su četiri vrste stresnih vlakana; ventralna stresna vlakna koja su povezana s FA na oba kraja; dorzalna stresna vlakna koja su povezana s FA na jednom kraju i protežu se do jezgre stanice; kortikalna stresna vlakna koja su vezana s FA na oba kraja, ali su značajno kraća i manje kontraktilna od ventralnih vlakana i perinuklearna stresna vlakna koja se protežu kroz cijelu stanicu, prolazeći preko jezgre, a povezana su s FA i jezgrinom ovojnicom (Lehtimäki i sur., 2021.). Ventralna stresna vlakna protežu se kroz cijelu stanicu, a na stražnjem dijelu imaju glavnu ulogu u kontraktilnosti i pokretanju stanice. Dorzalna stresna vlakna nastaju polimerizacijom aktina vezanog s FA na rubu stanice, pojavljuju se prilikom kretanja stanice i stvaranja novih adhezija te prenose mehaničke

podražaje od FA u cijelu stanicu. Kortikalna stresna vlakna nastaju neovisno o postojećim vlaknima i nalaze se ispod jezgre, dok se perinuklearna vlakna nalaze iznad jezgre i pretpostavlja se da im je glavna uloga prijenos jezgre i zadržavanje njenog oblika tijekom migracije stanice (Lehtimäki i sur., 2021.; Tojkander i sur., 2012.).

FA su dinamične strukture i njihov sastav se mijenja ovisno o signalima u okolini stanice. Mnogi proteini su regulirani fosforilacijom ili mehaničkim podražajima, a učestala izmjena proteina nužna je za migraciju stanica, a posebice za pravilan prijenos različitih signala (Tang i sur., 2018.; Zamir i Geiger, 2001.). Važnu ulogu u izmjeni proteina u FA imaju mikrotubuli koji prenose sastavnice FA koje se brzo izmjenjuju (Ng i sur., 2014.). Mikrotubuli su filamentozni polimeri koji nastaju vezanjem monomera α i β -tubulina u takozvane protofilamente. Vezanjem 13 protofilamenata u cilindričnu strukturu nastaju mikrotubuli, koji, poput F-aktina, imaju svoj plus i minus kraj (Muroyama i Lechler, 2017.). Postranslacijske modifikacije mikrotubula, kao i njihova gustoća i životni vijek uvelike ovise o dinamici na plus kraju. Upravo se plus krajem mikrotubuli pričvršćuju u blizini stanične membrane i FA te posreduju prijenos različitih molekula i vezikula u stanici (Meiring i sur., 2020.). FA omogućuju stabilizaciju mikrotubula u blizini stanične membrane vezanjem na proteine kortikalnog kompleksa za stabilizaciju mikrotubula (engl. *cortical microtubule stabilizing complex*, CMSC). CMSC grade proteini liprin α i β (Astro i sur., 2016.), ELKS (protein bogat aminokiselinama E, L, K i S) (Hida i sur., 2010.), kinezin KIF21A (van der Vaart i sur., 2013.), EB1 (engl. *end-binding*) koji se veže na rastući vrh mikrotubula, CLASP (engl. *cytoplasmic linker associated protein 1*), LL5 β (engl. *pleckstrin homology like domain family B member 2*) (Lansbergen i sur., 2019.) i KANK (engl. *KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein*). Pokazano je da se KANK iz CMSC-a direktno veže na domenu R7 talina iz FA putem domene KN i tako stvara vezu F-aktina i mikrotubula. Mutacije u veznim mjestima proteina talina i KANK dovode do prekida veze CMSC-a i FA (Bouchet i sur., 2016).

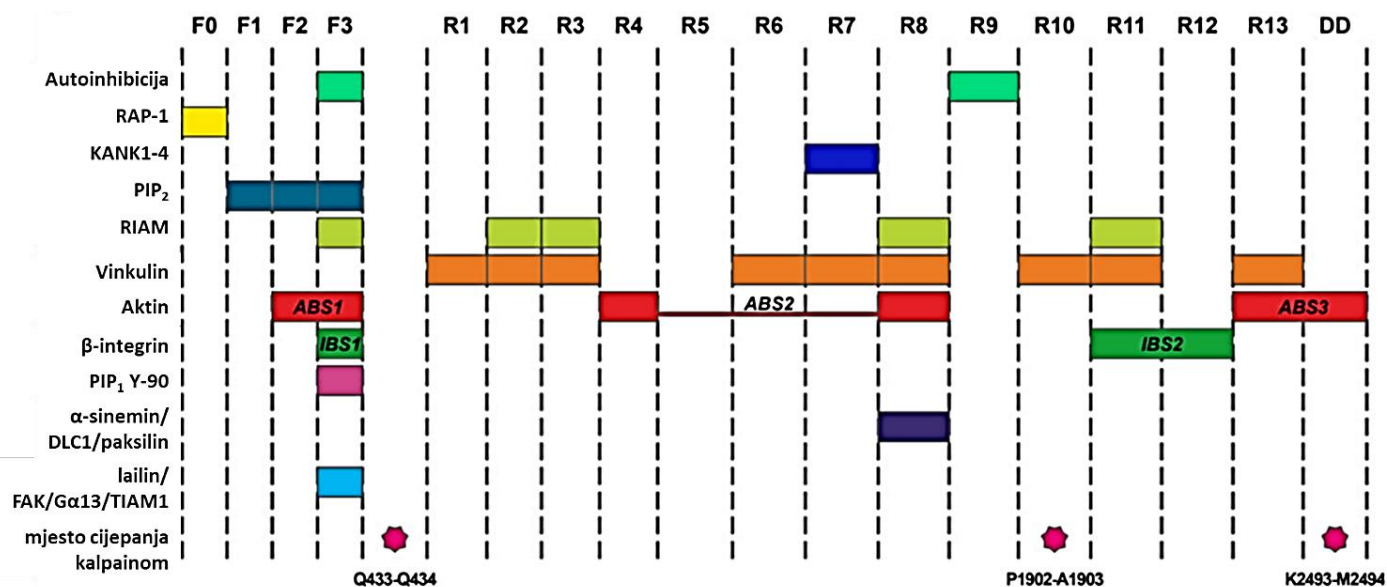
1.3.1. Talin

Talin je veliki adaptorni protein FA, otkriven 1983. godine (Burrige i Connell, 1983.). Talin se sastoji od atipične N-terminalne domene FERM (4.1. protein, ezrin, radiksin i moesin), građene od četiri poddomene (F0-F3), koja je povezana putem kraće vezujuće domene na veliku štapičastu domenu (engl. *rod*) koja se sastoji od 13 poddomena (R1-R13). Na kraju štapičaste domene nalazi se poddomena odgovorna za dimerizaciju dvije molekule talina (slika 5) (Gough i Goult, 2018.).



Slika 5. Građa proteina talina (preuzeto iz Goult, 2021.).

Glavna uloga domene FERM je vezanje i posljedična aktivacija integrinske podjedinice β putem poddomene F3 (Shattil i sur., 2010.). Štapićasta domena talina sastoji se od 2000 aminokiselina i 62 α -heliksa. Poddomene štapićaste domene imaju prilično različitu strukturu i posljedično vežu različite interakcijske partnere (slika 6) (Goult i sur., 2013.).



Slika 6. Prikaz veznih partnera talina i domena talina s kojima se vežu.

RAP-1 (engl. Ras related protein 1); *PIP₂*-fosfatidilinozitol- 4,5-difosfat; *DLC1-Rho GTPazni aktivator 1*, engl. *deleted in liver cancer 1*; *Gα13-G-protein*; *TIAM1-Rac1 specifični gvanin nukleotidni izmjenjujući faktor*; *ABS*-engl. *actin binding site*; *IBS*-engl. *integrin binding site* (preuzeto iz Gough i Goult, 2018. i dorađeno).

Kod kralježnjaka možemo razlikovati dva homologa talina, talin 1 i talin 2. Ti proteini imaju 76% identične proteinske sljedove i veliki broj veznih partnera, kao što je citoplazmatski rep integrinske

podjedinice β (Gough i Goult, 2018.), kindlin (Lu i sur., 2022.), vinkulin (Carisey i sur., 2013.) i KANK (Bouchet i sur., 2016.). Zanimljivo je da su talin 1 i 2 strukturno gotovo identični, ali postoje razlike u aminokiselinskom slijedu poddomena. Primjerice, F2 (86 %), F3 (89 %) i R13 (92 %) su u velikoj mjeri konzervirane poddomene između homologa, vjerojatno zbog svoje važne uloge u formiranju FA. Isto tako, poddomene R7 i R8 oba talina sadrže motiv LD (leucin-aspartat) za vezanje proteina, te su njihove vezne površine identične. Proteini KANK1 i KANK2 ostvaruju interakciju s domenom R7, dok RIAM i DLC1 vežu domenu R8. S druge strane, ostale poddomene se međusobno značajno razlikuju, a najviše se od ostalih razlikuje domena R5 (60 %) (Gough i Goult, 2018.).

Talin 1 možemo pronaći u svim stanicama u organizmu, a talin 2 uglavnom pronalazimo u mišićnim stanicama, stanicama moždane kore i fibroblastima (Thul i sur., 2017.). Iznenaduje da je talin 1 pronađen u FA i podosomima, a talin 2 u FA, FB i invadopodijima gdje je neophodan za stvaranje vučne sile i degradaciju ECM-a (Qi i sur., 2016.; Praekelt i sur., 2012.). Njihova uloga u stanicama nije jednaka. Primjerice, genska delecija (engl. *knockout*) talina 1 u fibroblastima (Zhang i sur., 2008.) i miocitima miša (Manso i sur., 2017.) mijenja adheziju i morfologiju stanica. Osim toga, genska delecija talina 1 dovodi do smrti miševa (Qi i sur., 2016.; Monkley i sur., 2000.), dok genska delecija talina 2 nije znatno utjecala na preživljenje miševa (Debrand i sur., 2012.; Monkley i sur., 2001.). Zanimljivo je spomenuti da su Manso i sur. (2017.) pokazali da gubitak talina 2, dominantne izoforme u miocitima, nije utjecao strukturno ni funkcionalno na srca miševa zbog kompenzatornog povećanja razine talina 1 i integrina $\beta 1$. Unatoč tome, treba napomenuti da talin 1 nije uspio u potpunosti nadomjestiti talin 2 te održati povećanu razinu integrina, jer je poznato da talin 2 ima veći afinitet vezanja za citoplazmatski rep podjedinice integrina $\beta 1$ (Manso i sur., 2017., Yuan i sur., 2017.).

Iduća važna razlika između dva homologa talina je u ulozi u proliferaciji stanica te je vjerojatno da njihova uloga ovisi o vrsti stanica u kojoj se istražuje. Smanjena količina talina 1 u endotelnim stanicama miša dovodi do smanjene proliferacije (Pulous i sur., 2021.), a u stanicama glatkih mišića značajno povećava staničnu proliferaciju i učinkovitost migracije (Wei i sur., 2017.). Sakamoto i sur. (2010.) pokazali su da u stanicama karcinoma prostate DU145 gubitak talina 1 onemogućuje stvaranje adhezija i posljedično dovodi do stanične smrti. U stanicama osteosarkoma čovjeka U2OS pokazana je interakcija između talina 1 i kinaze-1 ovisne o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK1), ključnog regulatora staničnog ciklusa, odnosno regulacije IAC-a i staničnog citoskeleta tijekom mitoze (Gough i sur., 2021).

Talini imaju specifične uloge, ovisno o vrsti tumorskih stanica, u njihovoj pokretljivosti, preživljenju i odgovoru na terapiju. U stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazano je da smanjena količina talina 1 povećava osjetljivost stanica na protutumorski lijek docetaksel (Singel i sur., 2013.), dok

je utišavanje talina 2 u istim stanicama smanjilo proliferaciju i učinkovitost migracije te potaknulo apoptozu (Wen i sur., 2019.; Li i sur., 2017.). Oba talina povezana su s razvojem malignih obilježja kod stanica hepatocelularnog karcinoma MHCC-97 L (Fang i sur., 2016.). S druge strane, talin 2 je smanjeno prisutan u uzorcima pacijenata i stanicama karcinom bubrega Caki-1, A-498, 786-O, ACHN te njegova povećana razina inhibira stanični rast i metastaziranje (Cai sur., 2022.).

1.3.2. KANK

Između mnogobrojnih veznih partnera talina istaknuti ćemo proteine iz obitelji KANK. Obitelj KANK sastoji se od četiri evolucijski očuvana proteina (KANK1 – 4) nastalih duplikacijom gena (Tadijan i sur., 2020.; Pan i sur., 2017.). Pokazano je da je ekspresija proteina KANK stanično specifična, pa tako KANK1 možemo pronaći u epitelnim stanicama, KANK2 i KANK4 su uglavnom eksprimirani u mezenhimalnim stanicama, dok KANK3 nalazimo isključivo u endotelnim stanicama krvnih i limfnih žila (Guo i sur., 2021.). Proteini KANK građeni su od tri domene, N-terminalne domene KANK (KN), domene smotane zavojnice (engl. *coiled-coil*, CC) čija dužina i sastav varira ovisno o kojem je proteinu KANK riječ (slika 7) i domene s ankirinskim ponavljajućim sljedovima (engl. *ankyrin repeat domain*, ANKRD) koja se sastoji od pet ponavljajućih sljedova (Chen i sur., 2018.; Kakinuma i sur., 2009.).

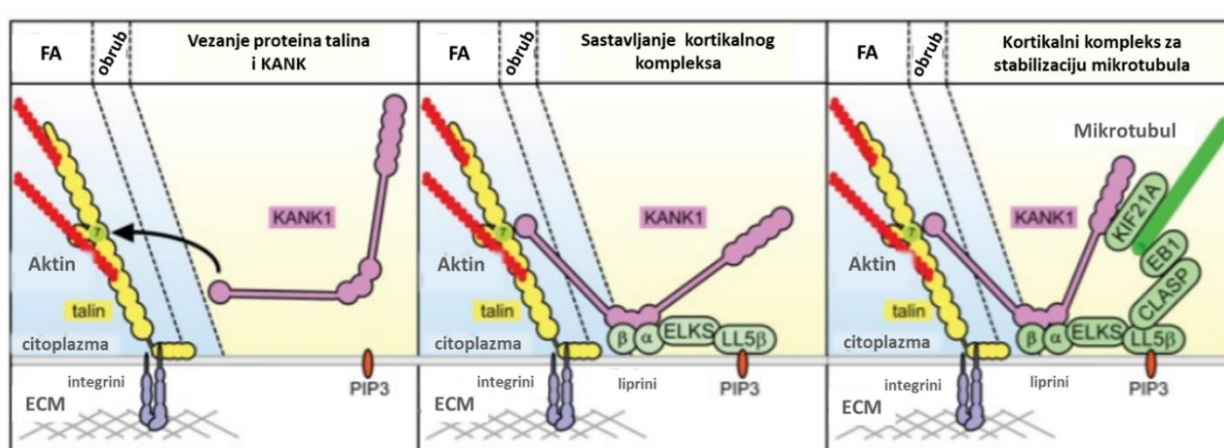


Slika 7. Razlike u strukturi proteina KANK. Brojevi predstavljaju domene CC, dok pravokutnici (A0-A5) predstavljaju domene ANKRD (preuzeto iz Tadijan i sur., 2020.).

Proteini KANK (osim KANK4) ostvaruju interakciju s CMSC-om vezanjem na liprin β 1 putem svoje domene CC. Proteini KANK povezuju liprin s obrubom (engl. *belt*) FA vezanjem na domenu R7 talina putem domene KN, što potiče vezanje ostalih sastavnica CMSC i dovodi mikrotubule u blizinu integrina (slika 8) (Sun i sur., 2016.; Bouchet i sur., 2016.). Interakcija proteina talina i KANK ključna je u međusobnoj

komunikaciji aktina i mikrotubula, o čemu će više riječi biti u poglavlju 1.3.3. Uistinu, KANK1 i 2 su pronađeni u obrubu FA posredovanih integrinom $\beta 1$, ali ne i u središtu FA (Stubb i sur., 2019.). Zanimljivo je spomenuti da je KANK1 pronađen i u jezgri gdje je uključen u unos β -katenina (Wang i sur., 2006.).

Osim što povezuju mikrotubule s FA, proteini KANK uglavnom negativno reguliraju polimerizaciju aktinskih vlakana putem Rho GTPaza Rho1 i Rac1 (engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). Primjerice, KANK1 nakon fosforilacije kinazom Akt inhibira aktivnost RhoA pomoću proteina 14-3-3 u stanicama bubrega embrija čovjeka HEK-293 i fibroblastima embrija miša (Kakinuma i sur., 2008.). Isto tako, KANK1 može inhibirati Rac1 vezanjem na supstrat inzulinskog receptora 53 (engl. *insulin receptor substrate 53*, IRSp53) i tako spriječiti stvaranje lamelipodija i širenje stanice (Roy i sur., 2009.). S druge strane, KANK2 je pronađen u kompleksu s regulatorom Rho GTPaza RhoGDI (engl. *Rho GDP-dissociation inhibitor 1*), te je smanjenje njegove ekspresije povećalo aktivnost Rho proteina u podocitima (Asano-Matsuda i sur., 2021.; Allison, 2015.). Rafiq i sur. (2019.) pokazali su da utišavanje proteina KANK1 ili KANK2 dovodi do povećanja FA i raspada podosoma. U tom je članku pokazano da utišavanjem proteina KANK dolazi do prekida veze FA i mikrotubula i oslobađanja proteina GEF-H1 (engl. *guanine nucleotide exchange factor H1*) s mikrotubula, koji tada aktivira signalni put Rho/ROCK (engl. *Rho-associated coiled-coil containing kinase*) i potiče nakupljanje filamenata miozina II, a time i rast stesnih vlakana i FA.



Slika 8. Prikaz stvaranja veze između FA i CMSC putem proteina KANK (preuzeto iz Bouchet i sur., 2016. i dorađeno).

Genetske studije obitelji proteina KANK potvrdile su njihovu važnu ulogu u fiziologiji i bolesti bubrega. Osim mutacija u proteinu KANK1, koje potiču tumorigenezu stanica bubrega (Sarkar i sur., 2002.), recesivne mutacije u genima čovjeka za KANK1, KANK2 i KANK4 povezane su s nefrotskim sindromom (Gee i sur., 2015.; Zhu i sur., 2008.). Delecija gena za KANK1 povezana je s neurodegenerativnim

bolestima, kao što su cerebralna paraliza, kvadriplegija i autizam, u studiji provedenoj na četiri generacije obitelji (Vanzo i sur., 2013.; Lerer i sur., 2005.). Kod modelnog organizma *Caenorhabditis elegans*, gubitak ortologa KANK, VAB-19, uzrokuje višestruke abnormalnosti, uključujući defekte prilikom rasta aksona i stvaranje praznina u bazalnoj membrani tijekom razvoja vulve (Ihara i sur., 2011.; Ding i sur., 2003.). Zaključno, ova opažanja ukazuju na široku uključenost proteina KANK u razvoj organizma (Guo i sur., 2021.).

Do sada je većinom istraživana uloga proteina KANK u razvoju tumora, prvenstveno s fokusom na KANK1 i njegovu ulogu tumorskog supresora (Fan i sur., 2020.; Chen i sur., 2017.; Sarkar i sur., 2002.). Pokazano je da KANK1 sudjeluje u regulaciji epitelno-mezenhimalne tranzicije, a njegovo utišavanje može smanjiti apoptozu, povećati pokretljivost stanica i razviti otpornost na protutumorski lijek paklitaksel u stanicama adenokarcinoma pluća A549 (Pu i sur., 2020.), dok je povećana ekspresija KANK1 u karcinomu dojke povezana s boljim ishodima liječenja pacijentica (Kariri i sur., 2020.). Smanjenje količine proteina KANK1 u stanicama karcinoma vrata maternice HeLa, te smanjenje količine proteina KANK1 i 2 u podocitima miša, uzrokovalo je smanjenu učinkovitost migracije stanica (Bouchet i sur., 2016; Gee i sur., 2015.). U stanicama melanoma MDA-MB-435S, smanjenje količine proteina KANK2 povećava osjetljivost stanica na protutumorski lijek paklitaksel i dovodi do smanjenja učinkovitosti migracije stanica (Paradžik i sur., 2020.). KANK3 se smatra mogućim tumorskim supresorom jer je smanjena razina KANK3 povezana sa smanjenim preživljenjem u šest od deset proučavanih tipova tumora, primjerice hepatocelularnog karcinoma i karcinoma prostate. Međutim, nije pronađena korelacija između ekspresije mRNA (engl. *messenger RNA*) KANK2 i preživljenja pacijenata u deset proučavanih tipova tumora (Kim i sur., 2018.; Leszczynska i sur., 2015.).

1.3.3. Međusobna komunikacija (engl. *crosstalk*) aktina i mikrotubula

U životinjskim stanicama citoskelet se sastoji od tri filamentozne sastavnice: mikrotubula, aktinskih filamenata i intermedijarnih filamenata. Sve tri sastavnice doprinose održavanju stanične morfologije, organizacije citoplazme i stabilizacije uslijed djelovanja mehaničkih sila. Unazad nekoliko godina, postalo je jasno da je međusobna komunikacija (engl. *crosstalk*, u nastavku ćemo koristiti izvorni pojam iz engleskog jezika) sastavnica citoskeleta nužna za osnovne biološke procese. Stoga bi se citoskelet trebao promatrati kao jedinstveni sustav gdje se sastavnice međusobno reguliraju kako bi precizno izvršavale svoje uloge. Aktinski filamenti i mikrotubuli značajno su dinamičniji od intermedijarnih filamenata, a mogu aktivno proizvoditi sile i poticati promjene staničnog oblika i pokretljivosti. Posebno

je istraživana uloga *crossstalka* aktina i mikrotubula u regulaciji stanične polarnosti tijekom migracije i diobe (Seetharaman i Etienne-Manneville, 2020.; Dogterom i Koenderink, 2019.). Postoji niz proteina koji stvaraju fizičku vezu između aktina i mikrotubula. Primjerice, protein plektin je važan medijator *crossstalka* tijekom kontrakcija citoskeleta, nerekceptorska tirozinska kinaza Abelson (engl. *non-receptor tyrosine kinase Abelson*, Abl) sudjeluje u protruzijama lamelipodija, a niz drugih proteina sudjeluje u organizaciji aktina i mikrotubula u aksonu živčanih stanica, npr. Tau (Elie i sur., 2015.), Pod1 (engl. *pollen defective in guidance1*), septini (Gregory i sur., 2008.) i DCX (engl. *doublecortin*) (Burnette i sur., 2008.; Bielas i sur., 2007.). Tijekom migracije, posebno je važno usmjerenje mikrotubula s FA paralelno sa smjerom migracije. Postoji nekoliko proteina koji usmjeravaju rast mikrotubula uz aktinska vlakna prema FA, primjerice MACF1 (engl. *microtubule-actin cross-linking factor 1*) (Yue i sur., 2016.), CLASP (Tsvetkov i sur., 2007.) i IQGAP1 (engl. *Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1*) (Noordstra i Akhmanova, 2017.; Bartolini i sur., 2016.). Ključnu ulogu u povezivanju mikrotubula s FA ima CMSC (Bouchet i sur., 2016.). Protein KANK pomoću domene KN ostvaruje interakciju s talinom iz FA, pomoću domene CC ostvaruje interakciju s liprinom $\beta 1$, a pomoću domene ANKRD veže kinezin KIF21A, koji se nalazi na vrhu rastućeg mikrotubula i tako omogućava pravilno usmjerenje mikrotubula. Gubitak proteina KANK1, KIF21A ili MACF1 dovodi do gubitka organizacije mikrotubula i posljedično do gubitka polarnosti stanice (van der Vaart, 2013.; Li i sur., 2011.; Wu i sur., 2008.).

1.4. Retikularne adhezije

Znanstvenici su unazad nekoliko desetljeća u stanicama zamijetili prisustvo plakova bogatih klatrinom, ravnih klatrinskih rešetaka ili klatrinskih ploča (engl. *clathrin-coated plaques, flat clathrin lattices (FCL), clathrin sheets*), koje se nalaze u blizini integrina (Lampe i sur., 2016.; De Deyne i sur., 1998.; Maupin i Pollard, 1983.; Heuser, 1980.). Sve do nedavno, ove strukture smatrane su tvorbama uključenim isključivo u procese endocitoze posredovane klatrinom. Međutim, Baschieri i sur. (2018.) pokazali su da su plakovi bogati klatrinom zapravo stabilne tvorbe vezane na integrin $\alpha V\beta 5$, koje sprječavaju nastanak mjehurića obavijenih klatrinom (engl. *clathrin coated pits*), odnosno da su ove tvorbe posljedica zaustavljene endocitoze posredovane klatrinom. Endocitoza posredovana klatrinom primarni je način internalizacije većine površinskih receptora i njihovih liganada. Endocitoza započinje invaginacijom stanične membrane i tvorbe vezikula kojima se željene sastavnice (teret) prenose u stanicu. Ponekad se proces invaginacije i sazrijevanja vezikula zaustavlja zbog mehaničkih zapreka i tada dolazi do pojave zaustavljene (engl. *frustrated*) endocitoze (Bruna-Gauchoux i Montagnac, 2022.; Baschieri i sur., 2020.).

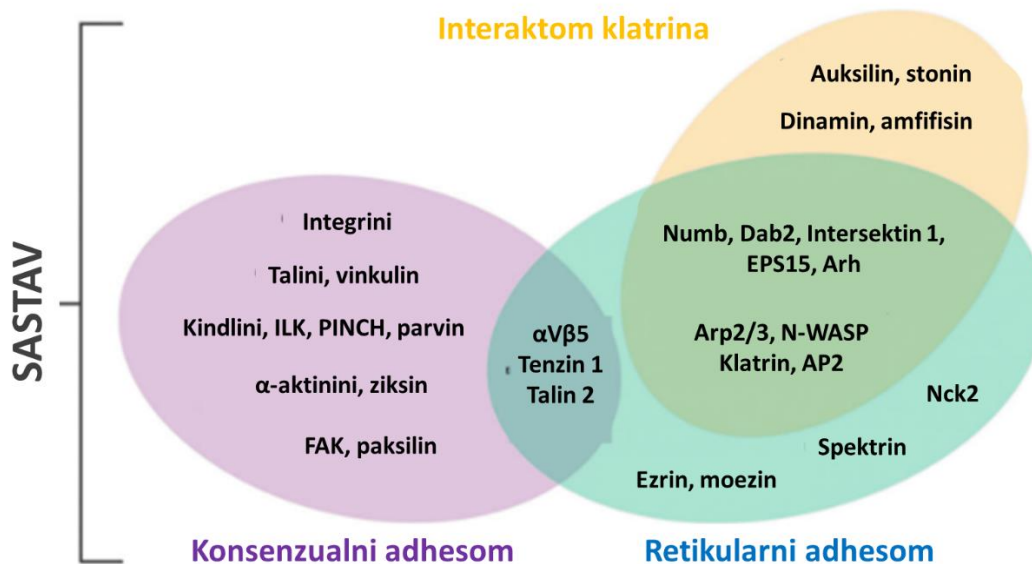
Plakovi bogati klatrinom primjer su zaustavljene endocitoze integrina vezanih na velike proteine ECM-a, posebice vitronektina (Baschieri i sur., 2018.; Leyton-Puig i sur., 2017.). Istovremeno su Lock i sur. (2018.) pokazali da ove strukture imaju i adhezivna svojstva te su ih nazvali retikularnim adhezijama (RA).

RA posredovane su isključivo integrinom $\alpha V\beta 5$, ali ne sadrže većinu proteina adhesoma (osim talina 2 i tenzina 3), te za razliku od FA ostaju prisutne u stanici tijekom diobe. Uslijed utišavanja integrina $\beta 5$ dolazi do zakašnjele mitoze, učestalo s neuspješnom citokinezom, te je zamijećena smanjena proliferacija stanica koje koriste integrin $\alpha V\beta 5$ za stvaranje FA i/ili RA, upućujući na ključnu ulogu adhezija posredovanih integrinom $\alpha V\beta 5$ u diobi stanice (Zuidema i sur., 2022.; Lock i sur., 2018.). Za razliku od ostalih IAC-a, RA ne ostvaruju interakciju s citoskeletom stanice te ih možemo proučavati nakon izlaganja stanica inhibitoru polimerizacije aktina, cytochalasinu D (cyto D), što dovodi do raspada FA (Lock i sur., 2018.). S obzirom na to da nastaju procesom zaustavljene endocitoze, glavne sastavnice RA su proteini uključeni u endocitozu posredovanu klatrinom poput proteina AP2 (engl. *adaptor protein 2*), Dab2 (engl. *disabled homolog 2*), Numb (engl. *NUMB endocytic adaptor protein*), EPS15/EPS15L1 (engl. *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15/ epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 like 1*), intersektina (ITSN) i ARH (engl. *autosomal recessive hypercholesterolemia*), odnosno veznih partnera fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PtdIns(4,5)P2) (slika 9) (Lock i sur., 2019.; Baschieri i sur., 2018.; Lock i sur., 2018.; Zuidema i sur., 2018.; Leyton-Puig i sur., 2017.). Tijekom endocitoze posredovane klatrinom, EPS15 i ITSN započinju tvorbu mjehurića obavijenih klatrinom i vežu AP2, glavni adaptorni protein za vezanje i internalizaciju tereta. AP2 potom veže specifične adaptorne proteine poput Dab2, ARH i Numba, koji su nužni za unos određenih receptora u stanicu (McMahon i Boucrot, 2011.). Smatra se da je aktivacija integrina $\beta 5$ u RA, umjesto talinom, posredovana adaptornim proteinima Dabom2, Numbom ili ARH-om, čiji je afinitet za vezanje na rep podjedinice $\beta 5$ nekoliko puta veći u usporedbi s talinom 1 (Zuidema i sur., 2022.).

Pokazano je da RA nastaju *de novo*, točnije nastaju kao male strukture, a nakupljanjem integrina rastu u prstenaste tvorbe koje ostaju stabilne u stanici preko 7 sati što je otprilike 2,2 puta duže od FA. Unatoč njihovoj dugotrajnosti, izmjena integrina u ovim strukturama brža je i učestalija nego u FA (Cresens i sur., 2023.; Lock i sur., 2018.). U stanicama koje tvore FA $\alpha V\beta 5$ i RA $\alpha V\beta 5$ zamijećeno je da je raspodjela integrina između FA i RA uvjetovana s nekoliko faktora. Lock i sur. (2018.) zamijetili su da omjer pojedinih fosfatidilinozitola u membrani stanice utječe na količinu FA i RA tako da PtdIns(4,5)P2 promovira nastanak RA, dok fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfat (PtdIns(3,4,5)P3) promovira nastanak FA. Primjerice, utišavanjem regulatornih proteina koji sudjeluju u nastanku PtdIns(4,5)P2 dolazi do prelaska integrina $\beta 5$ iz RA u FA. Iako je tvorba RA neovisna o aktinskom citoskeletu, smanjena aktinsko-miozinska kontraktilnost

promovira redistribuciju integrina iz FA u RA, dok povećana površinska napetost stanice promovira nastajanje FA (Zuidema i sur., 2022.). Osim toga, utišavanjem sastavnica endocitoze posredovane klatrinom, poput adaptornog proteina AP2, dolazi do prelaska integrina $\alpha V\beta 5$ iz RA u FA (Hakanpää i sur., 2023.). Zuidema i sur. (2022.) su metodama MS i koimunoprecipitacije identificirali nove interakcijske partnere integrina $\beta 5$ u RA, uključujući proteine iz obitelji Rho GEF, p115Rho-GEF i GEF-H1, te serinsku kinazu MARK2 (engl. *microtubule affinity regulating kinase 2*). S obzirom na to da sva tri spomenuta proteina ostvaruju interakciju s mikrotubulima, time je pokazana važnost ove sastavnice citoskeleta u regulaciji distribucije integrina $\alpha V\beta 5$ između FA i RA. U tom je članku pokazano i da gubitak MARK2 dovodi do značajnog prelaska integrina $\alpha V\beta 5$ iz RA u FA. S druge strane, GEF-H1, koji se u inaktivnoj formi nalazi vezan na mikrotubule, uslijed izlaganja stanica nokodazolu, inhibitoru polimerizacije mikrotubula, prelazi u aktivno stanje, povećava aktinsko-miozinsku kontraktilnost i time pojačava mehaničke sile u stanici, te dovodi do nakupljanja integrina $\alpha V\beta 5$ u FA.

Alfonzo-Méndez i sur. (2022.) pokazali su da, osim svojstva adhezije, RA služe i kao platforme za prijenos signala u stanicu. Koristeći fluorescencijsku i elektronsku mikroskopiju identificirali su područja RA bogata receptorom za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) i pokazali međusobnu regulaciju integrina $\beta 5$ i aktivnog EGFR-a. Točnije, uslijed vezanja liganda EGF na EGFR dolazi do njegove aktivacije, nakupljanja i fosforilacije, što potiče vezanje adaptornog proteina Grb2 (engl. *Growth factor receptor bound protein 2*), čime se aktivira nerekceptorska tirozinska kinaza Src, koja je sastavni dio konsenzualnog adhesoma. Src fosforilira integrin $\beta 5$, a posljedica ovog signalnog puta je povećanje količine FCL, odnosno RA, što utječe na regulaciju adhezije i endocitoze posredovane klatrinom.



Slika 9. Prikaz sastava retikularnog adhesoma te preklapanja s proteinima konsenzualnog adhesoma i endocitoze posredovane klatrinom.

Nck2-Nck adaptorni protein 2 (preuzeto iz Lock i sur., 2019. i dorađeno).

Pojava RA nije tkivno specifična. Primjerice, stanice trostruko-negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 tvore vrlo male količine RA, kao i stanice karcinoma pluća A549, stanice adenokarcinoma debelog crijeva HT29 i stanice glioblastoma U251MG u kojima se α V β 5 prvenstveno nalazi u FA. S druge strane, stanice karcinoma dojke MCF7 tvore obje strukture, ali preferencijalno RA α V β 5, a stanice adenokarcinoma debelog crijeva SW620 imaju isključivo RA α V β 5 (Zuidema i sur., 2022.). S obzirom na to da mnoge stanice ne eksprimiraju α V β 5, vjerojatno je da i neki drugi integrini, koji se nalazi u područjima bogatim klatrinom, može zaustaviti tvorbu vezikule obložene klatrinom i potaknuti tvorbu RA. Primjerice, Elkhatib i sur. (2017.) pokazali su postojanje struktura nalik RA bogatih integrinom β 1, klatrinom, Dab2 i AP2 tijekom uzgoja stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 u 3D kulturi u kolagenu. Osim toga, Wang i sur. (2019.) su pokazali da u 2D kulturi humanih žljezdanih epitelnih stanica integrin α 6 β 4 tvori prstenaste strukture, nalik na RA, koje imaju ulogu u povećanoj otpornosti stanica na rastezanje. Nije poznato imaju li slična svojstva i drugi integrini.

Hakanpää i sur. (2023.) u svome istraživanju razdvajaju RA od FCL te pokazuju da strukture međusobno kolokaliziraju. Koristeći biljeg endocitoze posredovane klatrinom, AP2, te biljeg RA, integrin α V β 5, pokazali su da se FCL vjerojatno formiraju na već postojećim RA. Osim toga, pokazali su da se tvorba struktura može regulirati putem FB α 5 β 1 i fibronektinom. Točnije, uzgojem stanica na podlozi obloženoj fibronektinom dolazi do značajnog smanjenja tvorbe FCL i RA u odnosu na stanice uzgajane na

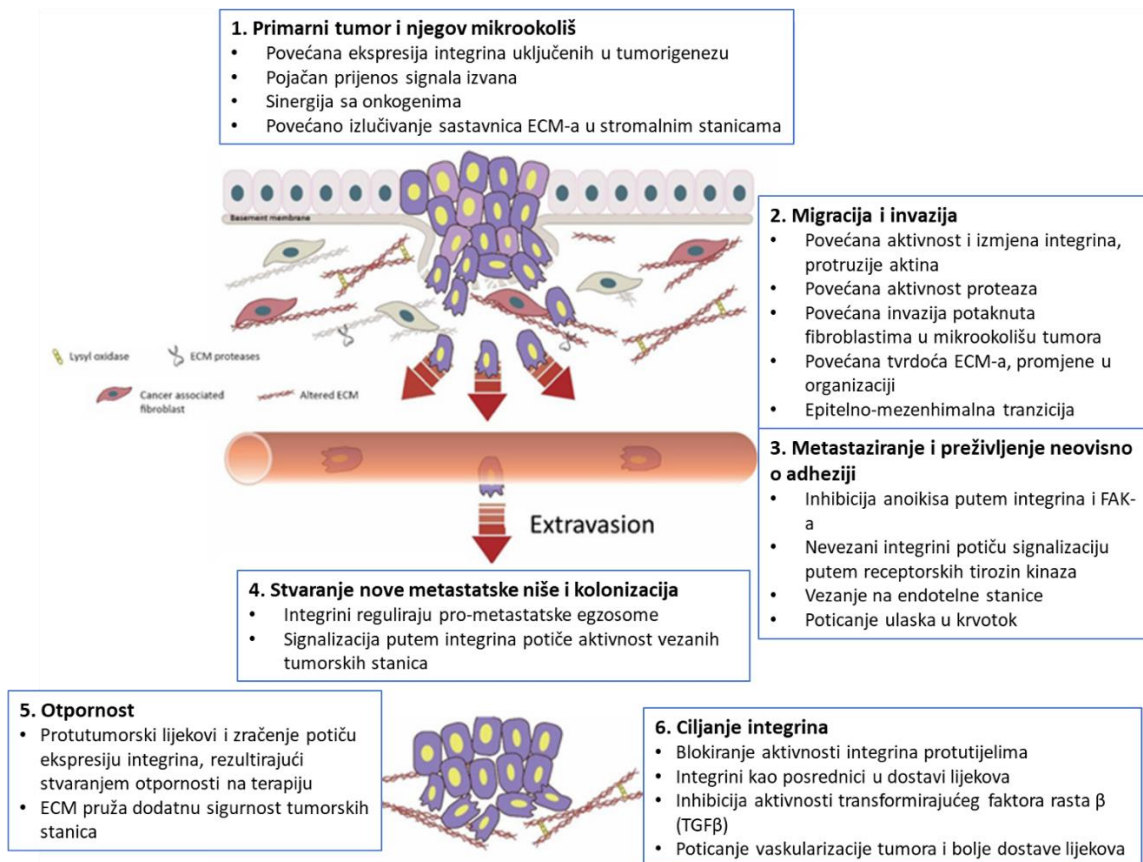
neobloženim podlogama. Također, stanične linije koje izlučuju velike količine fibronektina tijekom uzgoja pokazuju značajno manje FCL i RA. Razlog tome je aktivacija $\alpha 5\beta 1$ integrina iz FB i prelazak integrina $\alpha V\beta 5$ iz RA u FA. Blokiranjem aktivnosti $\beta 1$ tijekom uzgoja stanica na fibronektinu dolazi do ponovne tvorbe RA $\alpha V\beta 5$.

1.5. Integrini u tumorima

Tijekom tumorigeneze događaju se mnoge promjene u stanici koje utječu na razinu i repertoar integrina na površini stanica (Pang i sur., 2023.). Stanice pojačano ekspimiraju integrine koji im pospješuju rast, učinkovitost migracije i metastaziranje, a manje ekspimiraju integrine koji im osiguravaju mirujuće stanje (Stojanović i sur., 2016.). Isto tako tijekom razvoja metastaza iz primarnog tumora, integrini imaju ključnu ulogu. Promjena u ekspresiji integrina dovodi do povećane aktivacije proteinaza i posljedične razgradnje ECM-a, prodora tumorskih stanica u krvotok te implantacije tumorskih stanica u novoj niši (slika 10) (Arias-Mejias i sur., 2020.). Istraživanja pokazuju da mjesta metastaziranja nisu nasumična, a ključnu ulogu ima upravo repertoar integrina na tumorskoj stanici (Huang i Rofstad, 2018.). Nadalje, poznato je da ponekad promjene u signalnim putevima posredovanim integrinima dovode do pojave otpornosti stanica karcinoma na protutumorske lijekove i radioterapiju (Su i sur., 2020.). Otpornost tumorskih stanica na terapiju veliki je problem u kliničkoj primjeni. Budući da su radioterapija i protutumorski lijekovi još uvijek važni terapijski alati, razvila su se dva područja istraživanja, a to su otpornost tumorskih stanica na radioterapiju posredovana staničnom adhezijom (engl. *cell adhesion-mediated radioresistance*, CAM-RR) i otpornost na protutumorske lijekove posredovana staničnom adhezijom (engl. *cell adhesion-mediated drug resistance*, CAM-DR) (Dickreuter i Cordes, 2017.). Mnoge studije su pokazale, koristeći stanične linije tumora čovjeka ili miša, da smanjenje ekspresije ili inhibicije funkcije integrina smanjuje rast i metastaziranje tumora te otpornost na radioterapiju ili terapiju protutumorskim lijekovima (Cooper i Giancotti, 2019.; Hamidi i Ivaska, 2018.; Desgrosellier i Cheresch, 2010.).

Različiti $\beta 1$ -integrini uspješno su ciljani u predkliničkim istraživanjima, primjerice $\alpha V\beta 1$ (Reed i sur., 2015.), $\alpha 2\beta 1$ (Yoshimura i sur., 2009.), $\alpha 5\beta 1$ (Sawada i sur., 2008.), $\alpha 6\beta 1$ (Landowski i sur., 2014.) i $\alpha 2\beta 1$ (Moritz i sur., 2021.). Lijekovi specifični za $\alpha 5\beta 1$ napredovali su do kasnijih faza kliničkih ispitivanja u liječenju glioma i čvrstih tumora, u kombinaciji s protutumorskim lijekom karboplatinom, no u konačnici nisu bili posebno učinkoviti (Bergonzini i sur., 2022.; Raab-Westphal i sur., 2017.). Osim integrina $\beta 1$, posebno zanimljivi integrini u liječenju tumora su integrini $\alpha V\beta 3$ i $\alpha V\beta 5$ jer se osim na površini tumorskih

stanica nalaze i na endotelnim stanicama tijekom angiogeneze (Avraamides i sur., 2008.). Povećana ekspresija integrina $\alpha V\beta 3$ uočena je u mnogim tumorima, uključujući karcinome gušterače (Hosotani i sur., 2002.), prostate (McCabe i sur., 2007.), dojke (Felding-Habermann i sur., 2001.), vrata maternice (Gruber i sur., 2005.), tumore glave i vrata (Stojanović i sur., 2016.), kao i kod melanoma, gdje ima središnju ulogu u rastu tumora (Arias-Meijas i sur., 2020.). Isto tako, integrin $\alpha V\beta 5$ ima ključnu ulogu u invaziji i metastaziranju stanica karcinoma debelog crijeva (Enns i sur., 2005.) te u rastu tumora dojke (Bianchi-Smiraglia i sur., 2013.). Utišavanje podjedinice αV dovelo je do povećane osjetljivosti stanica trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-436) na protutumorski lijek paklitaksel te smanjene učinkovitosti migracije i invazije stanica (Stojanović i sur., 2018.). Unatoč tome, većina kliničkih studija temeljenim na inhibiciji integrina αV protututijelima ili malim inhibitorima u kombinaciji s drugim terapijama nije pokazala veliku učinkovitost u pacijenata oboljelih od metastatskog karcinoma prostate (oznaka: NCT00537381) (Heidenreich i sur., 2013.), metastatskog karcinoma debelog crijeva (oznaka: NCT01008475) (Laeufle i sur., 2018.; Élez i sur., 2015.), metastatskog melanoma (oznaka: NCT00246012) (O'Day i sur., 2011.), različitih čvrstih tumora (oznake: NCT00842712; NCT00705016) (Alday-Parejo i sur., 2019.; Vansteenkiste i sur., 2015.; Vermorken i sur., 2014.; Alva i sur., 2012.) i glioblastoma (oznaka: NCT00689221) (Stupp i sur., 2014.). Razlozi za neuspjeh kliničkih studija temeljenih na inhibiciji integrina αV nisu poznati.



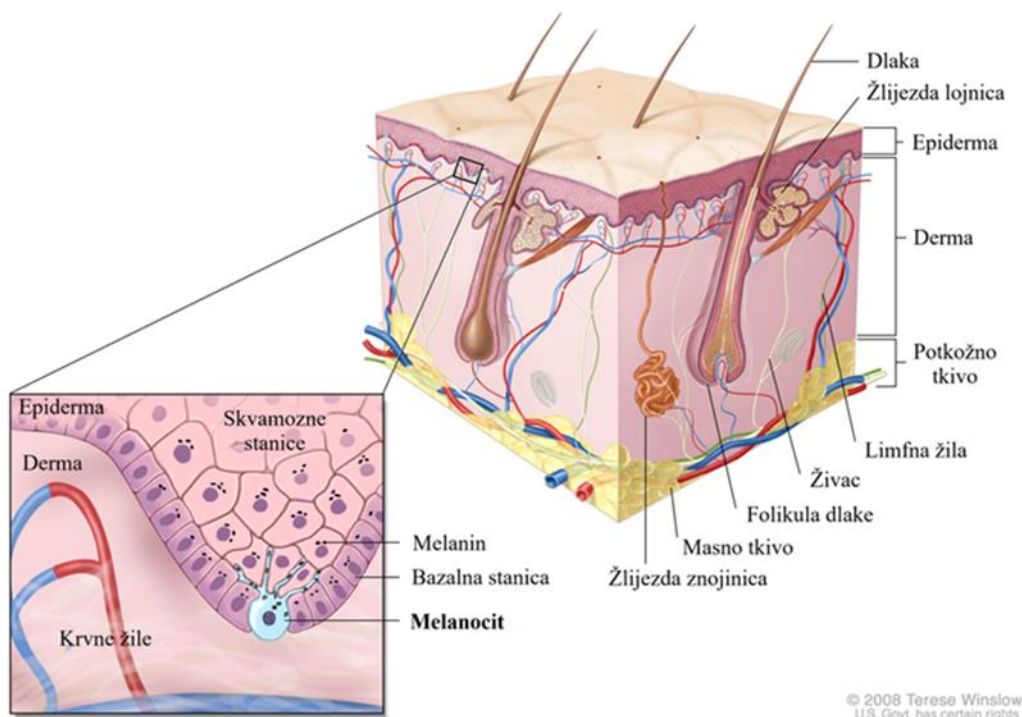
Slika 10. Prikaz uloge integrina u tumorigenezi i metastaziranju (preuzeto iz Hamidi i Ivaska 2018. i doradeno).

Do sada je na tržištu odobreno sedam lijekova usmjerenih na integrine za liječenje drugih bolesti osim tumora, poput antagonista α IIb β 3 u liječenju tromboze (abciximab, eptifibatid i tirofiban), protutijela na podjedinicu α 4 (natalizumab) i integrin α 4 β 7 (vedolizumab) u liječenju Crohnove bolesti i ulcerativnog kolitisa, zatim male molekule koja inhibira integrin α L β 2 u liječenju bolesti suhog oka (lifitegrast) te prvog lijeka za oralnu upotrebu koji inhibira integrin α V β 6/ α V β 1 u liječenju ulcerativnog kolitisa (carotegrast) (Pang i sur., 2023.). Unatoč ohrabrujućim predkliničkim rezultatima, koji pokazuju da su integrini dobra meta samostalno ili u kombinaciji s drugim terapijama, do sada nema odobrenih lijekova usmjerenih na integrine za liječenje tumora u klinici (Li i sur., 2021., Raab-Westphal i sur., 2017.). Smatra se da su glavni razlozi neuspjeha takve terapije sljedeći: 1. varijabilna ekspresija integrina, posebice promjena repertoara tijekom tumorigeneze; 2. promjene u funkciji istih integrina u različitim faza razvoja bolesti; 3. suprotna uloga istih integrina u različitim tumorima; 4. izlučivanje terapeutika putem izvanstaničnih vezikula. Neuspjeh većine lijekova u kliničkim studijama nije posljedica neželjenih nuspojava već nedostatak učinkovitosti tijekom ciljanja integrina malim inhibitorima, specifičnim siRNA molekulama ili protutijelima

(Bergonzini i sur., 2022.). Važno je naglasiti da u stanicama tumora tijekom promjene u ekspresiji jednog integrina može doći do promjene u ekspresiji drugih integrina, mehanizmom koji se naziva „*integrin crosstalk*“, te posljedično može doći do neuspjeha terapije (Samaržija i sur., 2020.; Truong i sur., 2014). Unatoč tome, trenutno se u kliničkim studijama nalazi oko 90 lijekova usmjerenih na integrine, a neki od njih i u liječenju tumora, poput citotoksičnog proteina za integrin $\alpha V\beta 3$ u liječenju čvrstih tumora (oznaka: NCT05085548), protutijela za integrinsku podjedinicu $\beta 6$ u liječenju tumora u kombinaciji s protutumorskim lijekovima (oznaka: NCT04389632), protutijela za integrinsku podjedinicu $\beta 1$ u liječenju glioma (oznaka: NCT04608812), alosteričkog aktivatora integrina za integrine $\alpha L\beta 2$ i $\alpha 4\beta 1$ u liječenju čvrstih tumora (oznaka: NCT04508179), te cikličkih peptida usmjerenih na integrine αV u kombinaciji s protutumorskim lijekovima (oznaka: NCT03517176) (Pang i sur., 2023.; Bergonzini i sur., 2022.). Ključ za uspjeh ciljanih lijekova u kliničkim studijama je detaljno poznavanje sastava i regulacije adhezija posredovanih integrinima, te mehanizma prenošenja informacija putem takvih adhezija (Pang i sur., 2023.; Humphries i sur., 2019.).

1.6. Melanom

Melanom je maligni tumor koji nastaje uslijed nekontrolirane diobe melanocita. Melanociti su stanice koje proizvode pigment melanin, a potječu iz neuralnog grebena. U čovjeku se melanociti nalaze u folikulama dlaka, očima, unutarnjem uhu, sluznici, središnjem živčanom sustavu, a pretežno su smješteni u epidermalnom sloju kože (slika 11) (Saginala i sur., 2021.). S obzirom na rasprostranjenost melanocita, melanom se uglavnom razvija na koži, ali se može javiti i na drugim mjestima u tijelu, primjerice na očima i moždanoj ovojnici. Zanimljivo je da melanom, iako čini manje od 5 % poznatih tumora kože, uzrokuje čak 90 % smrti povezanih s tumorom kože. Razlog tome je što je melanom izuzetno agresivna vrsta tumora sklona metastaziranju, a sukladno tome je i liječenje otežano (Srivastava i sur., 2019.; Matthews i sur., 2017.).



Slika 11. Prikaz sastava i građe kože te položaja melanocita (preuzeto iz PDQ Adult Treatment Editorial Board, Melanoma treatment, 2024. i dorađeno).

Od melanoma najčešće obolijeva starija populacija, ali je kod oboljelih adolescenata i mladih odraslih jedna od najučestalijih vrsta tumora (PDQ Adult Treatment Editorial Board, Melanoma treatment, 2024.). Najnovija globalna statistika procjenjuje da je 2020. godine ukupno dijagnosticirano 325 000 novih slučajeva melanoma, dok je broj umrlih od melanoma iznosio 57 000. Statistika pokazuje da od melanoma najčešće obolijevaju pripadnici bijele rase, muškarci nešto učestalije od žena, dok pripadnici crne i žute rase imaju vrlo mali broj oboljelih, manje od jedne osobe u 100 000 godišnje (Arnold i sur., 2022.). Glavni faktori rizika za pojavu melanoma su izlaganje ultraljubičastom (engl. *ultraviolet*, UV) zračenju na otvorenom, korištenje solarija, prekomjerna tjelesna težina, narušen imunski sustav uslijed bolesti, obiteljska anamneza i madeži (Saginala i sur., 2021.). Etiologija, histopatologija i genetske karakteristike melanoma vrlo su raznolike, što rezultira velikom heterogenošću bolesti, a složeni mehanizmi patogeneze posljedica su specifičnih genskih promjena unutar nekoliko povezanih signalnih puteva (Palmieri i ostali, 2015.). Maligna transformacija melanocita u metastatski melanom započinje pojavom točkastih mutacija i duplikacijom gena, što dovodi do povećane diobe stanica melanocita, koje se inače dijele manje od dva puta godišnje. Većina točkastih mutacija uzrokovana je UV zračenjem, primjerice zamjena citozina s

timinom (uzrokovano UV A zrakama) ili zamjena gvanina s timinom (uzrokovano UV B zrakama) te pojavom slobodnih radikala uslijed prekomjernog izlaganja UV zračenju (Schadendorf i sur., 2018.; Hodis i sur., 2012.). Kao i kod nastanka ostalih tumora, pri tome dolazi do aktivacije signalnih puteva koji promiču nekontroliranu diobu melanocita. Primjerice, signalni put mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) pretjerano je aktivan u oko 50 % melanoma. Razlog tome su mutacije u genu za kinazu BRAF (engl. *isoform B of RAF kinase*; *RAF, rapidly accelerated fibrosarcoma*) koje ju čine konstitutivno aktivnom. Najčešća mutacija u genu za kinazu BRAF je V600E koja se pojavljuje u 73 % slučajeva, dok se u 19 % slučajeva pojavljuje mutacija V600K. Isto tako, mutacija u genu za protein NRAS (engl. *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*), koji je također dio puta MAPK, zabilježena je u 64 % metastaza melanoma (Luke i sur., 2017.; Hoodis i sur., 2012.). Osim toga, u melanomima dolazi do mutacije u promotoru za telomeraznu reverznu transkriptazu (TERT) te obnove telomera tumorskih stanica nakon diobe (Griewank i sur., 2014.). Svojstvo invazivnosti stanica posljedica je dodatnih mutacija u signalnom putu ovisnom o kinaznom inhibitoru 2A ovisnom o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, *CDKN2A*) te mutacija u genima za tumorske supresore poput homologa fosfataze i tenzina (engl. *phosphatase-and-tensin homologue*, *PTEN*) i TP53 (engl. *tumour-protein 53*) (Shain i Bastian, 2016.; Palmieri i sur., 2015.). Stanice melanoma uspješno izbjegavaju imunosti sustav ekspresijom liganda za protein programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed-cell death-protein-1*, *PD-1*) na svojoj površini. Stanice imunosti sustava, T-limfociti, koriste receptor za PD-1 za prepoznavanje liganada PD-L1 i PD-L2 koje pronalazimo na zdravim T-limfocitima i drugim stanicama imunosti sustava. Aktivacijom Janus-kinaze (JAK) i aktivatora transkripcije proteina STAT (engl. *signal-transducer-and-activator-of-transcription*) stanice melanoma uspješno ekspimiraju ligande iz skupine PD-1 na svojoj površini i zaustavljaju imunosti odgovor potaknut T-limfocitima (Jakobs i sur., 2012.).

1.6.1. Liječenje melanoma

Melanomi se razvrstavaju u pet stadija koji ovise o uznapredovalosti bolesti. Početni, nulti stadij melanoma je tumor *in situ*, ograničen samo na epidermu bez ulceracija. Prvi stadij je lokalizirani tumor dubok do 2 mm sa ili bez ulceracija. U drugi stadij ubrajaju se melanomi dubine do 4 mm koji su se proširili na limfne čvorove, sa ili bez ulceracija, a ovisno o veličini i postojanju ulceracija razlikujemo tri podskupine. Treći stadij karakterizira proširenje primarnog tumora na okolne limfne čvorove i obližnja tkiva, a razlikuju se četiri podskupine ovisno o količini zahvaćenog tkiva i limfnih čvorova. U četvrti stadij ubrajaju se melanomi koji su metastazirali na druge organe (AIM, 2024.). Za uspješno izlječenje nužno je

dijagnosticiranje melanoma u ranim fazama, *in situ* i tada je petogodišnja stopa preživljenja kod pacijenata čak 99 %, dok je za metastatski melanom samo 27 % (Eddy i sur., 2021.). Melanom se može liječiti kirurškim postupkom, radioterapijom, protutumorskim lijekovima, fotodinamičkom terapijom, imunoterapijom i ciljanom terapijom. Kirurško uklanjanje korisno je u početnim fazama bolesti, dok se u kasnijim stadijima uglavnom primjenjuje imunoterapija i ciljana terapija malim inhibitorima, a vrlo često se različiti pristupi u liječenju međusobno kombiniraju (Long i sur., 2023.). U ciljanoj terapiji koriste se inhibitori ili protutijela koja blokiraju mutirane proteine karakteristične za melanom. U preko 50 % melanoma javlja se mutacija V600E ili V600K u kinazi BRAF i tada se mogu koristiti specifični inhibitori za BRAF kao što su vemurafenib ili dabrafenib, a razvijeni su i inhibitori za MEK: trametinib i kobimetinib. Nažalost, u velikom broju pacijenata nakon spomenutih terapija dolazi do pojave otpornosti tumora na lijekove te regresije melanoma, a kako bi se smanjila pojava otpornosti kombiniraju se inhibitori za BRAF i za MEK (Long i sur., 2017.; Kim i Cohen, 2016.). Za liječenje metastatskog melanoma koristi se i ciljana imunoterapija koja se temelji na stimulaciji imunskog odgovora na antigene tumorskih stanica. U terapiji postoji nekoliko inhibitora kontrolnih točaka. Primjer za to su protutijela na PD-1, pembrolizumab ili nivolumab. te protututijelo na citotoksični antigen 4 povezan s T-limfocitima (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*, CTLA-4) ipilimumab. Mehanizam djelovanja tih protutijela je sličan i zasniva se na aktivaciji T-limfocita i antitumorskog odgovora imunskog sustava (Domingues i sur., 2018.). Među imunoterapeutike ubraja se i onkolitički virus Talimogene laherparepvec (T-VEC). T-VEC je genetički modificiran virus herpes simplex koji se replicira prvenstveno u tumorskim stanicama, a sadrži dvije kopije ljudskog gena GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) koji nakon ekspresije privlači dendritičke stanice u područje tumora i potiče njihovo sazrijevanje (Ferrucci i sur., 2021.).

Razvoj više od deset novih ciljanih terapeutika unazad nekoliko godina povećao je preživljenje oboljelih od melanoma za 30 %. Točnije, petogodišnje preživljene oboljelih od prva tri stadija melanoma značajno se povećalo, preko 90 %, međutim, oboljeli od metastatskog melanoma i dalje pokazuju postotak petogodišnjeg preživljena manji od 30 % (Saginala i sur., 2021.). Iako istraživanja pokazuju da je preživljenje pri korištenju ciljane terapije povećano u usporedbi s liječenjem protutumorskim lijekovima, to vrijedi samo za pacijente koji imaju mutacije u proteinima signalnog puta BRAF-MEK ili su pogodni za primanje imunoterapije. Primjerice, pacijenti s divljim tipom gena BRAF ili pacijenti u uznapredovalom stadiju metastatskog melanoma i dalje se primarno liječe protutumorskim lijekovima (Schadendorf i sur., 2018.). Najčešće korišteni protutumorski lijekovi su alkilirajući agensi dakarbazin i temozolomid te vinka alkaloid vinkristin, inhibitor polimerizacije mikrotubula, kao i taksan paklitaksel, inhibitor depolimerizacije mikrotubula i cisplatina. S obzirom na to da je učinkovitost protutumorskih lijekova u liječenju pacijenta

oboljelih od melanom izuzetno mala, potrebno je pronaći nove mete unutar stanice za poboljšanje učinkovitosti postojećih terapija (Dhanyamraju i Patel, 2022.).

1.6.2. Repertoar integrina i glavnih proteina FA u melanomu

Integrinske podjedinice koje možemo pronaći u melanocitima su $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 5$, $\alpha 3$, αV , $\alpha 7$, $\alpha 6$ i $\alpha 2$. U većini melanoma možemo pronaći sličan repertoar integrina kao i u melanocitima, ali smanjenu količinu podjedinica $\beta 4$ i $\alpha 5$ te povećanu količinu $\alpha 6$ i $\alpha 3$. Isto tako u zdravim melanocitima možemo pronaći integrinsku podjedinicu $\beta 7$ koja u melanomima nije prisutna (D'Arcy i Kiel, 2021.). S obzirom na to da integrini imaju ključnu ulogu u rastu i metastaziranju tumora, razumijevanje promjena u sastavu integrina tijekom razvoja melanoma i njihovom kasnijem metastaziranju može biti od velike važnosti u prognozi i dijagnostici bolesti. Osim toga, kako bi se stanice uspješno kretale potrebno je reorganizirati ECM. Poznato je da tijekom razvoja melanoma, prelaskom iz radijalne faze rasta u vertikalnu fazu rasta, dolazi do povećane ekspresije integrina $\alpha V\beta 3$, smanjene apoptoze te povećane aktivnosti MMP-a (Hsu i sur., 1998.). MMP razgrađuju kolagen i fibronektin te tako oslobađaju peptidnu skevencu RGD koja predstavlja ligand za integrin $\alpha V\beta 3$ (Arias-Mejias i sur., 2020.). Osim toga, integrini $\alpha V\beta 3$ i $\alpha V\beta 5$ sudjeluju u angiogenezi tumora, tj. $\alpha V\beta 3$ potiče ekspresiju faktora rasta fibroblasta, dok $\alpha V\beta 5$ potiče ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta A. Stoga su upravo integrini αV česte mete istraživanja ciljane terapije melanoma (Raab-Westphal i sur., 2017.). Nažalost, unatoč ohrabrujućim rezultatima *in vitro*, inhibitor integrina αV cilengitid nije odobren u drugoj fazi kliničkog ispitivanja za liječenje melanoma (Kim i sur., 2012.). Nadalje, istraživanje monoklonskog protutijela intetumumaba, koji se veže na integrine αV , pokazalo je dobre rezultate u smanjenju angiogeneze i rasta tumora u predkliničkim studijama, ali ne i u kliničkim studijama na metastatskom melanomu (Alday-Parejo i sur., 2019.). Pickarski i sur. (2015.) predstavili su mali inhibitor integrina $\alpha V\beta 3$ s oralnom primjenom, MK-0429. Studije na miševima *in vivo* pokazale su uspješnost lijeka u prevenciji razvoja metastaza. U usporedbi s klasičnim protutumorskim lijekovima, lijek je doduše pokazao 50 % manju uspješnost, no značajno manje nuspojave. Zanimljivo je da istovremeno utišavanje podjedinica αV i $\beta 1$ pospješuje radioterapiju i djeluje na smanjenje progresije u preko 80 % ispitivanih uzoraka sarkoma i melanoma, što otvara mogućnost novog pristupa kombiniranim utišavanjem integrina i integrinskih podjedinica (Haeger i sur., 2020.).

Neuspjeh lijekova koji su usmjereni na integrine u liječenju melanoma potaknulo je ideju da integrine nije dovoljno ciljati na receptorskoj razini u samostalnoj terapiji već da bi se trebali ciljati i drugi proteini adhesoma (Arias-Mejias i sur., 2020.; Alday-Parejo i sur., 2019.). Primjerice, terapija usmjerena

na integrine bi se mogla kombinirati s inhibitorima kinaze FAK, važnog signalnog proteina adhesoma. Hess i sur. (2005.) pokazali su analizom *in situ* da je FAK fosforiliran na tirozinskim ostacima 397 i 576 isključivo u agresivnim uvealnim i kožnim melanomima. Inhibicija FAK-a i zaustavljanje prijenosa signala koristeći ekspresiju nekinaze povezane s FAK-om (engl. *FAK-related nonkinase*, FRNK), rezultiralo je smanjenom učinkovitosti invazije i migracije stanica melanoma. Međutim, Mousson i sur. (2021.) ukazuju na to da inhibicija FAK-a u metastatskim stanicama melanoma malim inhibitorima ili siRNA molekulama doduše dovodi do smanjenja učinkovitosti migracije, ali potiče stvaranje invadopodija i degradaciju ECM-a. Pokazuju da inhibicija interakcije FAK-a s paksilinom, adaptornim proteinom adhesoma, ali bez narušavanja funkcije FAK-a u stanici, dovodi do smanjenja učinkovitosti migracije stanica melanoma A375 i primarnih staničnih kultura melanoma te smanjenja degradacije matriksa. Ekspresija varijanti kinaze FAK s mutacijama u domeni FAT (engl. *focal adhesion targeting*) ili upotreba kompetitivnih inhibitora veznog mjesta za FAK na paksilinu, dovodi do inhibicije interakcije tih dvaju proteina. Pri tome funkcija FAK-a u citoplazmi ostaje očuvana čime se izbjegavaju neželjeni efekti. Talin 1 je jedan od glavnih adaptornih proteina FA i proteina koji se vežu na aktin. U melanocitima, talin 1 prisutan je u međusobnim vezama između stanica, te u vezama stanica sa ECM-om (Kaiser i sur., 1993.). Rezaie i sur. (2023.) proveli su istraživanje uloge talina 1 u melanomu koristeći podatke iz dostupnih online baza podataka, GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) i GNET2 (<http://gent2.appex.kr/gent2/>) te fiksirane uzorke pacijenata uklopljene u formalin, skupljenih u razdoblju od 2013. do 2020. (33 uzorka melanoma, 73 uzorka raka kože, 11 uzoraka zdrave kože). Rezultati su pokazali povećane količine mRNA talina 1 u uzorcima tumorskog tkiva u usporedbi sa zdravim tkivom, posebice u uzorcima metastatskog melanoma. Zanimljivo je da, iako rezultati daju naslutiti da povećana ekspresija talina 1 rezultira agresivnijom bolešću, nije pronađena značajna poveznica između količine talina 1 i preživljenja pacijenata oboljelih od melanoma ili drugih kožnih tumora. Stoga su potrebne daljnje studije kako bi se odredila uloga talina 1 u melanomu te njegova primjena kao biomarkera. Važno je napomenuti da je prethodno spomenuta studija proučavala isključivo ulogu talina 1 u melanomu, dok je u stanicama melanoma eksprimiran i talin 2, homolog talina 1. S obzirom na njihovu različitu ulogu u stanicama tumora, te moguću kompenzaciju jednog talina drugim (poglavlje 1.3.1.), prilikom istraživanja uloge talina kao potencijalne mete u liječenju ili biomarkera treba uzeti u obzir odnos i regulaciju oba homologa. Nelson i sur. (2011.) predstavili su kratki peptid VAP, dobiven od C-terminusa proteina IpaA izoliranog iz bakterija roda *Shigella*, koji pospešuje aktivaciju adaptornog proteina vinkulina. Izlaganje stanica VAP-u rezultira povećanim brojem aktivnih integrina $\beta 1$, povećanom adhezijom i pojačanim prijenosom signala u stanici. Istraživanje pokazuje da VAP značajno povećava osjetljivost stanica melanoma miša M21 na protutumorske lijekove ara-C i dakarbazin.

Zaključno, ti su autori pokazali da je uzrok povećane osjetljivosti stanica melanoma miša povećanje oštećenja DNA i posljedično apoptoze. Spomenuti rezultati ukazuju na to da manipulacija proteinima adhesoma i adhezijama može biti potencijalna strategija u liječenju melanoma, samostalno ili u kombinaciji s protutumorskim lijekovima.

1.7. Cilj istraživanja

Melanom je agresivna vrsta tumora otporna na širok raspon terapija. Usprkos novim pristupima u liječenju melanoma, kao što su ciljana terapija i imunoterapija, postoji potreba za otkrivanjem novih terapijskih meta koje se mogu ciljati samostalno ili u kombinaciji s drugim protutumorskim lijekovima. Integrini i proteini IAC-a su potencijalne mete u liječenju tumora. Integrini su receptori na površini stanica čijom aktivacijom dolazi do stvaranja dinamičnih, višeproteinskih adhezijskih kompleksa koji su uključeni u regulaciju pokretljivosti, preživljenja i migracije stanica, ali i u procese tumorigeneze, progresije tumora i metastaziranja. Pokazano je da stanična linija melanoma MDA-MB-435S preferencijalno koristi integrin $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ za adheziju, stvarajući dvije vrste IAC-a, FA i RA. Osim toga, pokazano je da se smanjenjem razine integrina αV ili β5 povećava osjetljivost stanica na inhibitor depolimerizacije mikrotubula paklitaksel (PTX) i onemogućava stanična migracija mehanizmom ovisnom o proteinu KANK2 iz CMSC-a.

Cilj ovog istraživanja je razjašnjenje mehanizma regulacije osjetljivosti stanica na PTX posredovanu integrinom $\alpha\text{V}\beta\text{5}$, te potraga za novom metom unutar stanice čije bi utišavanje poboljšalo učinkovitost liječenja PTX-om uz istovremeno smanjenje učinkovitosti migracije. Stoga u ovom doktorskom radu želimo istražiti komponente IAC-a, posebice proteine talin 1 i 2, kao i proteine KANK1 i 2. Također, želimo istražiti sastav RA i pronaći postoje li dodatni proteini koji se nalaze u obje vrste adhezija, FA i RA, kao što je protein talin 2. Odredit ćemo ulogu izoformi talina 1 i 2 te proteina KANK1 i 2, njihovu lokalizaciju u stanici, utjecaj utišavanja ovih proteina na osjetljivost na PTX i migraciju, moguće funkcionalne veze proteina talina i KANK te utjecaj utišavanja ovih proteina na aktinski citoskelet i mikrotubule.

Rezultati istraživanja FA i RA posredovanim integrinom $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ u stanicama melanoma MDA-MB-435S doprinijet će razumijevanju biologije adhezija i otkriti nove potencijalne proteine čijim bi ciljanjem mogli povećati osjetljivost stanica na protutumorski lijek PTX i ograničiti njihovu migraciju.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Stanice melanoma čovjeka

U radu smo koristili komercijalno dostupnu staničnu liniju melanoma čovjeka MDA-MB-435S (ATCC HTB-129D) kupljenu od tvrtke ATCC (American Type Culture Collection, SAD) koja raste prihvaćena za podlogu.

2.1.2. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Osnovne kemikalije korištene u istraživanju.

Kemikalija	Kataloški broj	Proizvođač
aceton	650501	Sigma-Aldrich, SAD
acetonitril	325730025	Thermo Fisher Scientific, SAD
albumin seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumine</i> , BSA)	80762	Carl Roth, Njemačka
amido crno (engl. <i>amido black</i>)	A8181	Sigma-Aldrich, SAD
amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3)	11213	Fluka, SAD
bromfenolno plavo	15375	Serva, Njemačka
beta-merkaptetanol	63690	Fluka, Njemačka
<i>Coomassie instant blue</i>	10491	Cepham Life Sciences, SAD
dimetilsulfoksid (DMSO) za otapanje kristala formazana	P120601	GramMol, Hrvatska
DL-Ditiotreitol (DTT)	D0632	Sigma-Aldrich, SAD
DMSO za zamrzavanje stanica	D8418	Sigma-Aldrich, SAD
DTBP (dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat)	20665	Thermo Fisher Scientific, SAD
Dulbeccova modifikacija Eagleove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , DMEM)	D5796	Sigma-Aldrich, SAD
EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)	1136808	GramMol, Hrvatska
etanol	P112001	GramMol, Hrvatska
FACSFlow™	342003	BD Biosciences, SAD
fosfatni pufer (engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> , PBS)	D8537	Sigma-Aldrich, SAD
geneticin, G418 disulfatna sol	A1720	Sigma-Aldrich, SAD
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich, SAD
inhibitor cytochalasin D	C8273	Sigma-Aldrich, SAD
jodoacetamid (IA)	I1149	Sigma-Aldrich
kemiluminiscentni reagens za western blot (Western lightning plus-ECL)	NEL104001EA	Perkin Elmer, SAD

kristal-ljubičasto	HT90132	Sigma-Aldrich, SAD
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	11668027	Invitrogen, SAD
podloga za uklapanje stakalaca (engl. <i>Dako fluorescent mounting medium</i>)	S3023	Dako, SAD
podloga za uklapanje stakalaca s bojom za jezgru (<i>Fluoromount-G™ DAPI</i>)	00-4959-52	Invitrogen, SAD
metanol (MeOH)	P140501	GramMol, Hrvatska
mlijeko u prahu, nemasno	F145.1	Carl Roth, Njemačka
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid))	M2128	Sigma-Aldrich, SAD
natrij-dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate, SDS</i>)	L5750	Sigma-Aldrich, SAD
natrij-deoksikolat	D6750	Sigma-Aldrich, SAD
natrij-klorid	P148590	GramMol, Hrvatska
opti-MEM (engl. <i>minimum essential media, MEM</i>)	11058-021	Gibco, SAD
pufer RIPA (engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)	89901	Thermo Fisher Scientific, SAD
pufer za gel elektroforezu	NP0002	Invitrogen, SAD
pufer za gel elektroforezu	1610732	Bio-Rad, SAD
reducirajući pufer za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel	B0007	Invitrogen, SAD
pufer za uklanjanje protutijela s membrane (engl. <i>stripping buffer</i>)	926-92000	LI-COR, SAD
protutumorski lijek paklitaksel	T7191	Sigma-Aldrich, SAD
RNA iMAX Lipofectamine®	13778-150	Invitrogen, SAD
serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum, FBS</i>)	F7524	Sigma-Aldrich, SAD
tripsin i pufer za otapanje tripsina za pripremu uzoraka za spektrometriju masa	V511A	Promega, SAD
tripsin-EDTA	T4049	Sigma-Aldrich, SAD
tris baza	T1503	Sigma-Aldrich, SAD
tris-klorovodična kiselina (tris-HCl)	1.08219	Merck Millipore, Njemačka
triton X-100	X100	Sigma-Aldrich, SAD
tween-20	P139	Sigma-Aldrich, SAD

2.1.3. Otopine

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

Tablica 2. Otopine korištene u istraživanju.

Otopina	Priprema	Temperatura čuvanja
0,1 % mravlja kiselina	2 µL mravlje kiseline u 2 mL mqH ₂ O	sobna
1 M NH ₄ HCO ₃	7,9 g u 100 mL mq H ₂ O	sobna

1,25 ng/ μ L tripsin (1 \times)	50 μ L tripsina (100 \times) u 5 mL 25 mM NH_4HCO_3 , napraviti netom prije upotrebe	-
10 mM DTT	7,7 mg DTT u 5 mL 25 mM NH_4HCO_3 , napraviti netom prije upotrebe	
125 ng/ μ L tripsin (100 \times)	20 μ g tripsina u 160 μ L pufera za otapanje tripsina	-20 °C
2 ili 4 %, paraformaldehid (PFA)	20 g ili 40 g PFA i 100 μ L NaOH otapa se u 1000 mL PBS-a	-20 °C
25 mM NH_4HCO_3	1 mL 1M NH_4HCO_3 u 40 mL mq H_2O	sobna
30 % (v/v) acetonitril / 0,1 % (v/v) mravlja kiselina	1,2 mL acetonitrila, 4 μ L mravlje kiseline, 2796 μ L mq H_2O	sobna
5 % (v/v) acetonitril / 0,1 % (v/v) mravlja kiselina	100 μ L acetonitrila, 2 μ L mravlje kiseline, 1898 μ L mq H_2O	sobna
5 %-tno mlijeko u TBST	5% mlijeko u 1 \times TBS s 0,1 % Tween, napraviti netom prije upotrebe	-
50 % (v/v) acetonitril / 0,1 % (v/v) mravlja kiselina	2,5 mL 99,8 % (v/v) acetonitril / 0,2 % (v/v) mravlja kiselina u 2,5 mL mq H_2O	sobna
50 % (v/v) acetonitril / 50 % (v/v) 25 mM NH_4HCO_3	5 mL 100 % acetonitrila u 5 mL 25 mM NH_4HCO_3 , napraviti netom prije upotrebe	-
50 % acetonitril	2 mL acetonitrila u 2 mL mq H_2O	sobna
55 mM jodoacetamid (IA)	40 mg IA u 5 mL 25 mM NH_4HCO_3 , napraviti netom prije upotrebe	-
99,8 % (v/v) acetonitril / 0,2 % (v/v) mravlja kiselina	15 μ L mravlje kiseline u 7,5 mL acetonitrila	sobna
ARS (engl. <i>adhesion recovery solution</i>)	125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % SDS (w/v), 150 mM DTT, napraviti netom prije upotrebe	-
BSA u PBS-u	1 %, 3 % ili 5 % BSA u PBS-u	-20 °C
DMEM-BSA	1 % BSA u DMEM	4 °C
DMEM-FBS	10 %-tni FBS u DMEM	4 °C
DMEM-HEPES	25 mM	4 °C
DTBP otopina	6 mM u 25 mM DMEM-HEPES, napraviti netom prije upotrebe	-
EDTA otopina	0,5 M, pH 8	4 °C
HEPES	1 M, pH 7,4	4 °C
hranjiva podloga za zamrzavanje stanica	950 μ L DMEM-FBS + 50 μ L DMSO, napraviti netom prije upotrebe	-
modificirana 5 \times RIPA	250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 750 mM NaCl, 25 mM dinatrij EDTA (pH 8), 12,5 % (w/v) SDS, 5 % Triton X-100, 5 % natrij-deoksikolat	4 °C
MTT otopina (12,1 mM, 10 \times)	5 mg MTT-a se otapa u 1 mL fosfatnog pufera (PBS), filtrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci	4 °C
NaCl	4 M	4 °C

otopina boje amido crno	0,1 % amido crno, 10 % octene kiseline, 7,5 % MeOH	sobna temperatura
otopina inhibitora Cytochalasina D u DMSO-u	25 µM	-20 °C
otopina geneticina u vodi	50 mg/mL	4 °C
otopina za odbojavanje amido crno	40 % MeOH, 7 % octene kiseline	sobna
otopina protutumorskog lijeka paklitaksela u DMSO-u	6 mg/mL	-20 °C
pufer za lizu stanica, RIPA	RIPA (89901) s dodatkom 1× inhibitora fosfataza i proteaza iz Halt Protease Inhibitor Cocktail Kita i 50 µM EDTA, napraviti netom prije upotrebe	-
pufer za prijenos proteina	50 mL SDS Tris-HCl pH 8,3, 350 mL reH ₂ O i 100 mL MeOH za 500 mL	4 °C
reducirajući pufer za nanošenje uzoraka za SDS-PAGE, (engl. <i>sample buffer</i> , SB), 6×	375 mM Tris-HCl (pH 6,8), 30 % (w/v) glicerol, 12 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) bromofenolno plavo, 12 % (v/v) β-merkaptetanol	-20 °C
TBS 10×	250 mL 1 M TrisHCl (pH 7,5), 150 mL 5 M NaCl, reH ₂ O do 500 mL	4 °C
TBST	1× TBS, 0,1 % Tween	4 °C
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM, pH 6,8	4 °C
Tris-HCl, pH 7,6	1 M, pH 7,6	4 °C
Tris-HCl, pH 8	1 M, pH 8	4 °C

2.1.4. Protutijela i spojevi korišteni u metodama western blot (WB) i imunofluorescencija (IF)

Za određivanje količine proteina metodom WB i vizualizacije proteina metodom IF koristili smo protutijela i boje navedene u tablici 3.

Tablica 3. Primarna i sekundarna protutijela te boje korištene u metodama WB i IF.

WESTERN BLOT					
Primarno protutijelo	Kataloški broj	Proizvođač	Monoklonalno/ poliklonalno	Organizam	Razrjeđenje*
anti-integrin β5	D24A5	Cell Signaling Technology, SAD	monoklonalno	miš	1:1000
anti-KANK1	HPA005539	Sigma-Aldrich, SAD	poliklonalno	zec	1:450

anti-KANK2	HPA015643	Sigma-Aldrich, SAD	poliklonalno	zec	1:1000
anti-liprin β 1	sc-514575	Santa Cruz Biotechnology, SAD	monoklonalno	miš	1:100
anti-talin 1	MCA4770GA	Bio-Rad, SAD	monoklonalno	miš	1:1000
anti-talin 2	MCA4771GA	Bio-Rad, SAD	monoklonalno	miš	1:1000
Sekundarno protutijelo	Kataloški broj	Proizvođač	Monoklonalno/ poliklonalno	Organizam	Razrjeđenje*
zečji imunoglobulin obilježen peroksidazom iz hrena	31466	Invitrogen, SAD	poliklonalno	koza	1:5000
mišji imunoglobulin obilježen peroksidazom iz hrena	G21040	Invitrogen, SAD	poliklonalno	koza	1:10000
IMUNOFLUORESCENCIJA					
Primarno protutijelo	Kataloški broj	Proizvođač	Monoklonalno/ poliklonalno	Organizam	Razrjeđenje**
anti- α -tubulin	ab52866	Abcam, UK	poliklonalno	zec	1:250
anti-integrin β 5	D24A5	Cell Signaling Technology, SAD	monoklonalno	zec	1:800
anti-KANK1	HPA005539	Sigma-Aldrich, SAD	poliklonalno	zec	1:100
anti-KANK2	HPA015643	Sigma-Aldrich, SAD	poliklonalno	zec	1:100
anti-liprin β 1	sc-514575	Santa Cruz Biotechnology, SAD	monoklonalno	miš	1:50
anti-talin 1	MCA4770GA	Bio-Rad, SAD	monoklonalno	miš	1:100
anti-talin 2	MCA4771GA	Bio-Rad, SAD	monoklonalno	miš	1:100
anti- α -aktinin 4	390205	Santa Cruz Biotechnology, SAD	monoklonalno	miš	1:25
anti-miozin IIA	909801	BioLegend, UK	poliklonalno	zec	1:500
anti-vinkulin	ab129002	Abcam, UK	monoklonalno	zec	1:100
anti-vinkulin, Alexa Fluor® 647	ab196579	Abcam, UK	monoklonalno	zec	1:200

anti-vinkulin, Alexa Fluor® 555	ab206908	Abcam, UK	monoklonalno	zec	1:200
Sekundarno protutijelo	Kataloški broj	Proizvođač	Monoklonalo/ poliklonalno	Organizam	Razrjeđenje**
mišji imunoglobulin IgG, Alexa Fluor 546	A-11030	Invitrogen, SAD	poliklonalno	koza	1:1000
mišji imunoglobulin IgG, Alexa Fluor 488,	#4408	Cell Signaling Technology, SAD	poliklonalno	koza	1:1000
mišji imunoglobulin IgG, Alexa Fluor 405	A-31553	Invitrogen, SAD	poliklonalno	koza	1:250
zečji imunoglobulin IgG, Alexa Fluor, 555	A-31572	Invitrogen, SAD	poliklonalno	magarac	1:1000
zečji imunoglobulin IgG, Alexa Fluor 647	#4414	Cell Signaling Technology, SAD	poliklonalno	koza	1:1000
mišji imunoglobulin IgG ₁ , Alexa Fluor 555,	A-21127	Invitrogen, SAD	poliklonalno	koza	1:1000
mišji imunoglobulin IgG _{2b} , Alexa Fluor 488	A-21141	Invitrogen, SAD	poliklonalno	koza	1:1000
mišji imunoglobulin IgG, STAR ORANGE	STORAGE-1001	Abberior, SAD	poliklonalno	koza	1:100
zečji imunoglobulin IgG, STAR RED	STRED-1002	Abberior, SAD	poliklonalno	koza	1:100
Boja	Kataloški broj	Proizvođač			Razrjeđenje**
faloidin Alexa Fluor 488	P5282	Sigma Aldrich, SAD			1:100
faloidin Alexa Fluor 555	8953S	Cell Signaling Technology, SAD			1:200

*Razrjeđenja pripremljena u 5 %-tnom mlijeku u TBST-u;

**Razrjeđenja pripremljena u 5 % BSA

2.1.5. Male interferirajuće RNA (siRNA) korištene u pokusima prolazne transfekcije

Popis malih interferirajućih RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) koje smo koristili u istraživanju naveden je u tablici 4. Za pripremu matičnih otopina smo siRNA, koje dolaze u liofiliziranom obliku, otopili u vodi bez nukleaza u koncentraciji od 100 μM . Radne otopine koncentracije 10 μM dobili smo razrjeđivanjem u vodi bez nukleaza.

Tablica 4. Popis siRNA molekula i njihovih ciljnih sljedova korištenih u istraživanju.

Specifičnost	Kataloški broj/Ciljni slijed	Proizvođač
nespecifična (si(-))	4390844	Ambion, SAD
talin 1	5'-TGAATGTCCTGTCAACTGCT-3'	Sigma-Aldrich, SAD
talin 2	5'-TTTCGTTTTCATCTACTCCTT-3'	Sigma-Aldrich, SAD
KANK1	5'-CAGAGAAGGACATGCGGAT-3'	Sigma-Aldrich, SAD
KANK2	5'-ATGTCAACGTGCAAGATGA-3'	Sigma-Aldrich, SAD
integrin αV	4390826	Ambion, SAD

2.1.6. Kompleti kemikalija i standardi

U tablici 5 i tablici 6 navedeni su kompleti kemikalija i standardi.

Tablica 5. Kompleti kemikalija korišteni u istraživanju.

Primjena	Naziv	Proizvođač	Kataloški broj
Mjerenje koncentracije proteina: BCA test	BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, SAD	23227
Priprema lizata stanica	Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit	Thermo Fischer Scientific, SAD	78430
Mjerenje proliferacije stanica	Click-iT	Invitrogen, SAD	C10632

Tablica 6. Standardi korišteni u SDS-PAGE.

Upotreba	Standard	Proizvođač	Kataloški broj
SDS-PAGE	Standard za određivanje molekularne mase proteina Pageruler Prestained Protein Ladder (10 – 180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, SAD	26616
	Standard za određivanje molekularne mase proteina Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (40 – 300 kDa)	Thermo Fisher Scientific, SAD	26625

2.1.7. Uređaji i laboratorijski pribor

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

Tablica 7. Uređaji korišteni u istraživanju.

Uređaj	Proizvođač
analitička vaga AB54-S	Mettler Toledo, Hrvatska
brojač stanica Coulter Counter	Beckman Coulter, SAD
brojač stanica Luna	Logos Biosystems, Južna Koreja
centrifuga za mikroeprovete (do 30130 x g) 5430 R	Eppendorf, Njemačka
centrifuga za stanice (do 12568 x g) Labofuge 400	Heraeus, Njemačka
fluorescentni mikroskop Olympus BX51TF	Olympus, Japan
hladnjak 4 °C	Gorenje, Slovenija
hladnjak -20 °C	Bosch, Njemačka
hladnjak -80 °C	Skadi MORIS Technology, Latvija
inkubator za uzgoj stanica HeraCell 150	Heraeus, Njemačka
izvor električne struje za elektroforezu proteina PowerPac Basic	Bio-Rad, SAD
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
konfokalni mikroskop Leica TCS SP8 X	Leica Microsystems, Njemačka
magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija
mini inkubator	Labnet, SAD
pH metar PH3 Sension+	Hach, SAD
protočni citometar FACSCalibur	BD Biosciences, SAD
spektrofotometar StatFax 2100	Awareness Technology INC, SAD
spektrometar masa QE-EF	Thermo Fisher Scientific, SAD
spremnik za tekući dušik 35VHC	Taylor-Wharton, SAD
super-rezolucijski mikroskop STEDYCON STED	Abberior, SAD
svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
tresilica za pločice	Eppendorf, Njemačka
uređaj za elektroforezu	Invitrogen, SAD
uređaj za hladenu vakumsku evaporaciju „Refrigerated Vapor Trap“	Thermo Fisher Scientific, SAD
uređaj za polu-suhi prijenos proteina, Trans-Blot Turbo Transfer	Bio-Rad, SAD
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom Ultrasonic Processor	ColeParmer, SAD
uređaj za vizualizaciju kemiluminiscentnog signala Uvitec Alliance Q9 mini	Cambridge, UK
uređaji za elektroforezu i prijenos proteina	BioRad, SAD
vaga	Tehnica, Slovenija
centrifuga s vakumom „SpeedVac Concentrator“	Thermo Fisher Scientific, SAD

pumpa s vakumom, KNF Laboport® mini pump	Sigma-Aldrich, SAD
vibracijska miješalica EV 102	Tehtnica, Slovenija
vodena kupelj JB Nova	Grant Instruments, UK
zibalica Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija

Tablica 8. Laboratorijski pribor korišten u istraživanju.

Laboratorijski pribor	Proizvođač
mikroepuvete za analizu uzoraka, 186002640	Waters, SAD
mikroepuvete za zamrzavanje stanica volumena 1,0 mL	Sigma-Aldrich, SAD
uređaj za vertikalnu elektroforezu proteina Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems	Bio-Rad, SAD
automatske pipete različitih volumena	Integra Biosciences, SAD
staklene tikvice različitih volumena	VWR, SAD
gradijentni poliakrilamidni gel za SDS-PAGE 4 – 12%, NPO321	Invitrogen
gradijentni poliakrilamidni gel za SDS-PAGE 4 – 15 %, Mini-PROTEAN TGX, 4561084	Bio-Rad, SAD
plastični umetci za migraciju stanica koji rade na principu Boyden komorice s rupicama promjera 8 µM	Corning, SAD
membrana za prijenos proteina, nitrocelulozna, Trans-Blot Turbo Transfer Pack, 1704158	Bio-Rad, SAD
mikropipete različitih volumena	Eppendorf, Njemačka
nastavci za mikropipete, različitih volumena	Brand, Njemačka
Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm	Falcon, SAD
plastični spremnici za led	-
plastične epruvete, 15 i 50 mL	Falcon, SAD
plastične mikroepuvete različitih volumena	Falcon, SAD
pločice s 96 bunarića s oblim dnom, BR701330	Sigma-Aldrich, SAD
pločice s 96 bunarića s rupom na dnu, PER.MOL.10	Glygen Corporation, SAD
pločice sa staklenim dnom s 4 komorice promjera 35 mm	Cellvis, SAD
pločice za uzgoj kulture stanica s 6, 24 ili 96 bunarića	Falcon, SAD
porozne kuglice za vezanje proteina, OLIGO R3, 1-1339-03	Thermo Fisher Scientific, SAD
PVDF pločice s 96 bunarića, 3504	Corning, SAD
staklene čaše različitih volumena	Kimble, SAD
staklene pipete različitih volumena: 1, 2, 5, 10 i 25 mL	Bellco, SAD; Hirschmann, Njemačka
strugač za stanice	TPP Techno Plastic Products AG, Švicarska

2.1.8. Računalni programi

Računalni programi navedeni su u tablici 9.

Tablica 9. Računalni programi korišteni u istraživanju.

Svrha	Naziv	Inačica	Izdavač
analiza slika snimljenih konfokalnim mikroskopom	LasX	3.5.7.23225	Leica Microsystems, Njemačka
mjerenje migracije i invazije stanica, denzitometrija	ImageJ	1.53	National Institutes of Health, SAD
statistička analiza	GraphPad Prism	9.0.0	GraphPad Software, SAD
obrada podataka dobivenih spektrometrijom masa	Scaffold	5.3.0	Proteome Software, SAD
	Mascot Deamon	2.5.1	Matrix Sciences International, SAD
	QSpec/QProt	1.3.5.	SourceForge, SAD
analiza podataka dobivenih na protočnom citometru	FCS Express Flow Cytometry Data Analysis	3	Denovosoftware, SAD
obrada slika snimljenih na STED-mikroskopu	Huygens	/	Scientific Volume Imaging, Nizozemska

2.2. Metode

Većina metoda stanične i molekularne biologije koje smo koristili u izradi ovog doktorskog rada opisana je u priručniku Metode u molekularnoj biologiji (Ambriović Ristov i sur., 2007.).

2.2.1. Kultura stanica

Stanice smo uzgajali prema uputama dobavljača u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM-FBS u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i atmosferi zasićenoj vlagom s 5 % CO₂. Ovisno o popunjenosti podloge, stanice smo rasiđivali dva do tri puta tjedno. Nakon uklanjanja hranjive podloge stanice smo isprali s 0,5 mL tripsina zagrijanog na 37 °C, a potom smo dodali 1 – 2 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge tijekom par minuta. Djelovanje tripsina zaustavili smo dodatkom četiri puta većeg volumena

DMEM-FBS-a. Broj nasađenih stanica za održavanje kulture iznosio je 7×10^5 stanica po Petrijevoj zdjelici promjera 10 cm.

Radi osiguravanja dovoljnih zaliha stanica, tijekom ranih pasaža stanice smo zamrzavali i pohranili u tekući dušik pri $-196\text{ }^\circ\text{C}$. Stanice smo nakon odvajanja od podloge, centrifugirali 10 minuta pri $1000 \times g$, a skupljeni talog stanica resuspendirali smo u $950\text{ }\mu\text{L}$ DMEM-FBS-a. Zamrzavanje se provodilo polagano, stanice smo inkubirali pola sata na ledu prije dodatka $50\text{ }\mu\text{L}$ DMSO-a, a potom smo mikroeprevete za zamrzavanje prebacili na stalak spremnika za tekući dušik tj. u pare tekućeg dušika ($-80\text{ }^\circ\text{C}$). Nakon 24 sata prebacili smo mikroeprevete u tekući dušik gdje su pohranjene do daljnjeg.

2.2.2. Izolacija integrinskog adhezijskog kompleksa

Izolaciju IAC-a proveli smo prema metodi opisanoj u Jones i sur. (2015.). Stanice (2×10^6) smo nasadili u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm kako bi nakon 48 sati popunjenost površine na kojoj rastu bila 80 – 90 %. Izolaciju IAC-a proveli smo, ovisno o potrebnoj količini uzorka za daljnju analizu, iz dvije, tri ili četiri Petrijeve zdjelice. Tijekom optimizacije izolacije IAC-a, svaki pokus proveli smo s jednakim brojem Petrijevih zdjelica kontrolne skupine, koju nismo izlagali kemijskom umreživaču i skupina izloženih kemijskom umreživaču. Tijekom kasnijih izolacija nismo provjeravali uspješnost umrežavanja, već smo sve Petrijeve zdjelice izlagali kemijskom umreživaču. Nakon uklanjanja tekuće hranjive podloge stanice smo isprali s 3 mL ugrijanog 25 mM DMEM-HEPES ($37\text{ }^\circ\text{C}$) kako bismo uklonili stanice koje nisu prihvaćene za podlogu. Potom smo na stanice dodali kemijski umreživač DTBP (6 mM, 5 mL) tijekom 10 minuta pri $37\text{ }^\circ\text{C}$. Umrežavanje smo zaustavili dodavanjem $150\text{ }\mu\text{L}$ 1 M Tris-HCl pufera (pH 8), tijekom dvije minute pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja tekućine, Petrijeve zdjelice sa stanicama držali smo pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$ i isprali s 5 mL hladnog PBS-a. Zatim smo stanice lizirali s 5 mL pufera 1 \times RIPA (5 \times RIPA razrijeđen s mqH_2O) tijekom par minuta pri sobnoj temperaturi, a proces lize pratili smo svjetlosnim mikroskopom. Ostatke stanica u Petrijevim zdjelicama isprali smo jakim mlazom vodovodne vode iz slavine tijekom 10 sekundi (protok vode otprilike 150 mL/s). Petrijeve zdjelice smo potom isprali s 5 mL hladnog PBS-a i provjerili smo uspješnost uklanjanja stanica (pod mikroskopom se ne vide stanice). Dobro ocijeđene Petrijeve zdjelice postavili smo na zamrznute plastične spremnike za led i proteine IAC-a u prvoj Petrijevoj zdjelici smo skupili u $400\text{ }\mu\text{L}$ ARS-a strugačem za stanice, nakon čega smo ARS sa skupljenim proteinima prenijeli pipetom u iduću Petrijevu zdjelicu i isti postupak smo ponovili na svim zdjelicama skupine. Nakon prenošenja skupljenih uzoraka iz zadnje Petrijeve zdjelice u mikroeprevetu, dodali smo ponovno $400\text{ }\mu\text{L}$ ARS-a u zadnju zdjelicu skupine i postupak ponovili u obrnutom smjeru. Za taloženje proteina, u uzorke

smo dodali četiri puta veći volumen hladnog acetona (ohlađenog pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), a uzorke pohranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

Za izolaciju samo proteina retikularnih adhezija, stanice smo prije umrežavanja izložili djelovanju cyto D (2 sata, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), kemikalije koja inhibira stvaranje aktinskog citoskeleta stanice i posljedično dovodi do raspada fokalnih adhezija, ostavljajući prisutne samo retikularne adhezije.

2.2.3. Analiza količine proteina natrij-dodecil sulfat elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*) i metodom WB

Priprema uzoraka proteina

Pripremu uzoraka proteina započeli smo uzgojem stanica u pločicama sa 6 bunarića (4×10^4). Nakon 72 sata, pločice smo postavili na led, stanice smo dva puta isprali hladnim PBS-om, dodali pufer RIPA s dodatkom EDTA i inhibitora proteaza i fosfataza, te smo lizate stanica skupili struganjem. Za smanjenje viskoziteta uzorka, zbog velike količine oslobođene DNA iz stanica, lizate smo izložili djelovanju ultrazvuka (3×5 sekundi s 30 % amplitude) te smo uzorke centrifugirali pri $14\ 000 \times g$ tijekom 5 minuta kako bismo dodatno uklonili prisutne veće komade raspadnutih stanica. Supernatant smo odvojili u nove mikroeprevete te smo ukupnu koncentraciju proteina u uzorku odredili BCA testom prema uputama proizvođača. Određenu količina uzorka (15 – 40 μg proteina) pomiješali smo s reducirajućim puferom za nanošenje uzoraka za SDS-PAGE do koncentracije pufera 1 \times , a prije nanašanja na gel uzorke smo zagrijali u termobloku tijekom 5 minuta pri $96\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Istraživanje proteina u uzorcima izoliranih IAC započeli smo taloženjem proteina dodatkom četiri puta većeg volumena hladnog acetona. Potom smo uzorke centrifugirali tijekom 20 minuta pri $16000 \times g$ i temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, supernatant smo pažljivo uklonili, a talog dodatno osušili na zraku u digestoru tijekom 15 minuta. Uzorke proteina otopili smo u $45\ \mu\text{L}$ 2 \times reducirajućeg pufera za nanošenje uzoraka za SDS-PAGE i zagrijavali u termobloku tijekom 30 minuta pri $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz trešnju brzinom 1000 rpm.

Razdvajanje proteina pomoću metode SDS-PAGE

Razdvajanje proteina uzoraka staničnih lizata i IAC-a pomoću metode SDS-PAGE provodili smo u vertikalnom gradijentnom poliakrilamidnom gelu (4 – 15 %, Bio-Rad). Gelove smo umetnuli u uređaj za

elektroforezu (BioRad, SAD) i dodali odgovarajuću količina 1 × pufera za elektroforezu (BioRad, SAD). Osim nanesenih uzoraka, na gel smo istovremeno nanijeli i standard za određivanje molekulske mase proteina. Ovisno o molekulskoj masi proteina kojeg smo željeli vizualizirati koristili smo standarde različitih raspona molekulskih masa. SDS-PAGE smo proveli pri naponu 80 – 110 V i zaustavili kada je bromfenol plava boja iz pufera za nanošenje uzoraka dosegla kraj gela.

Analiza proteina pomoću metode WB

Nakon razdvajanja proteina metodom SDS-PAGE, provedli smo polusuhi prijenos razdvojenih proteina s gela na nitroceluloznu membranu. Gradijentni gel s razdvojenim proteinima stavili smo na membranu te se slagao u „sendvič” između filter papira i to tako da je bliže negativno nabijenoj anodi u odnosu na membranu. Uspješnost prijenosa proteina na membranu odredili smo bojanjem membrane amido crnom bojom tijekom dvije minute pri sobnoj temperaturi. Nakon slikanja ovako vizualiziranih proteina, uklonili smo amido crnu boju otopinom za odbojavanje, a membranu smo ispirali tijekom pola sata u TBST-u i potom blokirali 5 %-tnom otopinom mlijeka tijekom sat vremena na zibalici. Blokiranje je nužan korak da bi se zasitila sva vezna mjesta na membrani. Potom smo membranu inkubirali s otopinom primarnog protutijela razrijeđenog u 5 % BSA/PBS tijekom noći pri 4 °C ili dva sata pri sobnoj temperaturi. Membrana smo nakon vezanja primarnog protutijela isprali s pet volumena TBST-a (5 puta po 5 minuta) i inkubirali u otopini odgovarajućeg sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom hrena, razrijeđenog u 5 % BSA/PBS, tijekom jedan sat pri sobnoj temperaturi. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela nalazi se u tablici 3. Nakon temeljitog ispiranja sekundarnog protutijela TBST-om na način kao što je prethodno opisano za primarno protutijelo, vezanje sekundarnog protutijela vizualizirali smo metodom kemiluminiscencije uz pomoć kemiluminiscentnog reagensa. Na istoj membrani proveli smo imunodetekcije više različitih proteina, ali smo prethodno vezana protutijela uklonili pomoću pufera za uklanjanje vezanih protutijela za membranu (engl. *stripping* pufera) kroz 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Membranu smo potom isprali TBST-om i ponovo blokirali u otopini 10 % mlijeka. Dobivene slike membrane analizirali smo pomoću računalnog programa ImageJ, kako bismo odredili razliku u količini proteina između uzoraka.

2.2.4. Prolazno utišavanje proteina siRNA molekulama

Za istraživanje uloge pojedinih proteina adhezije u stanicama MDA-MB-435S koristili smo metodu utišavanja proteina tranfekcijom pomoću malih interferirajućih molekula RNA, siRNA. Stanice (4×10^4 , 4

$\times 10^5$ ili $1,7 \times 10^6$) smo nasadili u pločice za uzgoj stanica s 24 bunarića, 6 bunarića ili u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm kako bi nakon 24 sata popunjenost površine bila 60 – 80 %. Na stanice smo dodali mješavinu siRNA s transfekcijskim reagensom pripremljenu prema uputama proizvođača (tablica 10). Konačne koncentracije siRNA bile su 25 nM. Nakon 24 ili 48 sati od transfekcije, stanice smo koristili za daljnje pokuse, a učinkovitost utišavanja provjeravali smo na proteinskoj razini metodom WB i/ili IF.

Tablica 10. Sastav transfekcijske smjese za prolazno utišavanje proteina transfekcijom specifičnih siRNA.

	Priprema smjese za 1 bunarić (pločica s 24 bunarića)	Priprema smjese za 1 bunarić (pločica sa 6 bunarića)	Priprema smjese za Petrijevu zdjelicu (10 cm)
Otopina A	48,75 μ L Opti-MEM + 1,25 μ L siRNA	120 μ L Opti-MEM + 5 μ L siRNA	1127 μ L Opti-MEM + 23 μ L siRNA
Otopina B	49,5 μ L Opti-MEM + 0,5 μ L Lipofectamin RNAiMax	123,33 μ L Opti-MEM + 1,67 μ L Lipofectamin RNAiMax	1136,2 μ L Opti-MEM + 13,8 μ L Lipofectamin RNAiMax
Volumen transfekcijske smjese	100 μ L	250 μ L	2300 μ L
Volumen DMEM-FBS-a	400 μ L	1750 μ L	7700 μ L

2.2.5. Analiza proteina metodom spektrometrije masa (MS)

Pripremu uzoraka za analizu proteina MS-om provedeli smo metodom digestije u gelu pomoću tripsina (engl. *in-gel tryptic digestion*). Uzorke koji su sadržavali izolirane IAC-e istaložili smo acetonom i pripremili za analizu kao što je prethodno opisano (Humphries i sur., 2009.). Uzorke otopljene u $2 \times$ reducirajućem puferu SDS (Invitrogen, SAD) zagrijavali smo na tresilici za pločice (30 minuta, 70 °C, 1000 rpm) i nanijeli na gradijentni poliakrilamidni gel za SDS-PAGE (4 – 12 %, Invitrogen). Gelove smo postavili u uređaj za elektroforezu (Invitrogen, SAD) i dodali odgovarajuću količinu $1 \times$ pufera za elektroforezu (Invitrogen, SAD). Elektroforezu smo proveli tijekom 3 min pri 200 V, što je dovoljno da proteini uđu u gel. Proteinske vrpce smo obojali bojom Coomassie plavo tijekom 20 minuta i gelove isprali preko noći u mqH_2O (pri 4 °C). Sljedeći dan, obojene vrpce proteina smo izrezali i nasjeckali na komade veličine približno 1 mm^3 pomoću rezača s oštricama i prebacili u perforirane pločice s 96 bunarića. Uklanjanje boje iz gela proveli smo ispiranjem otopinom 50 % (v/v) acetonitril / 50 % (v/v) 25 mM NH_4HCO_3 . Komadiće gela smo potom isprali i dehidrirali pomoću acetonitrila, nakon čega je uslijedilo dodatno sušenje u centrifugi s

vakuomom (tijekom 30 minuta, pri $-107\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uzorke proteina reducirali smo korištenjem 10 mM DTT-a (tijekom 1 sat pri $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mini inkubatoru) i alkilirani korištenjem 55 mM IA (tijekom 45 minuta pri, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, u mraku). Uzorke smo isprali i ponovno dehidrirali pomoću 25 mM NH_4HCO_3 i acetonitrila. Za dobivanje peptida iz uzoraka proteina, komadiće gela smo inkubirali u otopini tripsina (1,25 ng/ μL , Promega, SAD), prvo 45 minuta pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a potom preko noći pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mini inkubatoru. Dobivene peptide smo sakupili i ekstrahirali u čistoj pločici s 96 bunarića upotrebom 99,8 % (v/v) acetonitrila plus 0,2 % (v/v) mravlje kiseline (tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi) i 50 % (v/v) acetonitrila plus 0,1 % (v/v) mravlja kiseline (tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi). Uzroke smo potom osušili u centrifugi s vakuumom (tijekom 2 sata pri $-107\text{ }^{\circ}\text{C}$) i resuspendirali u 20 μL 5 % (v/v) acetonitrila/0,1 % (v/v) mravlje kiseline. Prije analize morali smo provesti odsoljavanje uzoraka pomoću poroznih kuglica za vezanje proteina u PVDF pločicama s 96 bunarića. Odsoljavanje smo proveli dodatkom uzorka proteina na kuglice u bunariću i ispiranjem kuglica s vezanim peptima pomoću 0,1 % mravlje kiseline. Peptide smo eluirali s kuglica u 30 % (v/v) acetonitril / 0,1 % (v/v) mravlja kiseline. Uzorke smo osušili u mikroepruветama za analizu uzoraka na spektrometru masa. Prije analize uzorke je potrebno ponovno otopiti u 11 μL 5 % (v/v) acetonitrila / 0,1 % (v/v) mravlje kiseline. Analizu proteina IAC-a proveli smo metodom MS u laboratoriju prof. dr. sc. Martina J. Humphriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Matrix Research, Faculty of Life Science, University of Manchester). Uzorke smo analizirali metodom LC-MS/MS (Horton i sur., 2015.) pomoću spektrometra masa Thermo QExactive HF. Smjese peptida eluirali smo tijekom 60 minuta koristeći gradijent koji sadrži 92 % otopine A (0,1 % mravlja kiseline u vodi) i 8 % do 33 % otopine B (0,1 % mravlja kiseline u acetonitrilu). Protok otapala postavljen je na 300 nL po minuti.

Identifikaciju proteina u uzorku analiziranom metodom MS započeli smo pretraživanjem baze podataka proteina čovjeka Swissprot i Trembl (12. prosinca 2021. / 10. lipnja 2023.) pomoću programa Mascot (Matrix science, verzija 2.5.1). Dopuštena tolerancija mase prekursora i fragmenata iona iznosila je 10 ppm, odnosno 0,6 Da. Karbamidometilaciju cisteina postavili smo kao fiksnu modifikaciju, a oksidaciju metionina kao varijabilnu modifikaciju. U daljnjoj analizi razmatrali smo samo peptide s ionima prekursora naboja 2+, 3+ i 4+. Identifikaciju proteina potvrdili smo programom Scaffold (Proteome softver, verzija 5.1.0). Identifikacija spektara provedena je u programu Scaffold algoritmom Scaffold (prag vjerojatnosti 95 %), a proteine smo identificirali uz vjerojatnost iznad 99 % te minimalno 1 prepoznati karakteristični peptid uz algoritam Protein prophet (Nesvizhskii i sur., 2003.). Ukupne brojeve spektara koristili smo kao mjeru količine proteina. Dobivene rezultate smo naknadno statistički obradili u programu QSpec kako bi se dobile stope lažnih pronalazaka (engl. *false discovery rate*, FDR) i relativne promjene

(engl. *fold change*). Dobivene vrijednosti korištene su za grafičko prikazivanje statistički značajnih promjena između uzoraka.

2.2.6. Analiza lokalizacije proteina metodom imunofluorescencije

Za vizualizaciju željenih proteina koristili smo metodu IF. Stanice (4×10^4) smo nasadili na pokrovno stakalce u pločicu s 24 bunarića. Nakon 48 ili 72 sata rasta stanice smo isprali PBS-om, fiksirali i permeabilizirali ledeno hladnim metanolom (tijekom 10 minuta), ili fiksirali s 2 % (v/v) PFA (tijekom 12 minuta) te permeabilizirali s 0,1 % (v/v) Triton X-100 (tijekom 2 minute). Kako bismo izbjegli nespecifično vezanje protutijela, uzorke smo blokirali u otopini 3 % BSA/PBS tijekom pola sata pri sobnoj temperaturi. Potom smo ih inkubirali u otopini primarnih protutijela u 5 % BSA/PBS tijekom sat vremena pri sobnoj temperaturi ili preko noći na 4 °C, a zatim u otopini sekundarnih protutijela obilježenih fluoroforom (tablica 3). Za vizualizaciju više proteina istovremeno koristili smo sekundarna protutijela obilježena različitim fluoroforima (Alexa Fluor 488, 555, 647). Aktin smo vizualizirali fluorescentno obilježenim faloidinom (Alexa Fluor 488 ili 555). Nakon završnog ispiranja u PBS-u, uzorke stanica smo uklopili u podlogu za uklapanje stakalaca s dodatkom boje DAPI (za bojenje jezgre). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu interferencijske refleksijske mikroskopije (engl. *interference reflection microscopy*, IRM). Analizu smo proveli na invertnom konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 X s HC PL APOCS2 63×/1,40 imerzijskim objektivom, a slike smo analizirali pomoću računalnog programa LasX i ImageJ. Kvantifikaciju aktinskih stresnih vlakana proveli smo samo s onim vlaknima koja su završavala u FA, što smo odredili bojanjem integrina $\beta 5$. Prilikom kvantifikacije mikrotubula, odabrali smo samo mikrotubule koji se nalaze 5 μm od ruba stanice (određeno na temelju IRM).

2.2.7. Analiza proteina imunofluorescencijom i super-rezolucijskom mikroskopijom

Za precizno određivanje lokalizacije i strukture proteina FA koristili smo imunofluorescenciju i super-rezolucijsku mikroskopiju, točnije, mikroskopiju stimulirane deplecije emisije (engl. *stimulated emission depletion microscopy*, STED). Stanice smo pripremili kao što je opisano u poglavlju 2.2.6. Nakon fiksacije, uzorke smo blokirali u otopini 3 % BSA/PBS tijekom pola sata pri sobnoj temperaturi. Potom smo ih inkubirali u otopini primarnih protutijela ili fluorescentno obilježenih malih peptida koji se specifično vežu za tubulin ili aktin u 5 % BSA/PBS (Affimer TUB32C i Affimer 14, patent: PCT/GB2014/050435) (Cordell i sur., 2022.) tijekom sat vremena pri sobnoj temperaturi ili preko noći pri 4 °C. Uslijedila je inkubacija sa sekundarnim protutijelima obilježenim fluoroforima pogodnim za snimanje na STED-mikroskopu

(Abberior STAR RED, Abberior STAR ORANGE) tijekom sat vremena pri sobnoj temperaturi. Nakon završnog ispiranja u PBS-u, uzorke smo uklopili u podlogu za uklapanje stakalaca. Analizu smo proveli na mikroskopu STEDYCON STED na Sveučilištu u Leedsu (Leeds, UK) u laboratoriju prof. dr. sc. Michelle Peckham. Za obradu dobivenih slika koristili smo računalni program za dekonvoluciju signala Huygens, a za analizu program Image J.

2.2.8. Određivanje proliferacije stanica

Test MTT

Citotoksični učinak protutumorskog lijeka PTX na stanice u kulturi odredili smo kolorimetrijskim testom MTT. Stanice (10^4) smo nasadili u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića i izložili željenim koncentracijama protutumorskog lijeka PTX. Nakon 72 sata, iz bunarića smo u potpunosti uklonili tekuću hranjivu podlogu. U svaki bunarić sa stanicama i u jedan bunarić bez nasađenih stanica (slijepa proba) dodali smo po 40 μ L 1 \times MTT otopine i inkubirali pločicu pri 37 °C tijekom tri sata u inkubatoru. Žive, metabolički aktivne stanice pomoću mitohondrijskih reduktaza reduciraju žuti MTT u ljubičaste kristale formazana koji se zatim otapaju dodatkom 170 μ L DMSO-a tijekom 30 minuta na tresilici za pločice. Nakon što su se kristali potpuno otopili, intenzitet obojenja (apsorbancija) izmjerili smo spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra StatFax 2100 pri valnoj duljini 600 nm. Proliferacija stanica je proporcionalna izmjerenoj apsorbciji.

Metoda Click-iT

Za određivanje proliferacije stanica koristili smo komplet kemikalija Click-iT prema uputama proizvođača. Stanice (4×10^5) smo nasadili u pločicu sa 6 bunarića i nakon 24 sata transficirali kontrolnom siRNA ili specifičnom siRNA. Nakon 24 sata, stanice smo odvojili od podloge pomoću tripsina, te ih ponovno nasadili u iste bunariće s ciljem oponašanja koraka tijekom testa MTT (nasađivanje, odvajanje od podloge, nasađivanje). Nakon 24 sata, u bunariće smo dodali modificirani analog timidina, EdU (5-etinil-2'-deoksiuridin, konačna koncentracija 10 μ M). Dva sata nakon toga, stanice smo odvojili od podloge pomoću tripsina, skupili u epruvete volumena 15 mL te isprali otopinom 1 % BSA/PBS (resuspendiranje i centrifugiranje pri 1100 \times g tijekom 5 minuta). Potom smo stanice fiksirali dodatkom Click-iT fiksativa (15 minuta pri sobnoj temperaturi) i permeabilizirali Click-iT permeabilizacijskim puferom (15 minuta pri sobnoj temperaturi, u mraku). Nakon toga smo na stanice dodali Click-iT koktel (30 minuta pri sobnoj temperaturi, u mraku), pripremljen prema uputama proizvođača. Stanice smo isprali Click-iT permeabilizacijskim puferom, centrifugirali (1100 \times g tijekom 5 minuta) i talog ponovno resuspendirali u

istoj otopini. Analizu smo proveli na protočnom citometru, a podatke analizirali pomoću FCS Express programa. Za određivanje stope proliferacije, uspoređivali smo broj proliferirajućih (EdU +) stanica.

2.2.9. Mikroskopija živih stanica

Za određivanje utjecaja utišavanja pojedinih proteina FA i RA na brzinu rasta mikrotubula u stanicama MDA-MB-435S, konstruirali smo populacije stanica MDA-MB-435S i i klon sa smanjenom ekspresijom integrina αV ($3\alpha V$), koje stabilno ekspimiraju fluorescentno obilježeni protein EB3 (engl., *end-binding protein 3*) koji se nalazi na vrhu rastućih mikrotubula (stanice izolirane u sklopu izrade diplomskog rada Kaatje Coopmans). Za mikroskopiju živih stanica, stanice MDA-MB-435S-EB3 i $3\alpha V$ -EB3 ($4,5 \times 10^4$) smo nasadili u pločicu s 4 komorice i staklenim dnom. U pokusima s prolaznim utišavanjem ili izlaganjem PTX-u, snimali smo stanice 48 sati nakon transfekcije ili 24 sata nakon izlaganja PTX-u. Slike smo snimali svakih 13 sekundi tijekom pet minuta po stanici koristeći mikroskop Leica TCS SP8 Xs HC PL APOCS2 $63\times/1,40$ imerzijskim objektivom, $3,5 \times$ zoom. Dobivene filmove analizirali smo računalnim programom ImageJ (*manual tracking plugin*).

2.2.10. Određivanje migratorne sposobnosti stanica

Za analizu pokretljivosti (migracije) stanica koristili smo plastične umetke koji koriste princip Boydenove komorice, a sastoje se od dva odjeljka razdvojenih membranom s rupicama promjera $8 \mu m$. Stanice smo nasadili u DMEM-FBS i nakon 24 sata uzgoja, zamijenili im hranjivu podlogu s DMEM-om bez seruma. Nakon 24 sata, odvojili smo izglednije stanice od podloge pomoću $0,5 \text{ mM}$ EDTA i dva puta isprali s DMEM-BSA, resuspendiranjem stanica u DMEM-BSA i centrifugiranjem ($1100 \times g$ tijekom 5 minuta). Plastične umetke smo postavili u pločicu s 24 bunarića te smo stanice (8×10^4) nasadili u komorice u DMEM-BSA. S donje strane bunarića, ispod komorice, pažljivo smo dodali DMEM-FBS i stanice su migrirale prema 10% (v/v) FBS u DMEM-u kao kemoatraktantu tijekom 22 sata. Za kontrolu nasađivanja jednakog broja stanica, za svaki uzorak, nasadili smo jednaki broj stanica u bunarić u DMEM-FBS, koje smo brojali nakon završene migracije. Nakon 22 sata, komorice smo isprali uranjanjem u bunarić napunjen PBS-om. Stanice zaostale na gornjoj strani membrane, koje nisu migrirale, uklonili smo štapićima s vatom natopljenim PBS-om. Stanice koje su migrirale kroz rupice u membrani, te su se nalazile na donjoj strani, fiksirali smo s 4% PFA tijekom 15 minuta. Nakon dva ispiranja membrane u PBS-u, stanice smo obojali s 1% (w/v) bojom kristal-ljubičasto u PBS-u tijekom 90 minuta. Nakon bojanja, pažljivo smo isprali membrane vodovodnom vodom i izrezali skalpelom. Membrane smo uklopili u podlogu za uklapanje stakalaca na

predmetno stakalce i snimili mikroskopom Olympus BX51TF (pet slika/uzorak). Broj stanica smo odredili pomoću računalnog programa ImageJ (*multi-point tool*).

2.2.11. Statistička analiza

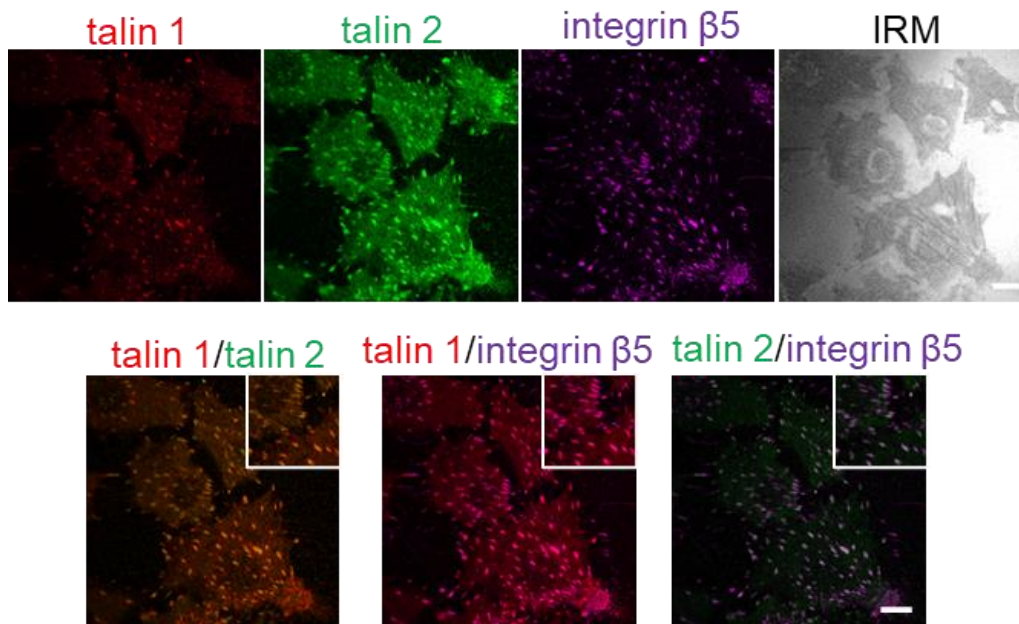
Sve dobivene rezultati obradili smo statistički pomoću računalnog programa GraphPad Prism (verzija 9.0.0). Podatke dobiveni metodom IF, WB, testom proliferacije i migracije analizirani smo jednosmjernom analizom varijance (engl. *one-way analysis of variance* (ANOVA)) i Dunnettovim testom višestruke usporedbe (usporedba više od tri grupe podataka) ili Studentovim t-testom (usporedba dvije grupe podataka). Podatke dobivene mikroskopijom živih stanica analizirani smo jednosmjernim testom ANOVA, Šídákovim testom višestruke usporedbe ili Studentovim t-testom. Podaci dobiveni testom MTT analizirani su dvosmjernim testom ANOVA sa Šídákovim testom višestruke usporedbe. Rezultati su prikazani kao histogrami s naznačenom srednjom vrijednosti (\pm standardna devijacija, SD), kao violinski prikazi ili kao dijagrami raspršenosti s označenim medijanom. Na prikazima rezultata, zvjezdica („*“) označava statistički značajnu razliku između uzoraka i to: * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$. Oznaka „ns“ označava nepostojanje statistički značajne razlike između uzoraka. Za vizualizaciju promjene količine proteina u uzorcima IAC-a analiziranih MS-om, korišten je dijagram vulkano. Iz dobivenih broja spektara za pojedini protein u programu Scaffold, u programu QSpec izračunali smo vrijednosti FDR i *fold change* na temelju kojih smo odredili značajne promjene u količini proteina između uzoraka. Količina proteina za čiji je broj spektara vrijednost FDR bila manja od 0,05 (negativni logaritam FDR veći od 1,3), a relativna promjena veća od 1,5 puta (\ln (fold change) veći ili manji od 0,405) ili od 2 puta (\ln (fold change) veći ili manji od 0,693), značajno je promjenjena u odnosu na količinu proteina u kontrolnom uzorku .

3. REZULTATI

3.1. Talin 1, talin 2 i KANK2 dio su FA $\alpha V\beta 5$ u stanicama melanoma MDA-MB-435S

Prethodna istraživanja naše grupe pokazala su da stanice melanoma MDA-MB-435S preferencijalno koriste integrin $\alpha V\beta 5$ za stvaranje adhezija tijekom uzgoja stanica bez prethodnog oblaganja površine proteinima ECM-a. Utišavanjem integrina αV i posljedično smanjenjem broja $\alpha V\beta 5$ adhezija, došlo je do povećanja osjetljivosti stanica na PTX i smanjenja učinkovitosti migracije. Usporedbom izoliranih IAC-a kontrolnih stanica i stanica sa stabilno smanjenom ekspresijom integrina αV (klon 3 αV) određene su sastavnice adhesoma integrina $\alpha V\beta 5$. Na popisu proteina identificiranih pomoću MS sa smanjenim brojem specifičnih spektara nalaze se talin 1 i talin 2 te sve sastavnice CMSC-a, uključujući i KANK2. Utišavanje proteina KANK2 imitiralo je utjecaj utišavanja integrina αV , povećalo je osjetljivost stanica na PTX te smanjilo učinkovitost migracije. Uz KANK2, u adhesomu je identificiran i KANK1 s malim brojem specifičnih spektara. No iz tih rezultata nije jasno smanjuje li se njegova količina nakon utišavanja integrina αV i koja je njegova uloga u ovim stanicama (Paradžik i sur., 2020). Isto tako, iz analize adhesoma nije bilo moguće zaključiti s kojim od dva homologa talina, 1 i/ili 2, KANK2 ostvaruje interakciju i koji je točan mehanizam povećane osjetljivosti stanica na PTX i smanjene učinkovitosti migracije uslijed utišavanja integrina αV .

Kako bismo potvrdili jesu li oba talina dio FA $\alpha V\beta 5$ stanica melanoma MDA-MB-435S, proveli smo analizu lokalizacije metodom IF (slika 12). Za istovremenu vizualizaciju oba talina koristili smo specifična primarna protutijela različitih izotipova te sekundarna protutijela specifična za izotip (za mišji globulin IgG₁ i IgG_{2b}). Za određivanje lokalizacije FA $\alpha V\beta 5$ koristili smo protutijelo za integrin $\beta 5$, s obzirom da se ova podjedinica integrina veže isključivo na podjedinicu αV (slika 3, Arias-Mejias i sur., 2020.) te je svaki uočeni signal odgovarao adheziji $\alpha V\beta 5$. Na slici 12 vidljivo je da se oba talina nalaze u blizini signala integrina $\beta 5$. Manje uvećane slike u gornjem desnom kutu preklapljenih slika potvrđuju da talin 1, talin 2 i integrin $\beta 5$ kolokaliziraju.

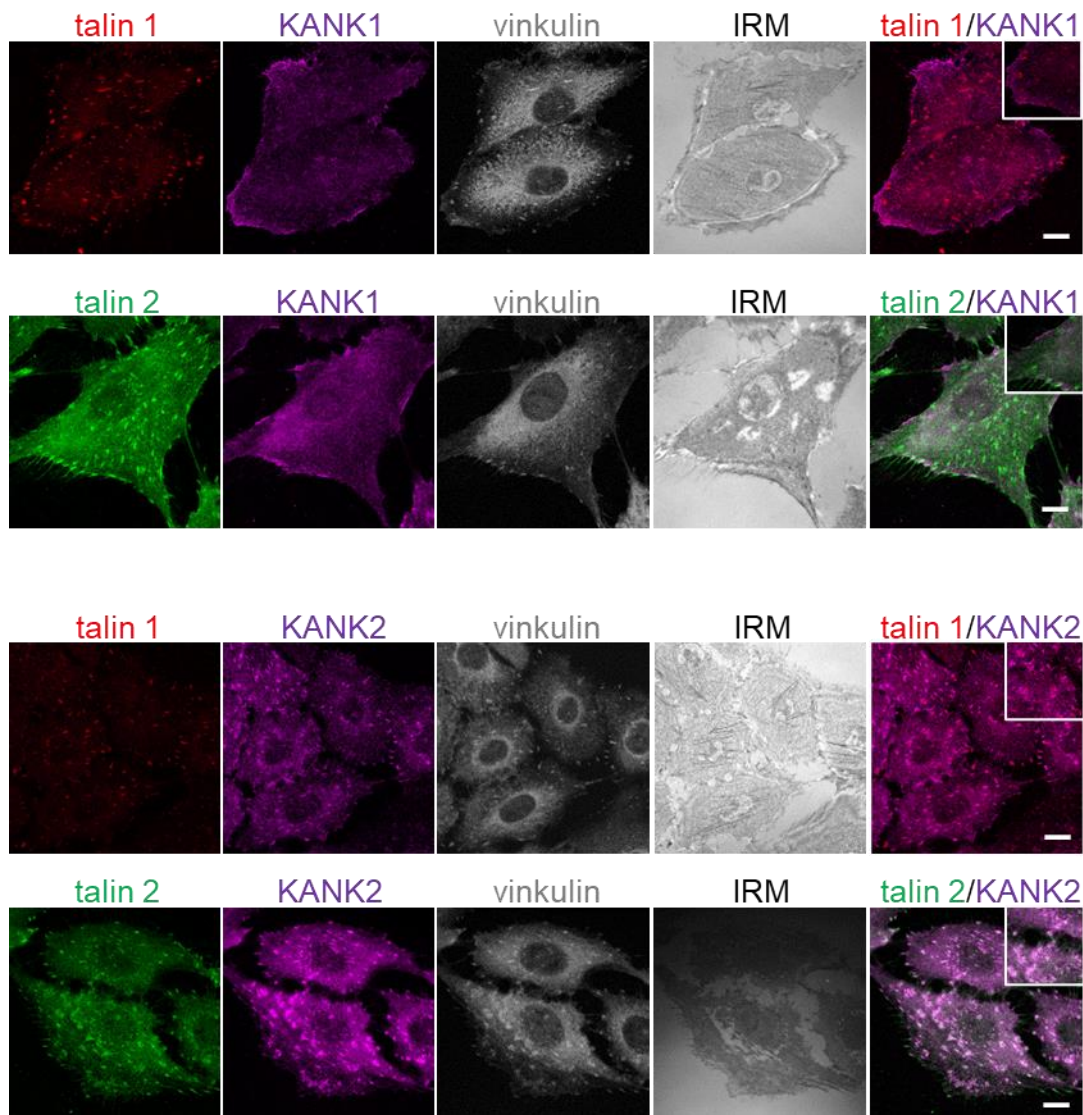


Slika 12. Talin 1 i 2 dio su FA α V β 5. Stanice smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelima za talin 1, talin 2 i integrin β 5. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima specifičnim za izotip za protutijelo za talin 1 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG₁ obilježen Alexa Fluor® 555, crveno), za talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG_{2b} obilježen Alexa Fluor® 488, zeleno) te za integrin β 5 (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Fluor, 647®, ljubičasto). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo proveli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μ m.

Bouchet i sur. (2016.) pokazali su da oba talina, talin 1 i talin 2, mogu stupiti u interakciju s oba proteina KANK, KANK1 i KANK2, vezanjem domene KN proteina KANK na domenu R7 talina. Međutim, njihovo istraživanje provedeno je koristeći *in vitro* test s kratkim fluorescentno obilježenim peptidnim sljedovima proteina. Kako bismo utvrdili postoji li funkcionalna interakcija proteina talina i KANK u stanicama, prvo smo istražili kolokaliziraju li proteini KANK s talinom 1 i talinom 2. Slika 13 prikazuje istovremenu lokalizaciju proteina KANK1 ili KANK2 s talinom1 i talinom 2. Uz to, vizualizirali smo i biljeg FA vinkulin. Slike preklopa signala i manje uvećane slike u gornjem desnom kutu, pokazuju da KANK2 kolokalizira s talinom 1 i talinom 2 i vinkulinom na rubu i sredini stanice, dok se KANK1 nalazi na rubu stanice i djelomično u blizini talina 1 i talina 2. Možemo zamijetiti i da je signal proteina KANK1 znatno slabiji i raspršeniji po cijeloj stanici u odnosu na signal proteina KANK2.

Rezultati ovog pokusa potvrđuju prethodne rezultate MS izoliranih IAC-a stanica MDA-MB-435S (Paradžik i sur., 2020.), točnije talin 1, talin 2 i KANK2, dio su FA α V β 5. Iz rezultata MS-a nije bilo jasno dolazi li do promjene u količini proteina KANK1 utišavanjem integrina α V, zbog jako malog broja spektara

za KANK1. Ovi rezultati potvrđuju da je količina proteina KANK1 u stanici znatno slabija u odnosu na KANK2, te pokazuju da KANK1 pretežno lokalizira na samom rubu stanice, djelomično u blizini talina 1 i talina 2, odnosno FA.

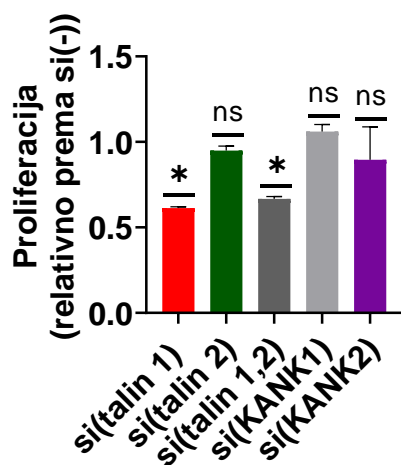


Slika 13. KANK2 lokalizira s FA koje sadrže talin 1 i talin 2, dok se KANK1 nalazi na rubu stanice u blizini FA. Stanice smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelima za talin 1 ili talin 2 i KANK1 ili KANK2. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima za protutijelo za talin 1 ili talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin obilježen Alexa Fluor® 555 ili Alexa Fluor® 488) te za KANK1 ili KANK2 (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Fluor®, 647®). Vinkulin smo vizualizirali pomoću direktno fluorescentno obilježenog protutijela (anti-vinkulin Alexa Fluor® 647, sivo). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo proveli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 µm.

3.2. Talin 1 je neophodan za stvaranje FA $\alpha\beta 5$ u stanicama melanoma MDA-MB-435S

Poznato je da su talin 1 i talin 2 strukturno gotovo identični, ali postoje razlike u aminokiselinskom slijedu poddomena, te se njihova uloga u stanicama značajno razlikuje (Gough i Goult, 2018.). Pokazano je da je delecija talina 1, za razliku od talina 2, smrtonosna za miševe te njegovo utišavanje smanjuje proliferaciju i učinkovitost adhezije stanica (Pulous i sur., 2021.; Debrand i sur., 2012.; Manso i sur., 2001.; Manso i sur., 2000.). KANK1 i KANK2 su strukturno slični proteini, ali KANK1 ima jednu domenu CC više. Istraživanja pokazuju važnu ulogu svih proteina obitelji KANK u razvoju organizma (Guo i sur., 2021.), no istraživanja o ulozi pojedinog proteina KANK u proliferaciji stanica su oskudna.

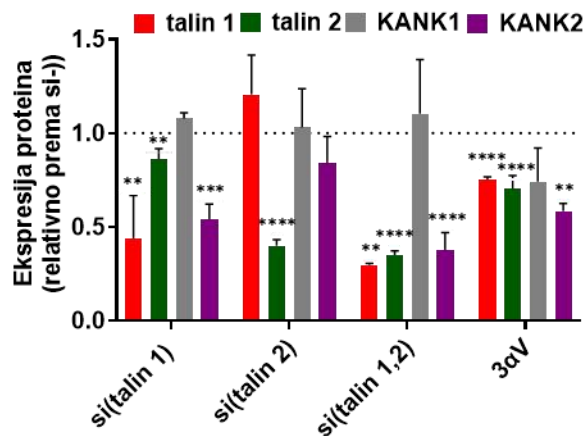
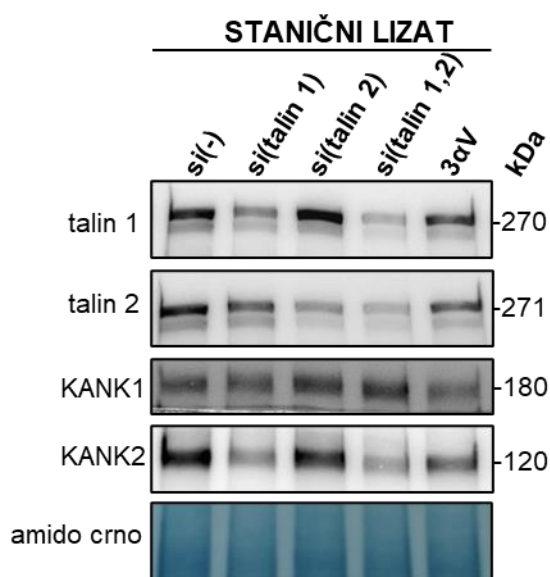
S obzirom na to da smo dokazali da su talin 1, talin 2 i KANK2 dio FA $\alpha\beta 5$ u stanicama MDA-MB-435S (slika 12, 13), dok je KANK1 lokaliziran izvan FA $\alpha\beta 5$, zanimala nas je njihova uloga u stanici. Koristeći siRNA molekule specifične za talin 1, talin 2, KANK1 ili KANK2, metodom Click-iT, analizirali smo utjecaj njihovog utišavanja na proliferaciju stanica. Uz to smo odredili i zajednički utjecaj utišavanja oba talina na proliferaciju stanica, istovremenom transfekcijom siRNA specifičnim za talin 1 i talin 2. Slika 14 pokazuje da utišavanjem talina 1 kao i talina 1 i 2 zajedno, smanjujemo proliferaciju stanica za čak 40 % u odnosu na kontrolne stanice. S druge strane, utišavanje proteina talina 2, KANK1 ili KANK2 nije utjecalo na proliferaciju stanica. Ovi rezultati upućuju na važnu ulogu talina 1 u proliferaciji stanica.



Slika 14. Utišavanje talina 1 smanjuje proliferaciju stanica, dok utišavanje proteina talina 2, KANK1 i KANK2 ne utječe na proliferaciju stanica. Proliferaciju stanica odredili smo koristeći komplet kemikalija Click-iT EdU. Stanice smo transficirali kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1, talin 2, talin 1 i 2, KANK1 ili KANK2. Histogrami predstavljaju rezultate mjerenja proliferacije, prikazane kao srednja vrijednost \pm SD (n = 2). Rezultate smo analizirani

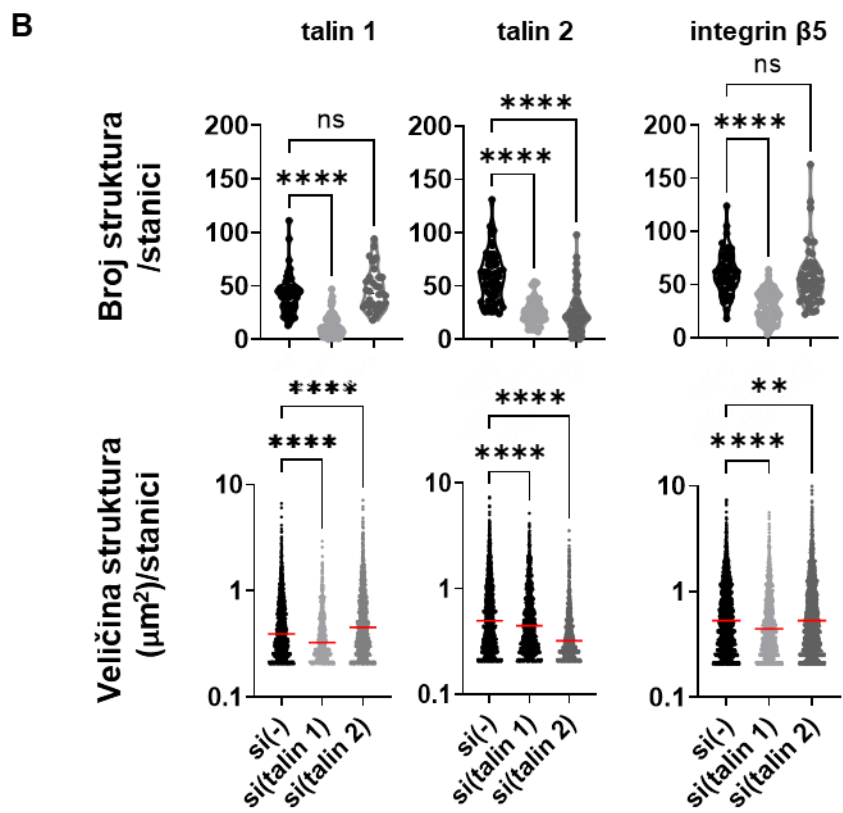
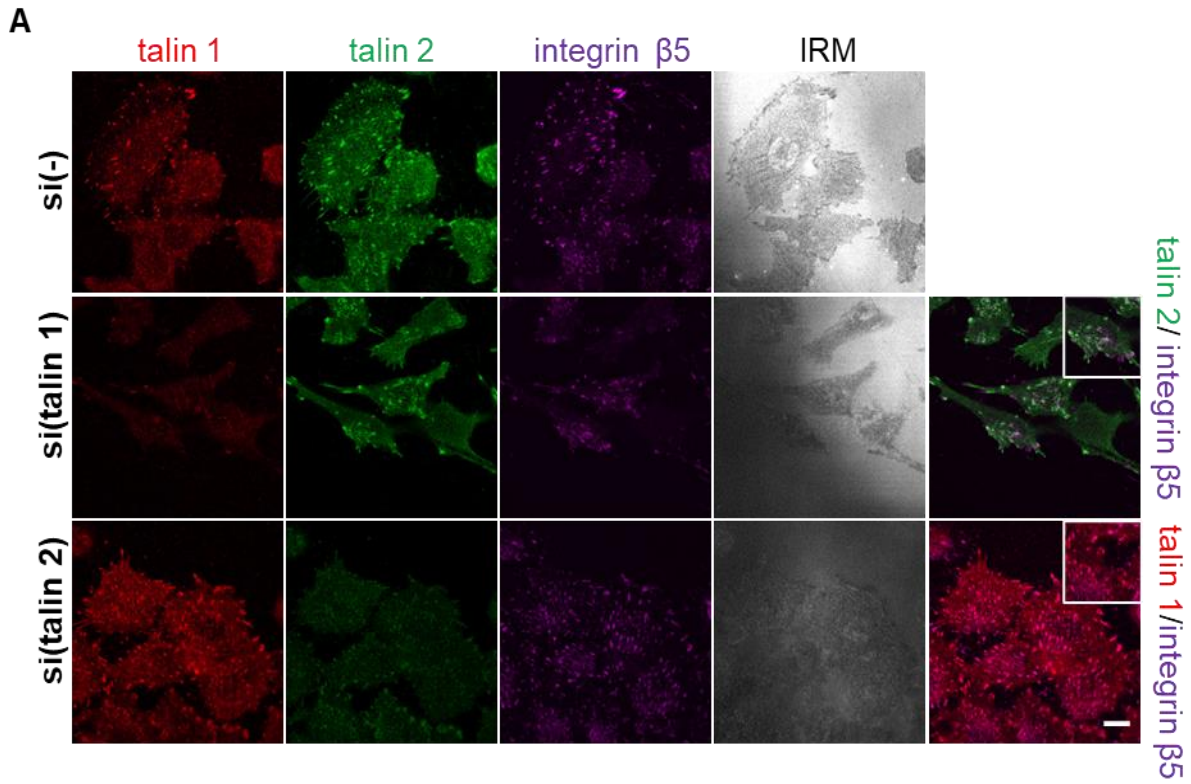
jednosmjernom analizom varijance s Dunnettovim testom višestruke usporedbe. * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

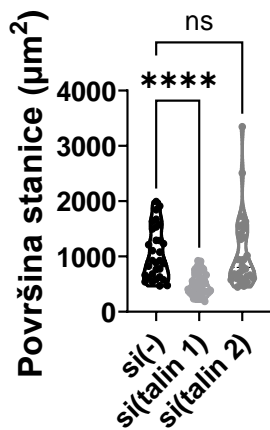
S obzirom na to da su talin i KANK vezni partneri (Bouchet i sur., 2016.), zanimao nas je utjecaj utišavanja pojedinog talina ili oba talina zajedno na količinu proteina KANK u stanicama MDA-MB-435S. Proveli smo SDS-PAGE i analizu WB ukupnih proteina u stanici nakon utišavanja pojedinog ili oba talina zajedno, a kao pozitivnu kontrolu u ovom pokusu koristili smo lizat stanica klona 3 α V sa stabilno utišanom ekspresijom integrina α V. Na temelju prethodnih rezultata MS-a (Paradžik i sur., 2020.) u uzorku 3 α V očekujemo smanjenje ukupne količine proteina talina 1, talina 2 i KANK2. Na slici 15 vidljivo je da je utišavanje pojedinog talina ili oba talina zajedno bilo uspješno i da se količina ukupnih proteina u stanici nakon utišavanja smanjila za više od 50 % u odnosu na kontrolne stanice. Isto tako, vidimo da je u uzorku lizata klona 3 α V došlo do statistički značajnog smanjenja količine proteina talina 1, talina 2 i KANK2, no količina proteina KANK1 ostaje jednaka u odnosu na kontrolne stanice. Utišavanjem talina 1 došlo je do značajnog smanjenja količine proteina talina 2 i KANK2, a utišavanjem talina 2 nije došlo do promjene u količini niti jednog od analiziranog proteina. Utišavanjem oba talina zajedno možemo vidjeti isti rezultat kao i utišavanjem samo talina 1, što upućuje na činjenicu da je uočeno smanjenje proteina talina 2 i KANK2 posljedica utišavanja samo talina 1. Prema tome KANK2 je dio FA α V β 5, ali to ne vrijedi za KANK1.



Slika 15. Utišavanje talina 1 smanjuje količinu proteina KANK2 u staničnom lizatu, dok količina proteina KANK1 ostaje jednaka. Proveli smo analizu WB proteina talina 1, talina 2, KANK1 i KANK2 u lizatima stanica MDA-MB-435S nakon transfekcije kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1, talin 2 ili talin 1 i 2 zajedno. Uz navedeno, na gel smo nanijeli i uzorak lizata klon stanica MDA-MB-435S sa stabilno utišanom ekspresijom integrina αV ($3\alpha V$). Stanične lizate smo skupili 48 sati nakon transfekcije. Histogrami predstavljaju kvantifikaciju rezultata WB prikazanu kao srednja vrijednost količine proteina \pm SD ($n = 3$), relativno prema količini proteina u kontrolnom uzorku koja iznosi 1 (označeno kao isprekidana linija). Rezultate smo analizirani jednosmjernom analizom varijance s Dunnettovim testom višestruke usporedbe. * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

S obzirom na prethodne rezultate koji pokazuju različite uloge talina 1 i talina 2 u proliferaciji stanica (slika 14), ali i utjecaj njihovog utišavanja na količinu ukupnog proteina KANK2 u stanici (slika 15) zanimao nas je utjecaj utišavanja pojedinog talina na FA $\alpha V\beta 5$. Stoga smo proveli analizu FA metodom IF nakon utišavanja pojedinog talina i kvantificirali promjene u broju i veličini FA određenih na temelju signala talina 1, talina 2 i integrina $\beta 5$. Na slici 16A i B vidljivo je da je utišavanje talina 1 i talina 2 bilo uspješno te se njihov signal u stanici značajno smanjio u odnosu na kontrolne stanice, što smo potvrdili kvantifikacijom broja i veličine struktura mjerenih signalom talina 1 i talina 2. Utišavanjem talina 1 došlo je do statistički značajnog smanjenja površine stanica, što je posebice vidljivo na IRM-slikama. Isto tako, utišavanje talina 1 dovelo je do značajnog smanjenja signala talina 2 i integrina $\beta 5$, njihovog broja i veličine, što upućuje na raspad FA što posljedično dovodi do smanjenja površine stanica. S druge strane, utišavanje talina 2 nije utjecalo na broj FA mjeren signalom talina 1 i integrina $\beta 5$, ali je dovelo do statistički značajnog povećanja površine FA $\alpha V\beta 5$ u odnosu na kontrolne stanice (slika 16B). Zanimljivo, uslijed utišavanja talina 1, primijetili smo manji broj struktura pozitivnih na talin 2 i integrin $\beta 5$ u sredini stanice, koje svojom lokalizacijom i izgledom odgovaraju RA $\alpha V\beta 5$ (slika 16A) potvrđenim u stanicama MDA-MB-435S (Paradžik i sur., 2020.). U konačnici, možemo zaključiti da uloga talina u FA $\alpha V\beta 5$ stanica MDA-MB-435S nije redundantna.





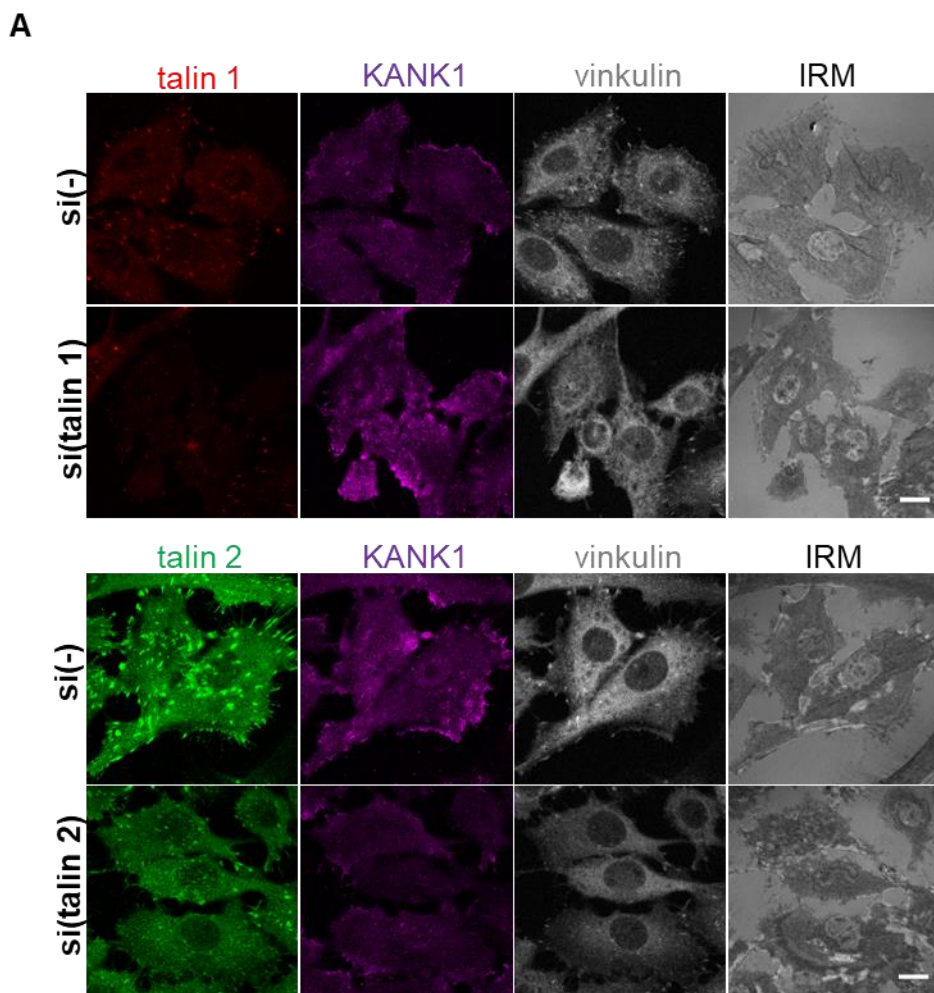
Slika 16. Za razliku od talina 2, utišavanje talina 1 dovodi do raspada FA $\alpha V\beta 5$. **A.** Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1 ili talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelima za talin 1, talin 2 i integrin $\beta 5$. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima specifičnim za izotip za protutijelo za talin 1 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG₁ obilježen Alexa Fluor® 555, crveno), za talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG_{2b} obilježen Alexa Fluor® 488, zeleno) te za integrin $\beta 5$ (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Fluor, 647®, ljubičasto). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analiza je provedena na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μm . **B.** Dijagrami violine i dijagrami raspršenosti prikazuju rezultate kvantifikacije slika IF u više od 45 stanica (n = 3). Gornji red prikazuje promjene u broju struktura u stanici (određenih signalom talina 1, talina 2 ili integrina $\beta 5$) nakon utišavanja talina 1 ili talina 2 u odnosu na kontrolne stanice. Donji red prikazuje promjene u veličini struktura u stanici (određenih signalom talina 1, talina 2 ili integrina $\beta 5$) nakon utišavanja talina 1 ili talina 2 u odnosu na kontrolne stanice. Treći red prikazuje promjenu u veličini stanice nakon utišavanja talina 1 ili talina 2. Rezultate smo analizirani jednosmjernom analizom varijance s Dunnettovim testom višestruke usporedbe. * označava p < 0,05; ** označava p < 0,01; *** označava p < 0,001 dok **** označava p < 0,0001, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

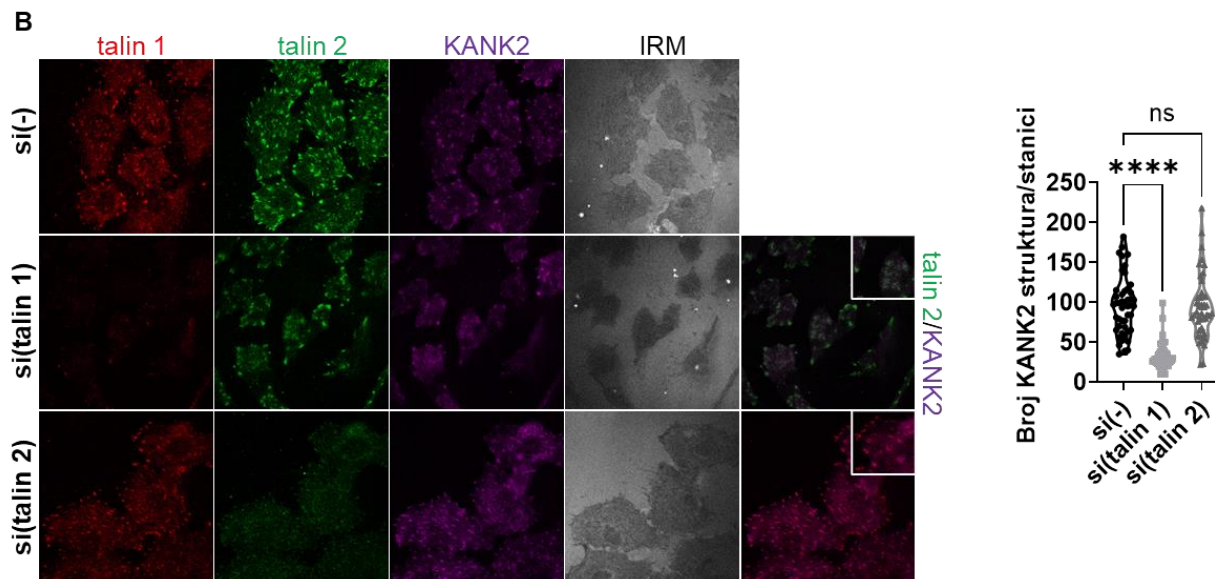
3.3. Talin 2 i KANK2 stvaraju funkcionalnu interakciju u stanicama MDA-MB-435S

Rezultati analize WB ukupnih proteina stanice (slika 15) pokazuju da utišavanje talina 1, za razliku od talina 2, smanjuje količinu KANK2 u stanicama MDA-MB-435S. S druge strane, razina proteina KANK1 ostala je jednaka u svim uzorcima. Iako rezultati analize WB ukupnih proteina u stanici mogu doprinijeti razumijevanju međusobnog odnosa i regulacije proteina, ne daju jasan odgovor što se događa s proteinima u samim adhezijama stanice. Metodom IF odredili smo kako utišavanje talina 1 i talina 2 utječe na lokalizaciju proteina KANK u stanici. Na slici 17A prikazani su rezultati analize IF proteina KANK1 nakon utišavanja pojedinog talina. Vinkulin je korišten kao biljeg FA. Iz rezultata je vidljivo da je utišavanje oba talina bilo uspješno, a lokalizacija proteina KANK1 ostala je jednaka u odnosu na kontrolni uzorak. Sličan pokus proveden je i za KANK2. Ovoga puta vizualizirali smo oba talina istovremeno s proteinom KANK2. Na

slici 17B primjećujemo da je utišavanje oba talina bilo uspješno, a rezultati pokazuju da je došlo do značajnog smanjenja signala KANK2 u stanici uslijed utišavanja talina 1, dok utišavanje talina 2 nije utjecalo na KANK2 (slika 17B, dijagram violine). Preklopne slike signala KANK2 i talina 2, nakon utišavanja talina 1, upućuju na postojanje struktura koje sadrže talin 2 i KANK2, a svojom lokalizacijom i izgledom odgovaraju RA (slika 17B).

Rezultati analize IF lokalizacije proteina KANK1 (slika 13), kao i rezultati analize WB i IF nakon utišavanja pojedinog talina u stanicama MDA-MB-435S (slika 15, 17A), upućuju da protein KANK1 ne kolokalizira s talinom 1 ili talinom 2 iz FA α V β 5 u stanicama MDA-MB-435S. S druge strane, utišavanje talina 1 dovodi do raspada FA α V β 5 te smanjenja KANK2 u stanicama (slika 16, 17B), što je potvrđeno analizom WB i IF. Ovi rezultati, zajedno s rezultatima analize MS (Paradžik i sur., 2020.), ukazuju da je KANK2 dio CMSC-a i vrlo vjerojatno ostvaruje interakciju s proteinom talinom iz FA α V β 5. Međutim, nije poznato ostvaruje li KANK2 interakciju s talinom 1, talinom 2 ili s oba talina.

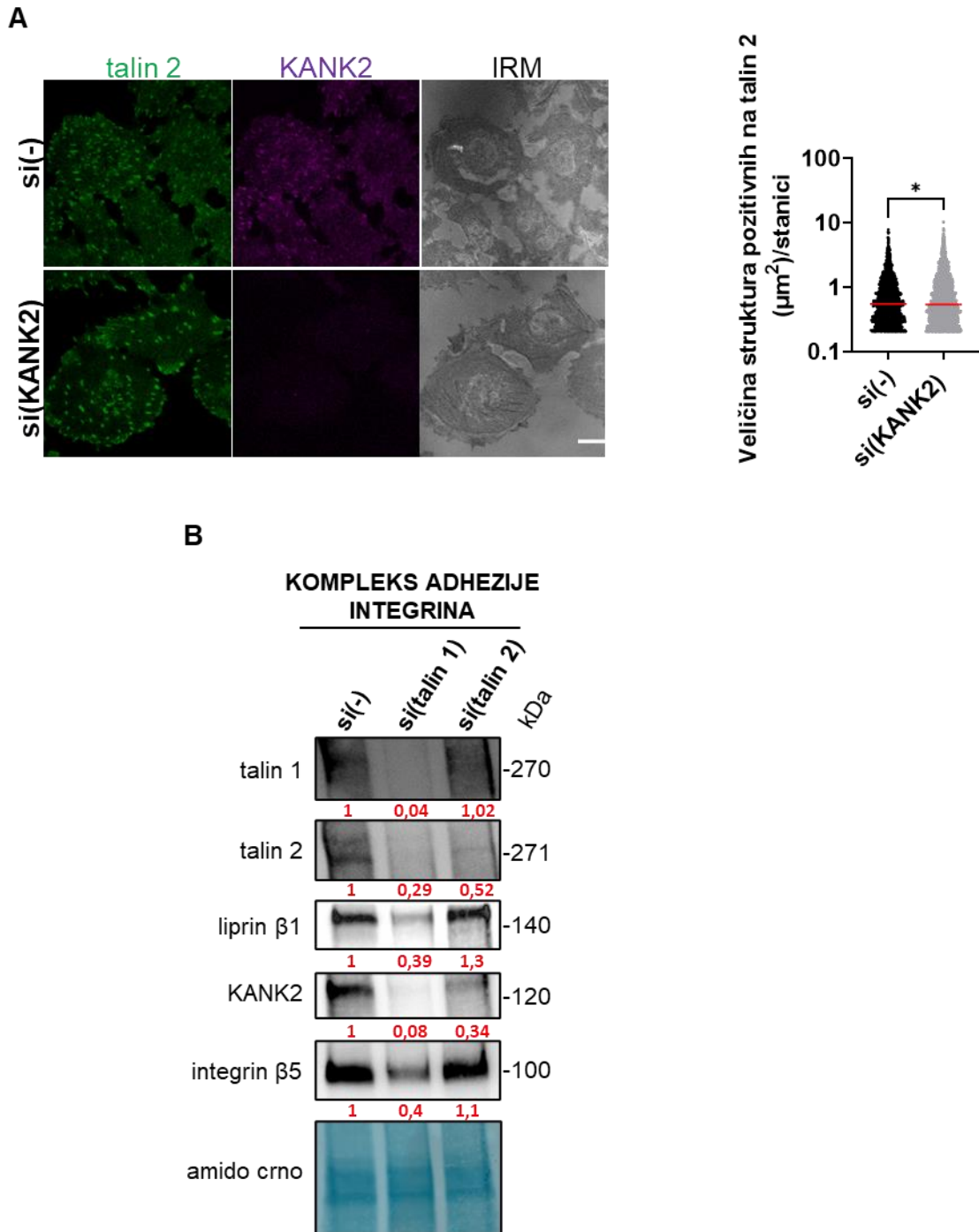




Slika 17. Utišavanje talina 1 ili talina 2 ne utječe na lokalizaciju proteina KANK1, dok utišavanje talina 1 smanjuje broj struktura proteina KANK2 u stanici. A. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1 ili talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelima za talin 1 ili talin 2 u kombinaciji s protutijelom za KANK1. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima za protutijelo za talin 1 ili talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin obilježen Alexa Fluor® 555, crveno ili Alexa Fluor® 488, zeleno) te za KANK1 (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Fluor, 647®, ljubičasto). Vinkulin smo vizualizirali direktno fluorescentno obilježenim protutijelom (anti-vinkulin Alexa Fluor® 647, sivo). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo proveli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μ m. B. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1 ili talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelima za talin 1 ili talin 2 i KANK2. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima specifičnim za izotip za protutijelo za talin 1 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG₁ obilježen Alexa Fluor® 555, crveno), za talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG_{2b} obilježen Alexa Fluor® 488, zeleno) te za KANK2 (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Fluor, 647®, ljubičasto). Vinkulin smo vizualizirali direktno fluorescentno obilježenim protutijelom (anti-vinkulin Alexa Fluor® 647, sivo). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo provedeli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μ m. Dijagram violine prikazuje rezultate promjene u broju struktura (određenih signalom KANK2) nakon utišavanja talina 1 ili talina 2 u više od 30 stanica (n = 2). Rezultate smo analizirali jednosmjernom analizom varijance s Dunnettovim testom višestruke usporedbe. * označava p < 0,05; ** označava p < 0,01; *** označava p < 0,001 dok **** označava p < 0,0001, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

Proteini KANK ostvaruju interakciju s liprinom β 1 putem domene CC, a vezanjem na R7 domenu talina, povezuju liprin s obrubom FA, što potiče vezanje ostalih sastavnica CMSC-a (slika 8) (Bouchet i sur., 2016.; Sun i sur., 2016). U stanicama MDA-MB-435S, razina sastavnica CMSC ovisi o vezi s FA α V β 5, što je vidljivo iz analize MS izoliranih IAC nakon utišavanja integrina α V, kada dolazi do smanjenja svih sastavnica CMSC-a (Paradžik i sur., 2020.). Isto tako, rezultati analize WB i IF nakon utišavanja talina 1 pokazuju da je talin 1 ključan za stvaranje FA α V β 5 te njegovim odsustvom dolazi do raspada istih, smanjenja veličine

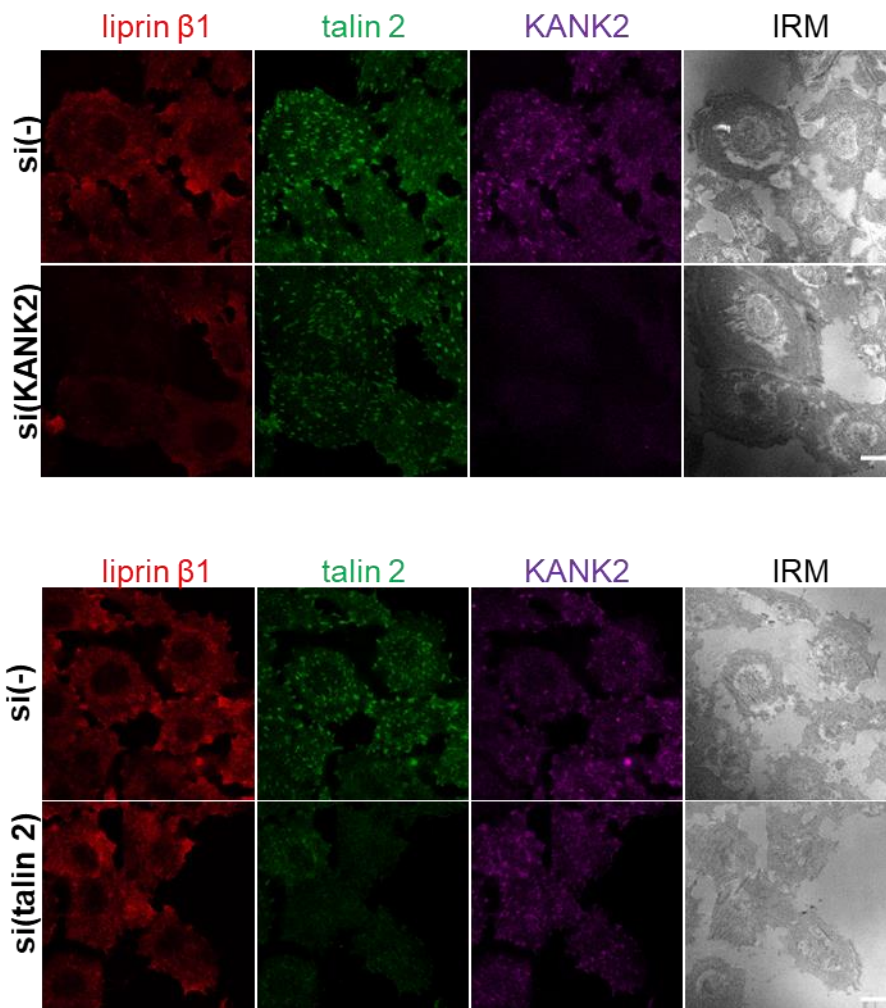
stanica i posljedično raspada CMSC-a i smanjenja količine KANK2 u stanicama (slika 14, 15, 16, 17B). S druge strane, utišavanje talina 2 nije utjecalo na veličinu stanice, ni količinu i lokalizaciju proteina KANK2 u stanici, ali je rezultiralo povećanjem veličine FA (slika 16, 17B). S obzirom na to da je veza mikrotubula s FA ključna za pravilnu izmjenu proteina FA (Ng i sur., 2014.), povećana veličina FA upućuje da je došlo do prekida veze FA i CMSC-a. Kako bismo potvrdili hipotezu da je prekid veze FA i CMSC-a uzrokovan prekidom interakcije FA i KANK2, odlučili smo vizualizirati promjene u veličini FA (mjereno signalom talina 2) i nakon utišavanja proteina KANK2. Utišavanjem proteina KANK2 dolazi do blagog, ali statistički značajnog, povećanja veličine FA, što dokazuje još jednom da je KANK2 vezan s FA, vrlo vjerojatno putem talina 2, a njegovim utišavanjem dolazi do promjene u dinamici izmjene proteina FA i posljedično njihovog povećanja. Kako bismo potvrdili ostvaruje li uistinu talin 2 funkcionalnu interakciju s proteinom KANK2 odlučili smo izolirati IAC-e stanica nakon utišavanja pojedinog talina. Korištena metoda izolacije IAC-a temelji se na umrežavanju bliskih proteina izlaganjem živih stanica umreživaču DTBP (Jones i sur., 2015.). U slučaju prekida veze FA i CMSC-a, uslijed utišavanja talina 2, očekujemo promjenu u količini umreženog proteina KANK2. S obzirom na to da prethodni rezultati ukazuju na to da utišavanjem talina 1 dolazi do raspada FA, u analizi WB izoliranih IAC nakon utišavanja talina 1 očekujemo smanjenje svih komponenti FA $\alpha\beta5$, ali i CMSC-a. Slika 18B prikazuje rezultate analize WB sastavnica FA (talin 1, talin 2 i integrin $\beta5$) i sastavnica CMSC-a (KANK2 i liprin $\beta1$) u izoliranim IAC-ima uslijed utišavanja pojedinog proteina. Denzitometrija analiziranih slika (crveni brojevi ispod slike) upućuje da je utišavanje oba talina bilo uspješno, te je njihova količina u izoliranim IAC-ima bila smanjena za više od 70 %. Utišavanjem talina 1 dolazi do smanjenja svih sastavnica FA i CMSC-a, što potvrđuje ključnu ulogu talina 1 u aktivaciji integrina i stvaranju FA. S druge strane, iako utišavanje talina 2 nije utjecalo na lokalizaciju proteina KANK2, niti njegovu količinu u uzorcima staničnih lizata (slika 15, 17B), u uzorcima IAC-a utišavanje talina 2 dovodi do smanjenja razine proteina KANK2. Ovi rezultati ukazuju na to da bi talin 2 i KANK2 mogli ostvarivati funkcionalnu interakciju u stanicama MDA-MB-435S.



Slika 18. Utišavanje proteina KANK2 ili talina 2 dovodi do prekida veze FA sa CMSC-om. A. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za KANK2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelima za talin 2 i KANK2. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima specifičnim za izotip za protutijelo za talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG2b obilježen Alexa Fluor® 488, zeleno) te za KANK2 (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Fluor, 647®, ljubičasto). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo proveli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala

iznosi 10 μm . Dijagram raspršenosti prikazuje kvantifikaciju promjenu u veličini struktura u stanici (određeno signalom talina 2) u više od 30 stanica ($n = 2$). Rezultate smo analizirali Studentovim t-testom. * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka. **B.** Analiza WB proteina talin 1, talin 2, liprina $\beta 1$, KANK2 i integrina $\beta 5$ u izolatima IAC-a stanica MDA-MB-435S nakon transfekcije s kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1 ili talin 2. IAC-e smo skupili 48 sati nakon transfekcije stanica. Brojevi ispod slika prikazuju količinu proteina prikazanu relativno prema količini proteina u kontrolnom uzorku koji iznosi 1.

Na slici 18B možemo vidjeti da količina liprina $\beta 1$ ostaje jednaka nakon utišavanja talina 2 što govori u prilog činjenici da utišavanje talina 2 ne utječe na stvaranje CMSC-a. Liprini $\alpha 1$ i $\beta 1$ predstavljaju tzv. skeletne (engl. *scaffolding*) proteine za stvaranje CMSC-a i nalazimo ih u obliku kortikalnih nakupina u blizini FA (Yu i sur., 2019.). Vizualizirali smo liprin $\beta 1$ nakon utišavanja proteina talina 2 ili KANK2 metodom IF. Na slici 19 vidimo da je utišavanje proteina talina 2 i KANK2 bilo uspješno. Isto tako, slika 19 potvrđuje da utišavanje talina 2 ne utječe na lokalizaciju liprina $\beta 1$ u stanici dok je utišavanje KANK2 dovelo je do značajnog smanjenja količine liprina $\beta 1$ u stanici. Ovi rezultati zajedno upućuju na zaključak da utišavanje talina 2 ne utječe na CMSC, ali da je prisustvo KANK2 nužno za stvaranje CMSC-a u stanicama MDA-MB-435S.



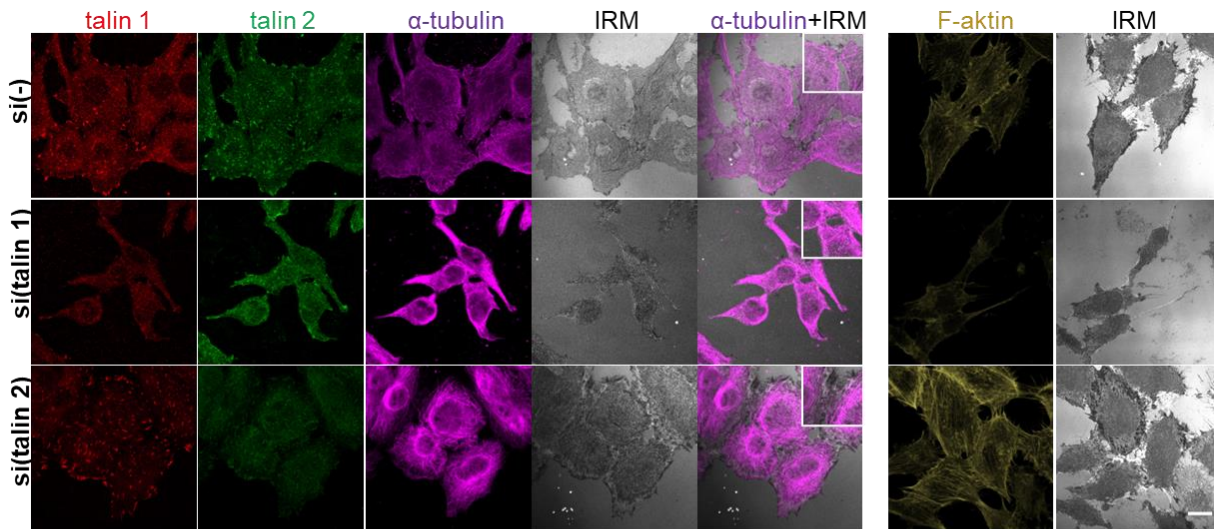
Slika 19. Utišavanje proteina KANK2 utječe na količinu liprina β 1. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 2 ili KANK2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelima za liprin β 1, talin 2 i KANK2. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima specifičnim za izotip za protutijelo za liprin β 1 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG₁ obilježen Alexa Fluor® 555, crveno), za talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG_{2b} obilježen Alexa Fluor® 488, zeleno) te za integrin β 5 (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Flour, 647®, ljubičasto). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo proveli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μ m.

3.4. Utišavanje talina 1 ili talina 2 različito utječe na aktinski citoskelet i mikrotubule u stanicama MDA-MB-435S

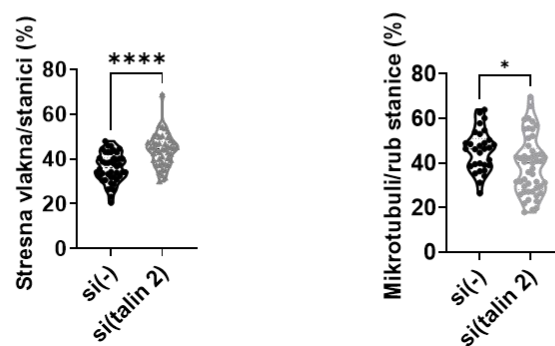
Pokazano je da utišavanjem proteina KANK2 dolazi do promjena u izgledu mikrotubula, ali ne i stresnih vlakana u stanicama MDA-MB-435S (Paradžik i sur., 2020.). Prethodni rezultati ukazuju na to da da bi talin 2 i KANK2 mogli stvarati funkcionalnu vezu (slika 18), stoga je za očekivati da će i utišavanje talina 2 utjecati na izgled mikrotubula. Isto tako, s obzirom na to da talin direktno veže s aktinom (Gough i

Goult, 2018.), zanimalo nas je kako će utišavanje talina 1 ili talina 2 utjecati na aktinski citoskelet stanice. Na slici 20A nalazi se prikaz mikrotubula i aktinskih vlakana (F-aktina) nakon utišavanja pojedinog talina. Utišavanje talina 1 i talina 2 bilo je uspješno, a još jednom smo potvrdili da utišavanjem talina 1 dolazi do značajnog smanjenja stanica, ali i potpunog raspada mikrotubula i aktina, što je posljedica raspada FA. U uzorcima utišavanja talina 2 možemo primijetiti promjenu u izgledu mikrotubula, a na slikama s preklapljenim signalom mikrotubula i IRM-a, vidljivo je da mikrotubuli ne dosežu rub stanice kao što je slučaj u kontrolnim stanicama. Opažanje je potvrđeno i kvantifikacijom gustoće mikrotubula na rubu stanice (slika 20B). Osim toga, utišavanje talina 2 uzrokovalo je statistički značajno povećanje stresnih vlakana u stanici u odnosu na kontrolu (kvantificiran je signal aktinskih vlakana koja su vezana s FA, točnije stresnih vlakana) (slika 20B). Ovi rezultati potvrđuju ključnu ulogu talina 1 u stvaranju FA α V β 5, ali predstavljaju i još jedan dokaz da su talin 2 i KANK2 mogući interakcijski partneri koji kontroliraju citoskelet stanice.

A



B



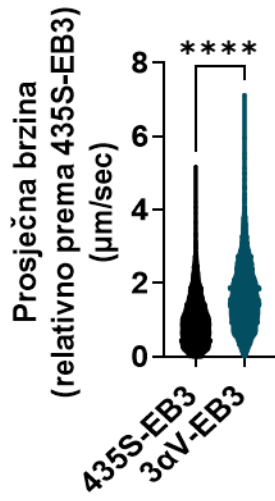
Slika 20. Utišavanje talina 1 ili talina 2 utječe na mikrotubule i aktinski citoskelet. A. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1 ili talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom (za vizualizaciju tubulina) i inkubirali s protutijelima za talin 1, talin 2 i α -tubulin. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima specifičnim za izotip za protutijelo za talin 1 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG₁ obilježen Alexa Fluor® 555, crveno), za talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG_{2b} obilježen Alexa Fluor® 488, zeleno) te za α -tubulin (protutijela za zečji imunoglobulin obilježena Alexa Fluor®, 647®, ljubičasto). Za vizualizaciju F-aktina stanice smo fiksirali u 2 % PFA, permeabilizirali pomoću Triton X-100, a potom inkubirali s fluorescentno obilježenim faloidinom (Alexa Fluor® 488 ili Alexa Fluor® 555, zlatna). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo proveli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μ m. **B.** Dijagrami violine prikazuju rezultate kvantifikacije promjene u količini stresnih vlakana nakon utišavanja talina 2 ili promjene u količini mikrotubula na rubu stanice u više od 30 stanica (n = 2). Rezultate smo analizirali Studentovim t-testom. * označava p < 0,05; ** označava p < 0,01; *** označava p < 0,001 dok **** označava p < 0,0001, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

3.5. Prekid veze između FA i CMSC-a dovodi do povećanja brzine rasta mikrotubula, povećane osjetljivosti na PTX i smanjene učinkovitosti migracije stanica MDA-MB-435S

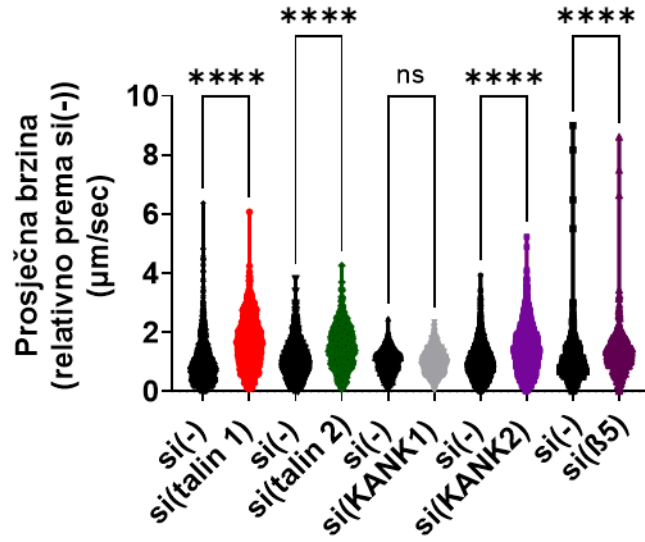
U stanicama MDA-MB-435S KANK2 povezuje FA i CMSC-a. Prekidom te veze, bilo utišavanjem integrina α V ili proteina KANK2 dolazi do povećane osjetljivosti stanica na protutumorski lijek PTX (Paradžik i sur., 2020.). PTX, komercijalnog naziva Taxol®, spada u skupinu protutumorskih lijekova taksana. Ulaskom u stanicu, PTX se veže na β -tubulin mikrotubula i sprječava normalnu dinamiku mikrotubula, točnije onemogućava njihovu depolimerizaciju. Na ovaj način, PTX blokira stvaranje diobenog vretena i diobu tumorskih stanica (Weaver, 2014.). S obzirom na to da utišavanjem proteina KANK2 dolazi do promjena u izgledu mikrotubula (Paradžik i sur., 2020.), pretpostavili smo da je narušavanje dinamike mikrotubula, prekidom veze FA i CMSC-a, potencijalni mehanizam povećane osjetljivosti stanica na PTX. Kako bismo provjerili ovu hipotezu koristili smo populaciju stanica MDA-MB-435S i klonu 3 α V koji imaju fluorescentno obilježeni protein EB3 na rastućem (plus) kraju mikrotubula (435S-EB3 i 3 α V-EB3). Na ovaj način, koristeći mikroskopiju živih stanica u vremenu, možemo pratiti rast pojedinačnih mikrotubula i mjeriti njihovu brzinu. Slika 21A prikazuje rezultate mjerenja brzine rasta mikrotubula u stanicama 435S-EB3 i 3 α V-EB3. Vidljivo je da je brzina rasta mikrotubula u stanicama 3 α V-EB3 1,6 puta brža nego u stanicama 435S-EB3. Utišavanje proteina talina 1, talina 2, KANK2 ili integrina β 5 također je značajno povećalo brzinu rasta mikrotubula u odnosu na kontrolne stanice. Utišavanje proteina KANK1 nije promijenilo brzinu rasta mikrotubula (slika 21B) što je u skladu s odsustvom njegove kolokalizacije s FA (slika 13) te nepromijenjene količine nakon utišavanja talina 1 ili 2 (slika 17A). Uz rezultate kvantifikacije prikazane su i pojedinačne slike izdvojene iz snimljenih filmova, gdje se vidi rast pojedinog mikrotubula u vremenu (označeno bijelom strelicom) (slika 21C). Rezultati ukazuju da raspad FA (utišavanjem integrina α V, integrina β 5 ili talina 1) ili

prekid veze FA i CMSC-a (utišavanjem proteina talina 2 ili KANK2) dovodi do promjene u dinamici mikrotubula. Ovi rezultati, stoga, dodatno potvrđuju hipotezu da talin 2 i KANK2 stvaraju funkcionalnu interakciju te da gubitak veze među njima dovodi do promjena u brzini rasta mikrotubula.

A

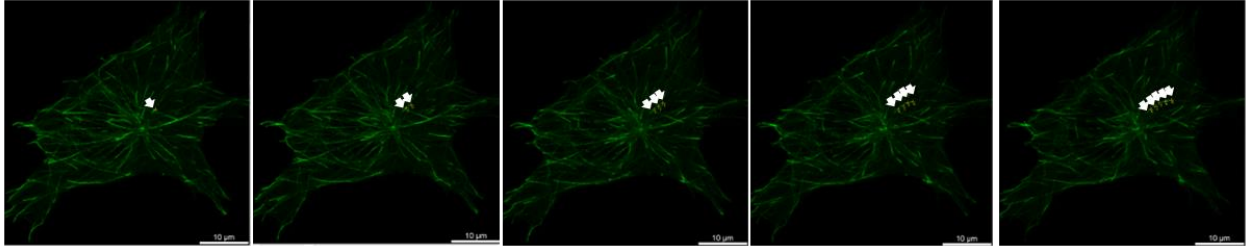


B

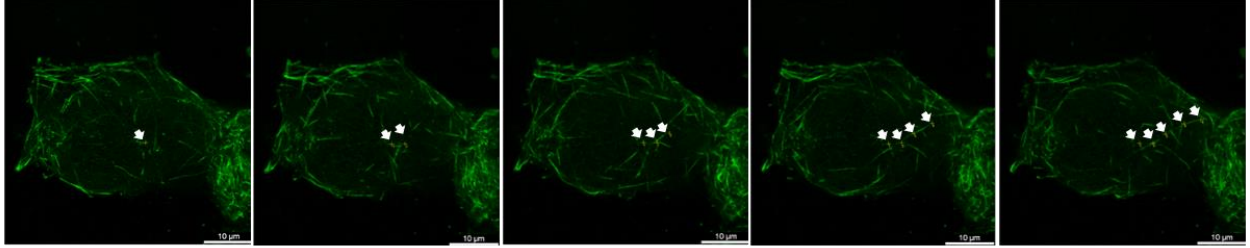


C

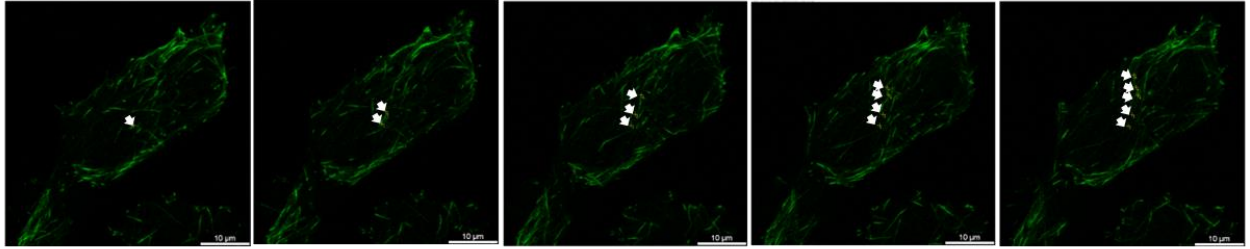
MDA-MB-435S-EB3



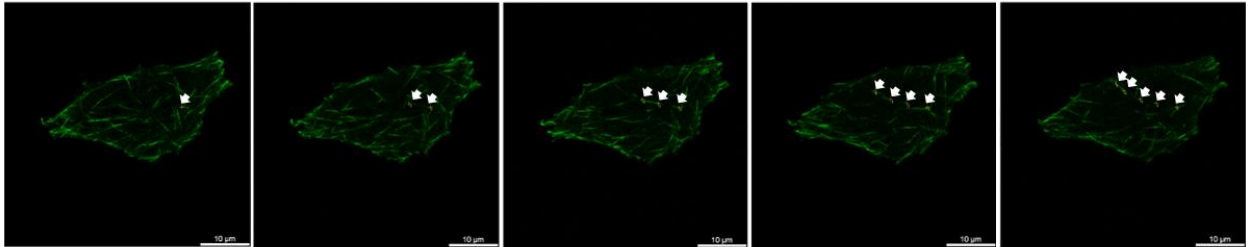
3αV-EB3



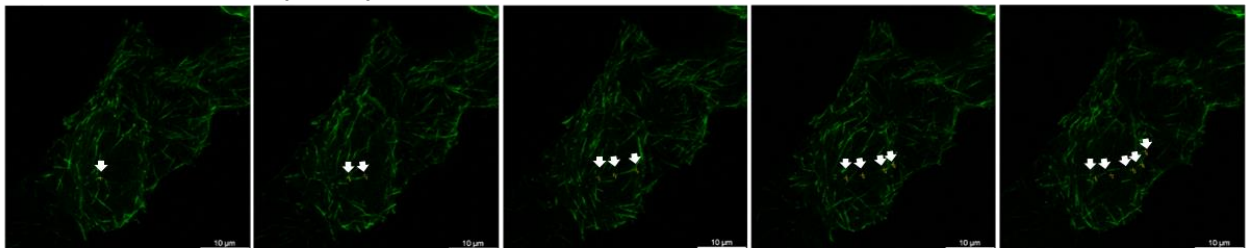
MDA-MB-435S-EB3, si(-)



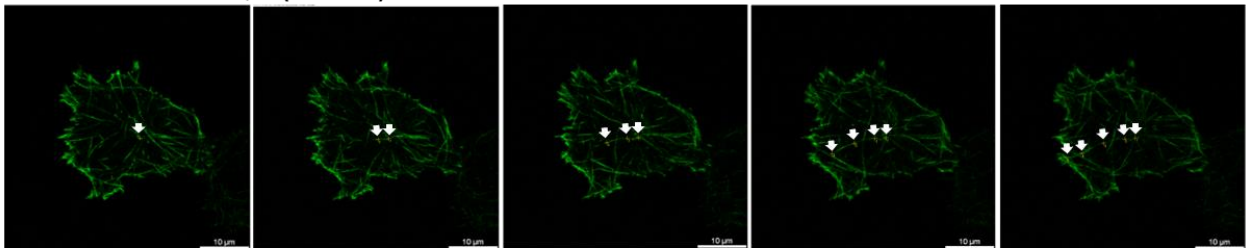
MDA-MB-435S-EB3, si(talin 1)



MDA-MB-435S-EB3, si(talin 2)



MDA-MB-435S-EB3, si(KANK2)



sekunde 0

26

52

78

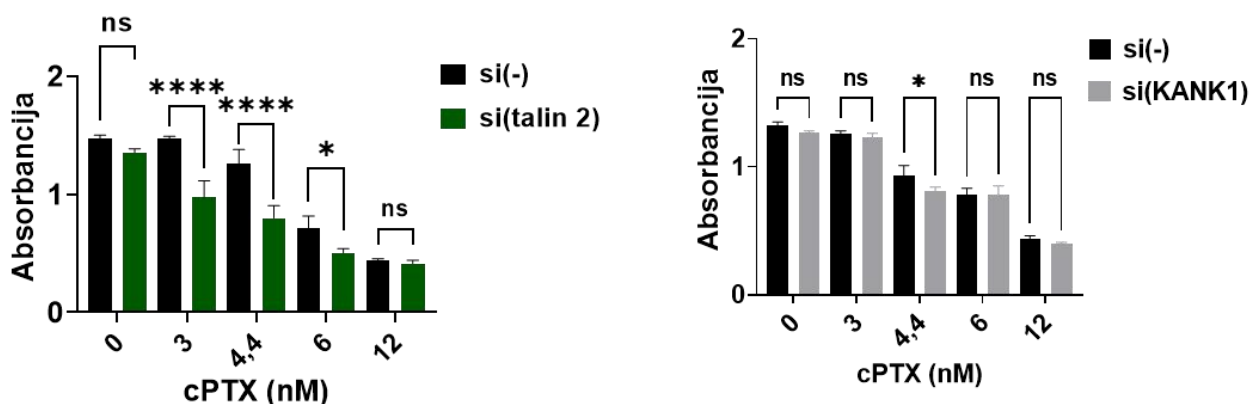
104

69

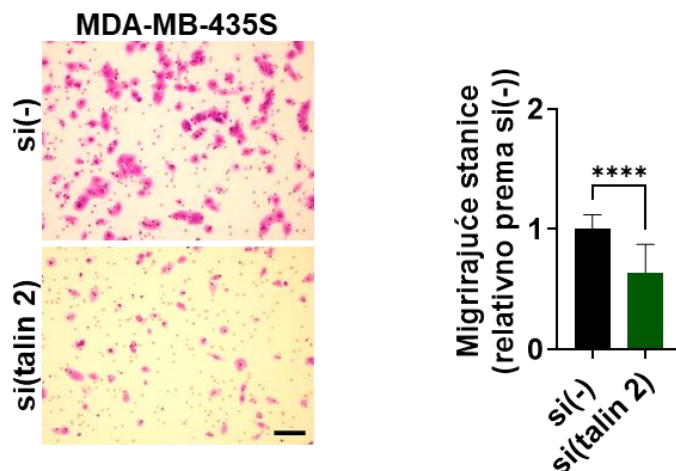
Slika 21. Utišavanje integrina αV , talina 1, talina 2, KANK2 ili integrina $\beta 5$ povećava brzinu rasta mikrotubula. A. Dijagram violine prikazuje kvantifikaciju rezultata mikroskopije živih stanica u vremenu. Pratili smo brzinu rasta mikrotubula (> 450 mikrotubula, $n = 3$) u stanicama MDA-MB-435S (435S-EB3) i klonu sa smanjenom ekspresijom αV integrina (3 αV -EB3). Brzinu rasta mikrotubula prikazali smo relativno prema kontrolnim stanicama 435S-EB3, a analizu smo proveli Studentovim t-testom. * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka. **B.** Brzinu rasta mikrotubula mjereli smo u stanicama 435S-EB3, 48 sati nakon transfekcije kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1, talin 2, KANK1, KANK2, ili integrin $\beta 5$. Brzinu rasta mikrotubula (> 250 mikrotubula, $n \geq 2$) prikazali smo relativno prema kontrolnim stanicama, a analizu smo proveli jednosmjernom analizom varijance i Šidákovim test višestruke usporedbe. * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka. **C.** Iz snimaka dobivenih mikroskopijom živih stanica 435S-EB3 i 3 αV -EB3 te stanica 435S-EB3 nakon transfekcije kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1, talin 2, KANK2, ili integrin $\beta 5$, izdvojili smo pojedinačne slike te rast pojedinog mikrotubula označili bijelom strelicom.

Prethodni rezultati upućuju da su promjene u dinamici mikrotubula, točnije povećanje brzine rasta mikrotubula, uzrokovane raspadom FA ili prekidom veze FA i CMSC-a (slika 21). Pretpostavka je da je uočena promjena razlog povećane osjetljivosti stanica na PTX. S obzirom na to da dosadašnji rezultati ukazuju na funkcionalnu vezu talina 2 i KANK2 (slika 18, 20, 21) odlučili smo provjeriti hoće li utišavanjem talina 2 doći do povećane osjetljivosti stanica na PTX te smanjenja učinkovitosti migracije. S obzirom na to da jedino utišavanjem proteina KANK1 nije došlo do promjene u brzini rasta mikrotubula (slika 21B, C), ovaj pokus je predstavljao kontrolu pretpostavljenog mehanizma. Iz histograma na slici 22A vidljivo je da utišavanje talina 2, za razliku od proteina KANK1, dovodi do značajnog povećanja osjetljivosti stanica na PTX u odnosu na kontrolu. Rezultati upućuju da je promjena u brzini rasta mikrotubula uzrokovala povećanje osjetljivosti stanica na PTX. Osim toga, slika 22B prikazuje da utišavanje talina 2 dovodi do smanjenja učinkovitosti migracije stanica. S obzirom na to da je citoskelet uključen u migraciju, za očekivati je da utišavanje talina 2, upravo kao i KANK2 (Paradžik i sur., 2020.), smanjuje učinkovitost migracije stanica.

A



B

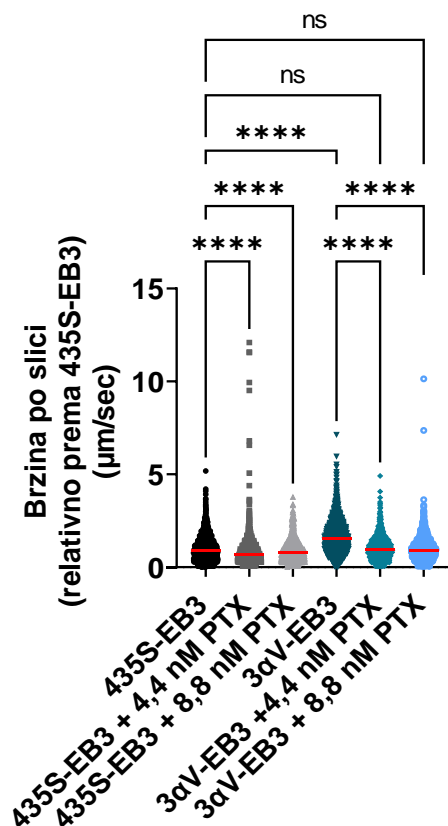


Slika 22. Utišavanje talina 2 povećava osjetljivost stanica na PTX i smanjuje učinkovitost migracije stanica. A. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanice smo nasadili u pločice s 96 bunarića i 24 sata nakon izložili različitim koncentracijama PTX-a. Osjetljivost smo odredili testom MTT, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost absorbancije \pm SD ($n = 3$). Rezultate smo analizirali dvostrukom analizom varijance i Šidákovim testom višestruke usporedbe. * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka. Prikazan je jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima. **B.** Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 2, uzgajali smo u hranjivoj podlozi bez seruma (24 sata) i potom nasadili u plastične umetke za migraciju. Nakon 22 sata migracije prema serumu kao kemoatraktantu, fiksirali smo stanice koje su migrirale, te ih obojali kristal-ljubičasto bojom i snimili svjetlosnim mikroskopom. Histogram prikazuje prosječan broj stanica koje su migrirale, određen iz tri pokusa, a rezultate smo analizirali Studentovim t-testom ($n = 3$). * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

PTX je protutumorski lijek koji vezanjem na mikrotubule onemogućava njihovu depolimerizaciju, čime mikrotubuli postaju stabilniji. Stanice 435S-EB3 i 3 α V-EB3 imaju različitu dinamiku mikrotubula i

posljedično različitu osjetljivost na PTX (slika 21). Kako bismo dodatno provjerili utjecaj PTX na dinamiku mikrotubula u stanicama 435S-EB3 i 3 α V-EB3 mjerili smo brzinu rasta mikrotubula mikroskopijom živih stanica nakon izlaganja stanica ekvimolarnoj (4,4 nM) i ekvitoksičnoj (8,8 nM) koncentraciji PTX. PTX je značajno smanjio brzinu rasta mikrotubula u obje stanične linije u usporedbi sa stanicama koje nisu bile izložene PTX. No, u 3 α V-EB3 koje pokazuju 1,6 puta veću brzinu rasta mikrotubula, PTX je smanjio brzinu rasta mikrotubula značajno više nego u stanicama 435S-EB3 (slika 23).

Zaključno, rezultati pokazuju da talin 2 i KANK2 ostvaruju funkcionalnu interakciju te povezuju CMSC i FA α V β 5 u stanicama MDA-MB-435S. Prekidom ove interakcije dolazi do promjena u citoskeletu stanice i smanjenja učinkovitosti migracije te povećane brzine rasta mikrotubula koja uzrokuje povećanu osjetljivost stanica na PTX. U stanicama s bržim rastom mikrotubula, stabilizirajuće djelovanje protutumorskog lijeka PTX-a na mikrotubule je naglašenije i dovodi do povećane osjetljivosti stanica.



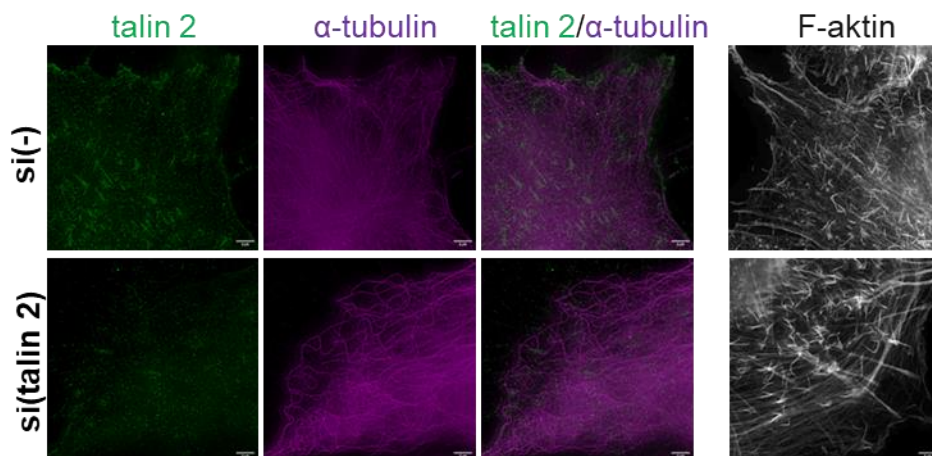
Slika 23. Povećana osjetljivost stanica na PTX korelira s bržim rastom mikrotubula. Stanice 435S-EB3 i 3 α V-EB3 izložili smo djelovanju ekvimolarnih i ekvitoksičnih koncentracija PTX-a tijekom 24 sata nakon čega smo im mjerili

brzinu rasta mikrotubula. Brzinu rasta mikrotubula (> 200 mikrotubula, n = 3) prikazali smo relativno prema kontrolnim 435S-EB3 stanicama, a analizu smo proveli jednosmjernom analizom varijance i Šidákovim testom višestruke usporedbe. * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

3.6. Prekid veze između proteina talina 2 i KANK2 dovodi do povećanja FA i količine stresnih niti u stanicama MDA-MB-435S

U poglavlju 3.4. prikazano je kako utišavanje talina 2 dovodi do promjena u izgledu stresnih vlakana i mikrotubula. Stanice sa smanjenom količinom talina 2 imaju smanjenu gustoću mikrotubula na rubu stanice, što je vrlo vjerojatno posljedica prekida veze FA sa CMSC-om (ovaj rad; Bouchet i sur., 2016.). Isto tako, vidljivo je značajno povećanje količine stresnih vlakana u stanicama sa smanjenom količinom talina 2. Prethodno smo pokazali na slici 16 da utišavanje talina 2 dovodi do značajnog povećanja veličine FA mjerenih signalom talina 1 i integrina $\beta 5$. Kako bismo dodatno potvrdili promjene u strukturi aktina i mikrotubula u stanicama s utišanim talinom 2 odlučili smo snimiti citoskelet stanice koristeći super-rezolucijsku mikroskopiju, točnije STED-mikroskopiju. Pomoću ove metode može se postići rezolucija od prosječno 40 nm, što je barem pet puta više nego u konfokalnoj mikroskopiji. Uz to, koristeći odgovarajuće programe, slike dobivene na STED-u mogu se naknado „dekonvoluirati“ (engl. *deconvolution*), točnije program računski određuje koji dio dobivenog signala odgovara originalnom signalu željenog proteina, dok ostatak signala prepoznaje kao šum i uklanja ga (Liu i sur., 2021.; Wang i sur., 2018.). Za vizualizaciju aktina i mikrotubula smo, umjesto primarnih i sekundarnih protutijela, koristili kratke fluorescentno obilježene peptide, nazvane Affimeri (Affimer TUB32C, Affimer 14) (Cordell i sur., 2022.). Na taj način se preciznije može odrediti lokalizacija i promjene u strukturi istraživanog proteina STED-mikroskopijom.

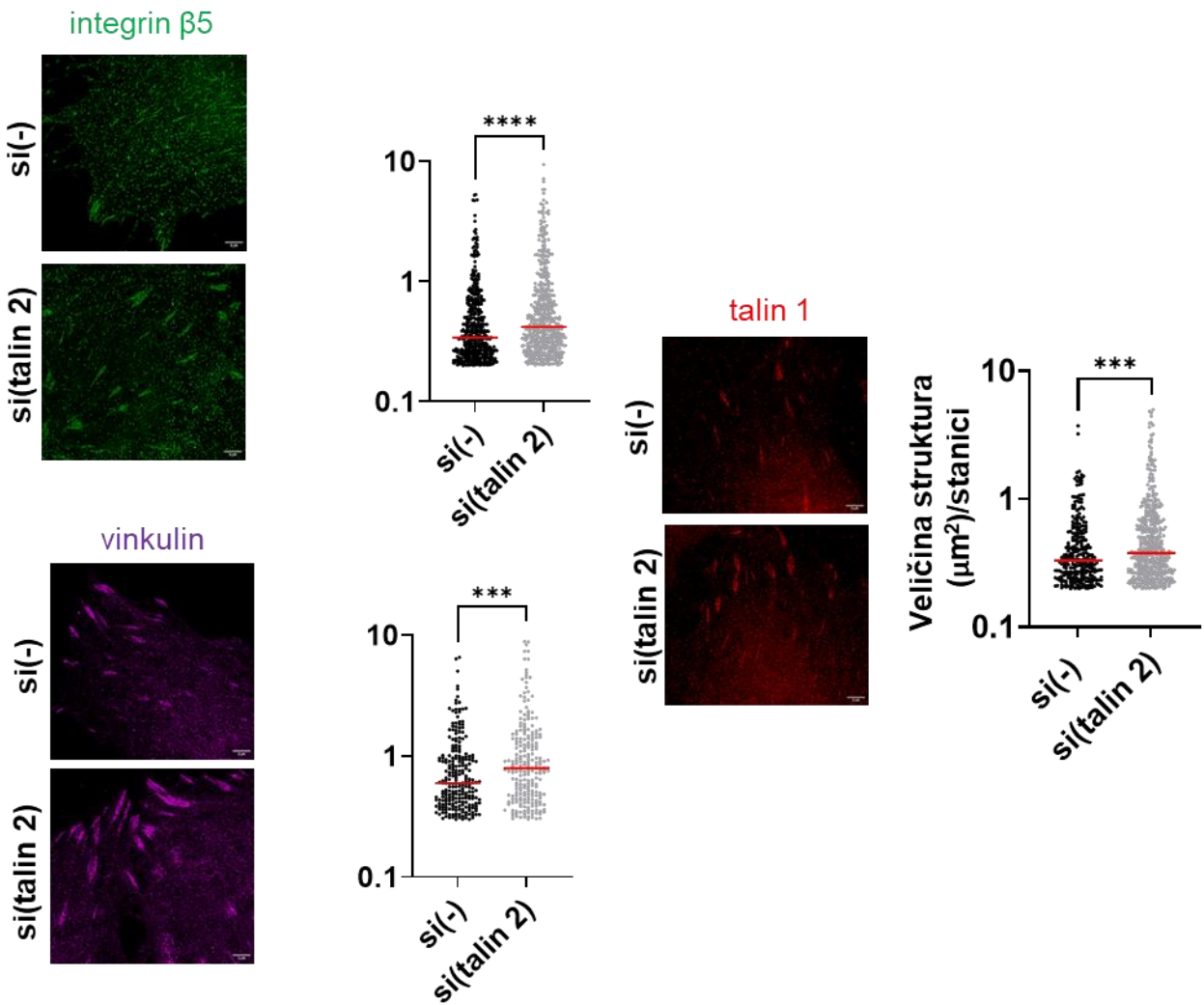
Na slici 24 vidljivo je kako utišavanjem talina 2 dolazi do promjene u gustoći mikrotubula na rubu stanice, što odgovara prethodno dobivenim rezultatima (slika 20). Osim toga, vidljivo je da utišavanje talina 2 dovodi i do promjene u količini i u organizaciji stresnih vlakana tj. povećana je količina dorzalnih stresnih vlakana koja se protežu prema rubovima stanice do FA.



Slika 24. Utišavanje talina 2 utječe na mikrotubule i aktinski citoskelet. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom (za vizualizaciju tubulina) i inkubirali s protutijelom za talin 2 i fluorescentno obilježenim malim peptidom za vizualizaciju tubulina (Affimer TUB32C, STAR RED®, ljubičasto). Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima za protutijelo za talin 2 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG obilježen STAR ORANGE® 555, zeleno). Za vizualizaciju aktinskih vlakna stanice smo fiksirali u 2 % PFA, permeabilizirali pomoću Triton X-100, a potom inkubirali s fluorescentno obilježenim malim peptidom za vizualizaciju aktina (Affimer 14, STAR RED®, sivo). Analizu smo proveli na super-rezolucijskom STED-mikroskopu STEDYCON. Skala iznosi 2 μ m.

Kako bismo dodatno potvrdili promjenu u veličini FA nakon utišavanja talina 2 (slika 16), proveli smo analizu talina 1, integrina β 5 te biljega FA, vinkulina na STED-mikroskopu. Snimanjem ruba stanice, dokazali smo da smanjenjem količine talina 2 u FA dolazi do statistički značajnog povećanja struktura pozitivnih na talin 1, integrin β 5 ili vinkulin (slika 25) što ukazuje na stvarno povećanje veličine FA.

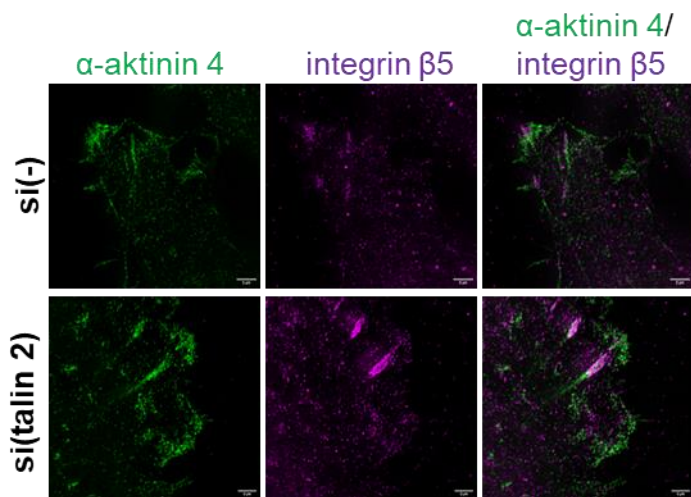
Zaključno, rezultati super-rezolucijske mikroskopije potvrđuju prethodno pokazane promjene u FA i citoskeletu stanice uslijed utišavanja talina 2. Promjene u izgledu mikrotubula na rubu stanice su vjerojatno posljedica prekida veze proteina talina 2 i KANK2, točnije FA i CMSC-a. Promjena u veličini FA uslijed utišavanja talina 2 upućuje na promjene u sastavu i/ili dinamici proteina adhesoma, što posljedično dovodi do povećane količine stresnih vlakana u stanicama.



Slika 25. Utišavanje talina 2 utječe na veličinu FA α V β 5. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom (za vizualizaciju integrina β 5 i talina 1) ili s 2 % PFA (za vizualizaciju vinkulina) i inkubirali s protutijelom za integrin β 5, talin 1 i vinkulin. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima za protutijelo za talin 1 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG obilježen STAR ORANGE[®], crveno) te za integrin β 5 i vinkulin (protutijelo za zečji imunoglobulin IgG obilježen STAR RED[®], zeleno, ljubičasto). Analizu smo proveli na super-rezolucijskom mikroskopu STEDYCON. Skala iznosi 2 μ m. Uz slike STED-mikroskopije nalaze se dijagrami raspršenosti koji prikazuju veličinu struktura određenih signalom integrina β 5, talina 1 ili vinkulina, a rezultate smo analizirani Studentovim t-testom ($n \geq 3$). * označava $p < 0,05$; ** označava $p < 0,01$; *** označava $p < 0,001$ dok **** označava $p < 0,0001$, „ns“ označava nepostojanje statističke značajnosti između uzoraka.

Najzastupljeniji proteini FA koji se vežu na aktin u stanicama MDA-MB-435S su filamin A, filamin B, α -aktinin 1 i α -aktinin 4, a utišavanjem integrina α V dolazi do smanjenja njihove razine u stanicama MDA-MB-435S (Paradžik i sur., 2020.). Filamini i α -aktinini povezuju aktinska vlakna međusobno i s drugim molekulama u stanici i time organiziraju aktinski citoskelet (Ribeiro i sur., 2014.). Filamini međusobno povezuju aktinska vlakna, ali i vežu preko 90 različitih signalnih, receptorskih i adaptornih proteina i tako sudjeluju u prijenosu signala u stanici. S druge strane, α -aktinin 1 i 4 možemo pronaći duž stresnih vlakana i u adhezijama na vodećem rubu migrirajuće stanice (Razinia i sur., 2012.; Edlund i sur., 2001.).

Za karakterizaciju promjena u FA α V β 5 koje dovode do povećanja količine stresnih vlakana u stanicama nakon utišavanja talina 2, odlučili smo vizualizirati i proteine koji se vežu na aktin pomoću STED-mikroskopije. Izabrali smo α -aktinin 4 jer je prethodno pokazano da je pojačano eksprimiran u stanicama melanoma (Hood i sur., 2010.), te se smatra potencijalnim dijagnostičkim biljekom u karcinomima (Yamamoto i sur., 2009.). Na slici 26 vidimo prikaz α -aktinina 4 i integrina β 5 nakon utišavanja talina 2. Ovaj rezultat potvrđuje povećanu veličinu FA, mjerenu signalom integrina β 5 te je vidljiv pojačan signal α -aktinina 4 koji je poprimio izduženi oblik u području FA α V β 5. Ovaj rezultat potvrđuje da utišavanjem talina 2 dolazi do promjena u sastavu adhesoma, točnije do povećane količine α -aktinina 4, povećanih stresnih niti te povećanih FA α V β 5.



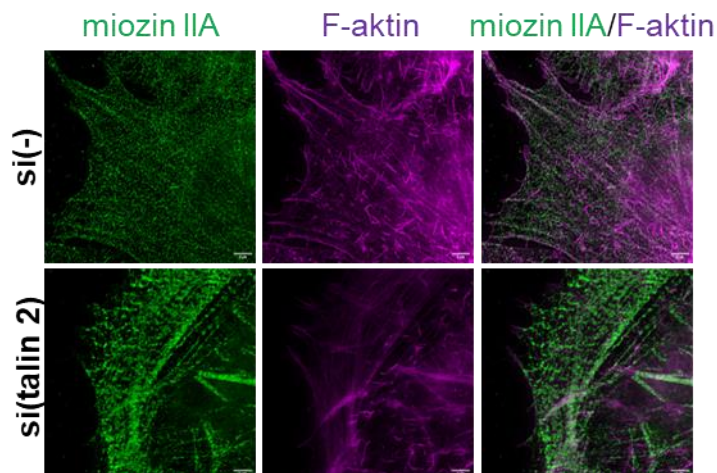
Slika 26. Utišavanje talina 2 utječe na izgled α -aktinina 4. Stanice transficirane s kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelom za integrin β 5 i α -aktinin 4. Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima za protutijelo za α -aktinin 4 (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG obilježen STAR ORANGE®, zeleno) te za integrin β 5 (protutijelo za zečji imunoglobulin IgG obilježen STAR RED®, ljubičasto). Analizu smo proveli na super-rezolucijskom mikroskopu STEDYCON. Skala iznosi 2 μ m.

3.7. Prekid veze između proteina talina 2 i KANK2 u stanicama MDA-MB-435S dovodi do povećanja FA s povećanom količinom motornog proteina miozina IIA

Rafiq i sur. (2019.) pokazali su da uslijed utišavanja proteina KANK1 i KANK2 i posljedičnog odvajanja mikrotubula od FA, dolazi do oslobađanja inaktivnog GEF-H1 proteina vezanog na rastuće mikrotubule. Oslobođeni GEF-H1 potiče aktivaciju signalnog puta Rho/ROCK što dovodi do nakupljanja filamenata miozina IIA i posljedično rasta stresnih vlakana i FA.

Dosad prikazani rezultati pokazuju da talin 2 i KANK2 ostvaruju interakciju i prekidom njihove veze dolazi do promjene u dinamici i izgledu mikrotubula te povećanju stresnih vlakana u stanici (slika 18B, 20, 21, 24, 25). Za potvrdu da odvajanje mikrotubula od FA u našim stanicama dovodi do povećanja količine stresnih vlakana i povećanja veličine FA utišali smo talin 2 i analizirali miozin IIA STED-mikroskopijom. Na slici 26 primjećujemo da utišavanje talina 2 dovodi do stvaranja velikog broja filamenata miozin IIA koji kolokaliziraju najvećim dijelom u područjima FA. Prema tome mehanizam u stanicama MDA-MB-435S identičan je onome opisanom u stanicama fibrosarkoma čovjeka HT1080 (Rafique i sur., 2019.). Filamenti miozina IIA potiču stvaranje mehanoosjetljivih FA stvarajući vučne sile (Riveline i sur., 2001.) i stabilizirajući stresna vlakna koja su povezana s FA (Oakes i sur., 2012.).

Možemo zaključiti da prekidom veze proteina talina 2 i KANK2 dolazi do oslobađanja GEF-H1, što posljedično uzrokuje nakupljanje miozina IIA, povećanje stresnih vlakana popraćeno s više α -aktinina 4 te, u konačnici, povećanja FA.



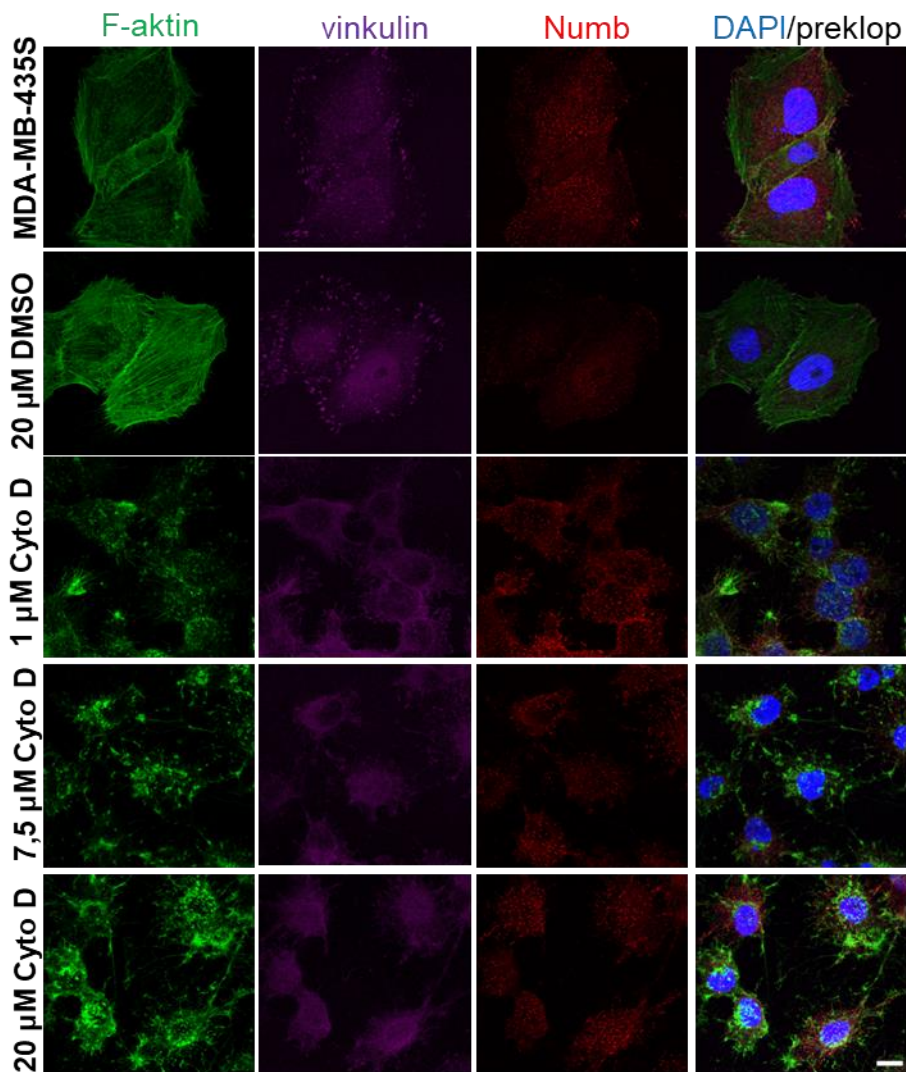
Slika 27. Utišavanje talina 2 pojačava nakupljanje filamenata miozina IIA. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca fiksirali s 2 % PFA i permeabilizirali s Triton X-100 te inkubirali s protutijelom za teški lanac miozina IIA i fluorescentno obilježenim malim peptidom za vizualizaciju aktina (Affimer 14, STAR RED®, ljubičasto). Potom je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelima za protutijelo za miozin IIA (protutijelo za mišji imunoglobulin IgG obilježen STAR ORANGE®, zeleno). Analizu smo proveli na super-rezolucijskom STED-mikroskopu STEDYCON. Skala iznosi 2 μ m.

3.8. Stanice MDA-MB-435S tvore RA α V β 5

Prethodna istraživanja naše grupe pokazala su da stanice MDA-MB-435S tijekom uzgoja na neobloženoj podlozi primarno koriste integrin α V β 5 za stvaranje FA, ali i RA (Paradžik i sur., 2020.). RA su otkrivene 2018. godine, kao nova vrsta adhezija posredovanih integrinom α V β 5 (Lock i sur., 2018.) koje nastaju kao posljedica zaustavljene endocitoze (Baschieri i sur., 2018.). Osim integrina α V β 5 grade ih proteini uključeni u endocitozu posredovanu klatrinom, poput adaptornih proteina AP2, Dab2, Numb, ARH te EPS15, EPS15L1 i ITSN. Jedini proteini konsenzualnog adhesoma koji se nalaze u FA i RA α V β 5 su talin 2 i tenzin 3. S obzirom na to da RA nastaju neovisno o aktinskom citoskeletu mogu se proučavati nakon izlaganja stanica cytochalasinu D (cyto D). Cyto D inhibira polimerizaciju aktina što posljedično dovodi do raspada FA ostavljajući prisutne samo RA u stanici. Upravo su tako Lock i sur. (2018.) odredili sastav RA stanica osteosarkoma čovjeka U2OS i to izlaganjem 20 μ M cyto D tijekom 2 sata.

Kako bismo odredili sastav RA u stanicama MDA-MB-435S odlučili smo ih izolirati i analizirati njihov sastav pomoću MS. Prvi korak prema tome je određivanje optimalne koncentracije cyto D, točnije koncentracije u kojoj su proteini RA obogaćeni u uzorku, a proteini FA što manje prisutni. Stoga smo izložili stanice različitim koncentracijama cyto D tijekom 2 sata i analizirali metodom IF neke od prethodno

potvrđenih sastavnica FA ili RA (slika 27). Kao kontrolu koristili smo stanice koje nisu izlagane djelovanju cyto D te stanice koje su izložene djelovanju samo otapala za cyto D (DMSO). Vizualizirali smo aktin, vinkulin kao biljeg FA te protein Numb kao biljeg RA. Osim toga, vizualizirali smo i jezgru stanice, jer je poznato da RA lokaliziraju u središnjem dijelu stanice, ispod jezgre (Lock i sur., 2018.). Iz slike 28 vidljivo je da otapalo DMSO ne utječe na izgled stanica, dok sve koncentracije cyto D ometaju polimerizaciju aktina, oslabljuju signal vinkulina te ne utječu na prisustvo proteina Numb. U najmanjoj koncentraciji mogu se mjestimično vidjeti ostatci polimeriziranog aktina i slabi signali vinkulina, koji, moguće, predstavljaju ostatke FA. Primjetili smo korelaciju između koncentracije cyto D, nestanka aktinskog citoskeleta i vinkulina te pojave karakterističnog izgleda RA u području ispod jezgre stanice. Stoga smo za daljnje pokuse, izolaciju i vizualizaciju RA, odlučili koristiti najvišu koncentraciju cyto D (20 μM), jednaku onoj koju su koristili Lock i sur. (2018.).



Slika 28. Određivanje koncentracije cytochalasina D (cyto D) za izolaciju i vizualizaciju RA. Četrdeset i osam sati nakon nasađivanja na stakalca stanice MDA-MB-435S smo izložili različitim koncentracijama cyto D (1, 7,5 i 20 μ M), inhibitora polimerizacije aktina, tijekom 2 sata. Kao kontrolu koristili smo stanice koje nisu izlagane cyto D i stanice izložene samo otapalu (20 μ M DMSO). Potom smo stanice fiksirali s 2 % PFA, permeabilizirali Tritonom X-100 i inkubirali s protutijelom za Numb. Uslijedila je inkubacija sa sekundarnim protutijelom za protutijelo za Numb (protutijela za zečji imunoglobulin IgG obilježena Alexa Flour 555[®], crveno). Vinkulin smo vizualizirali pomoću direktno fluorescentno obilježenog protutijela (anti-vinkulin Alexa Fluor[®] 647, ljubičasto), a aktin s fluorescentno obilježenim faloidinom (Alexa Flour 488[®]). Stakalca smo uklopili u podlogu za uklapanje s dodatkom boje za jezgru (DAPI, plava). Analizu smo provedeli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μ m.

Kako bismo odredili sastavnice retikularnog adhesoma stanica MDA-MB-435S izolirali smo RA metodom izolacije IAC-a kojom smo prethodno odredili sastav FA (Paradžik i sur., 2020.; Jones i sur., 2015.) uz dodatak odabrane koncentracije cyto D (20 μ M, 2 sata). Analiza MS-om provela se iz čak četiri replike svakog od uzoraka proteina (tablica 11, prilog 9.1.). Prvi uzorak je kontrolni uzorak proteina koji nisu umreženi te su stanice prethodno izložene djelovanju otapala DMSO-a, bez dodatka cyto D (uzorak DMSO). Uzorak DMSO korišten je kako bi se provjerila uspješnost umrežavanja DTBP-om, a u ovom uzorku očekujemo manje proteina karakterističnih za adhezije. Drugi uzorak su proteini koji su umreženi, ali stanice nisu izložene djelovanju cyto D (uzorak DTBP (FA+RA)). U ovom uzorku očekujemo obogaćenje proteinima FA i RA. Treći uzorak su proteini koji su umreženi, a stanice su prethodno izložene djelovanju cyto D tijekom 2 sata (uzorak Cyto D (RA)). U ovom uzorku očekujemo obogaćenje proteinima RA, a smanjenje količine proteina FA. Rezultati MS-a obrađeni su u programu Mascot i potom u programu Scaffold kako bismo dobili točan broj identificiranih spektara za pojedini protein. Ovaj podatak nam daje uvid u kvantitativni sastav identificiranih proteina, a usporedbom uzoraka proteina RA s kontrolnim uzorcima možemo zaključiti dolazi li do obogaćenja ili smanjenja pojedinog proteina uslijed izlaganja stanica cyto D. Na slici 29A prikazana je skraćena tablica broja spektara za najznačajnije proteine RA i FA u sva tri tipa uzorka. Usporedbom umreženih uzoraka s kontrolnim DMSO uzorkom, vidljivo je da je umrežavanje bilo uspješno i da je u druga dva uzorka došlo do obogaćenja proteina adhezija. Usporedbom uzorka DTBP (FA+RA) i Cyto D (RA) vidimo da je nakon izlaganja stanica cyto D došlo do smanjenja broja spektara za sve izdvojene proteine FA, poput talina 1, vinkulina, filamina i α -aktinina, a povećanja svih proteina RA, poput AP2A1 (podjedinice proteina AP2), Numb Dab2, ITSN, klatrin (engl. *clathrin heavy chain*, CLTC) i proteina dinamina 2 koji sudjeluje u odvajanju mjehurića obavijenih klatrinom od membrane u endocitozi posredovanoj klatrinom. Brojevi spektara za integrin β 5 i za talin 2 ostaju jednaki ili se malo povećavaju, što je u skladu s činjenicom da se ovi proteini nalaze u obje vrste adhezija, kao što je to već prethodno i pokazano (Lock i sur., 2019.).

Nakon analize rezultata u programu Scaffold, rezultate smo statistički obradili u programu QSpec (tablica 12, prilog 9.2.) i na slici 29B prikazali smo proteine čija se količina značajno promijenila u uzorcima Cyto D (RA) u usporedbi s uzorkom DTBP (FA+RA). Lijeva strana dijagrama vulkano prikazuje proteine koji su statistički obogaćeni u uzorcima RA (FDR < 0,05; fold change > -1,5 (manja značajnost) ili > -2 (veća značajnost)), a lijeva strana prikazuje proteine čija je količina statistički smanjena (FDR < 0,05; fold change < 1,5 (manja značajnost) ili < 2 (veća značajnost)) u uzorcima RA. Zelenom strelicom su dodatno naglašeni proteini koji su već prethodno pronađeni u retikularnom adhesomu, poput podjedinica AP2 (AP2A1 i AP2A2), CLTC-a i ITSN2. Protein EPS15L1 i ITSN1, podjedinica AP2B1 i talin 2 se nalaze na granici značajnosti. S druge strane, proteini koji su značajno smanjeni u uzorcima RA su naglašeni crvenom strelicom, poput proteina α -aktinina 1 i 4 i filamina B te plektina, ziksina i vinkulina.

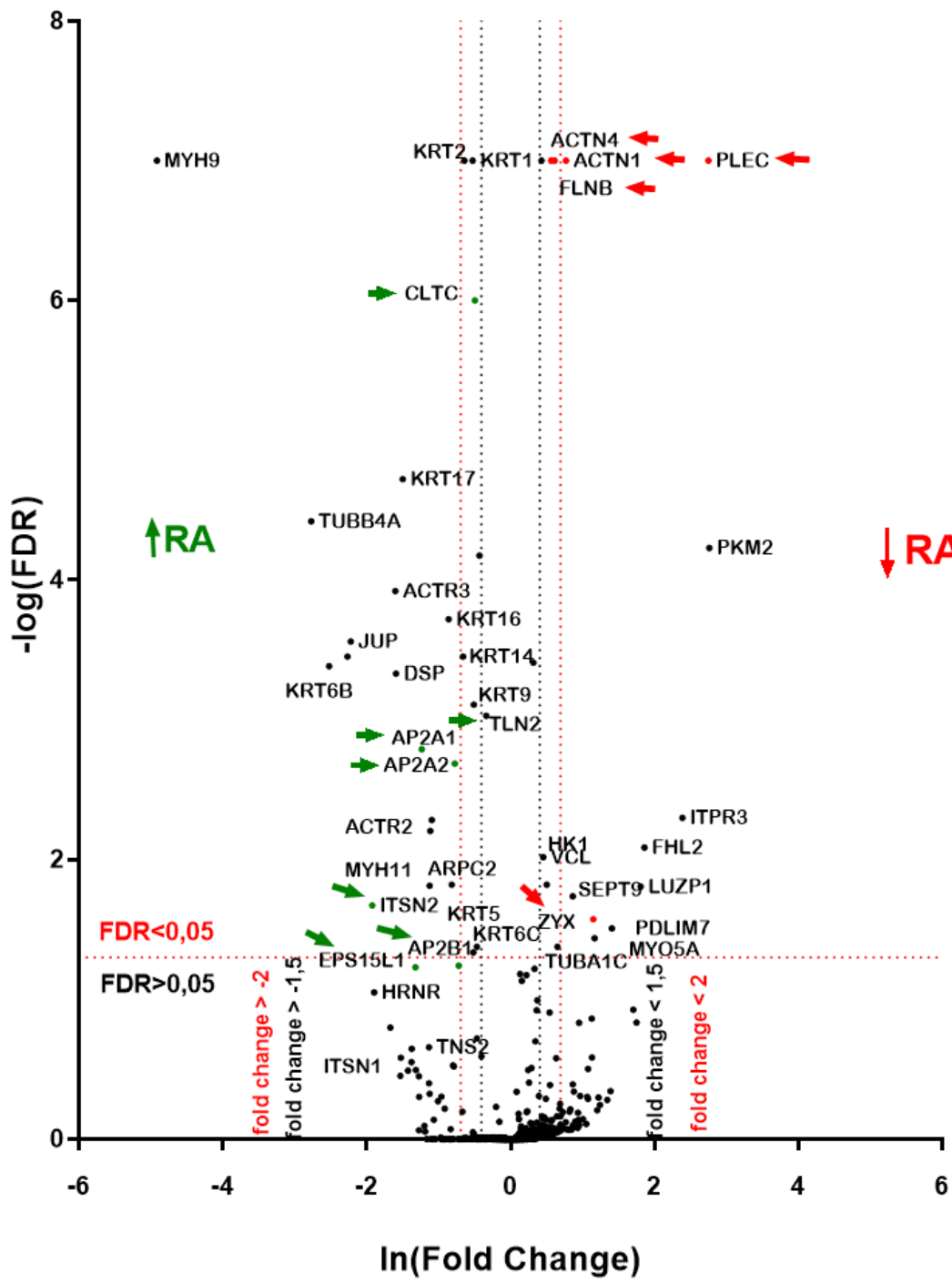
Potvrdu rezultata MS proveli smo metodama SDS-PAGE i WB, a rezultati su prikazani na slici 29C (zelenom bojom označeni su proteini konsenzualnog adhesoma, a ljubičastom bojom proteini RA). Uz uzorke izoliranih IAC-a, dodali smo i uzorak ukupnih proteina MDA-MB-435S stanica koji je služio kao kontrola uspješne izolacije proteina IAC-a od drugih proteina u stanici. I ovom metodom možemo vidjeti da je umrežavanje DTBP-om bilo uspješno i da su oba uzorka, DTBP i Cyto D, obogaćena proteinima adhezija. Osim toga, potvrdili smo da je izolacija RA bila uspješna, što je vidljivo iz smanjenja količine proteina talina 1 i filamina B te povećanja proteina Numb i AP2 u uzorku Cyto D (RA). Protein laktat-dehidrogenaza (LDH) je konstitutivno prisutan protein u svim stanicama u tijelu i nije dio adhesoma. LDH je služio kao kontrola uspješnosti izolacije proteina FA i RA ili samo RA od ostalih proteina u stanici. Signal LDH možemo vidjeti jedino u uzorku staničnog lizata stanica MDA-MB-435S, što je i očekivano. Količina integrina β 5 ostaje jednaka u svim uzorcima, što bi moglo upućivati da uslijed raspada aktinskog citoskeleta i FA, djelovanjem cyto D, dolazi do smanjenja stanične površinske napetosti i do prelaska integrina β 5 iz FA u RA. Zuidema i sur. (2022.) su zaista dokazali da smanjenje stanične površinske napetosti dovodi do prelaska integrina β 5 iz FA u RA.

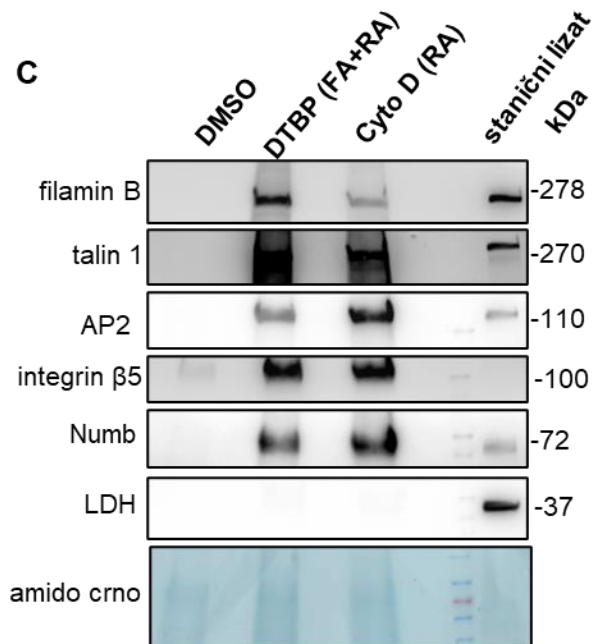
Zaključno, rezultati analize IF i MS te potvrda rezultata, dokazuju da stanice MDA-MB-435S tvore RA α V β 5 koje izgrađuju proteini koji su prethodno identificirani kao sastavni dio retikularnog adhesoma (Lock i sur., 2019.).

A

PROTEIN	DMSO	DTBP (FA+RA)	Cyto D (RA)
integrin β 5	58/63/54/50	64/73/52/40	64/77/79/45
AP2A1	2/2/0/0	24/9/10/2	49/15/25/3
Numb	0/0/0/0	0/0/0/0	4/0/0/0
Dab2	0/0/0/0	5/0/0/0	7/0/4/0
EPS15L1	0/0/0/0	6/0/0/0	22/2/4/2
ITSN1	0/0/0/0	0/0/0/0	12/0/2/0
ITSN2	0/0/0/0	0/0/0/0	19/0/3/0
CLTC	33/19/14/13	113/36/49/19	165/53/90/28
Dinamin 2	0/0/2/0	3/0/3/0	13/0/2/0
Vinkulin	6/5/5/7	105/4/51/18	46/9/33/20
taln1	37/98/95/79	218/118/160/111	165/108/167/80
taln2	0/0/0/0	128/55/84/29	127/80/146/42
Filamin A	62/64/58/45	294/68/174/88	232/49/111/43
Filamin B	11/8/0/0	212/24/120/32	143/7/44/6
α -aktinin 1	6/4/3/0	156/16/66/19	87/4/22/0
α -aktinin 4	6/4/2/5	173/20/89/32	122/2/40/6

B



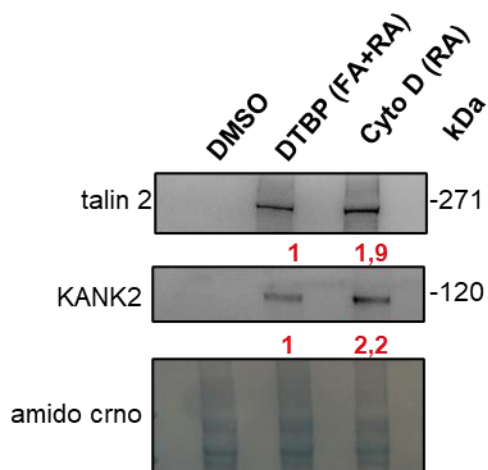


Slika 29. Spektrometrija masa proteina RA. **A.** Tablica prikazuje izdvojene proteine u uzorcima IAC-a bez umrežavanja (uzorak DMSO), sa umrežavanjem (uzorci DTBP (FA+RA)) i sa umrežavanjem i izlaganjem cyto D (20 μ M, 2 sata) (uzorci Cyto D (RA)). U tablici su navedeni brojevi ukupnih spektara za pojedini protein iz četiri replike dobivenih obradom podataka u programu Scaffold. **B.** Dijagram vulkano prikazuje rezultate MS-a uzoraka izoliranih proteina RA (n = 4). Oznake na apscisi i ordinati predstavljaju vrijednosti unutar kojih se nalaze proteini čija je količina statistički značajno promijenjena (FDR > 0,05 i fold change > -1,5 ili -2 te fold change < -1.5 ili -2). Proteini s lijeve strane dijagrama su oni proteini čija je količina statistički značajno povećana u uzorcima Cyto D (RA), dok proteini s desne strane predstavljaju proteine čija je količina značajno smanjena u uzorcima Cyto D (RA) u usporedbi s uzorcima DTBP (FA+RA). Rezultate analize MS obradili smo u programu Scaffold kako bismo dobili brojeve spektara za pojedini protein, koje smo potom statistički obradili u programu Qspec i dobili vrijednosti FDR i fold change. Strelice u boji označavaju proteine čija je količina očekivano povećana ili smanjena na temelju literaturnih podataka. **C.** Analiza WB proteina filamina B, talina 1, AP2, integrina β 5, Numb i LDH u izolatima IAC-a stanica bez korištenja kemijskog umreživača i cyto D (uzorak DMSO), nakon korištenja kemijskog umreživača, ali bez korištenja cyto D (uzorak DTBP (FA+RA)) te nakon korištenja kemijskog umreživača i 20 μ M cyto D (uzorak Cyto D (RA)). Uz uzorke izoliranih IAC-a dodali smo i uzorak staničnog lizata MDA-MB-435S kako bismo provjerili uspješnost analize SDS-PAGE i WB.

3.9. KANK2 je dio RA α β 5 u stanicama MDA-MB-435S

Rezultati opisani u poglavlju 3.8. pokazuju da smo uspješno optimizirali i izolirali proteine RA stanica MDA-MB-435S. U našim uzorcima došlo je do obogaćenja svih dosad otkrivenih sastavnica RA, poput integrina α β 5, adaptornih proteina uključenih u endocitozu posredovanu klatrinom te proteina talina 2. Uz očekivane proteine, zamijetili smo da u uzorcima MS dolazi do malog povećanja količine spektara za KANK2, koji dosad nije prepoznat kao sastavnica RA. Iako količina KANK2 nije bila statistički značajno promijenjena u uzorcima RA (broj spektara: 33/0/18/2) u odnosu na kontrolni uzorak DTBP (broj

spektara: 32/0/10/0), odlučili smo provjeriti ovo zapažanje metodom WB izoliranih FA i RA. Slika 30 prikazuje rezultate analize WB proteina talina 2 i KANK2. Možemo zamijetiti da je umrežavanje bilo uspješno i da je došlo do obogaćenja oba proteina u uzorcima DTBP (FA+RA) i Cyto D (RA). Isto tako, u uzorku Cyto D (RA) je došlo do povećanja količine talina 2 za skoro dva puta u odnosu na uzorak DTBP (FA+RA), što je očekivano s obzirom da je on sastavnica RA. U istom uzorku došlo je i do povećanja razine proteina KANK2 za više od 2 puta u odnosu na uzorak DTBP (FA+RA) ukazujući da je i KANK2 moguća sastavnica RA.



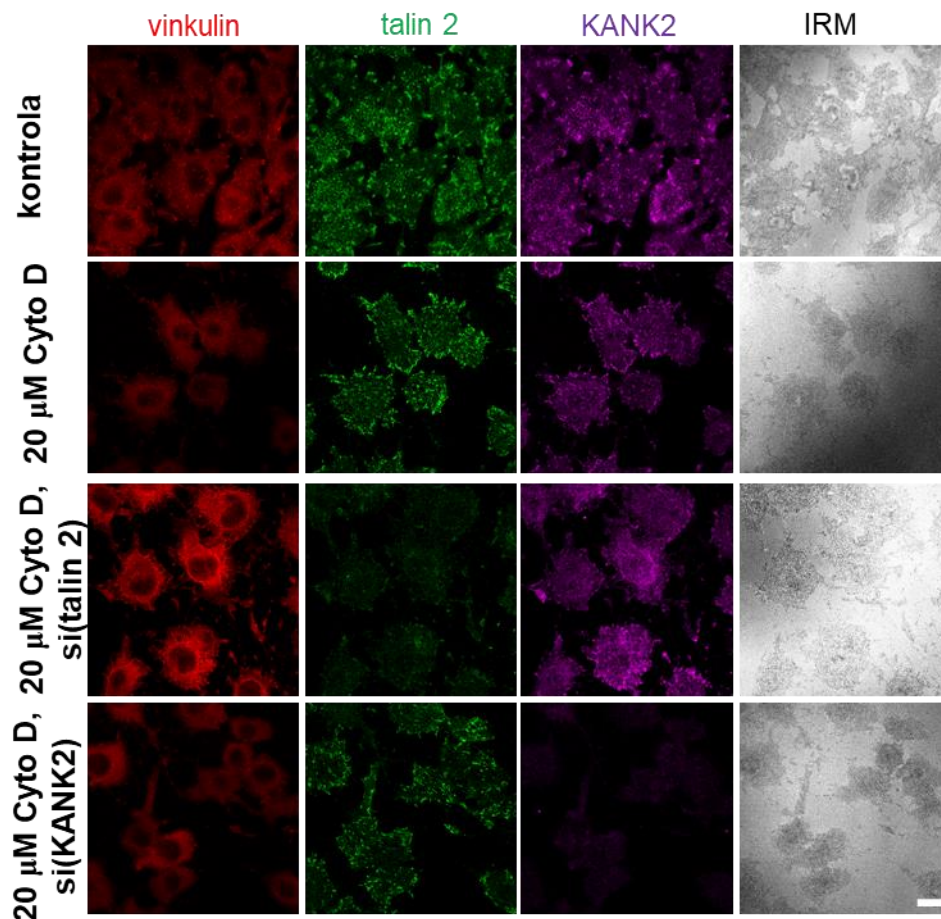
Slika 30. KANK2 je sastavni dio RA. Analiza WB proteina talina 2 i KANK2 u izolatima IAC-a stanica MDA-MB-435S bez korištenja kemijskog umreživača i cyto D (uzorak DMSO), nakon korištenja kemijskog umreživača, ali bez korištenja cyto D (uzorak DTBP (FA+RA)) te nakon korištenja kemijskog umreživača i cyto D (uzorak Cyto D (RA)). Brojevi ispod slika prikazuju rezultate denzitometrije, odnosno, količinu proteina prikazanu relativno prema količini proteina u uzorku DTBP koji iznosi 1.

Prijašnji rezultati IF pokazali su da utišavanjem talina 1 dolazi do raspada FA (slika 16), ali unatoč tome u stanicama ostaju prisutne strukture bogate proteinom integrinom $\beta 5$, talinom 2 i KANK2 koje odgovaraju RA (slika 16, 17). Kako bismo potvrdili prijašnja zapažanja i rezultate analize WB proteina KANK2 (slika 30), odlučili smo vizualizirati KANK2 nakon izlaganja stanica 20 μ M cyto D. Kako bismo bili sigurni da su strukture koje sadrže KANK2 uistinu RA, na istim uzorcima vizualizirali smo istovremeno protein vinkulin, biljeg FA i protein talin 2, dio RA. Na slici 31 u prvom redu je prikazan uzorak stanica koje nisu izlagane djelovanju cyto D, gdje možemo uočiti FA i RA. Signale proteina talina 2 i KANK2 pronalazimo na rubu i u sredini stanice gdje se djelomično preklapaju sa signalom vinkulina. U drugom redu slike 31 nalaze se stanice izložene djelovanju 20 μ M cyto D. U ovom uzorku dolazi do očekivanog raspada FA i posljedično smanjenja količine vinkulina. U stanicama je i dalje prisutan protein talin 2, čiji smještaj

odgovara RA, ali i protein KANK2 koji kolokalizira s talinom 2. Na temelju rezultata WB (slika 30) i IF (slika 31) zaključujemo da je KANK2 dosad neidentificirana sastavnica RA.

U našem modelu stanica MDA-MB-435S pokazali smo da talin 2 i KANK2 ostvaruju funkcionalnu interakciju i predstavljaju poveznicu FA i CMSC-a (poglavlje 3.3. i 3.5.). Kako bismo istražili ostvaruju li ova dva proteina interakciju i u RA proveli smo utišavanje svakog od ovih proteina specifičnom siRNA, stanice smo zatim izložili djelovanju cyto D kako bi ostale vidljive samo RA, te smo promatrali lokalizaciju i količinu oba proteina metodom IF. Slika 31 (treći i četvrti red) prikazuje da je utišavanje oba proteina u RA bilo uspješno te se njihova količina značajno smanjila u odnosu na kontrolne stanice. Utišavanje talina 2 nije dovelo do značajnog smanjenja KANK2, međutim, njegov signal je više raspršen po cijeloj stanici za razliku od kontrolnog uzorka. Isto tako, utišavanje proteina KANK2 nije značajno smanjilo sadržaj talina 2 koji i dalje lokalizira u RA, ali s obzirom na korištenu metodu teško je procijeniti je li došlo do stvarne promjene ili ne.

Zaključno, rezultati pokazuju da je KANK2 dosad neidentificirana sastavnica RA. U stanicama MDA-MB-435S talin 2 i KANK2 ostvaruju interakciju u FA $\alpha V\beta 5$, te je pokazano da su oba proteina dio RA $\alpha V\beta 5$, međutim iz rezultata analize WB i IF ne možemo zaključiti jesu li ova dva proteina u interakciji i u RA.



Slika 31. Odnos talina 2 i KANK2 u RA. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 2 ili KANK2, smo 48 sati nakon nasađivanja na stakalca izložili 20 μ M cyto D tijekom 2 sata. Potom smo stanice fiksirali metanolom i inkubirali s protutijelom za talin 2 i KANK2. Usljedila je inkubacija sa sekundarnim protutijelom za protutijelo za talin 2 (protutijela za mišji imunoglobulin IgG_{2b} obilježena Alexa Fluor 488®, zeleno) i za KANK2 (protutijela za zečji imunoglobulin IgG obilježena Alexa Fluor 647®, ljubičasto). Vinkulin smo vizualizirali pomoću direktno fluorescentno obilježenog protutijela (anti-vinkulin Alexa Fluor® 555, crveno). Za određivanje mjesta prihvaćanja stanica na podlogu koristili smo metodu IRM. Analizu smo proveli na konfokalnom mikroskopu TCS SP8 Leica. Skala iznosi 10 μ m.

3.10. Utišavanjem proteina talina 2 ili KANK2 dolazi do promjena u RA

U prethodnom poglavlju pokazali smo da je KANK2 dio RA u stanicama MDA-MB-435S. Kako bismo pobliže razumjeli ulogu proteina talina 2 i KANK2 u RA, analizirali smo uzorke RA iz stanica u kojima smo prethodno utišali talin 2 ili KANK2. Treba naglasiti da ovaj postupak podrazumijeva prolaznu transfekciju,

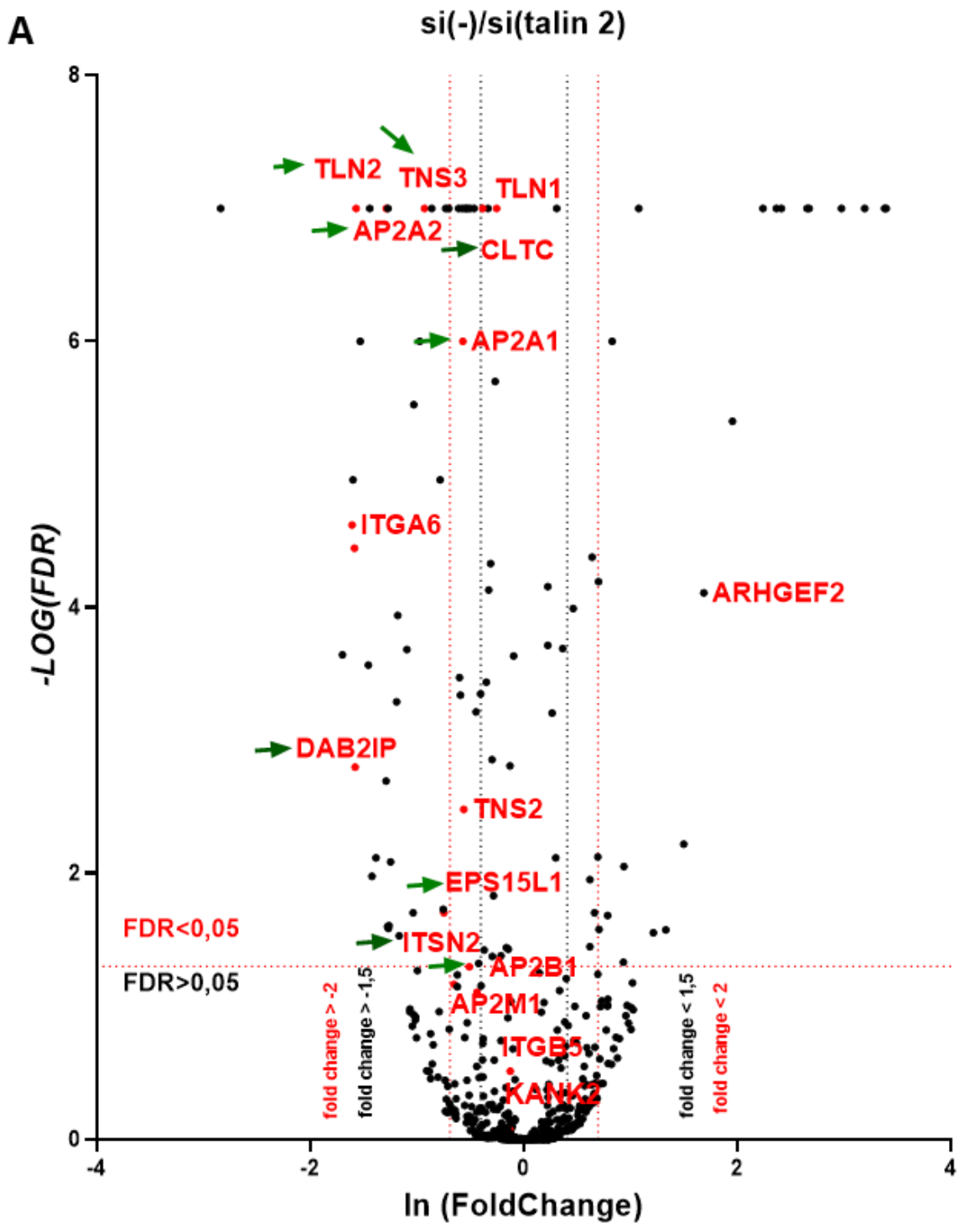
zatim inhibiciju stvaranja aktinskog citoskeleta pomoću cyto D, te na kraju dodatak umreživača DTBP koji umrežava proteine koji se nalaze u bliskoj interakciji u RA. S obzirom na to da prethodni rezultati pokazuju da utišavanjem talina 1 dolazi do raspada FA, ali u stanicama ostaju prisutne RA (slika 16, 17), analizirali smo i uzorak RA nakon utišavanja talina 1. Uzorke RA napravili smo u tri biološke replike za svaki uzorak. Rezultate MS analize (tablica 13, prilog 9.3.) obradili smo u programu Mascot i Scaffold te statističku analizu proveli u programu QSpec (tablica 14, 15, 16, prilog 9.4.). Rezultati značajno promijenjenih proteina u uzorcima RA nakon utišavanja specifičnom siRNA u usporedbi s kontrolnim uzorkom prikazani su na slici 32A, B, C. S lijeve strane dijagrama vulkano prikazani su proteini čija je količina značajno smanjena u odnosu na kontrolni uzorak. Dijagram vulkano proteina RA nakon utišavanja talina 2 (slika 32A) pokazuje da je utišavanje talina 2 bilo uspješno jer je količina talina 2 značajno smanjena u odnosu na kontrolni uzorak. Utišavanjem talina 2, dolazi do značajnog smanjenja količine nekih od sastavnica RA (označenih zelenom strelicom), poput AP2A1, AP2A2, tenzina 3, EPS1L15, ITSN2 te veznog partnera Dab2 proteina, DAB2IP (engl. *DAB2 interactive protein*). Ostali proteini RA poput CLTC, AP2B1 i AP2M1 bili su na granici značajnosti. Dijagram vulkano proteina RA nakon utišavanja proteina KANK2 (slika 32B) pokazuje da je utišavanje bilo uspješno jer je količina KANK2 značajno smanjena u odnosu na kontrolni uzorak. Utišavanjem proteina KANK2 također dolazi do smanjenja količine nekih od sastavnica RA poput CLTC proteina, AP2A1, AP2B1, ITSN2 te tenzina 3. Dijagram vulkano proteina RA nakon utišavanja talina 1 (slika 31C) pokazuje da je utišavanje talina 1 bilo uspješno jer je količina talina 1 značajno smanjena u odnosu na kontrolni uzorak. Utišavanjem talina 1 dolazi do smanjenja proteina talina 2, KANK1, KANK2, tenzina 3 te DAB2IP, ali većina proteina RA ostaje nepromijenjena u odnosu na kontrolni uzorak. Iako utišavanjem talina 1 dolazi do smanjenja količine proteina koji su dio RA moguće je da je uočeno smanjenje i posljedica raspada FA i citoskeleta stanica.

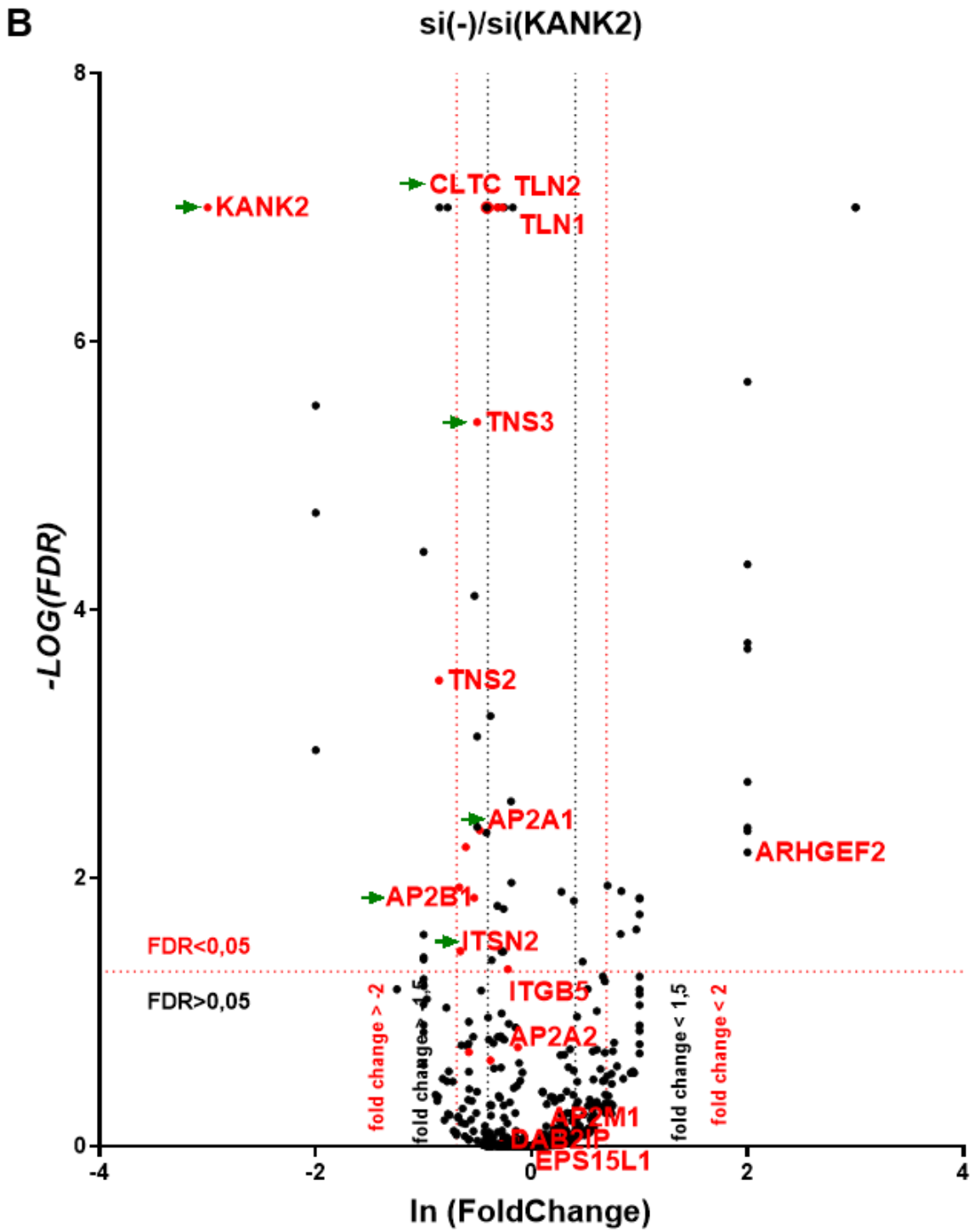
Kako bismo potvrdili dobivene rezultate MS, proveli smo analizu WB proteina RA u uzorcima izoliranih RA nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2. Utišavanje svih proteina bilo je uspješno. Na slici 32D možemo vidjeti da rezultati MS izoliranih proteina RA nakon utišavanja talina 2 ili KANK2 odgovaraju dobivenim signalima u analizi WB. Utišavanje proteina talina 2 ili KANK2 dovodi do smanjenja količine proteina AP2 i Numb za više od 50 %. Osim toga, utišavanje talina 2 dovodi do smanjenja količine KANK2 i obrnuto. Zanimljiv rezultat dobiven je u uzorcima RA nakon utišavanja talina 1 za koje znamo da dovodi do razaranja FA. Ti su uzorci imali povećanu količinu proteina AP2 i Numb za više od 2 puta, ali je došlo do smanjenja količine talina 2 i KANK2. Signal talina 1 bio je izuzetno slab u svim uzorcima, stoga na tim uzorcima nije provedena denzitometrija. S obzirom na to da talin 1 nije dio RA, za očekivati je da uzorci

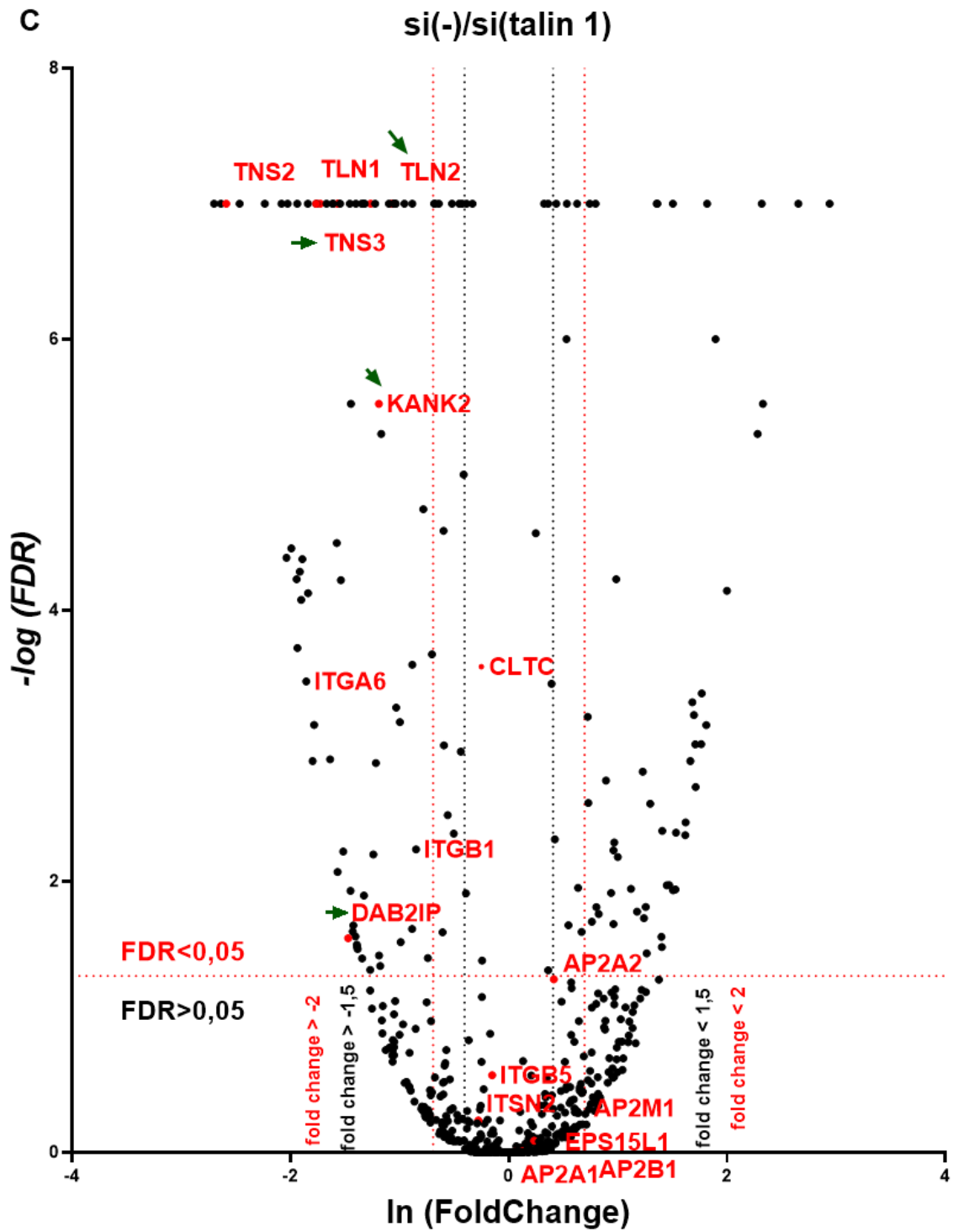
izloženi djelovanju cyto D neće imati značajne količine talina 1 i moguće je da ga je teže vizualizirati metodom WB u odnosu na metodu MS. Količina integrina $\beta 5$ ostala je nepromjenjena u svim uzorcima.

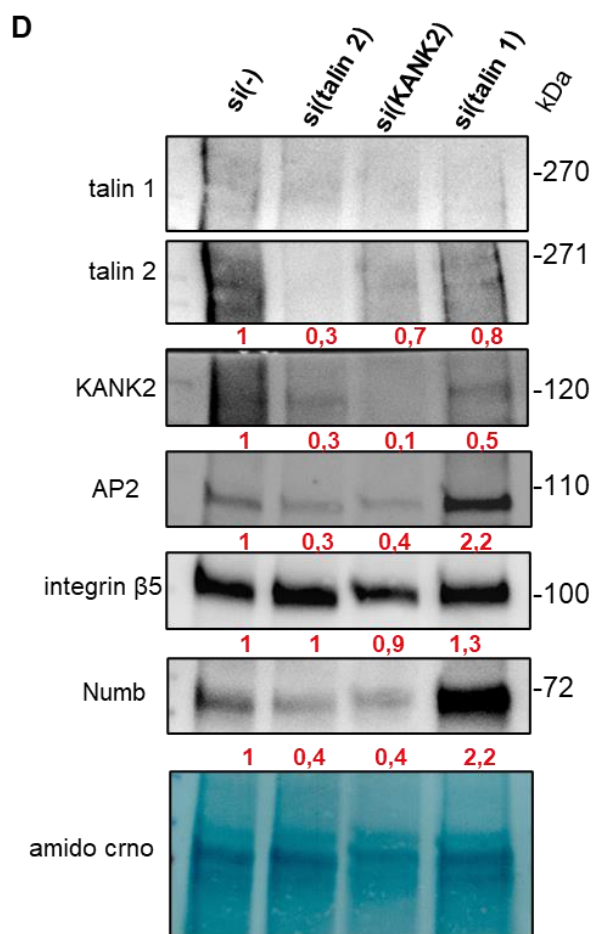
Zaključno, rezultati analize proteina RA metodom MS nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2 ukazuju da su talin 2 i KANK2 sastavnice RA čijim utišavanjem dolazi do značajnog smanjenja ostalih sastavnica RA. To potvrđuju rezultati analize WB koji pokazuju da utišavanjem talina 2 dolazi do smanjenja količine KANK2 i obrnuto, što upućuje na to da se ovi proteini međusobno reguliraju i u RA i da su potencijalno u funkcionalnoj interakciji. Međutim, ostaje otvoreno pitanje kojim mehanizmom se to događa. Zuidema i sur. (2022.) pokazali su da povećanje stanične površinske napetosti koje je popraćeno povećanjem FA smanjuje količine RA. U prvom dijelu ovog doktorskog rada pokazali smo da prekid veze KANK2 s talinom 2 dovodi do povećane stanične površinske napetosti što se odražava u povećanju filamenata miozina IIA i povećanju veličine FA. U drugom dijelu ovog doktorskog rada pokazujemo da utišavanje KANK2 ili talina 2 smanjuje količinu sastavnica RA. Moguće je da je zabilježena promjena u RA uslijed utišavanja proteina talina 2 ili KANK2 posljedica promjena u FA uslijed prekida njihove interakcije. Utišavanje talina 1, kada dolazi do raspada FA i smanjenja stanične površinske napetosti, stvarno ne mijenja (MS) ili čak povećava količinu proteina RA (WB) podupirući ovu hipotezu.

Iako smo u ovom istraživanju otkrili funkcionalne interakcije između talina 2 i KANK2 u FA i RA još istražujemo koja je njihova stvarna uloga u RA.









Slika 32. Spektrometrija masa RA nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2. A., B., C. Stanice transficirane kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1, talin 2 ili KANK2, smo nakon 48 sati izložili djelovanju cyto D (20 μ M, 2 sata) te smo izolirali proteine RA. Dijagrami vulkano prikazuju rezultate MS-a uzoraka izoliranih proteina RA (n = 3). Rezultate analize MS obradili smo u programu Scaffold kako bismo dobili brojeve spektara za pojedini protein, koje smo potom statistički obradili u programu Qspec i dobili vrijednosti FDR i fold change. Proteine od interesa označili smo crvenom bojom. Oznake na apscisi i ordinati predstavljaju vrijednosti unutar kojih se nalaze statistički značajno promijenjeni proteini (FDR < 0.5 i fold change > -1,5 ili -2 ili fold change < 1,5 ili 2) u odnosu na kontrolne stanice. Proteini s lijeve strane dijagrama predstavljaju proteine čija je količina statistički značajno smanjena u uzorcima RA nakon utišavanja pojedinog proteina te su označeni zelenom strelicom. **D.** WB proteina talina 1, talina 2, KANK2, AP2, integrina β 5 i Numb u izolatima RA nakon utišavanja proteina talina 2, KANK2 ili talina 1. Brojevi ispod slika prikazuju količinu proteina prikazanu relativno prema količini proteina u kontrolnom uzorku (si(-)) koji iznosi 1.

4. RASPRAVA

Integrini su transmembranski receptori čijom aktivacijom dolazi do tvorbe višeproteinskih IAC-a. IAC-i su uključeni u vezanje ECM-a sa staničnim citoskeletom kao i u prijenos signala čime reguliraju preživljenje, proliferaciju, pokretljivost i diferencijaciju stanica. Osim u regulaciji homeostaze u zdravim stanicama, poremećaji u ekspresiji integrina potiču procese tumorigeneze i metastaziranja tumora (Kanchanawong i Calderwood, 2023.; Pang i sur., 2023.). Dugi se niz godina, integrini istražuju kao potencijalne mete u liječenju tumora, samostalno ili u kombinaciji s postojećim terapijama, poput radioterapije i protutumorskih lijekova. Unatoč ohrabrujućim rezultatima *in vitro* i *in vivo*, klinička istraživanja u pacijenata to nisu potvrdila te do sada nema odobrenih lijekova usmjerenih na integrine ili proteine IAC-a za primjenu u liječenju tumora (Bergonzini i sur., 2022.). Važno je napomenuti da u klinici ipak nalazimo lijekove koji su usmjereni na integrine i to u liječenju pacijenata oboljelih od različitih autoimunih bolesti. Osim toga mnogi lijekovi koji su usmjereni na integrine i dalje se nalaze u različitim fazama kliničkih istraživanja. Smatra se da su za uspjeh kliničkih studija potrebna dodatna istraživanja sastava i regulacije adhezija posredovanih integrinima te mehanizma prenošenja informacija unutar njih (Pang i sur., 2023.).

Melanom je agresivna vrsta kožnog tumora koji može metastazirati iz relativno malog primarnog tumora u različite dijelove tijela (Srivastava i sur., 2019.). Unazad desetak godina došlo je do značajnog napretka u razvoju malih inhibitora, a unazad nekoliko godina i imunoterapije za liječenje pacijenata oboljelih od metastatskog melanoma. Unatoč tome, dio se pacijenata, u kasnijim stadijima bolesti ili uslijed razvitka otpornosti na spomenute terapije, liječi protutumorskim lijekovima. Protutumorski lijekovi imaju slabu učinkovitost u liječenju pacijenata oboljelih od melanoma u usporedbi s drugim tumorima (Schadendorf i sur., 2018.). Stoga bi bilo korisno pojačati učinkovitost liječenja protutumorskim lijekovima pronalaskom novih meta u melanomu. Za sada je poznato da su među potencijalnim novim metama identificirani integrini i proteini IAC-a (Arias-Mejias i sur., 2020.).

Prethodna istraživanja naše grupe identificirala su integrin αV kao potencijalnu metu u povećanju osjetljivosti stanica melanoma MDA-MB-435S na protutumorske lijekove vinkristin i PTX te smanjenju njihovog metastatskog potencijala, odnosno, smanjenju učinkovitost migracije stanica *in vitro*. Pokazano je da je za taj učinak odgovoran integrin $\alpha V\beta 5$ kojeg stanice MDA-MB-435S preferencijalno koriste za adheziju (Paradžik i sur., 2020.; Stojanović i sur., 2018.). Kako bi se detaljno istražile promjene adhesoma nakon utišavanja integrina αV , provedena je izolacija i analiza IAC stanica melanoma MDA-MB-435S i klona

αV u kojem je integrin αV stabilno utišan. Analiza rezultata MS-a pokazala je da stanice koriste integrin $\alpha V\beta 5$ za stvaranje FA, koje su sadržavale većinu proteina konsenzualnog adhesoma (Paradžik i sur., 2020.; Horton i sur., 2015.; adhesome.org). Između tih proteina našu su pažnju posebno privukli proteini talin 1 i talin 2 te proteini CMSC-a, KANK1 i KANK2. Pokusi *in vitro* dokazuju da oba homologa talina, mogu tvoriti vezu s oba homologa proteina KANK vezanjem domene R7 talina s domenom KN proteina KANK (Gough i Goult, 2018.; Bouchet i sur., 2016.). Utišavanje proteina KANK2 oponašalo je utišavanje integrina αV , povećalo je osjetljivost na PTX i smanjilo učinkovitost migracije te je zaključeno da je KANK2 glavna molekula koja povezuje CMSC i FA $\alpha V\beta 5$. Međutim, nije istraženo s kojim se proteinom, talinom 1 ili talinom 2, KANK2 veže u FA te nije istražena uloga proteina KANK1 u ovom staničnom modelu. Osim FA $\alpha V\beta 5$, pokazano je da stanice MDA-MB-435S tvore i RA $\alpha V\beta 5$, ali njihov sastav i uloga nisu dalje proučeni (Paradžik i sur., 2020.).

Ovaj doktorski rad predstavlja nastavak prethodno opisanih istraživanja u stanicama melanoma MDA-MB-435S. Rezultati detaljno opisuju molekularni mehanizam povećanja osjetljivosti stanica na PTX i smanjene učinkovitosti migracije uslijed utišavanja proteina integrina αV , KANK2 ili talina 2. Pokazana je različita uloga talina 1 i talina 2 u FA $\alpha V\beta 5$ i otkrivena je funkcionalna interakcija između proteina talina 2 i KANK2 koja regulira *crossstalk* aktina i mikrotubula. Rezultati također ukazuju da se u ovom staničnom modelu KANK1 ne nalazi u FA $\alpha V\beta 5$. Ovaj rad analizira i sastav druge vrste adhezija posredovanih integrinom $\alpha V\beta 5$, tj. RA. U njima je potvrđena prisutnost talina 2 te je po prvi put otkriven KANK2 kao novi protein u sastavu RA. U konačnici, sveukupni rezultati ovog dokorskog rada ukazuju na činjenicu da integrin $\alpha V\beta 5$ tvori FA i RA kojima su zajednički proteini talin 2 i KANK2 te da promjena jedne od ovih adhezija djeluje na drugu.

Unatoč strukturnoj sličnosti homologa talina 1 i talina 2 te KANK1 i KANK2, literaturni podaci pokazuju razlike u ulozi i lokalizaciji pojedinog homologa u različitim staničnim modelima (poglavlje 1.3.1, 1.3.2). Međutim, mali broj studija uspoređuje uloge i međusobnu regulaciju homologa unutar istog staničnog modela. S obzirom na to da stanice MDA-MB-435S sadrže oba homologa proteina talina i KANK, odlučili smo detaljno istražiti ulogu svakog od ovih proteina. U stanicama uzgojenim na neobloženoj podlozi pokazali smo da se oba talina nalaze u FA $\alpha V\beta 5$, koje se u takvim uvjetima uzgoja preferencijalno koriste za adheziju. U istim tim stanicama MDA-MB-435S te u stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 uzgojenim na fibronektinu, Qi i sur. (2016.) pokazali su da se talin 1 nalazi primarno u manjim FA, a talin 2 u zrelijim, većim FA. S obzirom na to da se integrin $\alpha V\beta 5$ ne veže za fibronektin (Pang i sur., 2023.) mogući integrini koji stvaraju FA u tim uvjetima su integrini $\alpha V\beta 3$ i $\alpha 5\beta 1$. Stanice MDA-MB-435S eksprimiraju oba

ova heterodimera integrina (Paradžik i sur., 2020.; Stojanović i sur., 2018.; naši neobjavljeni podaci). Moguće je da u uvjetima rasta na fibronektinu stanice MDA-MB-435S stvaraju FA $\alpha\beta3$ koje su obogaćene talinom 1, dok je talin 2 prisutan u većim, zrelim adhezijama posredovanim integrinom $\alpha5\beta1$. U drugim staničnim linijama, talin 1 je pronađen u FA i podosomima, a talin 2 u FB i invadopodijima (Praekelt i sur., 2012.). S obzirom na to da smo za potvrdu lokalizacije talina 1 i talina 2 u našim stanicama koristili integrin $\beta5$, koji je isključivo dio adhezija $\alpha\beta5$ (Hynes i Naba, 2012.), možemo tvrditi da su oba talina dio FA $\alpha\beta5$. Rezultati su pokazali da je talin 1 odgovoran za uspješnu tvorbu FA $\alpha\beta5$, vjerojatno putem aktivacije $\beta5$ integrina, a njegovo utišavanje onemogućava uspješnu adheziju stanica, što dovodi do potpunog raspada citoskeleta i posljedično značajno smanjene proliferacije stanica MDA-MB-435S. Rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da gubitak talina 1 onemogućava razvoj embrija miša i dovodi do njihove smrti (Monkley i sur., 2000.). Također, utišavanje talina 1 smanjuje adheziju i pokretljivost stromalnih stanica čovjeka te fibroblasta i miocita miša (Tang i sur., 2021.; Manso i sur., 2017.; Zhang i sur., 2008.). S druge strane, u našem staničnom modelu, utišavanje talina 2 nije utjecalo na tvorbu FA i proliferaciju stanica MDA-MB-435S. Štoviše, smanjenje količine talina 2 u stanicama dovodi do povećanja veličine FA (mjereno signalom talina 1, vinkulina ili integrina $\beta5$) i povećanja količine stresnih vlakana, što je utvrđeno konfokalnom i super-rezolucijskom mikroskopijom. Manso i sur. (2017.) pokazuju da u miocitima miša, gubitak talina 2 također ne utječe na strukturu i funkciju stanica i tkiva srca, no oni pokazuju da je razlog tome djelomična kompenzacija talina 2, talinom 1. U našem modelu dolazi do povećanja veličine FA, ali količina talina 1 u ukupnim proteinima stanice i u izoliranim IAC-ima ostaje jednaka nakon utišavanja talina 2, stoga ne možemo tvrditi da talin 1 nadomješta nedostatak talina 2. Uz to nije došlo ni do promjene u broju FA mjereno signalom talina 1, vinkulina ili integrina $\beta5$. Moguće je da je promjena u količini talina 1 vrlo suptilna i nije ju moguće izmjeriti metodom SDS-PAGE i WB, no njen učinak je vidljiv na FA i stresnim vlaknima. Možemo zaključiti da je talin 1 nužan za stvaranje FA te da talin 2 ne može nadomjestiti njegov nedostatak u stanicama MDA-MB-435S.

Prethodno objavljeni rezultati naše istraživačke grupe pokazali su da utišavanjem proteina KANK2 u stanicama MDA-MB-435S dolazi do promjene u izgledu mikrotubula, smanjene učinkovitosti migracije stanica i povećane osjetljivosti na protutumorski lijek PTX. U adhesomu je identificiran KANK1, ali nije određena njegova lokalizacija ni uloga. Pretpostavljeno je da bi i utišavanjem proteina KANK1 moglo doći do sličnog učinka kao i utišavanjem proteina KANK2 (Paradžik i sur., 2020.). Rezultati ovog doktorskog rada pokazuju da KANK1 i KANK2 imaju različitu lokalizaciju i ulogu u stanicama MDA-MB-435S. KANK1 lokalizira pretežno na rubu stanice, gdje se djelomično nalazi u blizini integrina $\alpha\beta5$, dok se KANK2 nalazi u FA, točnije kolokalizira s integrinom $\beta5$ i talinom 1 i 2. Isto tako, signal proteina KANK1 znatno je slabiji u

odnosu na signal proteina KANK2. Prethodna MS analiza pokazala je da utišavanjem integrina αV dolazi do smanjenja količine svih sastavnica FA i CMSC, uključujući i KANK2. No broj spektara za KANK1 bio je malo manji u odnosu na broj spektara za KANK2 i nije se moglo zaključiti dolazi li do promjena u njegovoj količini utišavanjem integrina αV (Paradžik i sur., 2020.). Kako bismo potvrdili rezultate dobivene za KANK2 i analizirali što se uistinu događa s količinom proteina KANK1 proveli smo analizu WB ukupnih proteina klona 3 αV . Rezultati su potvrdili da utišavanjem integrina αV dolazi do raspada FA i posljedično smanjenja količine proteina talina 1, talina 2 i KANK2, no količina KANK1 ostala je jednaka. Još važnije je da utišavanjem proteina KANK1 nije došlo do povećanja osjetljivosti stanica na PTX. Prema tome, rezultati upućuju na različitu ulogu proteina KANK u stanicama MDA-MB-435S te ukazuju da KANK1 nije sastavni dio FA $\alpha V\beta 5$. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se odredila točna uloga i vezni partneri proteina KANK1 u ovim stanicama. Literaturni podaci pokazuju da je uloga proteina KANK ovisna o vrsti stanica. Naime, Bouchet i sur. (2016.) pokazuju da je KANK1 dio CMSC i ostvaruje interakciju s talinom 1 u stanicama karcinoma vrata maternice HeLa. Sun i sur. (2016.) pokazuju da KANK2 ostvaruje interakciju s talinom u FA, ali njihovo vezanje uzrokuje klizanje adhezija u sredinu stanice. S druge strane, u pluripotentnim matičnim stanicama čovjeka HEL24.3 i HEL11.4, oba su proteina KANK, KANK1 i KANK2, lokalizirana u obrubu FA (Stubb i sur., 2019.). Do sada je pokazano da proteini KANK imaju ulogu u tumorigenezi (Tadijan i sur., 2020.), ali mali broj istraživanja se bavi kombiniranim pristupom utišavanja proteina KANK s postojećim protutumorskim lijekovima. Pu i sur. (2020.) pokazali su da utišavanje proteina KANK1 u stanicama karcinoma pluća A549 smanjuje apoptozu i osjetljivost stanica na PTX. Wang i sur. (2020.) pokazali su smanjenje količine proteina KANK1 u stanicama i uzorcima karcinoma usne šupljine koje su otporne na cisplatinu. Štoviše, povećanje količine proteina KANK1 čini stanice osjetljivijima na cisplatinu putem povećane apoptoze. Usprkos činjenici da se KANK1 ponaša kao tumorski supresor u drugim staničnim linijama (Fan i sur., 2020.; Chen i sur., 2017.; Sarkar i sur., 2002.), u našim stanicama MDA-MB-435S utišavanjem proteina KANK1 nismo primijetili promjene u osjetljivosti na PTX.

Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da KANK1 i KANK2 imaju različite uloge u stanicama MDA-MB-435S te da je KANK2 glavna poveznica CMSC-a i FA. Istražili smo s kojim homologom talina KANK2 ostvaruje funkcionalnu interakciju i tako posreduje vezu FA i CMSC-a. Utvrdili smo postojanje funkcionalne interakcije proteina KANK2 i talina 2 i objasnili molekularni mehanizam povećane osjetljivosti stanica na PTX uslijed utišavanja integrina αV . Iako su prethodna istraživanja, koristeći analizu *in vitro* fluorescentno obilježenih peptida koji odgovaraju domeni R7 talina i domeni KN proteina KANK, pokazala da oba talina mogu stupiti u interakciju s oba proteina KANK, rezultati nisu potvrđeni u staničnom modelu (Bouchet i sur., 2016.). Prvi korak u određivanju potencijalne interakcije bila je vizualizacija promjene lokalizacije i

količine proteina KANK2 u stanicama nakon utišavanja pojedinog talina. Utišavanjem talina 1 došlo je do raspada FA, CMSC-a i smanjenja površine stanica, dok su nakon utišavanja talina 2 FA ostale očuvane i nije došlo do promjene u lokalizaciji i količini proteina KANK2. S obzirom na to da utišavanjem talina 1 dolazi do potpunog raspada oba kompleksa, dok utišavanje talina 2 naizgled ne utječe na KANK2 i CMSC, međusobna interakcija talina i KANK2 nije izgledala vjerojatnom. Kako bismo ipak provjerili postoji li interakcija tih dvaju proteina odlučili smo provesti koimunoprecipitaciju (Tang i Takahashi, 2018.). Međutim, nakon brojnih pokušaja optimizacije te metode nismo uspjeli dobiti ujednačene rezultate. Vjerojatni razlog tome je izrazito dinamična priroda FA, ali i to da je konformacija štapićastih domena proteina talina regulirana mehaničkim podražajima stanice. Određena konformacija talina nužna je za stvaranje veze s proteinom KANK (Li i sur., 2023.) i moguće je da ju u uvjetima pokusa koimunoprecipitacije nije bilo moguće održati. Stoga smo odlučiti koristiti metodu izolacije IAC-a kojom smo prethodno odredili sastav adhesoma stanica (Paradžik i sur., 2020.). Primjenom ove metode dolazi do umrežavanja proteina koji su u bliskoj interakciji, te smo stoga pretpostavili da, ako talin 2 i KANK2 interagiraju, utišavanjem talina 2 doći će do smanjenja količine proteina KANK2 u izolatima IAC-a. Izolacija IAC-a nakon utišavanja pojedinog talina pokazala je da utišavanjem talina 1 dolazi do smanjenja količine svih sastavnica FA te proteina KANK2, što je očekivano s obzirom na ključnu ulogu talina 1 u tvorbi FA. Utišavanjem talina 2 potvrdili smo da ne dolazi do promjene u količini integrina $\beta 5$ koji stvara FA, ali je došlo do značajnog smanjenja količine proteina KANK2 što je bio prvi dokaz funkcionalne interakcije proteina talina 2 i KANK2. Iako dolazi do smanjenja količine proteina KANK2, utišavanje talina 2 ne utječe na njegovu lokalizaciju niti na količinu i lokalizaciju druge sastavnice CMSC-a, liprina $\beta 1$. S druge strane, utišavanje proteina KANK2 dovelo je do skoro potpunog gubitka liprina $\beta 1$ u stanicama MDA-MB-435S. Prethodno je bilo potvrđeno da pravilna tvorba CMSC-a prvenstveno ovisi o vezi proteina KANK s liprinom $\alpha 1$ i $\beta 1$ (Astro i sur., 2014; van der Vaart i sur., 2013.; Lansbergen i sur., 2006.). Isto tako, Bouchet i sur. (2016.) pokazali su da tvorba CMSC-a u stanicama HeLa ovisi o interakciji proteina KANK1 i liprina $\beta 1$. U našem staničnom modelu utišavanje talina 2 prekida vezu FA $\alpha V\beta 5$ i CMSC-a, ali ne utječe na tvorbu CMSC-a koji se i dalje nalazi u blizini FA. Međutim, drugi rezultati upućuju da se pri tome prekida funkcionalna veza FA s mikrotubulima, što ćemo detaljnije raspraviti u sljedećem poglavlju. Naši rezultati također pokazuju da je KANK2 nužan za stvaranje CMSC-a u stanicama MDA-MB-435S.

Nakon utišavanja talina 2 možemo zamijetiti da stanice sa smanjenom količinom talina 2 imaju smanjenu gustoću mikrotubula na rubu stanice. Prethodno istraživanje pokazalo je da i utišavanjem proteina KANK2 u stanicama MDA-MB-435S dolazi do promjene u izgledu mikrotubula (Paradžik i sur., 2020.). Kako smo pokazali da utišavanjem talina 2 dolazi do smanjenja količine umreženog proteina KANK2

u izoliranim IAC, možemo zaključiti da je prekid interakcije proteina talina 2 i KANK2 odgovoran za promjenu u izgledu mikrotubula. Lansbergen i sur. (2006.) pokazali su da utišavanjem sastavnica CMSC-a, poput proteina CLASP, LL5 β i ELKS dolazi do narušavanja stabilnosti i smanjenja gustoće mikrotubula na rubu stanice. Van der Vaart i sur. (2013.) pokazali su sličan učinak utišavanjem liprina α 1 i β 1 u stanicama HeLa. U istom istraživanju pokazali su da utišavanjem proteina KANK1, ali ne i KANK2, dolazi do prekida njihove interakcije s KIF21A, što uzrokuje kretanje mikrotubula paralelno s rubom stanice. U stanicama MDA-MB-435S, nakon utišavanja proteina KANK2 (Paradžik i sur., 2020.) i integrina α V (slika 21C, odgovarajući video uz sliku 21C koji je priložen u radu Lončarić i sur., 2023.) došlo je do sličnog rasta mikrotubula paralelno s rubom stanice. Bouchet i sur. (2016.) pokazali su da prekidom interakcije talina 1 i KANK1 dolazi do narušavanja organizacije CMSC-a i posljedične promjene u organizaciji mikrotubula na rubu stanica HeLa. Stanice MDA-MB-435S sa smanjenom količinom talina 2 imaju povećane FA (mjereno signalom vinkulina, talina 1 ili integrina β 5) i više stresnih vlakana. Osim toga, naši rezultati pokazuju da i smanjena količina proteina KANK2 dovodi do blagog povećanja FA (mjereno signalom talina 2). Poznato je da je pravilna dinamika mikrotubula nužna za izmjenu sastavnih proteina FA (Seetharaman i Etienne-Manneville, 2019.). Prekidom veze mikrotubula s FA ne dolazi do pravilne izmjene proteina adhesoma i posljedično vidimo promjene u FA i aktinskom citoskeletu. Više istraživanja pokazalo je da inhibicijom polimerizacije mikrotubula, primjerice izlaganjem stanica nokodazolu, dolazi do aktivacije Rho GTPaza, promjena u kontraktilnosti aktinskog citoskeleta te značajnog povećanja FA i količine stresnih vlakana (Liu i sur., 1998.; Bershadsky i sur., 1996.; Enomoto, 1996.). Rafiq i sur. (2019.) također su pokazali da uslijed prekida veze mikrotubula s FA, primjerice utišavanjem proteina KANK1 ili KANK2, dolazi do oslobađanja GEF-H1 s mikrotubula, aktivacije signalnog puta Rho/ROCK, povećane količine filamenata miozina IIA, povećanja broja stresnih vlakana i posljedičnog povećanja FA.

Potaknuti prethodnim istraživanjima, odlučili smo provjeriti dolazi li prekidom veze proteina talina 2 i KANK2 do aktivacije signalnog puta Rho i povećane količine filamenata miozina IIA. Uistinu, utišavanjem talina 2 u stanicama MDA-MB-435S zamijetili smo da se stvara veći broj filamenata miozina IIA na stresnim vlaknima u odnosu na kontrolne stanice. Gotovo identičnu promjenu u izgledu filamenata miozina IIA su zamijetili i Rafiq i sur. (2019.) nakon utišavanja proteina KANK1 ili izlaganja stanica nokodazolu. Kako bismo detaljnije istražili promjene koje utišavanje talina 2 uzrokuje u adhesomu, odlučili smo vizualizirati i protein koji se veže na aktin, α -aktinin 4. Pokazano je da miozin IIA i α -aktinin 1 igraju važnu ulogu u povezivanju aktinskih vlakana međusobno i sazrijevanju adhezija (Choi i sur., 2008.). Mi smo pokazali da utišavanjem talina 2, osim promjene u veličini FA, dolazi i do povećane količine i promijenjenog izgleda α -aktinina 4. Ovaj protein ima važnu ulogu u povezivanju aktinskih vlakana međusobno i pokretljivosti stanice. U

njegovom odsustvu dolazi do stvaranja velikih aktinskih vlakana sa smanjenom dinamikom te smanjenja učinkovitosti migracije stanica (Kemp i Briehar., 2018.). Zanimljivo, Barai i sur. (2021.) pokazali su međusobnu regulaciju α -aktinina 4 i miozina IIA i IIB. Koristeći stanične linije MDA-MB-231 i HIT1080, ovi autori pokazuju da je lokalizacija α -aktinina 4 na stresnim vlaknima u blizini miozina IIA nužna za održavanje miozina IIA u blizini FA na vodećem rubu stanice i regulaciju njihove dinamike. S druge su strane, Hu i sur. (2019.) pokazali složenu regulaciju aktinsko-miozinskih vlakana putem α -aktinina 4 i tropomiozina. Tropomiozin i α -aktinin 4 se međusobno natječu za vezanje na aktin i pravilan omjer tih dvaju proteina doprinosi optimalnoj količini miozina IIA i staničnoj površinskoj napetosti. Utišavanjem bilo kojeg od spomenuta dva regulatora dolazi do povećanog vezanja miozina IIA na aktin, no utišavanje tropomiozina dovodi do drugačije organizacije aktinskih vlakana i smanjenja FA, dok utišavanje α -aktinina 4 dovodi do gubitka vlakana aktina i povećanja kontraktilnosti stanice. Prema tome zaključujemo da u stanicama MDA-MB-435S prekidom veze talina 2 i KANK2 dolazi do povećanog nakupljanja filamenata miozina IIA, povećanja stresnih vlakana, nakupljanja α -aktinina 4 te povećanja FA, što je vjerojatno uzrokovano oslobađanjem proteina GEF-H1 kao što su opisali Rafiq i sur. (2019.).

Crosstalk aktina i mikrotubula posebno je važan u regulaciji preživljenja i kretanja stanica. Tijekom migracije, mikrotubuli se kreću paralelno sa smjerom FA i tako omogućuju pravilnu migraciju stanice te izmjenu proteina FA na vodećem rubu stanice. Veza mikrotubula i aktina ostvaruje se putem CMSC-a, ali i putem drugih medijatora poput proteina MACF1, CLASP, IQGAP1 i CLIP1 (engl. *CAP-Gly-containing cytoplasmic linker protein of 170 kDa*) (Seetharaman i Etienne-Manneville, 2019.; Noordstra i Akhmanova, 2017.; Bartolini i sur., 2016.). Stoga ne čudi da u stanicama MDA-MB-435S prekidom funkcionalne interakcije talina 2 i KANK2, utišavanjem jednog od tih dvaju proteina, dolazi do narušavanja *crosstalka* aktina i mikrotubula što uzrokuje značajno smanjenje učinkovitosti migracije. Ovisno o analiziranom staničnom modelu istu ulogu mogu imati KANK1 i/ili KANK2. Pokazano je da utišavanje proteina KANK1 u stanicama HeLa (Bouchet i sur., 2016.), kao i utišavanje proteina KANK1 i KANK2 u podocitima miša (Gee i sur., 2015.), dovodi do smanjenja učinkovitosti migracije stanica. Isto tako, utišavanje talina 2 u stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 dovodi do smanjenja učinkovitosti migracije i invazije (Wei i sur., 2019.; Liang i sur., 2018.). Objavljen je, međutim, i potpuno suprotni učinak promjene količine talina 2 na migraciju. Povećana količina talina 2 dovodi do smanjenja učinkovitosti migracije stanica karcinoma bubrega, no u radu nije identificiran mehanizam kojim se to događa (Cai i sur., 2022.). Međutim, u fibroblastima miša KANK2 je lokaliziran u obrubu FA, veže talin i posljedično smanjuje prijenos mehaničkih podražaja na FA, što uzrokuje pojavu nazvanu „*adhesion sliding*“, tj. klizanje adhezija u centralni dio stanice što za posljedicu ima smanjenje učinkovitosti migracije. U ovom staničnom modelu utišavanje proteina

KANK2 dovodi do povećane učinkovitosti migracije, vjerojatno zbog smanjene pojave klizanja adhezija (Sun i sur., 2016.). Možemo zaključiti da, ovisno o staničnom modelu, talin 2 i KANK2 imaju različitu lokalizaciju, vezne partnere i posljedično različitu ulogu u staničnoj migraciji.

Ometanjem tvorbe FA (utišavanjem integrina αV ili talina 1) te prekidom veze FA s CMSC-om (utišavanjem talina 2 ili KANK2) dolazi do promjene u izgledu mikrotubula i povećanja osjetljivosti stanica MDA-MB-435S na protutumorski lijek PTX. PTX vezanjem na β -tubulin iz mikrotubula onemogućava njihovu depolimerizaciju, a time i diobu stanica (Dumontet i Jordan, 2010.). Pretpostavili smo da je uočena povećana osjetljivost stanica MDA-MB-435S na PTX upravo posljedica promjene u dinamici mikrotubula. Mikroskopija živih stanica s fluorescentno obilježenih proteinom EB3, koji se nalazi na rastućem vrhu mikrotubula (Mustyatsa i sur., 2017.), potvrdila je da utišavanjem proteina integrina αV , integrina $\beta 5$, talina 1, talina 2 ili KANK2 dovodi do značajnog povećanja brzine rasta mikrotubula, ukazujući na promjene u dinamici mikrotubula. Utišavanjem proteina KANK1 nismo uočili promjenu u osjetljivosti stanica na PTX, niti je količina proteina KANK1 smanjena raspadom FA uzrokovanog utišavanjem integrina αV ili talina 1. Stoga smo stanice s utišanim proteinom KANK1 koristili kao kontrolu za pokuse brzine rasta mikrotubula. Pokazali smo da utišavanjem proteina KANK1 ne dolazi do promjene u brzini rasta mikrotubula. Kako bismo dodatno povezali primijećene promjene s osjetljivošću stanica 435S-EB3 i $3\alpha V$ -EB3 na PTX, izložili smo ih djelovanju ekvimolarnih i ekvitoksičnih koncentracija PTX-a i zamijetili da dodatkom PTX dolazi do smanjene brzine rasta mikrotubula svih tretiranih stanica u usporedbi s netretiranim stanicama. S obzirom na to da PTX vezanjem na mikrotubule dovodi do njihove stabilizacije, odnosno do smanjenja njihove dinamike (Pasquier i sur., 2005.), u stanicama $3\alpha V$ -EB3 u kojima je brzina rasta mikrotubula povećana dolazi do izraženijeg učinka PTX u odnosu na kontrolne stanice 435S-EB3, čime $3\alpha V$ -EB3 postaju osjetljivije na PTX. Treba naglasiti da smo u pokusima mikroskopije živih stanica koristili fluorescentno obilježeni EB3 koji se nalazi na rastućem vrhu mikrotubula te smo vidjeli što se događa s polimerizacijom, odnosno brzinom rasta mikrotubula. No, EB3 ne može dati uvid u proces depolimerizacije, odnosno raspada mikrotubula. Iako u našem istraživanju to nije bilo potrebno, bilo bi zanimljivo, koristeći biljege depolimerizacije mikrotubula, primjerice proteine iz obitelji kinezina 13 (Wordeman, 2005.), dobiti uvid u cijeli proces dinamike mikrotubula uslijed utišavanja proteina FA i CMSC-a.

U ovom radu predstavili smo novu potencijalnu metu u liječenju tumora, protein talin 2. Njegovim utišavanjem smanjuje se učinkovitost migracije stanica MDA-MB-435S i povećava njihova osjetljivost na PTX. Prethodna istraživanja pokazala su važnu ulogu talina, posebice talina 2, u tvorbi invadopodija i metastaziranju i invaziji stanica tumora (Qi i sur., 2016.; Beaty i sur., 2014.; Praekelt i sur., 2012.). Baster i

sur. (2020.) su u stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazali da su talin 2 i integrin $\beta 1$ lokalizirani u invadopodijima čime omogućuju vezanje stanice na ECM i posljedično oslobađanje vezikula MMP-a iz stanice. Povećano lučenje MMP2 i MMP9 uzrokuje povećanu invaziju tumorskih stanica, a utišavanjem talina 2 dolazi do ometanja ovog mehanizma i smanjene učinkovitosti migracije i invazije stanica. Li i sur. (2017.) pokazali su značajno povećanu količinu talina 2 u uzorcima karcinoma dojke u odnosu na zdrava tkiva, te su koristeći stanice MDA-MB-231 pokazali da utišavanjem talina 2 dolazi do smanjene učinkovitosti migracije i proliferacije stanica, povećane količine kaspaza 3 i 9, te, posljedično, do povećane apoptoze stanica. Wei i sur. (2019.) su koristeći isti stanični model pokazali da utišavanjem talina 2 dolazi do promjene u sastavu tumorskog mikrookoliša, tj. do smanjenja količine fosforilirane kinaze B, fosforilirane ribosomalne kinaze S6 i proteina HIF1 α (engl. *hypoxia-inducible factor 1 α*) i, posljedično, do smanjenja učinkovitosti invazije stanica. S druge strane, istraživanje uzoraka dobivenih iz pacijenata oboljelih od karcinoma bubrega pokazuje da smanjena količina talina 2 korelira s kraćim preživljenjem pacijenata. Isto istraživanje pokazuje da povećana količina proteina talina 2 smanjuje rast i metastaziranje stanica karcinoma bubrega inhibicijom signalnog puta Wnt/ β -katenin (Cai i sur., 2022.). Iako su provedena istraživanja uloge oba talina u stanicama raznih tumora (Lončarić i sur., 2023.; Fang i sur., 2016.), većina istraživanja bila je usmjerena je na ulogu jednog od homologa. Obzirom da je talin 1 prisutan u skoro svim stanicama čovjeka (Thul i sur., 2017.), a prethodno je pokazana djelomična kompenzacija talina 2 talinom 1 (Manso i sur., 2017.), u istraživanjima staničnih linija tumora poželjno bi bilo istražiti ulogu oba homologa u regulaciji preživljenja, migracije i odgovora stanica tumora na terapiju. Osim u spomenutom istraživanju, prema našim saznanjima, uloga talina 2 nije istražena u drugim staničnim linijama melanoma ili uzorcima pacijenata. Međutim, pokazano je da su i drugi proteini adhesoma potencijalne mete u ciljanoj terapiji ili dijagnostici melanoma. Primjerice α -aktinin 4 je povećano eksprimiran u metastatskom melanomu (Hood i sur., 2010.), te njegova povećana količina u stanici potiče mezenhimalni fenotip i invaziju stanica melanoma (Shao i sur., 2014.). Naši rezultati pokazuju povećanu količinu i promijenjenu distribuciju α -aktinina 4 nakon utišavanja talina 2, pri čemu stanice imaju povećanu osjetljivost na PTX i smanjenu učinkovitost migracije. Prethodno je bilo pokazano da smanjena ekspresija filamina A korelira s dužim preživljenjem pacijenata, a utišavanje filamina A značajno je smanjilo proliferaciju, učinkovitost migracije i invazije staničnih linija melanoma (Zhang i sur., 2014.). S druge strane, filamin B ima ulogu tumorskog supresora u melanomima, te su istraživanja *in vivo* pokazala da miševi s genskom delecijom filamina B tvore značajno veće tumore (Bandaru i sur., 2014.). Koroknai i sur. (2016.) pokazali su da je povećani broj kopija gena za plektin pronađen u metastatskim staničnim linijama melanoma. Uvidom u rezultate analize MS adhesoma stanica MDA-MB-435S vidimo veliki broj specifičnih spektara za plektin, što označava

njegovu povećanu količinu u ovim stanicama, a utišavanjem integrina αV dolazi do smanjenja broja spektara za plektin (Paradžik i sur., 2020.). Isto tako, povećana količina mRNA za talin 1 korelira sa agresivnijim stadijem melanoma, međutim razina njegove ekspresije nije povezana s preživljenjem pacijenata (Rezaie i sur., 2023.). U našem istraživanju otkrili smo molekularni mehanizam povećane osjetljivosti stanica MDA-MB-435S na PTX i smanjenja učinkovitosti njihove migracije nakon utišavanja integrina αV , KANK2 ili talina 2 te predlažemo talin 2 kao novu potencijalnu metu u liječenju melanoma. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja na većem broju staničnih linija melanoma kako bi se potvrdilo da je ovo promjena koja se spomenutim postupcima može općenito inducirati u metastatskim melanomima, a koja bi onda mogla dovesti do povećanja osjetljivosti melanoma na PTX te smanjenje njegovog metastatskog potencijala.

Utišavanjem talina 2 dolazi do promjene u izgledu i brzini rasta mikrotubula, povećanju veličine FA i količine stresnih vlakana te smanjenju učinkovitosti migracije i povećanju osjetljivosti na PTX. Na temelju svih naših rezultata možemo zaključiti da uloga talina u stanicama MDA-MB-435S nije redundantna, jer kao što talin 2 ne može nadomjestiti ulogu talina 1 u tvorbi FA, isto tako talin 1 ne može nadomjestiti ulogu talina 2 i ostvariti funkcionalnu interakciju s CMSC-om. Iako su talin 1 i talin 2 strukturno gotovo identični, aminokiselinski sljedovi ova dva homologa razlikuje se za više od 20 % (Gough i Goult, 2018.). Moguće je da su razlike u aminokiselinama u domenama talina odgovorne za različite uloge dvaju talina u stanicama MDA-MB-435S. Li i sur. (2023.) su u svom istraživanju pretpostavili da su FA građene od dvije „populacije“ talina i to središnjeg talina koji primarno ostvaruje interakciju s aktinom i vinkulinom te talina koji se nalazi na rubu pojedine FA i ostvaruje interakciju s proteinima KANK. S obzirom na to da je talin 1 nužan za tvorbu FA, možemo pretpostaviti da on započinje stvaranje FA aktivacijom integrina $\beta 5$ što dovodi do vezanja ostalih sastavnica FA, dok se talin 2 veže kasnije tijekom zrenja FA, preferencijalno na integrine na krajevima FA. Upravo bi ovakva lokalizacija talina 1 i 2 u FA stanica MDA-MB-435S mogla objasniti zašto samo talin 2 interagira s proteinom KANK2 koji je lokaliziran u obrubu FA (Yu i sur., 2019.; Bouchet i sur., 2016.; Sun i sur., 2016.). Osim toga, pokazano je da je CDK1 regulator adhezija tijekom staničnog ciklusa, a ostvaruje interakciju s talinom 1. CDK1 fosforilira domene R7 i R8 talina 1 što dovodi do smanjenog vezanja proteina KANK na njih. Moguće je da i u našem modelu CDK1 primarno fosforilira upravo talin 1, što uzrokuje smanjeno vezanje proteina KANK. Li i sur. (2023.) su u svom istraživanju pokazali da je lokalizacija KANK1 u obrubu FA regulirana kontrakcijom aktinsko-miozinskih vlakana. Smanjenje kontraktinosti uslijed izlaganja stanica inhibitoru kinaze ROCK uzrokuje smanjeno vezanje aktina i miozina u području FA te premještanje proteina KANK iz obruba u središte FA, tj. njegovo vezanje na domenu R7 talina u središnjem

dijelu FA. U našem sustavu dolazi do povećane veličine FA mjerenih signalom talina 1 ili vinkulina nakon utišavanja talina 2 i prekida veze FA s proteinom KANK2. Ako pretpostavimo da u stanicama MDA-MB-435S talin 1 primarno veže aktin i vinkulin, dok talin 2 primarno veže KANK2, moguće je da uslijed gubitka talina 2 i prekida veze FA s CMSC-om dolazi do olakšanog vezanja vinkulina i aktina na preostali talin 1, što vidimo kao povećanje veličine FA i količine stresnih vlakana.

Zaključno, u prethodno diskutiranom prvom dijelu doktorskog rada pokazali smo različite lokalizacije proteina KANK1 i KANK2 i različite uloge talina 1 i talina 2 u stanicama MDA-MB-435S. Pokazali smo da talin 2 i KANK2 ostvaruju funkcionalnu interakciju i predstavljaju poveznicu aktina iz FA i CMSC-a. Prekidom ove veze dolazi do povećane brzine rasta mikrotubula što uzrokuje povećanu osjetljivost stanica na PTX i smanjenu učinkovitost migracije. Većina prikazanih rezultata iz ovog dijela doktorskog rada objavljena je nedavno u radu Lončarić i sur. (2023.). Dodatno smo u stanicama s utišanim talinom 2 proveli pokuse koristeći super-rezolucijsku fluorescencijsku mikroskopiju koji su potvrdili rezultate prikazane u radu.

Paradžik i sur. (2020.) zamijetili su da stanice MDA-MB-435S tvore dvije vrste adhezija s integrinom $\alpha V\beta 5$: FA u kojima je integrin $\alpha V\beta 5$ kolokaliziran s vinkulinom i F-aktinom te RA $\alpha V\beta 5$ u kojima nisu lokalizirani vinkulin i F-aktin. U drugom dijelu ovog doktorskog rada analizirali smo sastav integrin RA $\alpha V\beta 5$ u stanicama melanoma MDA-MB-435S koristeći prethodno opisanu metodu izolacije IAC-a (Lock i sur., 2018.; Jones i sur., 2015.). Metoda podrazumijeva izlaganje stanica DTBP-u, čime dobivamo uzorke obogaćene proteinima staničnih adhezija. U našem staničnom modelu, ovi uzorci su bili posebno obogaćeni proteinima FA. Prilikom izolacije RA stanice smo prethodno izlagali djelovanju cyto D, čime smo inhibirali polimerizaciju aktina, što je dovelo do raspada FA, a u stanici su ostale prisutne samo RA čija je tvorba neovisna o aktinu. Pregledni rad Lock i sur. (2019.) sažima prethodno provedena istraživanja sastava RA (Baschieri i sur., 2018.; Lock i sur., 2018.; Zuidema i sur., 2018.; Leyton-Puig i sur., 2017.) i prikazuje glavne sastavnice retikularnog adhesoma. Proteini koji su pronađeni u sva četiri istraživanja su integrin $\alpha V\beta 5$, AP2 i klatrin. U tri istraživanja pronađen je adaptorni protein Numb, a u dva od četiri istraživanja pronađeni su proteini Dab2, ITSN1, EGF/EGFR, EPS15, EPS15L1 i N-WASP. Lock i sur. (2018.) jedini su pokazali prisustvo proteina konsenzualnog adhesoma, talina 2 i tenzina 3, u RA. Naši rezultati potvrđuju prisustvo prethodno navedenih sastavnica RA u uzorcima izoliranih RA. MS-om i statističkom analizom smo potvrdili da RA stanica MDA-MB-435S sadrže proteine uključene u endocitozu posredovanu klatrinom, primjerice CLTC, AP2 (potvrđeno podjedinicama AP2A1, AP2B1, AP2A2), ITSN2, EPS15L1 te protein konsenzualnog adhesoma talin 2. Na temelju rezultata programa Scaffold možemo pretpostaviti da su

dodatne sastavnice RA, čija količina nije bila statistički značajna, dinamamin 2, ITSN1, Dab2 i tenzin 3. Potvrdom rezultata metodom SDS-PAGE i WB smo dokazali da RA sadrže i Numb. Zuidema i sur. (2022.) su metodom MS i koimunoprecipitacije pokazali nove interakcijske partnere integrina $\beta 5$ u RA, uključujući Rho GEF proteine p115Rho-GEF i GEF-H1 (ARHGEF2) te serinsku kinazu MARK2. Mi, međutim, u našim uzorcima RA nismo identificirali niti jedan od spomenutih proteina. S obzirom na ograničenja metode MS, moguće je da su i ovi proteini dio retikularnog adhesoma stanica MDA-MB-435S, ali ih nismo uspjeli detektirati.

Uvidom u broj spektara dobivenih analizom uzoraka proteina MS-om, zamijetili smo blago, ali statistički neznačajno povećanje broja spektara za KANK2 u uzorku Cyto D (RA) u odnosu na kontrolni uzorak (DTBP), što upućuje na povećanu količinu KANK2 u uzorcima RA. Validacijom uzoraka metodama SDS-PAGE i WB, pokazali smo da je došlo do značajnog povećanja količine proteina KANK2 u uzorcima RA u odnosu na kontrolne uzorke. Vizualizacijom stanica izloženih cyto D potvrdili smo lokalizaciju KANK2 u RA što je prvi takav podatak u literaturi. Osim KANK2, u uzorcima RA nije došlo do obogaćenja niti jednog drugog proteina CMSC-a, međutim broj spektara za liprin $\alpha 1$, liprin $\beta 1$ i MACF1 ostaje približno jednak u kontrolnom uzorku DTBP (30/0/4/0; 53/7/22/2; 113/7/24/4) i uzorku Cyto D (26/0/11/0; 44/0/27/5; 96/5/34/0). Na temelju toga možemo pretpostaviti da CMSC ostaje prisutan u stanici unatoč raspadu FA te potencijalno ostvaruje interakciju i s proteinima RA. S obzirom na to da u stanicama MDA-MB-435S talin 2 i KANK2 ostvaruju interakciju i čine vezu FA i CMSC-a, moguće je da je njihova interakcija održana i u RA. Kako bismo provjerili ovu hipotezu, prvo smo vizualizirali KANK2 nakon utišavanja talina 2 u RA i obrnuto. Uočili smo da utišavanjem talina 2 dolazi do blagog smanjenja signala proteina KANK2, međutim dio signala je i dalje bio prisutan u prstenastim strukturama koje odgovaraju RA. S druge strane, utišavanje proteina KANK2 nije utjecalo na lokalizaciju i količinu talina 2 u RA. Slične rezultate dobili smo i promatrajući njihov odnos u FA, gdje utišavanje talina 2 nije utjecalo na lokalizaciju KANK2, i obrnuto, utišavanje proteina KANK2 nije utjecalo na prisustvo talina 2 u FA, već je štoviše dovelo do blagog pojačanja fluorescentnog signala talina 2 u FA.

Obzirom da metodom IF nismo mogli odrediti ostvaruju li talin 2 i KANK2 interakciju i u RA, odlučili smo ponovno koristiti metodu izolacije i analize RA, ali nakon utišavanja proteina talina 2 ili KANK2. Ovaj pokus nam je dao uvid u međusobnu regulaciju talina 2 i KANK2 u RA, ali i njihov utjecaj na ostale sastavnice retikularnog adhesoma. Rezultati MS i potvrda rezultata metodom SDS-PAGE i WB pokazuju da utišavanjem talina 2 dolazi do značajnog smanjenja količine proteina KANK2 u RA (otprilike 70 %), dok utišavanjem proteina KANK2 dolazi do smanjenja količine talina 2 za 30 % u odnosu na kontrolni uzorak. Iz

ovih rezultata možemo zaključiti da se talin 2 i KANK2 međusobno reguliraju u RA i vrlo interagiraju. Osim toga, u našim smo eksperimentima zamijetili da utišavanjem talina 2 ili KANK2 dolazi i do značajnog smanjenja količine drugih sastavnica RA, poput proteina AP2, Numb, ITSN2, CLTC i tenzina 3. U uzorku s utišanim talinom 2 došlo je i do smanjenja količine proteina EPS15L1 i DAB2IP. To može biti posljedica ključne uloge jednog od ovih proteina u procesu stvaranja RA nizvodno od integrina $\alpha\beta 5$ ili, kao što je prethodno navedeno, smanjena količina RA može biti odraz međusobne regulacije proteina talina 2 i KANK2 u FA. Zanimljivo, u oba uzorka (si(talin 2) i si(KANK2)) dolazi i do smanjenja količine drugog homologa tenzina, tenzina 2. U prethodnim istraživanjima tenzin 2 nije predstavljen kao sastavnica RA (Lock i sur., 2019.), a uvidom u rezultate MS možemo vidjeti blago obogaćenje tenzina 2 u dvije replike uzoraka RA (15/0/9/0) u odnosu na kontrolne uzorke (6/0/0/0) u stanicama MDA-MB-435S. Iako nismo potvrdili prisustvo tenzina 2, s obzirom na to da se njegova količina mijenja u skladu s drugim sastavnicama RA, možemo pretpostaviti da je i on dio retikularnog adhesoma. Zaključno, talin 2 i KANK2 su dio RA i reguliraju veliki broj sastavnica RA. Treba još jednom naglasiti da iako utišavanje talina 2 ili KANK2 uzrokuje smanjenje količine sastavnica RA, pri tome nije došlo do promjene količine integrina αV ili $\beta 5$, sudeći po rezultatima mjerenja metodom MS ili metodom WB u izolatima RA.

Utišavanje talina 1 dovodi do raspada FA u stanicama MDA-MB-435S. Unatoč tome, u stanicama ostaju prisutne RA, što smo potvrdili vizualizacijom integrina $\beta 5$, talina 2 i KANK2. Potvrdili smo da talin 1, za razliku od talina 2, nije dio RA. Stoga je uzorak RA nakon utišavanja talina 1, u pokusima istraživanja utjecaja utišavanja proteina talina 2 ili KANK2 na RA, korišten kao kontrola. S obzirom na to da talin 1 nije sastavnica RA, očekujemo da njegovo utišavanje neće utjecati na tvorbu RA i količinu proteina RA. Rezultati MS potvrđuju da utišavanjem talina 1 količina većine sastavnica RA ostaje nepromijenjena. Štoviše, potvrda rezultata metodom SDS-PAGE i WB pokazuje da u uzorku s utišanim talinom 1 dolazi do značajnog obogaćenja količine sastavnica RA poput proteina AP2 i Numb. S druge strane, u uzorku dolazi do smanjenja manjeg broja proteina koji su dio RA, poput talina 2, KANK2, tenzina 3 te DAB2IP, no moguće je da su ove promjene odraz utišavanja talina 1 u FA, kada dolazi do potpunog raspada FA i citoskeleta stanice.

Iako su Zuidema i sur. (2022.) pokazali da integrin $\beta 5$ iz RA ostvaruje interakciju s GEF-H1 (ARHGEF2), mi nismo identificirali ovaj protein kao dio retikularnog adhesoma koristeći metodu izolacije RA i analize MS-om u stanicama MDA-MB-435S. Zanimljivo, u drugom dijelu istraživanja, kada izoliramo i analiziramo RA nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2, u svim uzorcima pronalazimo manji broj spektara za GEF-H1. Točnije, na dijagramima vulkano možemo vidjeti da dolazi do njegovog obogaćenja nakon utišavanja talina 2 ili KANK2 u odnosu na kontrolni uzorak (si(-)). S obzirom na to da

utišavanjem talina 2 ili KANK2 dolazi do osiromašenja velikog broja sastavnica RA, a obogaćenja samo proteina GEF-H1, možemo pretpostaviti da on uistinu nije dio RA u našim stanicama. Druga moguća pretpostavka je da je obogaćenje GEF-H1 posljedica osiromašenja talina 2 ili KANK2 u FA. Naime, tijekom 48 sati uzgoja stanice su izložene djelovanju siRNA, a tek dva sata prije izolacije stanice izlažemo djelovanju cyto D. Stoga postoji mogućnost da su neke od promjena koje vidimo posljedica utišavanja proteina u cijeloj stanici, a ne samo u RA. Pokazali smo da utišavanjem talina 2 dolazi do prekida veze FA s mikrotubulima i oslobađanja GEF-H1, koji potiče aktivaciju signalnog puta Rho/ROCK i dovodi do nakupljanja filamenata miozina IIA i povećanja stresnih vlakana i FA. Moguće je da je povećana količina GEF-H1 u uzorku RA nakon utišavanja talina 2 ili KANK2 posljedica oslobođenog GEF-H1 uslijed prekida veze FA s mikrotubulima, međutim to pitanje nismo detaljnije istraživali.

Prethodna istraživanja su potvrdila da aktivacija integrina $\beta 5$ u RA nije posredovana talinom kao što je slučaj u FA. Lock i sur. (2018.) pokazali su da je talin 2 sastavnica RA, ali da ne sudjeluje u aktivaciji integrina $\beta 5$. U stanicama s utišanim talinom 2 oni su zamijetili povećanu količinu RA, slično kao i u uzorku stanica nakon izlaganja cyto D. U stanicama MDA-MB-435S talin 2 također ne sudjeluje u aktivaciji integrina $\beta 5$ i tvorbi FA, ali ga primarno možemo vidjeti u FA $\alpha V\beta 5$, koje se nalaze na rubu i u sredini stanice, dok manji broj signala potencijalno odgovara RA. Njegovim utišavanjem zamjećujemo samo povećanu veličinu FA, no ne i promjene u RA. Tek nakon izlaganja stanica cyto D možemo vidjeti RA obogaćene talinom 2. Utišavanjem talina 2 dolazi do osiromašenja sastavnica RA, ali količina integrina $\beta 5$ u uzorcima ostaje jednaka, što podržava hipotezu da talin 2 nije aktivator integrina u RA. Potencijalni aktivatori integrina $\beta 5$ u RA su proteini Dab2, Numb i ARH za koje je dokazano da ostvaruju interakciju s integrinom $\beta 5$ (Calderwood i sur., 2003.), te im je afinitet vezanja za integrin $\beta 5$ nekoliko puta veći nego afinitet talina 1 (Zuidema i sur., 2022.). Upravo je interakcija spomenutih sastavnica RA s integrinom $\beta 5$ mogući razlog zašto su do sada zamijećene i opisane samo RA posredovane integrinom $\alpha V\beta 5$. Kako bi dodatno objasnili raspodjelu integrina u FA i RA, Zuidema i sur. (2018.) su konstruirali kimerne podjedinice integrina koje su građene od izvanstanične domene (ex) integrina $\beta 5$ i citoplazmatskih domena (in) integrina $\beta 3$ i $\beta 1$. Ovakvi kimerni integrini, zbog svoje izvanstanične domene, primarno vežu vitronektin, jednako kao i integrin $\alpha V\beta 5$ u FA i RA. U tom je radu pokazano da su integrini $\beta 5^{ex}/\beta 1^{in}$ i $\beta 5^{ex}/\beta 3^{in}$ preferencijalno lokalizirani u FA, za razliku od integrina $\beta 5$ kojeg su pronašli i u FA i u RA. Time je pokazano da je citoplazmatska domena integrina $\beta 5$ odgovorna za njegovu lokalizaciju u RA, moguće zbog velikog afiniteta vezanja ostalih sastavnica RA za integrin $\beta 5$. Isto tako, Baschieri i sur. (2018.) pokazali su da isključivo utišavanje $\beta 5$, ali ne i integrina $\beta 1$ i $\beta 3$, dovodi do smanjenja broja RA. Međutim, Zuidema i sur. (2018.) pokazali su da i integrini $\beta 5^{ex}/\beta 1^{in}$ i $\beta 5^{ex}/\beta 3^{in}$ mogu tvoriti RA u uvjetima male stanične površinske napetosti. Pokazano je da u

ovakvim uvjetima proteini Numb i Dab2 ostvaruju interakciju s integrinom $\beta 3$ i omogućuju vezanje klatrina na površini stanice (Yu i sur., 2015.). Isto tako, Elkhatib i sur. (2017.) pokazuju prisustvo integrina $\alpha 2\beta 1$ u području klatrinskih rešetki tijekom uzgoja stanica na mekanom 3D matriksu, tj. u uvjetima male stanične površinske napetosti. S druge strane, tijekom uzgoja stanica na tvrdim površinama poput plastike i stakla jedino je integrin $\beta 5$ lokaliziran u RA. Baschieri i sur. (2018.) naglašavaju da su stabilne RA prisutne tijekom uzgoja stanica na staklu u uvjetima velike stanične površinske napetosti, dok su malobrojne i kratkoživuće RA zamijetili prilikom uzgoja stanica na mekanoj podlozi u uvjetima male stanične površinske napetosti. Dosadašnja istraživanja sastava RA su provedena na stanicama uzgajanim na plastičnim podlogama (ovaj rad; Lock i sur., 2018.; Baschieri i sur., 2018.; Leyton-Puig i sur., 2017.), što je mogući razlog zašto su zamijećene RA posredovane integrinom $\alpha V\beta 5$.

Kako RA nastaju kao posljedica zaustavljene endocitoze integrina vezanih na velike sastavnice ECM-a, glavne sastavnice retikularnog adhesoma predstavljaju proteini uključeni u endocitozu posredovanu klatrinom (Baschieri i sur., 2018.; Leyton-Puig i sur., 2017.). Integrin $\alpha V\beta 5$ veže vitronektin u svojoj okolini i pokušaj internalizacije povezanih integrina i vitronektina u stanicu rezultira zaustavljenom endocitozom i tvorbom RA. Iako su dosad opisane samo RA $\alpha V\beta 5$, neka istraživanja upućuju da i integrini $\alpha 2\beta 1$ (Elkhatib i sur., 2017.) i $\alpha 6\beta 4$ (Wang i sur., 2019.) mogu tvoriti prstenaste strukture nalik RA. S obzirom na to da svi integrini vežu velike proteine ECM-a, poput kolagena, laminina, vitronektina, fibronektina i drugih, u teoriji bi moglo doći do zaustavljanja endocitoze bilo kojeg integrinskog receptora. No, prethodno je razjašnjeno da tvorba RA ovisi o nekoliko faktora, primjerice o staničnoj površinskoj napetosti i afinitetu vezanja ostalih sastavnica RA na integrinsku podjedinicu. Možemo pretpostaviti da RA nisu isključivo posljedica zaustavljene endocitoze, već su u njihovu tvorbu i regulaciju uključeni i drugi faktori. Trebalo bi provesti dodatna istraživanja sastava i vizualizacije adhezija stanica koje ne ekspimiraju integrin $\alpha V\beta 5$ na svojoj površini te istraživanja stanica uzgojenih na prethodno obloženim podlogama s različitim proteinima ECM-a. Na ovaj način bi se mogli razjasniti uvjeti u kojima dolazi do tvorbe RA, kao i istražiti njihov sastav.

Proces mitoze adherentnih stanica istražuje se već dugi niz godina. Stanice ulaskom u mitozu reorganiziraju citoskelet, mijenjaju svoj oblik i postaju zaokružene te gube većinu adhezija s ECM-om, primjerice FA (Ramkumar i Baum, 2016.; Dao i sur., 2009.; Maddox i Burr ridge, 2003.). Unatoč promjenama u organizaciji aktinskog citoskeleta i gubitku FA, stanice ostaju vezane na ECM i susjedne stanice, što je nužno za pravilnu citokinezu i kasniju adheziju stanica kćeri (Thullberg i sur., 2007.; Reverte i sur., 2006.; Aszodi i sur., 2003.). Istraživanja pokazuju da tijekom mitoze veze između stanica ostaju prisutne, poput

dezmosoma i čvrstih veza (Baker i Garrod, 1993.), međutim nije istražena priroda preostalih adhezija stanica sa ECM-om. Lock i sur. (2018.) su prvi pokazali da RA, za razliku od FA, ostaju prisutne u stanici tijekom diobe te omogućuju pravilnu mitozu i citokinezu. Pokazali su da RA i retrakcijska vlakna pravilno ocrtavaju područje adhezije stanice majke i posreduju prijenos informacije na stanice kćeri, što njima omogućuje pravilnu adheziju. Utišavanjem integrina $\beta 5$ dolazi do zakašnjele mitoze, učestalo s neuspješnom citokinezom, te je zamijećena smanjena proliferacija stanica koje koriste integrin $\alpha V\beta 5$ za stvaranje FA i/ili RA, upućujući time na ključnu ulogu $\alpha V\beta 5$ adhezija u diobi stanice (Zuidema i sur., 2022.; Lock i sur., 2018.). Iako u stanicama MDA-MB-435S nismo provjerili utjecaj utišavanja integrina $\beta 5$ na proliferaciju, u radu Paradžik i sur. (2020.) primjećen je povećan postotak stanica s većim brojem jezgara u klonu 3 αV u odnosu na kontrolne MDA-MB-435S stanice. Povećan broj jezgri u stanici upućuje na nepravilnu diobu i citokinezu u stanicama s manje adhezija $\alpha V\beta 5$ (Paradžik i sur., 2020.).

Osim uloge u adheziji stanica tijekom mitoze, pokazano je da RA imaju i signalnu ulogu u stanici. Pokazana je međusobna regulacija integrina $\beta 5$ i EGFR-a (Alfonzo-Méndez i sur., 2022.). Aktivacija EGFR uzrokuje vezanje adaptornog proteina Grb2, aktivaciju kinaze Src, fosforilaciju integrina $\beta 5$ i povećanu tvorbu RA. Osim toga, Leyton-Puig i sur. (2017.) su pokazali da su RA mjesta prijenosa signala transmembranskog receptora LPAR1 (engl. *lipid lysophosphatidic acid receptor 1*), koji je lokaliziran u području RA kada nije aktivan, dok aktivacijom s LPA dolazi do njegove internalizacije. Isto tako, pokazali su da utišavanjem N-WASP dolazi do značajnog gubitka RA u stanicama. Zanimljivo je da smanjenjem količine N-WASP i gubitkom RA dolazi do značajne aktivacije signalnog puta potaknutog s LPAR1, što ukazuje na to da lokalizacija LPAR1 u području RA, ali ne i njegova internalizacija, potiče aktivaciju nizvodnih signalnih puteva. Cresens i sur. (2023.) pokazali su povećanu količinu RA u staničnim linijama metastatskog karcinoma debelog crijeva (KM12SM, KM12L4a) u usporedbi s manje agresivnim staničnim linijama karcinoma debelog crijeva (KM12) i zaključili da su ove strukture uključene u progresiju i metastaziranje tumora. U rezultatima izolacije FA i RA stanica MDA-MB-435S nismo detektirali spomenute receptore poput EGFR i LPAR1. Isto tako, nismo proučavali interakciju RA s drugim receptorima na staničnoj površini i nije nam poznato sudjeluju li RA i u ovim stanicama u aktivaciji određenih signalnih puteva.

U stanicama koje tvore FA i RA zamijećeno je da je raspodjela integrina između FA i RA uvjetovana s nekoliko faktora. U stanicama MDA-MB-435S vidimo da ne dolazi do promjene u količini integrina $\beta 5$ nakon izlaganja stanica cyto D u odnosu na kontrolne stanice. Ti rezultati upućuju na zaključak da raspadom FA dolazi do prelaska integrina $\beta 5$ u RA. Literaturni podaci pokazuju da promjene u površinskoj napetosti stanice dovode do različite raspodjele integrina $\beta 5$ između FA i RA. U stanju povećane stanične površinske

napetosti integrin $\beta 5$ preferencijalno tvori FA, dok u stanju smanjene aktinsko-miozinske kontraktilnosti integrin $\beta 5$ prelazi iz FA u RA (Zuidema i sur., 2022.). Pokazali smo da u stanicama MDA-MB-435S dolazi do smanjene aktinsko-miozinske kontraktilnosti utišavanjem talina 1, raspadom FA i posljedično narušavanja integriteta citoskeleta. U ovim uvjetima smo zamijetili prisustvo RA, što smo potvrdili i rezultatima WB uzoraka RA nakon utišavanja talina 1, kada dolazi do obogaćenja sastavnica retikularnog adhesoma. Povećanu aktinsko-miozinsku kontraktilnost u stanicama MDA-MB-435S uzrokovali smo utišavanjem talina 2. Tada dolazi do povećane količine miozina IIA, stresnih vlakana i veličine FA. U uzorcima izoliranih IAC-a nakon utišavanja talina 2 nismo zamijetili promjenu u količini integrina $\beta 5$ u adhezijama, ali je došlo do povećanja FA, što upućuje na to da je došlo do preraspodjele integrina $\beta 5$ iz RA u FA. Isto tako, Zuidema i sur. (2022.) su pokazali da poremećaj polimerizacije mikrotubula dovodi do povećane kontraktilnosti i prelaska integrina $\beta 5$ iz RA u FA. U stanicama MDA-MB-435S utišavanjem proteina KANK2 dolazi do promjene u organizaciji i brzini rasta mikrotubula, te do povećane veličine FA mjereno signalom talina 2, što upućuje na promjenu u kontraktilnosti stanice koja rezultira potencijalnim prelaskom integrina $\beta 5$ iz RA u FA, što vidimo kao povećanje veličine FA.

Utišavanjem sastavnica RA, poput proteina AP2 (Hakanpää i sur., 2023.), ARH, Numb i EPS15/EPS15L1 (Zuidema i sur., 2018.) dolazi do značajnog smanjenja broja RA. U stanicama MDA-MB-435S, utišavanjem talina 2 ili KANK2 dolazi do promjene u količini proteina RA, međutim količina integrina $\beta 5$ u RA ostaje jednaka. Rezultati upućuju na to da utišavanje talina 2 ili KANK2 nije dovoljno da u potpunosti spriječi tvorbu RA, ali može potencijalno utjecati na njihov sastav. S druge strane, moguće je da je posljedica promjene u RA odraz utjecaja utišavanja talina 2 ili KANK2 u FA. S obzirom na to da u prvom dijelu ovog doktorskog rada pokazujemo da utišavanjem talina 2 ili KANK2 dolazi do povećane aktinsko-miozinske kontraktilnosti, tj. stanične površinske napetosti, moguće je da je ometena tvorba RA posljedica promjena u FA i citoskeletu stanice.

Zuidema i sur. (2022.) naglašavaju važnu ulogu mikrotubula u regulaciji RA. Oni pokazuju da integrin $\beta 5$ iz RA ostvaruje interakciju s regulatorima i veznim partnerima mikrotubula uključujući p115Rho-GEF i GEF-H1 (ARHGEF2) te serinsku kinazu MARK2. Ti su autori pokazali da inhibicijom polimerizacije mikrotubula dolazi do oslobađanja proteina GEF-H1, povećane kontraktilnosti stanica i značajnog prelaska integrina $\alpha V\beta 5$ iz RA u FA. Također su pokazali da utišavanjem MARK2 dolazi do nakupljanja integrina $\alpha V\beta 5$ u FA. U našim uzorcima RA nismo pronašli spomenute proteine, ali smo pokazali da proteini CMSC-a (liprin $\alpha 1$, $\beta 1$ i MACF1) ostaju prisutni u stanici uslijed izlaganja stanica cyto D, te smo po prvi puta pokazali da je KANK2 sastavnica RA. Osim toga, pokazali smo da KANK2 utječe na

sastav i količinu proteina RA. Na temelju tih rezultata možemo pretpostaviti da je regulacija i tvorba RA posredovana mikrotubulima i proteinima uključenim u regulaciju mikrotubula. Dodatna istraživanja naše grupe u drugim staničnim linijama pokazuju da mikrotubuli ostaju sačuvani nakon izlaganja stanica cyto D (neobjavljeni rezultati). U budućnosti će biti potrebno vizualizirati mikrotubule nakon razgradnje aktinskog citoskeleta izlaganjem stanica cyto D i/ili nakon utišavanja proteina KANK2 u stanicama MDA-MB-435S, kako bi razjasnili tvore li RA vezu s mikrotubulima putem CMSC-a, poput FA.

Većina istraživanja uloge IAC-a, posebice FA, u adheziji i migraciji stanica dosad je provedena *in vitro*, koristeći adherentne stanične linije uzgojene na 2D podlogama. Međutim, FA su zamijećene i u 3D uvjetima uzgoja (Doyle i sur., 2015.), ali i u sustavima *in vivo* (Green i Brown, 2019.), gdje su manjih dimenzija te im je životni vijek značajno kraći. Novija istraživanja ukazuju da, iako migracija stanica u 2D sustavima ovisi o IAC-ima, stanice mogu migrirati *in vivo* izmjenjujući adhezije koje su posredovane integrinima te adhezije neovisne o integrinima, što ukazuje da uloga FA u 2D i 3D sustavima nije u potpunosti jednaka (Yamaguchi i Knaut, 2022.). Dosad su sva istraživanja RA provedena *in vitro*, međutim, ostaju otvorena pitanja o ulozi i tvorbi RA *in vivo* (Cresens i sur, 2023.; Lock i sur., 2019.). Prethodna istraživanja upućuju na postojanje RA i njihovu ulogu *in vivo*. RA, odnosno plakovi bogati klatrinom, zamijećeni su na površini miocita te na mjestima vezanja osteoklasta i kosti (Vassilopoulos i sur., 2014.; Akisaka, 2000.). Isto tako, integrin $\alpha V\beta 5$ zamijećen je u RA na apikalnoj strani stanica retine, gdje ima ulogu u fagocitozi fotoreceptora (Nandrot i sur., 2004.). Vjerojatno je da je uloga RA *in vivo* specifična ovisno o vrsti stanica i tkiva.

U ovom doktorskom radu detaljno smo istražili FA i RA u stanicama MDA-MB-435S za koje je prethodno određen sastav adhesoma (Paradžik i sur., 2020.). Otkrili smo da se glavna poveznica FA $\alpha V\beta 5$ i CMSC-a sastoji u vezi između proteina talina 2 i KANK2. Osim toga, pokazali smo da su talin 2 i KANK2 dio RA $\alpha V\beta 5$ i sudjeluju u regulaciji sastava RA. Upravo je integrin $\alpha V\beta 5$ često istraživana meta u liječenju tumora (Pang i sur., 2023.). Međutim, brojna istraživanja pokazuju da je uloga integrina $\beta 5$ *in vivo* ovisna o ECM-u i okolišu stanice, a genskom delecijom integrina $\beta 5$ u miševima pokazano je da integrini imaju redundantnu ulogu u organizmu. Primjerice, gubitkom integrina $\beta 5$ može doći do povećanja ekspresije integrina $\beta 3$ i obrnuto (Stojanović i sur., 2018.; Lane i sur., 2005.). Daljnja istraživanja uloge i regulacije integrina $\beta 5$ *in vitro* i *in vivo* i bolje razumijevanje mogućnosti drugih integrina da nadomjeste nedostatak ove podjedinice mogu doprinijeti razvoju lijekova koji su usmjereni na integrine u liječenju tumora. U ovom radu identificirali smo talin 2 kao novu potencijalnu metu za povećanje osjetljivosti stanica metastatskog melanoma na PTX. Talin 2 i KANK2 su proteini koji se nalaze nizvodno od integrina te njihovim utišavanjem ne utječemo na tvorbu FA, ali narušavamo dinamiku citoskeleta stanice. Upravo to što utišavanje ovih

proteina povećava osjetljivost na PTX, ali ne utječu na tvorbu adhezija i staničnu proliferaciju, čini ih pogodnim metama koje će imati veći utjecaj na tumorske stanice, a manje na okolne zdrave stanice organizma. Ovim istraživanjem pokazujemo da FA i RA u stanicama MDA-MB-435S imaju zajedničke sastavnice, talin 2 i KANK2, koje se međusobno reguliraju. Prethodno prikupljeni podaci naše istraživačke grupe, zajedno s rezultatima ovog doktorskog rada, stvorili su preduvjete za buduća istraživanja mehanizama i važnosti međusobne regulacije adhezija.

5. ZAKLJUČCI

1. Proteini talin 1, talin 2 i KANK2 dio su fokalnih adhezija posredovanih integrinom $\alpha\beta5$ u stanicama melanoma MDA-MB-435S.
2. Uloga i lokalizacija proteina KANK1 i KANK2 razlikuje se u stanicama MDA-MB-435S. KANK1 lokalizira na rubu stanice, mjestimično u području fokalnih adhezija posredovanih integrinom $\alpha\beta5$, dok KANK2 kolokalizira s proteinima fokalnih adhezija. Raspad fokalnih adhezija utječe na ukupnu količinu i lokalizaciju proteina KANK2, ali ne utječe na količinu i lokalizaciju proteina KANK1. Utišavanje proteina KANK1, za razliku od KANK2, ne utječe na brzinu rasta mikrotubula i ne povećava osjetljivost stanica na protutumorski lijek paklitaksel.
3. Protein talin 1 glavni je aktivator integrina $\beta5$ i nužan je za tvorbu fokalnih adhezija posredovanih integrinom $\alpha\beta5$ u stanicama MDA-MB-435S. Utišavanjem talina 1 dolazi do raspada fokalnih adhezija i citoskeleta stanice što uzrokuje smanjenu proliferaciju stanica.
4. Protein talin 2 ostvaruje interakciju s proteinom KANK2 u stanicama MDA-MB-435S. Njihova interakcija povezuje fokalne adhezije i kortikalni kompleks za stabilizaciju mikrotubula i time dva dijela citoskeleta, aktin i mikrotubule.
5. Uloga homologa proteina KANK1 i KANK2, kao i homologa talina 1 i talin 2 nije redundantna u stanicama MDA-MB-435S. Jedan homolog ne može nadomjestiti nedostatak drugog.
6. Utišavanje proteina talina 2, integrina αV i KANK2, uzrokuje povećanu osjetljivost stanica na paklitaksel i smanjenu učinkovitost migracije. Talin 2 je nova potencijalna meta za kombinirano liječenje melanoma s paklitakselom.
7. Utišavanjem integrina αV , integrina $\beta5$, talina 1, talina 2 i KANK2 dolazi do promjene u dinamici mikrotubula, odnosno bržeg rasta mikrotubula. U stanicama s bržim rastom mikrotubula, stabilizirajuće djelovanje protutumorskog lijeka paklitaksela na mikrotubule je naglašenije i dovodi do pojačane osjetljivosti stanica na paklitaksel.
8. Prekidom veze proteina talina 2 i KANK2 dolazi do nakupljanja filamenata miozina IIA i povećanja količine stresnih vlakana koje je popraćeno s povećanom količinom α -aktinina 4 te u konačnici povećanja fokalnih adhezija. Ovaj učinak je vrlo vjerojatno posljedica oslobađanja proteina GEF-H1 vezanog na rastuće mikrotubule koji se oslobađa nakon raspada mikrotubula, potiče aktivaciju signalnog puta Rho/ROCK što dovodi do povećanja fokalnih adhezija i nakupljanja veće količine stresnih vlakana.

9. Stanice MDA-MB-435S tvore retikularne adhezije posredovane integrom $\alpha V\beta 5$ koje su izgrađene od adaptornih proteina uključenih u endocitozu posredovanu klatrinom i proteina talina 2. Novootkrivena sastavnica retikularnih adhezija u stanicama MDA-MB-435S je KANK2.
10. Talin 2 i KANK2 vjerojatno ostvaruju interakciju u retikularnim adhezijama stanica MDA-MB-435S. Utišavanje svakog od njih pojedinačno smanjuje količinu sastavnica retikularnih adhezija, ali ne i količinu integrina $\alpha V\beta 5$.

6. LITERATURA

Abercrombie, M., Heaysman, J. E., Pegrum, S. M. (1971.) The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* **67**: 359-367. doi: 10.1016/0014-4827(71)90420-4.

AIM: At Melanoma Foundation (2024.), <https://www.aimatmelanoma.org/stages-of-melanoma/>.
Pristupljeno 16.02.2024.

Ajeian, J. N., Horton, E. R., Astudillo, P., Byron, A., Askari, J. A., Millon-Frémillon, A., Knight, D., Kimber, S. J., Humphries, M. J., Humphries, J. D. (2016.) Proteomic analysis of integrin-associated complexes from mesenchymal stem cells. *Proteomics Clin. Appl.* **10**: 51-57. doi: 10.1002/prca.201500033.

Akisaka, T. (2000.) Ultrastructure of clathrin sheets and cytoskeleton of podosomes on the cytoplasmic side of ventral membranes of cultured osteoclasts. *Kaibogaku Zasshi.* **75**:381-386. PMID: 11025947.

Alday-Parejo, B., Stupp, R., Rüegg, C. (2019.) Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-cancer Therapy? *Cancers (Basel).* **11**: 978. doi:10.3390/cancers11070978.

Alfonzo-Méndez, M. A., Sochacki, K. A., Strub, M. P., Taraska, J. W. (2022.) Dual clathrin and integrin signaling systems regulate growth factor receptor activation. *Nat. Commun.* **13**: 905. doi: 10.1038/s41467-022-28373-x.

Allison, S. (2015.) The KANK family in podocyte function. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**: 387. doi: 10.1038/nrneph.2015.84.

Alva, A., Slovin, S., Daignault, S., Carducci, M., DiPaola, R., Pienta, K., Agus, D., Cooney, K., Chen, A., Smith, D. C., Hussain, M. (2012.) Phase II Study of Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in Patients with Non- metastatic Castration Resistant Prostate Cancer, NCI-6735. A Study by the DOD/PCF Prostate Cancer Clinical Trials Consortium. *Invest. New Drugs.* **30**: 749-757. doi:10.1007/s10637-010-9573-5.

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

Anthis, N. J., Campbell, I. D. (2011.) The tail of integrin activation. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 191-198. doi:10.1016/j.tibs.2010.11.002.

Arias-Mejias, S. M., Warda, K. Y., Quattrocchi, E., Alonso-Quinones, H., Sominidi-Damodaran, S., Meves, A. (2020.) The role of integrins in melanoma: a review. *Int. J. Dermatol.* **59**: 525-534. doi: 10.1111/ijd.14850.

Arnold, M., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Vaccarella, S., Meheus, F., Cust, A. E., de Vries, E., Whiteman, D. C., Bray, F. (2022.) Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol.* **158**: 495-503. doi: 10.1001/jamadermatol.2022.0160.

Asano-Matsuda, K., Ibrahim, S., Takano, T., Matsuda, J. (2021.) Role of Rho GTPase Interacting Proteins in Subcellular Compartments of Podocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 3656. doi: 10.3390/ijms22073656.

Astro, V., Tonoli, D., Chiaretti, S., Badanai, S., Sala, K., Zerial, M., de Curtis, I. (2016.) Liprin-alpha1 and ERC1 control cell edge dynamics by promoting focal adhesion turnover. *Sci. Rep.* **6**: 33653. doi: 10.1038/srep33653.

Aszodi, A., Hunziker, E. B., Brakebusch, C., Fässler, R. (2003.) β 1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* **17**: 2465-2479. doi: 10.1101/gad.277003.

Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., Varnier, J. A. (2008.) Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* **8**: 604-617. doi: 10.1038/nrc2353.

Bachmann, M., Kukkurainen, S., Hytönen, V. P., Wehrle-Haller, B. (2019.) Cell Adhesion by Integrins. *Physiol. Rev.* **99**: 1655-1699. doi: 10.1152/physrev.00036.2018.

Baker, J., Garrod, D. (1993.) Epithelial cells retain junctions during mitosis. *J. Cell Sci.* **104**: 415-425. doi: 10.1242/jcs.104.2.415.

Bandaru, S., Zhou, A. X., Rouhi, P., Zhang, Y., Bergo, M. O., Cao, Y., Akyürek, L. M. (2014.) Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis.* **3**: e119. doi: 10.1038/oncsis.2014.33.

Barai, A., Mukherjee, A., Das, A., Saxena, N., Sen, S. (2021.) α -Actinin-4 drives invasiveness by regulating myosin IIB expression and myosin IIA localization. *J. Cell Sci.* **134**: jcs258581. doi: 10.1242/jcs.258581.

Barber-Pérez, N., Georgiadou, M., Guzmán, C., Isomursu, A., Hamidi, H., Ivaska, J. (2020.) Mechano-responsiveness of fibrillar adhesions on stiffness-gradient gels. *J. Cell Sci.* **133**: jcs242909. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.242909>.

Bartolini, F., Andres-Delgado, L., Qu, X., Nik, S., Ramalingam, N., Kremer, L., Alonso, M. A., Gundersen, G. G. (2016.) An mDia1-INT2 formin activation cascade facilitated by IQGAP1 regulates stable microtubules in migrating cells. *Mol. Biol. Cell.* **27**: 1797-1808. doi: 10.1091/mbc.E15-07-0489.

Baschieri, F., Dayot, S., Elkhatib, N., Ly, N., Capmany, A., Schauer, K., Betz, T., Vignjevic, D. M., Poincloux, R., Montagnac, G. (2018.) Frustrated endocytosis controls contractility-independent mechanotransduction at clathrin-coated structures. *Nat. Commun.* **9**: 3825. doi: 10.1038/s41467-018-06367-y.

Baschieri, F., Porshneva, K., Montagnac, G. (2020.) Frustrated clathrin mediated endocytosis – causes and possible functions. *J. Cell Sci.* **133**: jcs240861. doi:10.1242/jcs.240861

Baster, Z., Li, L., Rajfur, Z., Huang, C. (2020.) Talin2 mediates secretion and trafficking of matrix metalloproteinase 9 during invadopodium formation. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **1867**: 118693. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118693.

Beaty, B. T., Wang, Y., Bravo-Cordero, J. J., Sharma, V. P., Miskolci, V., Hodgson, L., Condeelis, J. (2014.) Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. *J. Cell Biol.* **205**: 737-751. doi: 10.1083/jcb.201312046.

Bell-McGuinn, K. M., Matthews, C. M., Ho, S. N., Barve, M., Gilbert, L., Penson, R. T., Lengyel, E., Palaparthi, R., Gilder, K., Vassos, A., McAuliffe, W., Weymer, S., Barton, J., Schilder, R. J. (2011.) A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* **121**: 273-279. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.12.362.

Bergonzini, C., Kroese, K., Zweemer, A. J. M., Danen, E. H. J. (2022.) Targeting Integrins for Cancer Therapy - Disappointments and Opportunities. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**: 863850. doi: 10.3389/fcell.2022.863850.

Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A., Geiger, B. (1996.) Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.* **6**: 1279-1289. doi: 10.1016/S0960-9822(02)70714-8.

Bianchi-Smiraglia, A., Paesante, S., Bakin, A. V. (2013.) Integrin $\beta 5$ contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. *Oncogene.* **32**: 3049-3058. doi:10.1038/onc.2012.320.

Bielas, S. L., Serneo, F. F., Chechlac, M., Deerinck, T. J., Perkins, G. A., Allen, P. B., Ellisman, M. H., Gleeson, J. G. (2007.) Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell*. **129**: 579-591. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.023.

Bouchet, B. P., Gough, R. E., Ammon, Y. C., van de Willige, D., Post, H., Jacquemet, G., Altelaar, A. F. M., Heck, A. J. R., Goult, B. T., Akhmanova, A. (2016.) Talin-KANK1 interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to focal adhesions. *eLife*. **5**: e18124. doi: 10.7554/eLife.18124.

Bruna-Gauchoux, J., Montagnac, G. (2022.) Constraints and frustration in the clathrin-dependent endocytosis pathway. *C. R. Biol*. **345**: 43-56. doi: 10.5802/crbiol.88.

Burnette, D. T., Ji, L., Schaefer, A. W., Medeiros, N. A., Danuser, G., Forscher, P. (2008.) Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Dev. Cell*. **15**: 163-169. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.016.

Burridge, K. (2017.) Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J*. **284**: 3355-3361. doi: 10.1111/febs.14195.

Burridge, K., Connell, L. (1983.) Talin: A cytoskeletal component concentrated in adhesion plaques and other sites of actin-membrane interaction. *Cell Motil*. **3**: 405-417. doi: 10.1002/cm.970030509.

Cai, J., Huang, Z., Zhou, J., Wu, W., Ye, Y. (2022.) TLN2 functions as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma via inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Transl. Androl. Urol*. **11**: 39-52. doi: 10.21037/tau-21-914.

Calderwood, D. A., Fujioka, Y., de Pereda, J. M., García-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C. J., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H. (2003.) Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 2272-2277. doi: 10.1073/pnas.262791999.

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

Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A. M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J., Ballestrem, C. (2013.) Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force- dependent manner. *Curr. Biol*. **23**: 271-281. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.009.

Chastney, M. R., Conway, J. R. W., Ivaska, J. (2021.) Integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.* **31**: R536-R542. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.038.

Chastney, M. R., Lawless, C., Humphries, J. D., Warwood, S., Jones, M. C., Knight D, Jorgensen C, Humphries MJ. (2020.) Topological features of integrin adhesion complexes revealed by multiplexed proximity biotinylation. *J. Cell Biol.* **219**: e202003038. doi: 10.1083/jcb.202003038.

Chen, N.P, Sun, Z., Fässler, R. (2018.) The Kank family proteins in adhesion dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **54**: 130-136. doi: 10.1016/j.ceb.2018.05.015.

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. doi: 10.3892/or.2017.5823.

Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., Horwitz, A. R. (2008.) Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **10**: 1039-1050. doi: 10.1038/ncb1763.

Ciobanasu, C., Faivre, B., Le Clainche, C. (2012.) Actin dynamics associated with focal adhesions. *Int. J. Cell Biol.* **2012**: 941292. doi: 10.1155/2012/941292.

Cooper, G. M. (2000.) *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition., Sinauer Associates, Sunderland.

Cooper, J., Giancotti, F. G. (2019.) Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell.* **35**: 347-367. doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.007.

Cordell, P., Carrington, G., Curd, A., Parker, F., Tomlinson, D., Peckham, M. (2022.) Affimers and nanobodies as molecular probes and their applications in imaging. *J. Cell Sci.* **135**: jcs259168. doi: 10.1242/jcs.259168.

Cresens, C., Solís-Fernández, G., Tiwari, A., Nuyts, R., Hofkens, J., Barderas, R., Rocha, S. (2023.) Flat clathrin lattices are linked to metastatic potential in colorectal cancer. *iScience.* **26**: 107327. doi: 10.1016/j.isci.2023.107327.

Dao, V. T., Dupuy, A. G., Gavet, O., Caron, E., de Gunzburg, J. (2009.) Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *J. Cell Sci.* **122**: 2996-3004. doi:10.1242/jcs.041301.

D'Arcy C, Kiel C. (2021.) Cell Adhesion Molecules in Normal Skin and Melanoma. *Biomolecules*. **11**: 1213. doi: 10.3390/biom11081213.

De Deyne, P.G., O'Neill, A., Resneck, W. G., Dmytrenko, G. M., Pumplin, D. W., Bloch, R. J. (1998.) The vitronectin receptor associates with clathrin- coated membrane domains via the cytoplasmic domain of its beta5 subunit. *J. Cell Sci*. **111**: 2729-2740. doi: 10.1242/jcs.111.18.2729.

Debrand, E., Conti, F. J., Bate, N., Spence, L., Mazzeo, D., Pritchard, C. A., Monkley, S. J., Critchley, D. R. (2012.) Mice carrying a complete deletion of the talin2 coding sequence are viable and fertile. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **426**: 190-195. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.061.

Desgrosellier, J. S., Cheresch, D. A. (2010.) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer*. **10**: 9-22. doi: 10.1038/nrc2748.

Dhanyamraju, P. K., Patel, T. N. (2022.) Melanoma therapeutics: a literature review. *J. Biomed. Res*. **36**: 77-97. doi: 10.7555/JBR.36.20210163.

Dickreuter, E., Cordes, N. (2017.) The cancer cell adhesion resistome: mechanisms, targeting and translational approaches. *Biol. Chem*. **398**: 721-735. doi: 10.1515/hsz-2016-0326.

Ding M., Goncharov A., Jin Y. & Chisholm A. D. (2003.) C. elegans ankyrin repeat protein VAB-19 is a component of epidermal attachment structures and is essential for epidermal morphogenesis. *Development*. **130**: 5791-5801. doi: 10.1242/dev.00791.

Dogterom, M., Koenderink, G. H. (2019.) Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **20**: 38-54. doi: 10.1038/s41580-018-0067-1.

Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P., Pópulo, H. (2018.) Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther*. **7**: 35-49. doi: 10.2147/ITT.S134842.

Dong, J. M., Tay, F. P., Swa, H. L., Gunaratne, J., Leung, T., Burke, B., Manser, E. (2016.) Proximity biotinylation provides insight into the molecular composition of focal adhesions at the nanometer scale. *Sci. Signal*. **9**: rs4. doi: 10.1126/scisignal.aaf3572.

Doyle, A. D., Carvajal, N., Jin, A., Matsumoto, K., Yamada, K. M. (2015.) Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat. Commun*. **6**: 8720. doi: 10.1038/ncomms9720.

Dumontet, C., Jordan, M. A. (2010.) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **9**: 790-803. doi: 10.1038/nrd3253.

Eddy, K., Shah, R., Chen, S. (2021.) Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Front. Oncol.* **10**: 626129. doi: 10.3389/fonc.2020.626129.

Edlund, M., Lotano, M. A., Otey, C. A. (2001.) Dynamics of α -actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with α -actinin-green fluorescent protein. *Cell Motil. Cytoskelet.* **48**: 190-200. doi:10.1002/1097-0169(200103)48:3<190::AID-CM1008>3.0.CO;2-C.

Élez, E., Kocáková, I., Höhler, T., Martens, U. M., Bokemeyer, C., Van Cutsem, E., Melichar, B., Smakal, M., Csósz, T., Topuzov, E., Orlova, R., Tjulandin, S., Rivera, F., Straub, J., Bruns, R., Quarantino, S., Tabernero, J. (2015.) Abituzumab Combined with Cetuximab Plus Irinotecan versus Cetuximab Plus Irinotecan Alone for Patients with KRAS Wild-type Metastatic Colorectal Cancer: the Randomised Phase I/II POSEIDON Trial. *Ann. Oncol.* **26**: 132-140. doi:10.1093/annonc/mdu474.

Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lieuvain, A., Blanchoin, L., Arnal, I. (2015.) Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci. Rep.* **5**: 9964. doi: 10.1038/srep09964.

Elkhatib, N., Bresteau, E., Baschieri, F., Rioja, A. L., van Niel, G., Vassilopoulos, S., Montagnac, G. (2017.) Tubular clathrin/AP-2 lattices pinch collagen fibers to support 3D cell migration. *Science.* **356**: eaal4713. doi: 10.1126/science.aal4713.

Elkhatib, N., Neu, M. B., Zensen, C., Schmoller, K. M., Louvard, D., Bausch, A. R., Betz, T., Vignjevic, D. M. (2014.) Fascin plays a role in stress fiber organization and focal adhesion disassembly. *Curr. Biol.* **24**: 1492-1499. doi: 10.1016/j.cub.2014.05.023.

Enns, A., Korb, T., Schlüter, K., Gassmann, P., Spiegel, H.-U., Senninger, N., Mitjans, F., Haier, J. (2005.) $\alpha\beta 5$ -integrins mediate early steps of metastasis formation. *Eur. J. Cancer.* **41**: 1065-1072. doi:10.1016/j.ejca.2004.12.031.

Enomoto, T. (1996.) Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct. Funct.* **21**: 317-326. doi: 10.1247/csf.21.317.

Fan, H., Tian, H., Cheng, X., Chen, Y., Liang, S., Zhang, Z., Liao, Y., Xu, P. (2020.) Aberrant Kank1 expression regulates YAP to promote apoptosis and inhibit proliferation in OSCC. *J. Cell. Physiol.* **235**: 1850-1865. doi: 10.1002/jcp.29102.

Fang, K. P., Dai, W., Ren, Y. H., Xu, Y. C., Zhang, S. M., Qian, Y. B. (2016.) Both Talin-1 and Talin-2 correlate with malignancy potential of the human hepatocellular carcinoma MHCC-97 L cell. *BMC Cancer.* **16**: 45. doi: 10.1186/s12885-016-2076-9.

Felding-Habermann, B., O'Toole, T. E., Smith, J. W., Fransvea, E., Ruggeri, Z. M., Ginsberg, M. H., Hughes, P. E., Pampori, N., Shattil, S. J., Saven, A., Mueller, B. M. (2001.) Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 1853-1858. doi: 10.1073/pnas.98.4.1853.

Ferrucci, P. F., Pala, L., Conforti, F., Cocorocchio, E. (2021.) Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers (Basel).* **13**: 1383. doi: 10.3390/cancers13061383.

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. doi: 0.1172/JCI79504.

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

Górska, A., Mazur, A. J. (2022.) Integrin-linked kinase (ILK): the known vs. the unknown and perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* **79**: 100. doi: 10.1007/s00018-021-04104-1.

Gough, R. E., Goult, B. T. (2018.) The tale of two talins - two isoforms to fine-tune integrin signalling. *FEBS Lett.* **592**: 2108-2125. doi: 10.1002/1873-3468.13081.

Goult, B. T. (2021.) The Mechanical Basis of Memory - the MeshCODE Theory. *Front. Mol. Neurosci.* **14**: 592951. doi: 10.3389/fnmol.2021.592951.

Goult, B. T., Zacharchenko, T., Bate, N., Tsang, R., Hey, F., Gingras, A. R., Elliott, P. R., Roberts, G. C. K., Ballestrem, C., Critchley, D. R., Barsukov, I. L. (2013.) RIAM and vinculin binding to talin are mutually

exclusive and regulate adhesion assembly and turnover. *J. Biol. Chem.* **288**: 8238-8249. doi: 10.1074/jbc.M112.438119.

Green, H. J., Brown, N. H. (2019.) Integrin intracellular machinery in action. *Exp. Cell Res.* **378**: 226-231. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.011.

Gregory, S. L., Ebrahimi, S., Milverton, J., Jones, W. M., Bejsovec, A., Saint, R. (2008.) Cell division requires a direct link between microtubule-bound RacGAP and Anillin in the contractile ring. *Curr. Biol.* **18**: 25-29. doi: 10.1016/j.cub.2007.11.050.

Griewank, K. G., Scolyer, R. A., Thompson, J. F., Flaherty, K. T., Schadendorf, D., Murali, R. (2014.) Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**: djt435. doi: 10.1093/jnci/djt435.

Gruber, G., Hess, J., Stiefel, C., Aebbersold, D. M., Zimmer, Y., Greiner, R.H., Studer, U., Altermatt, H. J., Hlushchuk, R., Djonov, V. (2005.) Correlation between the tumoral expression of β 3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy. *Br. J. Cancer.* **92**: 41-46. doi: 10.1038/sj.bjc.6602278.

Guo, S. S., Seiwert, A., Szeto, I. Y. Y., Fässler, R. (2021.) Tissue distribution and subcellular localization of the family of Kidney Ankyrin Repeat Domain (KANK) proteins. *Exp. Cell Res.* **398**: 112391. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112391.

Haeger, A., Alexander, S., Vullings, M., Kaiser, F. M. P., Veelken, C., Flucke, U., Koehl, G. E., Hirschberg, M., Flentje, M., Hoffman, R. M., Geissler, E. K., Kissler, S., Friedl, P. (2020.) Collective cancer invasion forms an integrin-dependent radioresistant niche. *J. Exp. Med.* **217**: e20181184. doi:10.1084/jem.20181184.

Hakanpää, L., Abouelezz, A., Lenaerts, A. S., Culfa, S., Algie, M., Bärlund, J., Katajisto, P., McMahon, H., Almeida-Souza, L. (2023.) Reticular adhesions are assembled at flat clathrin lattices and opposed by active integrin α 5 β 1. *J. Cell Biol.* **222**: e202303107. doi: 10.1083/jcb.202303107.

Hamidi, H., Ivaska, J. (2018.) Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* **18**: 533-548. doi: 10.1038/s41568-018-0038-z.

Heidenreich, A., Rawal, S. K., Szkarlat, K., Bogdanova, N., Dirix, L., Stenzl, A., Welslau, M., Wang, G., Dawkins, F., de Boer, C. J., Schrijvers, D. (2013.) A Randomized, Double-Blind, Multicenter, Phase 2 Study of a Human Monoclonal Antibody to Human α v Integrins (Intetumumab) in Combination with

Docetaxel and Prednisone for the First-Line Treatment of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Ann. Oncol.* **24**: 329-336. doi:10.1093/annonc/mds505.

Hess, A. R., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Seftor, E. A., Schneider, G. B., Seftor, R. E., Nickoloff, B. J., Hendrix, M. J. (2005.) Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res.* **65**: 9851-9860. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2172.

Heuser, J. (1980.) Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **84**: 560-583. doi: 10.1083/jcb.84.3.560.

Hida, Y., Ohtsuka, T. (2010.) CAST and ELKS proteins: structural and functional determinants of the presynaptic active zone. *J. Biochem.* **148**: 131-137.

Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P. i sur. (2012.) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* **150**: 251-263. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.024.

Hood, B. L., Grahovac, J., Flint, M. S., Sun, M., Charro, N., Becker, D., Wells, A., Conrads, T. P. (2010.) Proteomic analysis of laser microdissected melanoma cells from skin organ cultures. *J. Proteome Res.* **9**: 3656–3663. doi: 10.1021/pr100164x.

Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Fremillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D., Humphries, M. J. (2015.) Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat. Cell. Biol.* **17**: 1577-1587. doi: 10.1038/ncb3257.

Horton, E. R., Humphries, J. D., James, J., Jones, M. C., Askari, J. A., Humphries, M. J. (2016a.) The integrin adhesome network at a glance. *J. Cell Sci.* **129**: 4159-4163. doi: 10.1242/jcs.192054.

Horton, E. R., Humphries, J. D., Stutchbury, B., Jacquemet, G., Ballestrem, C., Barry, S. T., Humphries, M. J. (2016b.) Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of adhesion complex composition. *J. Cell Biol.* **212**: 349-364. doi: 10.1083/jcb.201508080.

Hosotani, R., Kawaguchi, M., Masui, T., Koshiba, T., Ida, J., Fujimoto, K., Wada, M., Doi, R., Imamura, M. (2002.) Expression of Integrin α V β 3 in Pancreatic Carcinoma: Relation to MMP-2 Activation and Lymph Node Metastasis. *Pancreas.* **25**: 30-35. doi: 10.1097/00006676-200208000-00021.

Hsu, M. Y., Shih, D. T., Meier, F. E., Van Belle, P., Hsu, J. Y., Elder, D. E., Buck, C. A., Herlyn, M. (1998.) Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical

growth phase in primary human melanoma. *Am. J. Pathol.* **153**: 1435-1442. doi: 10.1016/s0002-9440(10)65730-6.

Hu, S., Grobe, H., Guo, Z., Wang, Y. H., Doss, B. L., Pan, M., Ladoux, B., Bershadsky, A. D., Zaidel-Bar, R. (2019.) Reciprocal regulation of actomyosin organization and contractility in nonmuscle cells by tropomyosins and alpha-actinins. *Mol. Biol Cell.* **30**: 2025-2036. doi: 10.1091/mbc.E19-02-0082.

Huang, I. H., Hsiao, C. T., Wu, J. C., Shen, R. F., Liu, C. Y., Wang, Y. K., Chen, Y. C., Huang, C. M., del Álamo, J. C., Chang, Z. F., Tang, M. J., Khoo, K. H., Kuo, J. C. (2014.) GEF-H1 controls focal adhesion signaling that regulates mesenchymal stem cell lineage commitment. *J. Cell Sci.* **127**: 4186-4200. doi: 10.1242/jcs.150227.

Huang, J., Zhang, L., Wan, D., Zhou, L., Zheng, S., Lin, S., Qiao, Y. (2021.) Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**: 153. doi: 10.1038/s41392-021-00544-0.

Huang, R., Rofstad, E. K. (2018.) Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**: 92. doi: 10.1186/s13046-018-0763-x.

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. doi: 10.1126/scisignal.2000396.

Humphries, J. D., Chastney, M., Askari, J., Humphries, M. J. (2019.) Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **56**:14-21. doi: 10.1016/j.ceb.2018.08.004.

Humphries, J. D., Zha, J., Burns, J., Askari, J. A., Below, C. R., Chastney, M. R., Jones, M. C., Mironov, A., Knight, D., O'Reilly, D. A., Dunne, M. J., Garrod, D. R., Jorgensen, C., Humphries, M. J. (2022.) Pancreatic ductal adenocarcinoma cells employ integrin $\alpha 6 \beta 4$ to form hemidesmosomes and regulate cell proliferation. *Matrix Biol.* **110**: 16-39. doi: 10.1016/j.matbio.2022.03.010.

Hynes, R. O. (1987.) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**: 549-554. doi: 10.1016/0092-8674(87)90233-9.

Hynes, R. O. (2002.) Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* **110**: 673-687. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6.

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

Ihara, S., Hagedorn, E. J., Morrissey, M. A., Chi, Q., Motegi, F., Kramer, J. M., Sherwood, D. R. (2011.) Basement membrane sliding and targeted adhesion remodels tissue boundaries during uterine-vulval attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* **13**: 641-651. doi: 10.1038/ncb2233.

Jones, M. C., Humphries, J. D., Byron, A., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Paul, N. R., Ng, D. H. J., Askari, J. A., Humphries, M. J. (2015). Isolation of integrin-based adhesion complexes. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **66**: 9.8.1-9.8.15. doi: 10.1002/0471143030.cb0908s66.

Kadry, Y. A., Calderwood, D. A. (2020.) Structural and signaling functions of integrins. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1862**: 183206. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183206.

Kaiser, H. W., Ness, W., Offers, M., O'Keefe, E. J., Kreysel, H. W. (1993.) Talin: adherens junction protein is localized at the epidermal-dermal interface in skin. *J. Invest. Dermatol.* **101**: 789-793. doi: 10.1111/1523-1747.ep12371696.

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. doi: 10.1083/jcb.200707022.

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. doi: 10.1007/s00018-009-0038-y.

Kanchanawong, P., Calderwood, D. A. (2023.) Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **24**: 142-161. doi: 10.1038/s41580-022-00531-5.

Kariri, Y.A., Joseph, C., Kurozumi, S., Toss, M.S., Alsaleem, M., Raafat, S., Mongan, N.P., Aleskandarany, M.A., Green, A.R., Rakha, E.A. (2020.) Prognostic significance of KN motif and ankyrin repeat domains 1 (KANK1) in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **179**: 349-357. doi: 10.1007/s10549-019.

Kemp, J. P. Jr., Briehner W. M. (2018.) The actin filament bundling protein α -actinin-4 actually suppresses actin stress fibers by permitting actin turnover. *J. Biol. Chem.* **293**: 14520-14533. doi: 10.1074/jbc.RA118.004345.

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. doi: 10.1080/17460441.2016.1201057.

Kim, K. B., Prieto, V., Joseph, R. W., Diwan, A. H., Gallick, G. E., Papadopoulos, N. E., Bedikian, A. Y., Camacho, L. H., Hwu, P., Ng, C. S., Wei, W., Johnson, M. M., Wittemer, S. M., Vardeleon, A., Reckweg, A., Colevas, A. D. (2012.) A randomized phase II study of cilengitide (EMD 121974) in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res.* **22**: 294-301. doi: 10.1097/CMR.0b013e32835312e4.

Koroknai, V., Ecsedi, S., Vízkeleti, L., Kiss, T., Szász, I., Lukács, A., Papp, O., Ádány, R., Balázs, M. (2016.) Genomic profiling of invasive melanoma cell lines by array comparative genomic hybridization. *Melanoma Res.* **26**: 100-107. doi: 10.1097/CMR.0000000000000227.

Kuo, J. C., Han, X., Hsiao, C. T., Yates, J. R. 3rd, Waterman, C. M. (2011.) Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* **13**: 383-393. doi: 10.1038/ncb2216.

Kuo, J. C., Han, X., Yates, J. R. 3rd, Waterman, C. M. (2012.) Isolation of focal adhesion proteins for biochemical and proteomic analysis. *Methods Mol. Biol.* **757**: 297-323. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6_19.

Laeufle, R., Arnold, D., Kopetz, S., Straub, J., Bruns, R., Massimini, G., Debenedetto, R. Linke, R., Elez Fernandez, E., Tabernero, J. (2018.) Patient Selection for Targeting Integrin with Abituzumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): A Retrospective Analysis of the Randomized Phase I/II Poseidon Study. *Ann. Oncol.* **29**: viii164. doi:10. 1093/annonc/mdy281.035.

Lampe, M., Vassilopoulos, S., Merrifield., C. (2016.) Clathrin coated pits, plaques and adhesion. *J. Struct. Biol.* **196**: 48-56. doi: 10.1016/j .jsb.2016.07.009.

Landowski, T. H., Gard, J., Pond, E., Pond, G. D., Nagle, R. B., Geffre, C.P., Cress, A. E. (2014.) Targeting integrin alpha6 stimulates curative-type bone metastasis lesions in a xenograft model. *Mol. Cancer Ther.* **13**: 1558-1566. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0962.

Lane, N. E., Yao, W., Nakamura, M. C., Humphrey, M. B., Kimmel, D., Huang, X., Sheppard, D., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (2005.) Mice lacking the integrin beta5 subunit have accelerated osteoclast

maturation and increased activity in the estrogen-deficient state. *J. Bone Miner. Res.* **20**: 58-66. doi: 10.1359/JBMR.041017.

Lansbergen, G., Grigoriev, I., Mimori-Kiyosue, Y., Ohtsuka, T., Higa, S., Kitajima, I., Demmers, J., Galjart, N., Houtsmuller, A. B., Grosveld, F., Akhmanova, A. (2006.) CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. *Dev. Cell.* **11**: 21-32. doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.012.

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

Legerstee, K., Houtsmuller, A. B. (2021.) A Layered View on Focal Adhesions. *Biology (Basel)*. **10**: 1189. doi: 10.3390/biology10111189.

Lehtimäki, J. I., Rajakylä, E. K., Tojkander, S., Lappalainen, P. (2021.) Generation of stress fibers through myosin-driven reorganization of the actin cortex. *eLife*. **10**: e60710. doi: 10.7554/eLife.60710.

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. doi: 10.1093/hmg/ddi415.

Leszczynska, K.B., Foskolou, I.P., Abraham, A.G., Anbalagan, S., Tellier, C., Haider, S., Span, P.N., O'Neill, E.E., Buffa, F.M., Hammond, E.M. (2015.) Hypoxia-induced p53 modulates both apoptosis and radiosensitivity via AKT. *J. Clin. Invest.* **125**: 2385-2398. doi:/10.1172/JCI80402.

Leyton-Puig, D., Isogai, T., Argenzio, E., van den Broek, B., Klarenbeek, J., Janssen, H., Jalink, K., Innocenti, M. (2017.) Flat clathrin lattices are dynamic actin-controlled hubs for clathrin-mediated endocytosis and signalling of specific receptors. *Nat. Commun.* **8**: 16068. doi: 10.1038/ncomms16068.

Li, C. C., Kuo, J. C., Waterman, C. M., Kiyama, R., Moss, J., Vaughan, M. (2011.) Effects of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange (BIG) 1 and KANK1 proteins on cell polarity and directed migration during wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 19228-19233. doi: 10.1073/pnas.1117011108.

Li, L., Li, X., Qi, L., Rychahou, P., Jafari, N., Huang, C. (2017.) The role of talin2 in breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget*. **8**: 106876-106887. doi: 10.18632/oncotarget.22449.

Li, M., Wang, Y., Li, M., Wu, X., Setrerrahmane, S., Xu, H. (2021.). Integrins as Attractive Targets for Cancer Therapeutics. *Acta Pharmaceutica Sinica*. **11**: 2726-2737. doi:10.1016/j.apsb.2021.01.004.

Li, X., Goult, B. T., Ballestrem, C., Zacharchenko, T. (2023.) The structural basis of the talin-KANK1 interaction that coordinates the actin and microtubule cytoskeletons at focal adhesions. *Open Biol.* **13**: 230058. doi: 10.1098/rsob.230058.

Liu, B. P., Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K. (1998.) Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein rho. *Cell Adhes. Commun.* **5**: 249-255. doi: 10.3109/15419069809040295.

Liu, Y., Peng, Z., Peng, X., Yan, W., Yang, Z., Qu, J. (2021.) Shedding New Lights Into STED Microscopy: Emerging Nanoprobes for Imaging. *Front. Chem.* **9**: 641330. doi: 10.3389/fchem.2021.641330.

Lock, J. G., Baschieri, F., Jones, M. C., Humphries, J. D., Montagnac, G., Strömblad, S., Humphries, M. J. (2019.) Clathrin-containing adhesion complexes. *J. Cell Biol.* **218**: 2086-2095. doi: 10.1083/jcb.201811160.

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. doi: 10.1038/s41556-018-0220-2.

Lončarić, M., Stojanović, N., Rac-Justament, A., Coopmans, K., Majhen, D., Humphries, J. D., Humphries, M. J., Ambriović-Ristov, A. (2023.) Talin2 and KANK2 functionally interact to regulate microtubule dynamics, paclitaxel sensitivity and cell migration in the MDA-MB-435S melanoma cell line. *Cell Mol. Biol. Lett.* **28**: 56. doi: 10.1186/s11658-023-00473-6.

Long, G. V., Hauschild, A., Santinami, M., Atkinson, V., Mandalà, M., Chiarion-Sileni, V. i sur. (2017.) Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **377**: 1813-1823. doi: 10.1056/NEJMoa1708539.

Long, G. V., Swetter, S. M., Menzies, A. M., Gershenwald, J. E., Scolyer, R. A. (2023.) Cutaneous melanoma. *Lancet.* **402**: 485-502. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00821-8.

López-Colomé, A. M, Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., López, E. (2017.) Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. *J. Hematol. Oncol.* **10**: 50. doi:10.1186/s13045-017-0418-y.

Lu, F., Zhu, L., Bromberger, T., Yang, J., Yang, Q., Liu, J., Plow, E. F., Moser, M., Qin, J. (2022.) Mechanism of integrin activation by talin and its cooperation with kindlin. *Nat. Commun.* **13**: 2362. doi: 10.1038/s41467-022-30117-w.

Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A., Long, G. V. (2017.) Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**: 463-482. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.43.

Maddox, A. S., Burridge, K. (2003.) RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J. Cell Biol.* **160**: 255-265. doi: 10.1083/jcb.200207130.

Manso, A. M., Okada, H., Sakamoto, F. M., Moreno, E., Monkley, S. J., Li, R., Critchley, D. R., Ross, R. S. (2017.) Loss of mouse cardiomyocyte talin-1 and talin-2 leads to β -1 integrin reduction, costameric instability, and dilated cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**: E6250-E6259. doi: 10.1073/pnas.1701416114.

Matthews, N. H., Li, W. Q., Qureshi, A. A., Weinstock, M. A., Cho, E. (2017.) „Epidemiology of melanoma“. str: 3-22 u *Cutaneous melanoma: Etiology and therapy* (uredio William, H. W. i Farma, J. M.) Brisbane, Australia: Codon Publications. doi: 10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017.ch1.

Maupin, P., Pollard., T. D. (1983.) Improved preservation and staining of HeLa cell actin filaments, clathrin-coated membranes, and other cyto- plasmic structures by tannic acid-glutaraldehyde-saponin fixation. *J. Cell Biol.* **96**: 51-62. doi: 10.1083/jcb.96.1.51.

McCabe, N., De, S., Vasanji, A., Brainard, J., Byzova, T. V. (2007.) Prostate cancer specific integrin α v β 3 modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene.* **26**: 6238-6243. doi: 10.1038/sj.onc.1210429.

McMahon, H., Boucrot, E. (2011.) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 517-533. doi: 10.1038/nrm3151.

Meiring, J. C. M., Shneyer, B. I., Akhmanova, A. (2020.) Generation and regulation of microtubule network asymmetry to drive cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **62**: 86-95. doi: 10.1016/j.ceb.2019.10.004.

Mishra, Y. G., Manavathi, B. (2021.) Focal adhesion dynamics in cellular function and disease. *Cell Signal.* **85**: 110046. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110046.

Monkley, S. J., Zhou, X. H., Kinston, S. J., Giblett, S. M., Hemmings, L., Priddle, H., Brown, J. E., Pritchard, C. A., Critchley, D. R., Fässler, R. (2000.) Disruption of the talin gene arrests mouse development

at the gastrulation stage. *Dev. Dyn.* **219**: 560-574. doi: 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1079>3.0.CO;2-Y.

Monkley, S. J., Pritchard, C. A., Critchley, D. R. (2001.) Analysis of the mammalian talin2 gene TLN2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**: 880-885. doi: 10.1006/bbrc.2001.5497.

Moritz, M. N. O., Merkel, A. R., Feldman, E. G., and Selistre-de-Araujo, H. S. (2021.) Biphasic $\alpha 2\beta 1$ Integrin Expression in Breast Cancer Metastasis to Bone. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 6906. doi:10.3390/ijms22136906.

Mousson, A., Legrand, M., Steffan, T., Vauchelles, R., Carl, P., Gies, J. P., Lehmann, M., Zuber, G., De Mey, J., Dujardin, D., Sick, E., Rondé, P. (2021.) Inhibiting FAK-Paxillin Interaction Reduces Migration and Invadopodia-Mediated Matrix Degradation in Metastatic Melanoma Cells. *Cancers (Basel)*. **13**: 1871. doi: 10.3390/cancers13081871.

Muroyama, A., Lechler, T. (2017.) Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development*. **144** : 3012-3021. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.153171>.

Murphy, D. A., Courtneidge, S. A. (2011.) The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 413-426. doi: 10.1038/nrm3141.

Mustyatsa, V. V., Boyakhchyan, A. V., Ataulakhanov, F. I., Gudimchuk, N. B. (2017.) EB-Family Proteins: Functions and Microtubule Interaction Mechanisms. *Biochemistry (Mosc.)*. **82**: 791-802. doi: 10.1134/S0006297917070045.

Myllymäki, S. M., Kämäräinen, U. R., Liu, X., Cruz, S.P., Miettinen, S., Vuorela, M., Varjosalo, M., Manninen, A. (2019.) Assembly of the $\beta 4$ -Integrin Interactome Based on Proximal Biotinylation in the Presence and Absence of Heterodimerization. *Mol. Cell Proteomics*. **18**: 277-293. doi: 10.1074/mcp.RA118.001095.

Naba, A., Clauser, K. R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S. A., Hynes, R. O. (2012.) The matrisome: *in silico* definition and *in vivo* characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol. Cell Proteomics*. **11**: M111.014647. doi: 10.1074/mcp.M111.014647.

Nandrot, E. F., Kim, Y., Brodie, S. E., Huang, X., Sheppard, D., Finnemann, S. C. (2004.) Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking α 5 β 1 integrin. *J. Exp. Med.* **200**: 1539-45. doi: 10.1084/jem.20041447.

Nazemi, M., Rainero, E. (2020.) Cross-Talk Between the Tumor Microenvironment, Extracellular Matrix, and Cell Metabolism in Cancer. *Front. Oncol.* **10**: 239. doi: 10.3389/fonc.2020.00239.

Nelson, E. S., Folkmann, A. W., Henry, M. D., DeMali, K. A. (2011.) Vinculin activators target integrins from within the cell to increase melanoma sensitivity to chemotherapy. *Mol. Cancer Res.* **9**: 712-23. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0599.

Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., Aebersold, R. (2003.) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**: 4646-4658. doi: 10.1021/ac0341261.

Ng, D. H., Humphries, J. D., Byron, A., Millon-Frémillon, A., Humphries, M. J. (2014.) Microtubule-dependent modulation of adhesion complex composition. *PLoS One.* **9**: e115213. doi: 10.1371/journal.pone.0115213.

Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou, N. H. (2012.) Gap junctions. *Compr. Physiol.* **2**: 1981-2035. doi: 10.1002/cphy.c110051.

Noordstra, I., Akhmanova, A. (2017.) Linking cortical microtubule attachment and exocytosis. *F1000Research.* **6**: 469. doi: 10.12688/f1000research.10729.1.

O'Day, S., Pavlick, A., Pavlick, A., Loquai, C., Lawson, D., Gutzmer, R., Richards, J., Schadendorf, D., Thompson, J. A., Gonzalez, R., Trefzer, U., Mohr, P., Ottensmeier, C., Chao, D., Zhong, B., de Boer, C. J., Uhlir, C., Marshall, D., Gore, M. E., Lang, Z., Hait, W., Ho, P. (2011.) A Randomised, Phase II Study of Intetumumab, an Anti- α v-integrin mAb, Alone and with Dacarbazine in Stage IV Melanoma. *Br. J. Cancer* **105**: 346-352. doi:10.1038/bjc.2011.183.

Oakes, P. W., Beckham, Y., Stricker, J., Gardel, M. L. (2012.) Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J. Cell Biol.* **196**: 363-374. doi: 10.1083/jcb.201107042.

Palmieri, G., Ombra, M., Colombino, M., Casula, M., Sini, M., Manca, A., Paliogiannis, P., Ascierto, P. A., Cossu, A. (2015.) Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Front Oncol.* **5**: 183. doi: 10.3389/fonc.2015.00183.

Pan, W., Sun, K., Tang, K., Xiao, Q., Ma, C., Yu, C., Wei, Z. (2017.) Structural insights into ankyrin repeat-mediated recognition of the kinesin motor protein KIF21A by KANK1, a scaffold protein in focal adhesion. *J. Biol. Chem.* **293**: 1944-1956. doi: 10.1074/jbc.M117.815779.

Pang, X., He, X., Qiu, Z., Zhang, H., Xie, R., Liu, Z., Gu, Y., Zhao, N., Xiang, Q., Cui, Y. (2013.) Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. *Signal. Transduct. Target Ther.* **8**: 1. doi: 10.1038/s41392-022-01259-6.

Pannekoek, W. J. , de Rooij, J., Gloerich, M. (2019.) Force transduction by cadherin adhesions in morphogenesis. *F1000Res.* **8**: 1044. doi: 10.12688/f1000research.18779.1.

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 α V β 5 Focal Adhesions to Microtubules and Regulates Sensitivity to Microtubule Poisons and Cell Migration. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 125. doi:10.3389/fcell.2020.00125.

Pasquier, E., Honore, S., Pourroy, B., Jordan, M. A., Lehmann, M., Briand, C., Braguer, D. (2005.) Antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells. *Cancer Res.* **65**: 2433-2440. doi: 10.1158/0008-5472.

PDQ Adult Treatment Editorial Board (2024.) Melanoma treatment (PDQ®): Health professional version. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389469/> .
Pristupljeno: 16.02.2024.

Pickarski, M., Gleason, A., Bednar, B., Duong, L. T. (2015.) Orally active α v β 3 integrin inhibitor MK-0429 reduces melanoma metastasis. *Oncol. Rep.* **33**: 2737-2745. doi: 10.3892/or.2015.3910.

Plopper, G., Ingber, D. E. (1993.) Rapid induction and isolation of focal adhesion complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 571-578. doi: 10.1006/bbrc.1993.1662.

Prækelt, U., Kopp, P. M., Rehm, K., Linder, S., Bate, N., Patel, B., Debrand, E., Manso, A. M., Ross, R. S., Conti, F., Zhang, M. Z., Harris, R. C., Zent, R., Critchley, D. R., Monkley, S. J. (2012.) New isoform-specific monoclonal antibodies reveal different sub-cellular localisations for talin1 and talin2. *Eur. J. Cell Biol.* **91**: 180-191. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.12.003.

Pu, J., Shen, J., Zhong, Z., Yanling, M., Gao, J., Journal, A.I., 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. doi: 10.1080/21691401.2020.1728287.

Pulous, F. E., Carnevale, J. C., Al-Yafeai, Z., Pearson, B. H., Hamilton, J. A. G., Henry, C. J., Orr, A. W., Petrich, B. G. (2020.) Talin-dependent integrin activation is required for endothelial proliferation and postnatal angiogenesis. *Angiogenesis*. **24**: 177-190. doi: 10.1007/s10456-020-09756-4.

Qi, L., Jafari, N., Li, X., Chen, Z., Li, L., Hytönen, V. P., Goult, B. T., Zhan, C. G., Huang, C. (2016.) Talin2-mediated traction force drives matrix degradation and cell invasion. *J. Cell Sci.* **129**: 3661-3674. doi: 10.1242/jcs.185959.

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

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. doi: 10.1038/s41563-019-0371-y.

Ramkumar, N., Baum, B. (2016.) Coupling changes in cell shape to chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**: 511-521. doi: 10.1038/nrm.2016.75.

Razinia, Z., Mäkelä, T., Yläne, J., Calderwood, D. A. (2012.) Filamins in mechanosensing and signaling. *Annu. Rev. Biophys.* **41**: 227-246. doi: 10.1146/annurev-biophys-050511-102252.

Reed, N. I., Jo, H., Chen, C., Tsujino, K., Arnold, T. D., DeGrado, W. F., Sheppard, D. (2015.) The alphavbeta1 integrin plays a critical in vivo role in tissue fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **7**: 288ra279. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa5094.

Reverte, C. G., Benware, A., Jones, C. W., LaFlamme, S. E. (2006.) Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. *J. Cell Biol.* **174**: 491-497. doi: 10.1083/jcb.200603069.

Rezaie, Y., Fattahi, F., Mashinchi, B., Kamyab Hesari, K., Montazeri, S., Kalantari, E., Madjd, Z., Saeednejad Zanjani, L. (2023.) High expression of Talin-1 is associated with tumor progression and recurrence in melanoma skin cancer patients. *BMC Cancer*. **23**: 302. doi: 10.1186/s12885-023-10771-z.

Ribeiro Ede, A. Jr., Pinotsis, N., Ghisleni, A., Salmazo, A., Konarev, P. V., Kostan, J., Sjöblom, B., Schreiner, C., Polyansky, A. A., Gkougkouli, E. A., Holt, M. R., Aachmann, F. L., Zagrović, B., Bordignon, E.,

Pirker, K. F., Svergun, D. I., Gautel, M., Djinović-Carugo, K. (2014.) The structure and regulation of human muscle α -actinin. *Cell*. **159**: 1447-1460. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.056.

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., Bershadsky, A. D. (2001.) Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* **153**: 1175-1186. doi: 10.1083/jcb.153.6.1175.

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

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. doi: 10.1083/jcb.200805147.

Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Barsouk, A. (2021.) Epidemiology of Melanoma. *Med. Sci. (Basel)*. **9**: 63. doi: 10.3390/medsci9040063.

Sakamoto, S., McCann, R. O., Dhir, R., Kyprianou, N. (2010.) Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. *Cancer Res.* **70**: 1885-1895. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2833.

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 (Basel)*. **12**: 1910. doi: 10.3390/cancers12071910.

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. doi: 10.1074/jbc. M204244200.

Sawada, K., Mitra, A.K., Radjabi, A.R., Bhaskar, V., Kistner, E.O., Tretiakova, M. i sur. (2008.) Loss of e-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* **68**: 2329-2339. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5167.

Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., Ugurel, S. (2018.) Melanoma. *Lancet*. **392**: 971-984. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31559-9.

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 Reports* **12**: 259-266. doi:10.1038/embor.2011.5.

Schiller, H. B., Hermann, M. R., Polleux, J., Vignaud, T., Zanivan, S., Friedel, C. C., Sun, Z., Raducanu, A., Gottschalk, K. E., Théry, M., Mann, M., Fässler, R. (2013.) β 1- and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.* **15**: 625-636. doi: 10.1038/ncb2747.

Seetharaman, S., Etienne-Manneville, S. (2019.) Microtubules at focal adhesions—a double-edged sword. *J. Cell Sci.* **132**: jcs232843.

Seetharaman, S., Etienne-Manneville, S. (2020.) Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends Cell Biol.* **30**: 720-735. doi: 10.1016/j.tcb.2020.06.004.

Shain, A. H., Bastian, B. C. (2016.) From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer.* **16**: 345-358. doi: 10.1038/nrc.2016.37.

Shao, H., Li, S., Watkins, S. C., Wells, A. (2014.) α -Actinin-4 Is Required for Amoeboid-type Invasiveness of Melanoma. *Cells. J. Biol. Chem.* **289**: 32717–32728. doi: 10.1074/jbc.M114.579185.

Shattil, S. J., Kim, C., Ginsberg, M. H. (2010.) The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 288-300. doi: 10.1038/nrm2871.

Singel, S. M., Cornelius, C., Batten, K., Fasciani, G., Wright, W. E., Lum, L., Shay, J.W. (2013.) A targeted RNAi screen of the breast cancer genome identifies KIF14 and TLN1 as genes that modulate docetaxel chemosensitivity in triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**: 2061-2070. doi: 10.1016/j.neo.2014.03.008.

Sjöblom, B., Salmazo, A., Djinović-Carugo, K. (2008.) Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* **65**: 2688-2701. doi: 10.1007/s00018-008-8080-8.

Srivastava, A., Srivastava, P., Pant, A. B. (2019.) „Molecular Diagnostics in Melanoma: An Update.“. str: 1-11. u *Molecular Diagnostics in Cancer Patients* (uredio Shukla, K., Sharma, P., Misra, S.) Singapore: Springer. doi: 10.1007/978-981-13-5877-7_5.

Steed, E., Balda, M. S., Matter, K. (2010.) Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* **20**: 142-149. doi: 10.1016/j.tcb.2009.12.002.

Stojanović, N., Brozović, 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. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.019.

Stojanović, N., Dekanić, A., Paradžik, M., Majhen, D., Ferenčak, K., Ruščić, J., Bardak, I. i sur. (2018.) Differential effects of integrin αv knockdown and cilengitide on sensitization of triple-negative breast cancer and melanoma cells to microtubule poisons. *Mol. Pharmacol.* **94**: 1334-1351. doi: 10.1124/mol.118.113027.

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. doi: 10.1038/s41467-019-12611-w.

Stupp, R., Hegi, M. E., Gorlia, T., Erridge, S. C., Perry, J., Hong, Y.-K. i sur. (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. doi:10.1016/S1470-2045(14)70379-1.

Su, C. Y., Li, J. Q., Zhang, L. L., Wang, H., Wang, F. H., Tao, Y. W., Wang, Y. Q., Guo, Q. R., Li, J. J., Liu, Y., Yan, Y. Y., Zhang, J. Y. (2020.) The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers. *Front. Pharmacol.* **11**: 579068. doi: 10.3389/fphar.2020.579068.

Sulzmaier, F. J., Jean, C., Schlaepfer, D. D. (2014.) FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Rev. Cancer.* **14**: 598-610. doi: 10.1038/nrc3792.

Sun, Z., Costell, M., Fässler, R. (2019.) Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat. Cell Biol.* **21**: 25-31. doi:10.1038/s41556-018-0234-9.

Sun, Z., Tseng, H. Y., Tan, S., Senger, F., Kurzawa, L., Dedden, D., Mizuno, N., Wasik, A. A., Thery, M., Dunn, A. R., Fässler, R. (2016.) Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nat. Cell Biol.* **18**: 941-953. doi: 10.1038/ncb3402.

Tadijan, A., Humphries, J. D., Samaržija, I., Stojanović, N., Zha, J., Čuljak, K., Tomić, M., Paradžik, M., Nestić, D., Kang, H., Humphries, M. J., Ambriović-Ristov, A. (2021.) The Tongue Squamous Carcinoma Cell Line Cal27 Primarily Employs Integrin $\alpha6\beta4$ -Containing Type II Hemidesmosomes for Adhesion Which Contribute to Anticancer Drug Sensitivity. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**: 786758. doi: 10.3389/fcell.2021.786758.

Tadijan, A., Samaržija, I, Humphries, J. D., Humphries, M. J., Ambriović-Ristov, A. (2020.) KANK family proteins in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **131**: 105903. doi: 10.1016/j.biocel.2020.105903.

Tang, K., Boudreau, C. G., Brown, C. M., Khadra, A. (2018.) Paxillin phosphorylation at serine 273 and its effects on rac, rho and adhesion dynamics, *PLoS Comput. Biol.* **14**: e1006303. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006303.

Tang, X., Li, Q., Li, L., Jiang, J. (2021.) Expression of Talin-1 in endometriosis and its possible role in pathogenesis. *Reprod. Biol Endocrinol.* **19**: 42. doi: 10.1186/s12958-021-00725-0.

Tang, Z., Takahashi, Y. (2018.) Analysis of Protein-Protein Interaction by Co-IP in Human Cells. *Methods Mol. Biol.* **1794**: 289-296. doi: 10.1007/978-1-4939-7871-7_20.

Tapia-Rojo, R. (2024.) Mechanochemical regulation of the talin-vinculin interaction. *Biophys. J.* **123**: 2A. doi.org/10.1016/j.bpj.2023.11.144.

Thul, P. J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A. i sur. (2017.) A subcellular map of the human proteome. *Science.* **356**: eaal3321. doi: 10.1126/science.aal3321.

Thullberg, M., Gad, A., Le Guyader, S., Strömblad, S. (2007.) Oncogenic H-Ras V12 promotes anchorage-independent cytokinesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **104**: 20338-20343. doi: 10.1073/pnas.0706609105.

Tojkander, S., Gateva, G., Lappalainen, P. (2012.) Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* **125**: 1855-1864. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>.

Truong, H. H., Xiong, J., Ghotra V. P., Nirmala, E., Haazen, L., Le Dévédec, S. E. i sur. (2014.) β 1 integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGF β -miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer. *Sci. Signal.* **7**: ra15. doi: 10.3390/ijms22136906.

Truong, T., Shams, H., Mofrad, M. R. K. (2015.) Mechanisms of integrin and filamin binding and their interplay with talin during early focal adhesion formation, *Integr. Biol.*, **7**: 1285-1296. doi: 10.1039/c5ib00133a.

Tsvetkov, A. S., Samsonov, A., Akhmanova, A., Galjart, N. & Popov, S. V. (2007.) Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* **64**: 519-530. doi: 10.1002/CM.20201.

van der Vaart, B., van Riel, W. E., Doodhi, H., Kevenaer, J. T., Katrukha, E. A., Gumy, L., Bouchet, B. P., Grigoriev, I., Spangler, S. A., Yu, K. L., Wulf, P. S., Wu, J., Lansbergen, G., van Battum, E. Y., Pasterkamp, R. J., Mimori-Kiyosue, Y., Demmers, J., Olieric, N., Maly, I. V., Hoogenraad, C. C., Akhmanova, A. (2013.) CFEOM1-associated kinesin KIF21A is a cortical microtubule growth inhibitor. *Dev. Cell.* **27**: 145–160. doi: 10.1016/j.devcel.2013.09.010.

Vansteenkiste, J., Barlesi, F., Waller, C. F., Bannouna, J., Gridelli, C., Goekkurt, E., Verhoeven, D., Szczesna, A., Feurer, M., Milanowski, J., Germonpre, P., Lena, H., Atanackovic, D., Krzakowski, M., Hicking, C., Straub, J., Picard, M., Schuette, W., O'Byrne, K. (2015.) Cilengitide Combined with Cetuximab and Platinum-Based Chemotherapy as First-Line Treatment in Advanced Non-small-cell Lung Cancer (NSCLC) Patients: Results of an Open-Label, Randomized, Controlled Phase II Study (CERTO). *Ann. Oncol.* **26**: 1734-1740. doi:10. 1093/annonc/mdv219.

Vanzo, R. J., Martin, M. M., Sdano, M. R., South, S. T. (2013.) Familial KANK1 deletion that does not follow expected imprinting pattern. *Eur. J. Med. Genet.* **5**: 256-259. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.02.006.

Vassilopoulos, S., Gentil, C., Lainé, J., Buclez, P. O., Franck, A., Ferry, A., Précigout, G., Roth, R., Heuser, J. E., Brodsky, F. M., Garcia, L., Bonne, G., Voit, T., Piétri-Rouxel, F., Bitoun, M. (2014.) Actin scaffolding by clathrin heavy chain is required for skeletal muscle sarcomere organization. *J. Cell Biol.* **205**: 377-393. doi: 10.1083/jcb.201309096.

Vermorken, J. B., Peyrade, F., Krauss, J., Mesía, R., Remenar, E., Gauler, T. C., Keilholz, U., Delord, J. P., Schafhausen, P., Erfán, J., Brümmendorf, T. H., Iglesias, L., Bethe, U., Hicking, C., Clement, P. M. (2014.) Cisplatin, 5-fluorouracil, and Cetuximab (PFE) with or without Cilengitide in Recurrent/metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Results of the Randomized Phase I/II ADVANTAGE Trial (Phase II Part). *Ann. Oncol.* **25**: 682-688. doi:10.1093/annonc/mdu003.

Walko, G., Castañón, M. J., Wiche, G. (2015.) Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* **360**: 363-378. doi: 10.1007/s00441-014-2061-z.

Wang, J. C., Bolger-Munro, M., Gold, M. R. (2018.) Visualizing the Actin and Microtubule Cytoskeletons at the B-cell Immune Synapse Using Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy. *J. Vis. Exp.* **134**: 57028. doi: 10.3791/57028.

Wang, J., Jia, J., Zhou, L. (2020.) Long non-coding RNA CASC2 enhances cisplatin sensitivity in oral squamous cell cancer cells by the miR-31-5p/KANK1 axis. *Neoplasma*. **67**: 1279-1292. doi: 10.4149/neo_2020_191029N1102.

Wang, M., Hinton, J. P., Gard, J. M. C., Garcia, J. G. N., Knudsen, B. S., Nagle, R. B., Cress, A. E. (2019.) Integrin $\alpha 6\beta 4$ E variant is associated with actin and CD9 structures and modifies the biophysical properties of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions. *Mol. Biol. Cell*. **30**: 838-850. doi: 10.1091/mbc.E18-10-0652.

Wang, Y., Kakinuma, N., Zhu, Y., Kiyama, R. (2006.) Nucleo-cytoplasmic shuttling of human Kank protein accompanies intracellular translocation of β -catenin. *J. Cell Sci*. **119**: 4002-4010. doi: 10.1242/jcs.03169.

Weaver, B. A. (2014.) How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell*. **25**: 2677-2681. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916.

Wei, X., Sun, Y., Wu, Y., Zhu, J., Gao, B., Yan, H., Zhao, Z., Zhou, J., Jing, Z. (2017.) Downregulation of Talin-1 expression associates with increased proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in aortic dissection. *BMC Cardiovasc. Disord*. **17**: 162. doi: 10.1186/s12872-017-0588-0.

Wen, Z., Liang, Y., Chen, H., Ji, L., Du, J., Xie, X., Li, X., Lou, Y. (2019.) Talin2 regulates breast cancer cell migration and invasion by apoptosis. *Oncol. Lett*. **16**: 285-293. doi: 10.3892/ol.2019.10175.

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. doi: 10.1038/nrm3769.

Wordeman, L. (2005.) Microtubule-depolymerizing kinesins. *Curr. Opin. Cell Biol*. **17**: 82-88. doi: 10.1016/j.ceb.2004.12.003. PMID: 15661523.

Wu, X., Kodama, A., Fuchs, E. (2008.) ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell*. **135**: 137-148. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.045.

Yamaguchi, N., Knaut, H. Focal adhesion-mediated cell anchoring and migration: from in vitro to in vivo. *Development*. **149**: dev200647. doi: 10.1242/dev.200647.

Yamamoto, S., Tsuda, H., Honda, K., Onozato, K., Takano, M., Tamai, S., Imoto, I., Inazawa, J., Yamada, T., Matsubara, O. (2009.) Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod. Pathol*. **22**: 499-507. doi: 10.1038/modpathol.2008.234.

Yoshimura, K., Meckel, K. F., Laird, L. S., Chia, C. Y., Park, J. J., Olino, K. L. i sur. (2009.) Integrin alpha2 mediates selective metastasis to the liver. *Cancer Res.* **69**: 7320-7328. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0315.

Yu, C. H., Rafiq, N. B., Cao, F., Zhou, Y., Krishnasamy, A., Biswas, K. H., Ravasio, A., Chen, Z., Wang, Y. H., Kawauchi, K., Jones, G. E., Sheetz, M. P. (2015.) Integrin-beta3 clusters recruit clathrin-mediated endocytic machinery in the absence of traction force. *Nat Commun.* **6**: 8672. doi: 10.1038/ncomms9672.

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. doi: 10.1021/acs.nanolett.9b01732.

Yuan, Y., Li, L., Zhu, Y., Qi, L., Azizi, L., Hytönen, V. P., Zhan, C. G., Huang, C. (2017.) The molecular basis of talin2's high affinity toward β 1-integrin. *Sci. Rep.* **7**: 41989. doi: 10.1038/srep41989.

Yue, B. (2014.) Biology of the extracellular matrix: An overview. *J. Glaucoma.* **28**: 20-23. doi: 10.1097/IJG.000000000000108.

Yue, J., Xie, M., Gou, X., Lee, P., Schneider, M. D., Wu, X. (2014.) Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4. *Dev. Cell.* **31**: 572-585. doi: 10.1016/j.devcel.2014.10.025.

Yue, J., Zhang, Y., Liang, W. G., Gou, X., Lee, P., Liu, H., Lyu, W., Tang, W. J., Chen, S. Y., Yang, F., Liang, H., Wu, X. (2016.) In vivo epidermal migration requires focal adhesion targeting of ACF7. *Nat. Commun.* **7**: 11692. doi: 10.1038/ncomms11692.

Zamir, E., Geiger, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **114**: 3583-3590. doi: 10.1242/jcs.114.20.3583.

Zhang, K., Zhu, T., Gao, D., Zhang, Y., Zhao, Q., Liu, S., Su, T., Bernier, M., Zhao, R. (2014.) Filamin A expression correlates with proliferation and invasive properties of human metastatic melanoma tumors: implications for survival in patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **140**: 1913-1926. doi: 10.1007/s00432-014-1722-3.

Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S. J., Critchley, D. R., Sheetz, M. P. (2008.) Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat. Cell Biol.* **10**: 1062–1068. doi: 10.1038/ncb1765.

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. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.09.017.

Zuidema, A., Wang, W., Kreft, M., Bleijerveld, O. B., Hoekman, L., Aretz, J., Böttcher, R. T., Fässler, R., Sonnenberg, A. (2018.) Mechanisms of integrin $\alpha V\beta 5$ clustering in flat clathrin lattices. *J. Cell Sci.* **131**: jcs221317. doi: 10.1242/jcs.2213172018.

Zuidema, A., Wang, W., Kreft, M., Bleijerveld, O. B., Hoekman, L., Aretz, J., Böttcher, R. T., Fässler, R., Sonnenberg, A. (2022.) Molecular determinants of $\alpha V\beta 5$ localization in flat clathrin lattices - role of $\alpha V\beta 5$ in cell adhesion and proliferation. *J. Cell Sci.* **135**: jcs259465. doi: 10.1242/jcs.259465.

Zuidema, A., Wang, W., Sonnenberg, A. (2020.) Crosstalk between Cell Adhesion Complexes in Regulation of Mechanotransduction. *Bioessays.* **42**: e2000119. doi: 10.1002/bies.202000119.

7. SAŽETAK

Melanom je agresivna vrsta tumora sklona metastazama, što otežava liječenje. Unatoč razvoju ciljanih lijekova i imunoterapije, dio pacijenata oboljelih od melanoma se i dalje liječi protutumorskim lijekovima kao što je otrov mikrotubula, PTX. Budući da liječenje protutumorskim lijekovima nije dovoljno učinkovito u pacijenata oboljelih od melanoma kao što je za neke druge tumore, postoji potreba da se pronađu nove mete i pristupi za poboljšanje učinkovitosti. Potencijalne mete u stanicama tumora su proteini adhezija koje stanice koriste za prihvaćanje i interakciju s okolinom. Najbolje istraženi su transmembranski receptori integrini, koji sudjeluju u regulaciji preživljenja, proliferacije, pokretljivosti i diferencijacije stanica. Aktivacijom integrina dolazi do stvaranja dinamične strukture IAC-a, sastavljenih od velikog broja adaptornih i signalnih proteina te proteina koji vežu citoskelet stanice. Međutim, do sada nema odobrenih lijekova koji su usmjereni na integrine u liječenju tumora. Cilj našeg istraživanja je detaljnije istražiti prijenos signala putem IAC-a, te pronaći nove mete unutar IAC-a čijim utišavanjem možemo poboljšati protutumorsko djelovanje PTX-a. Koristeći metode molekularne i stanične biologije, s naglaskom na MS, prethodno je pokazano da smanjenje količine integrina αV , odnosno FA $\alpha V\beta 5$ i proteina KANK2, sastavnice CMSC-a, može povećati protutumorski učinak PTX-a i smanjiti učinkovitost migracije stanica melanoma (Paradžik i sur., 2020.). U ovom radu smo detaljno opisali mehanizam povećane osjetljivosti stanica melanoma MDA-MB-435S nakon utišavanja integrina αV , talina 2 ili KANK2. Dokazali smo da KANK2 ostvaruje interakciju s talinom 2 iz FA $\alpha V\beta 5$ i tako predstavlja poveznicu FA i CMSC, odnosno aktina i mikrotubula. Narušavanjem ove veze, bilo utišavanjem integrina αV , talina 2 ili KANK2 dolazi do povećane osjetljivosti stanica na PTX i smanjene učinkovitosti migracije. Mehanizam povećane osjetljivosti stanica na PTX uzrokovan je promjenom u dinamici mikrotubula, točnije dolazi do povećane brzine rasta mikrotubula uslijed raspada FA (primjerice utišavanjem integrina αV) ili prekida veze FA i CMSC-a (utišavanjem proteina talina 2 ili KANK2). Dodatni dokaz za ovaj mehanizam je da je u stanicama s bržim rastom mikrotubula, stabilizirajuće djelovanje PTX-a značajno naglašenije. Osim toga, u ovom radu detaljno opisujemo različite uloge homologa talina, talina 1 i talina 2 u stanicama MDA-MB-435S. Naime, u literaturi ima vrlo malo podataka o ulozi ova dva homologa u FA. Naše istraživanje pokazuje da je njihova uloga u stanicama MDA-MB-435S različita i jedinstvena, a utišavanjem jednog od homologa nismo zabilježili kompenzaciju drugim homologom. Talin 1 ključan je za aktivaciju integrina $\beta 5$ i tvorbu FA $\alpha V\beta 5$ te njegovim utišavanjem stanice gube sposobnost adhezije i značajno im se smanjuje proliferacija. S druge strane, talin 2 nije nužan za tvorbu FA $\alpha V\beta 5$, ali ih povezuje s CMSC-om interakcijom s proteinom KANK2. Utišavanjem talina 2 dolazi do povećane veličine FA $\alpha V\beta 5$, ali količina talina 1 ostaje jednaka u stanici, što

upućuje da talin 1 vjerojatno ne može nadomjestiti nedostatak talina 2 ili zbog nedostataka kvantitativnih metoda ne možemo uočiti malu promjenu u količini talina 1 u stanici. No utišavanjem talina 2 dolazi do povećanja filamenata miozina IIA i povećanjem količine stresnih vlakana. Na temelju svih rezultata pretpostavljamo mehanizam u kojemu prekid veze talina 2 i KANK2 dovodi do odvajanja mikrotubula od FA, čime dolazi do oslobađanja molekule GEF-H1, aktivacije Rho/ROCK signalnog puta što vodi povećanju filamenata miozina IIA, stresnih vlakana, proteina α -aktinina 4 i veličine FA. Osim toga, istražili smo ulogu drugog homologa proteina KANK, KANK1. Pokazali smo da je njegova lokalizacija i količina u stanici različita u usporedbi s proteinom KANK2. Njegovim utišavanjem ne dolazi do promjene u brzini rasta mikrotubula ni povećanja osjetljivosti stanica na PTX. U ovom radu istražili smo i sastav druge vrste adhezija α V β 5, RA. Uz potvrdu poznatih sastavnica RA, dokazali smo po prvi put da je i KANK2 dio retikularnog adhesoma. Pokazali smo da proteini talin 2 i KANK2 sudjeluju u regulaciji RA jer njihovim utišavanjem dolazi do smanjene količine većine sastavnica RA, no ne i integrina α V β 5. Osim toga, utišavanjem talina 2 dolazi do smanjene količine proteina KANK2 u RA i obrnuto, što upućuje na zaključak da talin 2 i KANK2 interagiraju i u RA. Međutim, nismo odgovorili na pitanje koja je njihova uloga u RA. Zaključno, ovaj rad analizira dvije vrste integrin α V β 5 adhezija, FA i RA, otkrivajući da obje adhezije sadrže proteine talin 2 i KANK2. Uloga ovih proteina u FA je da ih povezuju s CMSC-om, odnosno da povezuje dva dijela citoskeleta, aktin i mikrotubule. Uloga talina 2 i KANK2 u RA je još uvijek nepoznata, no vrlo vjerojatno ostvaruju interakciju i reguliraju tvorbu RA. Proteini talin 2 i KANK2 su potencijalne mete za kombinirano liječenje tumora s PTX jer njihovim utišavanjem stanice MDA-MB-345S postaju osjetljivije na PTX i smanjena im je migratorna sposobnost. Pretpostavljamo da bi lijekovi usmjereni na ove proteine mogli dati jednoznačjniji odgovor u odnosu na lijekove usmjerene na integrin α V ili β 5. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja na drugim staničnim linijama melanoma kako bi se to potvrdilo.

8. SUMMARY

Melanoma is an aggressive type of tumor prone to metastases, which makes it difficult to treat. Despite the development of targeted agents and immunotherapy, a fraction of melanoma patients are still treated with antitumor drugs such as the microtubule poison, PTX. Since therapy with antitumor drugs is not as effective in melanoma as it is for some other tumors, there is an urge to find new targets and approaches to improve its efficacy. One of the potential targets within the tumour cells are proteins of cell adhesion, that cells use to attach and interact with their environment. One of the best-studied transmembrane receptors are integrins, which regulate cell survival, proliferation, motility and differentiation. The activation of integrins leads to the formation of dynamic IACs, composed of many adapter and signaling proteins and proteins that bind the cell cytoskeleton. However, so far, integrin-based therapeutics have proven to be ineffective in clinical trials for tumour therapy. Therefore, we aim to better understand integrin-mediated signalling and to search for another target within the IAC that will provide a more uniform response in tumour therapy. Using different methods of molecular and cell biology, with an emphasis on MS, it was previously shown that the decreased amount of integrin αV , i.e. $\alpha V\beta 5$ FA and the protein KANK2, a component of CMSC, can increase the efficacy of PTX and reduce the migration of melanoma cells MDA-MB-435S (Paradžik et al., 2020). In this thesis, we have described the molecular mechanism of increased sensitivity of MDA-MB-435S melanoma cells after knockdown of integrin αV , talin 2 or KANK2. We proved that KANK2 interacts with talin 2 from $\alpha V\beta 5$ FA and thus represents a link between FA and CMSC, that is actin and microtubules. Disruption of their interaction, either by knockdown of integrin αV , talin 2 or KANK2, results in increased sensitivity of cells to PTX and reduced migration. The mechanism of increased sensitivity to PTX is a result of changed microtubule dynamics, more specifically, an increased velocity of microtubule growth, caused by FA disruption (knockdown of αV integrin) or loss of interaction between FA and CMSC (knockdown of talin 2 or KANK2). Additional evidence for this mechanism is the more pronounced effect of PTX in cells with a higher velocity of microtubule growth. Additionally, in this paper we present the different roles of the talin homologs, talin 1 and talin 2, in MDA-MB-435S cells. Namely, the role of these two homologues in FA is poorly described in the literature. Our research shows that the role of talin 1 and 2 is different and unique and after the knockdown of one of the homologues, there was no evidence of its mutual compensation in the cells. Talin 1 is crucial for the activation of integrin $\beta 5$ and the formation of $\alpha V\beta 5$ FA, and upon its knockdown cells are unable to adhere and their proliferation is significantly reduced. On the other hand, talin 2 is not necessary for the formation of $\alpha V\beta 5$ FA, but it connects them with CMSC by interacting with

the KANK2. Talin 2 knockdown leads to an increased size of α V β 5 FA, but due to the lack of quantitative methods, it is not clear whether this is accompanied by a small compensation with talin 1. However knockdown of talin 2 results in an increase of myosin IIA filaments and the amount of stress fibers. Based on these results, we hypothesize a mechanism in which a disruption of talin 2- KANK2 interaction leads to the uncoupling of microtubules from the cell membrane, release of the GEF-H1, activation of the Rho/ROCK signaling pathway, which results in an increased myosin IIA filaments, stress fibers, an actin-binding protein α -actinin 4 and FA size. In addition, we investigated the role of another KANK protein homologue, KANK1. KANK1 localization and expression is different compared to protein KANK2 in MDA-MB-435S cells. Its knockdown does not change velocity of a microtubule growth nor increases sensitivity of cells to PTX. In this study, we investigated the composition of another type of α V β 5 mediated adhesions, RA. We have confirmed that RAs of MDA-MB-435S cells are composed of already validated proteins, however, we have presented the new component, KANK2. We have shown that both talin 2 and KANK2 regulate the formation of RAs. Knockdown of either one results in a reduced amount of major components of RA, however, the amount of α V β 5 remains the same. In addition, talin 2 knockdown leads to a reduced amount of KANK2 in RA and *vice versa*, suggesting their interaction in α V β 5 RA as well. However, their exact role in RA remains to be discovered. In conclusion, this doctoral study analyzes two types of integrin α V β 5 adhesions, FA and RA, revealing that both adhesions contain talin 2 and KANK2. The role of these proteins in the FA is to connect them with CMSC, that is, to connect the two parts of the cytoskeleton, actin and microtubules. The role of talin 2 and KANK2 in RA is still unknown, but it is very likely that they interact and have an important role in the regulation of the formation of RA. Knockdown of talin 2 or KANK2 results in increased sensitivity to PTX and reduced migration of MDA-MB-435S cells, which makes both talin 2 and KANK2 potential targets for combined therapy with PTX. We hypothesize that targeting these proteins could provide a more uniform response than targeting α V or β 5 integrins. However, further studies using other melanoma cell lines are needed to confirm this effect.

9. PRILOZI

9.1. Rezultati MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom FA i RA u stanicama MDA-MB-435S

U tablici 11 nalaze se rezultati MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom IAC-a bez korištenja kemijskog umreživača i cyto D (uzorak DMSO), nakon korištenja kemijskog umreživača, ali bez korištenja cyto D (uzorak DTBP (FA+RA)) te nakon korištenja kemijskog umreživača i cyto D (uzorak Cyto D (RA)) u stanicama MDA-MB-435S. Prikazano je 307 najzastupljenijih proteina od ukupno 745 detektiranih proteina u uzorcima.

Tablica 11. Rezultati MS-a uzoraka proteina FA i RA u stanicama MDA-MB-435S.

Naziv proteina (engleski)	Kratica	Oznaka	DMSO				DTBP (FA+RA)				Cyto D (RA)			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Broj spektara</i>														
Tenascin C	TNC	A0A024R884	445	427	416	320	342	522	452	321	309	438	466	224
Tenascin	TNC	J3QSU6	409	389	0	0	319	470	411	292	286	0	426	206
Myosin-9	MYH9	P35579	156	282	274	215	277	273	317	255	198	265	287	185
Non-muscle myosin heavy chain 9	MYH9	A0A0U4BW16	0	245	237	0	0	0	0	0	0	224	246	0
Plectin	PLEC	Q15149	93	39	7	5	567	107	262	93	421	104	267	50
Transforming growth factor-beta-induced protein	TGFBI	Q15582	132	201	203	149	94	199	161	133	93	199	161	104
Talin-1	TLN1	Q9Y490	37	98	95	79	218	118	160	111	165	108	167	80
Vimentin	VIM	P08670	71	78	77	93	210	93	129	98	179	60	117	96
Filamin-A	FLNA	P21333	62	64	58	45	294	68	174	88	232	49	111	43
CYR61 protein	CYR61	Q6FI18	126	91	114	123	81	83	88	87	92	101	106	78
Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	P63261	45	65	61	56	130	69	115	79	138	65	90	66
ITGAV protein	ITGAV	A5YM53	75	78	83	68	86	88	77	62	80	93	103	52
Neuroblast differentiation-associated protein	AHNAK	Q09666	8	0	0	0	396	15	73	12	334	2	44	3
Keratin 1	KRT1	H6VRF8	129	59	53	58	79	64	41	54	200	75	52	54
EMILIN-1	EMILIN1	Q9Y6C2	72	82	91	89	51	91	78	64	48	82	83	60

Sushi repeat-containing protein SRPX	SRPX	P78539	95	81	81	73	62	90	59	51	69	89	64	38
Semaphorin-3C	SEMA3C	Q99985	73	80	88	58	38	77	73	58	51	86	75	45
Thrombospondin-1	THBS1	P07996	142	55	56	41	87	56	43	48	101	55	50	33
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	P35908	97	49	42	44	72	44	29	44	200	67	34	40
Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	P13645	78	51	49	50	75	49	37	40	154	68	39	35
Integrin beta-5	ITGB5	P18084	58	63	54	50	64	73	52	40	64	77	79	45
Talin-2	TLN2	Q9Y4G6	0	0	0	0	128	55	84	29	127	80	146	42
Glia-derived nexin	SERPINE2	P07093	64	72	65	66	47	75	51	45	46	75	49	51
Myosin-10	MYH10	P35580	45	66	75	54	56	55	65	56	45	55	65	45
Serine protease 23	PRSS23	O95084	61	60	62	63	46	69	59	54	49	69	58	48
Tubulin beta chain	TUBB	P07437	48	43	45	53	60	49	68	62	54	39	52	73
Filamin-B	FLNB	O75369	11	8	0	0	212	24	120	32	143	7	44	6
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	P68104	49	58	47	46	49	65	59	57	54	69	46	44
Clathrin heavy chain 1	CLTC	Q00610	33	19	14	13	113	36	49	19	165	53	90	28
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	LTBP1	Q14766	47	70	81	74	20	63	53	31	15	64	59	35
Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	P68371	42	39	42	50	53	45	58	58	0	35	45	66
Semaphorin-3D	SEMA3D	O95025	47	48	61	48	27	53	52	40	28	56	48	31
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1	P46940	18	37	24	17	135	42	48	31	109	31	38	13
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	P11142	39	32	31	33	63	43	54	51	68	34	57	37
Fibronectin 1, isoform CRA_n	FN1	A0A024R462	74	44	53	40	63	40	45	38	36	29	39	19

Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	P68363	36	40	36	39	49	47	51	48	45	40	47	40
Annexin OS	ANXA2	A0A024R5Z7	55	40	41	43	54	44	36	37	55	41	37	39
Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	P68366	38	42	35	39	45	45	48	46	43	41	44	42
Actinin alpha 4 isoform 1 (Fragment)	ACTN4	A0A0S2Z3G9	6	4	2	5	173	20	87	32	122	2	40	6
Histone 1, H1e	HIST1H1E	A3R0T8	40	35	37	48	25	41	58	61	29	39	32	40
Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	P35527	71	29	26	45	51	30	14	27	99	35	27	33
Secreted frizzled-related protein 1	SFRP1	Q8N474	50	37	41	51	32	33	34	35	37	41	39	37
Histone H1.5	HIST1H1B	P16401	36	36	37	43	22	46	50	64	25	39	30	35
Tubulin alpha chain	TUBA1C	F5H5D3	32	0	0	0	46	0	46	0	43	0	0	0
Elongation factor 2	EEF2	P13639	22	28	17	12	65	39	57	48	65	26	45	18
cDNA FLJ53662, highly similar to Actin		B7Z6P1	0	0	0	24	0	0	49	0	0	28	0	0
Tubulin beta-4A chain	TUBB4A	P04350	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0	52
Semaphorin -3E	SEMA3E	O15041	28	39	56	32	12	47	47	35	16	40	39	22
Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	Q05639	30	43	33	28	29	47	39	35	34	52	30	30
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1	Q01082	1	0	0	0	163	8	53	7	148	2	36	4
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	SPTAN1	Q13813	4	0	0	0	174	5	39	9	150	0	34	4
Dickkopf-like protein 1	DKK1	I1W660	37	31	42	51	31	30	28	27	31	31	32	35
A disintegrin and metalloprot	ADAMT S1	Q9UHI8	61	37	31	34	40	35	23	18	44	31	25	16

einase with thrombospondin motifs														
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P04406	43	34	31	30	38	37	27	32	43	35	26	25
Actinin, alpha 1, isoform CRA_a	ACTN1	A0A024R694	6	4	3	0	156	16	66	19	87	4	22	0
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	P35625	41	32	33	27	29	34	24	34	29	36	31	31
Pyruvate kinase PKM	PKM	P14618	34	44	31	29	30	35	31	34	27	38	29	28
Periostin	POSTN	Q15063	25	42	40	41	14	40	36	35	15	38	35	30
Annexin A1	ANXA1	P04083	39	38	27	28	35	40	26	29	36	41	26	32
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90A B1	P08238	21	32	26	23	40	36	51	35	36	24	41	22
Hemoglobin subunit alpha	HBA2	A0A1S5UZ39	15	37	44	53	10	34	26	29	13	32	36	35
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90A A1	P07900	30	34	32	23	30	32	39	34	33	21	40	24
Moesin	MSN	P26038	55	24	18	18	64	24	27	19	63	17	25	11
Keratin, type I cytoskeletal 14	KRT14	P02533	56	23	20	26	29	16	11	24	78	32	13	23
Hexokinase-1	HK1	P19367	36	28	16	10	29	59	29	38	17	31	31	10
Keratin, type II cytoskeletal 5	KRT5	P13647	51	24	21	30	39	20	9	24	72	34	15	20
Semaphorin-3A	SEMA3A	Q14563	33	33	50	31	18	34	31	19	26	30	32	12
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4	LTBP4	A0A0C4DH07	19	42	45	52	3	43	32	19	2	41	39	21
Pyruvate kinase	PKM2	A0A024R5Z9	0	0	0	0	0	34	0	30	0	0	0	0
cDNA FLJ46846, similar to AHNAK (Fragment)		Q6ZQN2	0	0	0	0	138	0	0	0	124	0	0	0
Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B	P04259	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39	0	0

cDNA FLJ53698, highly similar to Gelsolin		B7Z992	23	29	26	29	29	29	27	22	29	24	27	23
Prelamin-A/C	LMNA	P02545	27	15	6	17	42	34	42	37	30	13	40	21
Keratin, type II cytoskeletal 6C	KRT6C	P48668	44	30	14	28	35	20	0	26	55	37	15	25
Myosin-11	MYH11	P35749	0	32	35	24	0	27	0	0	0	28	33	0
Vinculin	VCL	P18206	6	5	5	7	105	4	51	18	46	9	33	20
Plasminogen activator	PLAT	B8ZX62	33	29	29	21	23	35	24	17	25	32	23	17
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1	Q14204	43	25	13	7	40	26	33	13	44	20	27	2
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	MACF1	H3BPE1	0	6	0	0	113	7	24	4	96	5	34	0
Serum albumin	ALB	P02768	19	27	25	30	15	26	24	25	19	27	25	27
Prothrombin	F2	P00734	27	22	25	26	20	25	22	28	21	27	26	26
Nestin, isoform CRA_c	NES	D3DVC4	0	1	0	9	77	17	46	19	57	3	32	13
Keratin, type I cytoskeletal 16	KRT16	P08779	44	24	0	24	22	0	0	19	43	21	0	31
Complement C3	C3	P01024	23	23	25	25	16	28	20	26	15	24	22	24
Histone H1.1	HIST1H1A	Q02539	24	19	24	32	12	25	20	27	15	26	18	23
Plectin (Fragment)	PLEC	E9PMV1	0	0	0	0	65	0	0	0	0	0	0	0
Heat shock 70 kDa protein 1B	HSPA1B	A0A0G2JIW1	18	19	25	26	29	20	23	21	25	10	27	13
Vitronectin	VTN	P04004	32	17	17	23	21	13	16	14	20	17	18	14
Cell proliferation-inducing protein 41		A1KY36	14	31	32	24	9	29	19	18	8	28	15	14
Myosin-14	MYH14	Q7Z406	0	0	0	0	30	0	0	0	17	0	0	0
Collagen alpha-1(VIII) chain	COL8A1	P27658	0	29	31	24	0	27	18	16	0	27	15	13
Connective tissue	CTGF	Q5M8T4	39	19	20	21	21	24	10	13	28	22	21	9

growth factor														
Alpha-2-macroglobulin	A2M	P01023	20	24	25	22	16	22	21	22	16	21	20	21
Radixin	RDX	B0YJ88	45	14	0	0	49	15	0	0	49	0	11	0
Matrilin-2	MATN2	O00339	21	29	28	19	10	32	22	14	9	30	23	6
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	P60842	18	18	16	15	27	22	25	21	26	14	21	12
Ribosomal protein S27a	RPS27A	Q5RKT7	16	8	3	8	34	15	17	11	50	23	24	14
Semaphorin-3B	SEMA3B	Q13214	14	29	34	17	2	25	22	13	2	30	26	10
Growth/differentiation factor 15	GDF15	Q99988	20	20	23	25	14	22	16	14	15	18	19	19
Tubulin beta-1 chain	TUBB1	Q9H4B7	15	19	25	22	16	18	20	23	12	15	16	24
Ezrin	EZR	P15311	39	0	0	9	47	0	0	10	47	0	11	0
Histone H4	HIST1H4A	P62805	23	16	12	14	19	23	24	17	17	13	14	21
Keratin, type I cytoskeletal 17	KRT17	Q04695	28	15	0	16	0	0	0	13	38	28	0	0
cDNA FLJ33834 similar to AHNAK		Q8N274	0	0	0	0	82	0	0	0	74	0	0	0
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2	P19823	15	17	17	15	8	22	19	18	11	20	18	17
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNP U	Q00839	14	16	13	15	14	23	17	19	9	17	19	7
Lactadherin	MFGE8	Q08431	17	22	22	22	10	23	11	14	12	19	14	7
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	ITIH3	Q06033	4	24	28	18	2	24	18	14	0	22	18	12
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	P21796	21	13	11	12	20	27	13	19	14	14	14	9
Nucleolin	NCL	P19338	21	11	12	17	10	15	21	14	11	9	17	10
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	P02765	13	16	17	20	11	16	12	18	11	13	16	16
Complement C4-A	C4A	POCOL4	19	14	13	13	13	16	11	12	15	16	15	12

Tensin-3	TNS3	Q68CZ2	0	0	0	0	31	8	20	6	32	18	40	9
Alpha-enolase	ENO1	P06733	13	18	17	14	18	12	13	9	17	9	20	10
Kinesin-1 heavy chain	KIF5B	P33176	23	17	14	10	14	15	13	6	15	15	8	8
Synemin	SYNM	O15061	0	1	2	2	61	8	20	6	49	2	13	5
cDNA FLJ53573, highly similar to Myosin Ic		B7Z3E5	13	4	2	2	49	14	20	8	38	2	10	0
Liprin-beta-1	PPFIBP1	Q86W92	0	2	0	0	53	7	22	2	44	0	27	5
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	P00558	8	15	15	20	11	10	13	13	11	11	19	12
Fibulin-1	FBLN1	P23142	13	16	21	14	8	16	14	14	6	17	18	7
Plasminogen	PLG	A0A0F7G8J1	9	16	18	16	7	15	16	14	7	14	16	13
Plasminogen	PLG	P00747	7	14	16	12	0	19	22	17	4	18	18	12
Integrin-linked protein kinase	ILK	A0A0A0MTH3	2	8	11	14	23	10	12	11	22	11	17	11
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	P62937	11	13	11	12	21	9	13	13	16	7	10	13
AP-2 complex subunit alpha-1	AP2A1	O95782	2	2	0	0	24	9	10	2	49	15	25	3
Nucleolar protein 56	NOP56	O00567	13	14	16	11	8	15	12	11	9	14	13	6
Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1	P11940	10	9	9	13	18	13	12	15	14	15	12	9
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	P17844	9	12	9	13	10	16	11	11	10	15	10	13
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	P78527	36	6	1	0	12	17	17	3	18	6	11	0
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	P04075	15	10	8	13	14	14	6	13	16	9	13	10
Hemicentin-1	HMCN1	Q96RW7	12	13	29	16	0	17	19	13	0	7	16	0
Coagulation factor V	F5	P12259	22	9	10	10	16	9	8	9	19	8	11	8

Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	EIF2S3	P41091	17	11	9	8	10	16	8	7	15	13	9	2
Protein disulfide-isomerase	P4HB	P07237	15	14	13	16	9	13	8	10	7	13	10	12
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3 variant		Q59GX6	6	11	4	9	10	12	15	14	14	11	12	11
40S ribosomal protein S3	RPS3	P23396	15	11	8	11	14	15	9	9	12	13	9	8
Adenosylhomocysteine	AHCY	P23526	16	12	12	12	14	7	7	12	15	9	11	6
Transketolase	TKT	P29401	10	14	8	3	13	15	14	14	14	4	14	7
SLC25A5 protein (Fragment)	SLC25A5	Q6NVCO	13	12	9	10	13	12	11	10	8	10	13	8
Cartilage oligomeric matrix protein	COMP	P49747	2	18	15	17	0	8	11	12	0	11	14	6
Galectin-1	LGALS1	P09382	12	10	7	9	16	14	14	13	9	7	7	9
Protein Wnt-5b	WNT5B	Q9H1J7	16	9	13	10	8	13	7	9	6	11	10	7
Utrrophin	UTRN	P46939	0	0	0	0	49	0	10	0	51	0	13	0
ADP/ATP translocase 3	SLC25A6	P12236	0	13	0	0	13	0	0	0	9	0	0	0
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	P11021	15	10	4	6	15	13	11	10	13	6	12	6
Histone H1.0	H1FO	P07305	10	8	9	11	7	9	8	22	8	10	6	16
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	P45880	12	9	7	7	16	15	11	11	10	8	10	7
Slit homolog 2 protein	SLIT2	O94813	48	7	9	4	18	6	0	0	20	6	0	0
Neurotrypsin	PRSS12	P56730	10	14	15	11	0	14	8	5	4	16	12	6
60S ribosomal protein L23a	RPL23A	A8MUS3	9	11	10	13	8	12	6	4	8	11	6	8
Histone H2B type F-S	H2BFS	P57053	11	9	10	11	10	10	9	10	11	9	10	10

Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	P67809	9	15	9	13	3	8	10	9	6	11	8	11
N-acetylglucosamine 2-epimerase	RENBP	P51606	22	11	8	10	8	10	3	4	8	9	8	5
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	P10809	17	10	2	5	19	11	7	8	15	3	7	6
Tissue factor pathway inhibitor	TFPI	P10646	12	9	11	14	9	9	8	8	7	7	8	10
40S ribosomal protein S7	RPS7	P62081	9	15	11	9	2	9	5	7	4	13	6	11
cDNA FLJ54588, highly similar to Major vault protein		B4DDR2	0	5	2	0	3	24	15	12	6	19	15	4
40S ribosomal protein S8	RPS8	P62241	13	8	7	8	10	7	5	10	13	7	7	9
60S ribosomal protein L6	RPL6	A0A024RBK3	10	10	4	7	8	13	11	9	10	12	4	9
eIF4G1 protein	EIF4G1	B2RU06	3	10	4	4	7	9	14	10	7	8	7	6
Leukocyte antigen	HLA-A	O15506	6	7	8	7	9	10	9	8	8	7	9	11
Bone morphogenetic protein 1	BMP1	P13497	13	9	16	8	4	9	8	8	5	14	9	2
CD109 antigen	CD109	Q6YHK3	6	3	3	2	26	3	5	15	15	2	4	16
Complement decay-accelerating factor	CD55	B1AP13	8	10	11	12	4	9	6	7	4	10	6	5
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	C1QTNF3	Q9BXJ4	10	8	11	12	8	10	7	7	9	7	6	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	P52272	2	7	5	5	9	12	15	14	5	3	12	11

40S ribosomal protein S3a	RPS3A	Q6NXR8	8	9	9	11	7	14	6	5	5	10	9	7
KN motif and ankyrin repeat domains 1	KANK1	Q6PIB3	0	0	0	0	37	2	9	0	34	0	16	0
Integrin beta-1	ITGB1	P05556	1	10	5	4	10	15	9	7	8	11	15	4
EH domain-containing protein 3	EHD3	Q9NZN3	0	10	12	14	0	7	9	9	0	9	9	8
Antithrombin-III	SERPINC1	P01008	13	7	8	7	6	7	4	5	6	7	7	6
Serpin peptidase inhibitor, clade D (Heparin cofactor)	SERPIND1	Q8IVC0	5	15	11	7	2	10	14	5	4	9	9	4
Fatty acid synthase	FASN	P49327	3	5	3	0	15	5	17	7	24	1	8	0
WD repeat domain 1, isoform CRA_a	WDR1	Q53GN4	5	9	11	5	7	5	6	5	17	5	11	3
Fermitin family homolog 3	FERMT3	Q86UX7	17	7	7	8	9	8	8	4	9	6	8	5
AP-2 complex subunit beta	AP2B1	P63010	0	0	0	0	19	3	9	0	40	6	15	0
KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	KANK2	Q63ZY3	0	0	0	0	32	0	10	0	33	0	18	2
Nucleophosmin isoform 2 (Fragment)	NPM1	A0A0S2Z491	4	7	7	9	8	7	12	11	7	4	9	13
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	A0A1X7SB22	5	8	5	9	5	7	7	9	6	6	6	12
Calpain 2, large [catalytic] subunit variant (Fragment)		Q59EF6	0	10	6	9	0	12	7	11	0	16	10	4
Elongation factor 1-gamma	EEF1G	P26641	5	9	6	7	10	9	10	10	7	3	8	6

14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	P63104	6	5	7	7	11	7	8	7	10	6	10	8
Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	Q08380	18	5	4	8	10	9	8	8	6	8	6	6
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3	Q9Y277	10	7	6	7	9	13	8	9	4	8	9	3
Septin 9, isoform CRA_a	SEPT9	A0A024R8V0	2	2	0	0	34	2	18	7	19	0	4	1
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1	P63000	10	10	7	10	7	9	7	6	6	10	5	6
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	Q9NR30	5	12	10	7	5	11	8	5	2	7	6	3
Alpha-1,4 glucan phosphorylase (Fragment)		Q59GM9	0	11	9	3	10	6	6	9	6	7	16	4
Pleckstrin homology-like domain family B member 2	PHLDB2	Q86SQ0	0	0	0	0	36	0	11	0	34	0	9	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	B2R5W2	9	9	11	11	5	7	6	6	5	10	6	8
Transforming protein RhoA	RHOA	P61586	6	8	6	13	4	11	8	5	4	8	8	6
Histone H2A	HIST1H2AC	A0A024R017	8	7	6	9	9	9	8	7	7	8	7	8
Laminin subunit beta-1	LAMB1	G3XAI2	28	7	6	7	7	5	4	3	5	3	4	2
Endoplasmic reticulum chaperone protein BiP	HSP90B1	P14625	14	11	9	7	6	8	5	6	9	6	7	5
Staphylococcal nuclease domain containing 1, isoform CRA_b	SND1	A0A140VK49	8	8	0	3	13	6	9	4	12	5	7	0
Copine-1	CPNE1	B0QZ18	5	10	6	8	6	8	4	8	7	9	3	1
Non-POU domain-containing protein	NONO	Q15233	8	6	2	7	13	5	8	11	11	0	6	8

octamer-binding protein														
Alpha-fetoprotein	AFP	P02771	3	10	8	9	0	12	6	10	0	7	6	11
AP-2 complex subunit alpha-2	AP2A2	O94973	0	0	0	0	13	0	0	0	34	0	16	0
40S ribosomal protein S13	RPS13	P62277	8	8	7	7	4	9	6	5	6	10	7	11
ATP-dependent 6-phosphofru ctokinase, platelet type	PFKP	Q01813	15	12	7	7	4	11	4	6	4	9	5	2
ELKS/Rab6-interacting/ CAST family member 1	ERC1	Q8IUD2	0	0	0	0	38	0	10	3	24	0	12	0
L-lactate dehydrogen ase A chain	LDHA	P00338	7	8	7	7	10	5	4	6	11	4	7	6
Galectin-3	LGALS3	P17931	0	10	7	8	2	7	8	10	1	5	7	14
60S ribosomal protein L26	RPL26	P61254	16	5	7	6	8	6	4	7	8	6	4	5
Transformin g growth factor beta-2	TGFB2	P61812	10	4	8	13	7	4	7	6	8	3	6	10
60S ribosomal protein L9	RPL9	P32969	7	11	9	10	5	11	5	3	8	11	4	2
Coronin	CORO1C	A0A024 RB15	0	5	6	3	18	6	7	4	16	7	9	0
Alpha-1,4 glucan phosphoryla se	PYGL	E9PK47	4	11	11	9	0	7	6	8	0	6	10	6
Thrombosp ondin-4	THBS4	P35443	4	9	9	7	4	10	7	7	4	6	11	6
Heterogene ous nuclear ribonucleop rotein K, isoform CRA_d	HNRPK	A0A024 R228	4	9	3	7	3	6	9	17	5	2	8	12
Septin-7	SEPT7	Q16181	2	2	3	2	22	2	14	7	15	3	5	5
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	P62258	5	3	0	6	18	5	8	6	11	5	7	8
Thrombosp ondin type-1 domain-	THSD4	Q6ZMP0	13	10	10	8	4	8	5	4	3	9	5	4

containing protein 4														
EH domain-containing protein 1	EHD1	A0A024R571	9	8	9	10	2	6	8	6	4	7	6	6
Deleted in autism protein 1	C3orf58	Q8NDZ4	12	10	12	10	2	11	4	5	3	7	5	5
Adenylyl cyclase-associated protein	CAP1	D3DPU2	3	7	8	6	10	7	7	6	14	7	9	3
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	P23246	7	5	4	6	6	5	4	12	6	3	6	17
Histone H3.1	HIST1H3A	P68431	7	5	5	6	7	6	9	10	6	5	7	10
ADP-ribosylation factor 1	ARF1	P84077	8	6	9	8	6	8	8	8	6	7	6	2
Hyaluronan-binding protein 2	HABP2	Q14520	11	9	8	8	10	8	5	5	9	5	6	0
Uncharacterized protein		A0A1W2PNV4	4	2	2	0	14	2	1	0	34	4	10	2
Desmoplakin	DSP	P15924	25	0	0	2	7	0	0	0	35	7	0	2
Copine III, isoform CRA_a	CPNE3	A0A024R994	5	9	7	8	4	10	7	5	7	10	5	4
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	ADAMT S15	Q8TE58	5	11	12	6	0	10	8	4	0	10	9	2
Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	UACA	H0YNH8	0	0	0	0	37	0	10	0	26	0	6	0
60S ribosomal protein L22	RPL22	P35268	7	9	9	7	3	10	4	5	4	12	3	7
Galactose-3-O-sulfotransferase 4	GAL3ST4	Q96RP7	2	9	10	8	0	10	6	6	0	8	7	5
60S ribosomal protein L4	RPL4	P36578	5	7	3	9	7	10	7	3	7	7	6	4

Myosin light polypeptide 6	MYL6	B7Z6Z4	5	3	5	6	11	6	9	7	7	6	6	10
Ras-related protein Rap-1b	RAP1B	P61224	9	6	9	8	6	6	5	7	6	6	6	7
Midkine	MDK	E9PLM6	7	6	7	9	5	7	7	5	5	7	6	8
Matrix Gla protein	MGP	A0A024 RAX0	4	8	6	6	3	11	5	7	3	10	5	13
40S ribosomal protein S24	RPS24	A0A087 WU50	7	7	8	8	8	6	8	5	8	6	2	5
Calpain 1, (Mu/I) large subunit, isoform CRA_a	CAPN1	A0A024 R580	0	9	9	8	0	10	7	7	0	10	7	5
60S ribosomal protein L27	RPL27	P61353	7	7	9	5	5	8	8	7	5	7	3	5
Myb-binding protein 1A	MYBBP1 A	Q9BQG0	4	7	5	6	4	6	11	10	6	5	6	4
Keratin, type II cytoskeletal 1b	KRT77	Q7Z794	9	0	0	7	11	0	0	0	18	0	0	0
Triosephosphate isomerase	HEL-S-49	V9HWK 1	7	8	6	10	3	6	5	7	3	6	9	6
Septin-2	SEPT2	Q15019	4	3	0	0	18	5	12	7	15	2	6	2
Actin-related protein 2/3 complex subunit	ARPC1B	A4D275	0	0	0	0	13	0	0	0	30	0	0	0
Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	P12109	7	7	11	7	4	6	7	8	3	6	6	7
40S ribosomal protein S18	RPS18	P62269	6	10	5	6	7	5	4	4	5	9	6	8
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	Q13283	5	11	5	4	6	6	6	6	6	7	4	6
Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein	SNRPB	Q66K91	7	5	6	12	3	8	5	7	5	5	6	5
cDNA FLJ52561 similar to Four and a half LIM		B7Z4B7	7	6	10	10	2	7	6	4	5	7	7	3

domains protein 1														
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	O15144	3	0	0	0	12	0	2	0	36	2	6	2
ARP3 actin-related protein 3 homolog (Yeast), isoform CRA_a	ACTR3	A0A024RAI1	0	0	0	2	9	0	0	0	44	0	8	2
Eukaryotic translation initiation factor 2 beta	EIF2S2	B5BU01	7	7	7	6	4	8	6	4	4	9	7	4
Collagen triple helix repeat-containing protein 1	CTHRC1	Q96CG8	4	6	6	7	4	7	6	7	4	6	6	9
40S ribosomal protein S30	FAU	E9PR30	6	5	7	5	6	6	7	8	3	5	5	9
Vitamin D-binding protein	GC	P02774	8	5	6	8	5	7	4	6	5	7	6	5
40S ribosomal protein S14	RPS14	P62263	5	6	6	9	2	6	6	6	3	7	6	9
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	Q08211	5	7	6	2	5	10	10	6	4	4	10	0
ADP-ribosylation factor 4	ARF4	P18085	0	0	0	0	5	8	8	0	6	0	8	0
Fermitin family homolog 2	FERMT2	Q96AC1	0	0	0	0	18	3	9	0	14	5	13	3
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	E9PAV3	10	5	7	6	4	6	6	6	6	5	6	6
Transferrin receptor protein 1	TFRC	P02786	8	4	0	0	21	7	3	3	14	6	6	0
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	LRP1	Q07954	0	8	15	6	0	8	7	9	0	7	7	2

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4	Q14624	4	5	4	6	4	5	5	5	3	6	6	6
60S ribosomal protein L30	RPL30	P62888	8	8	6	6	6	9	5	3	5	7	5	3
Ribosomal protein L7, isoform CRA_a	RPL7	A0A024R814	7	6	3	6	5	6	5	3	7	8	5	6
Liprin-alpha-1	PPFIA1	Q13136	0	0	0	0	30	0	4	0	26	0	11	0
Beta-2-glycoprotein 1	APOH	P02749	7	6	6	5	5	4	4	6	5	6	4	4
60S ribosomal protein L8	RPL8	P62917	7	6	4	6	4	6	7	4	4	7	4	7
Complement C5	C5	P01031	8	10	8	5	4	6	3	4	5	6	3	3
L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	P07195	7	5	6	7	7	4	6	4	6	5	7	3
Agrin	AGRN	A0A087X208	24	5	6	0	11	5	4	4	4	2	0	0
Transgelin-2	TAGLN2	P37802	3	5	5	7	3	7	7	12	3	3	3	11
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	P05198	11	8	3	6	6	4	5	6	9	3	4	2
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	CNP	A0A024R1T5	4	8	6	6	2	9	3	1	3	7	1	3
Protein Wnt-5a	WNT5A	P41221	13	6	3	5	5	6	0	0	4	6	6	0
Ribosomal protein L5	RPL5	A2RUM7	6	6	5	5	4	9	4	4	5	6	3	2
Testicular secretory protein Li 63	UBE1	A0A024R1A3	3	10	7	4	2	5	6	6	2	4	8	5
40S ribosomal protein S4	RPS4X	B2R491	6	7	3	4	6	9	6	2	8	7	5	0
Zyxin	ZYX	Q15942	0	0	3	0	24	0	16	3	9	0	2	2
GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	B5MDF5	8	5	7	6	5	6	5	4	6	6	5	4
40S ribosomal protein S15a	RPS15A	P62244	6	7	4	3	4	7	5	4	7	8	5	6

60S ribosomal protein L11	RPL11	P62913	4	6	2	5	3	7	4	4	5	7	3	2
Serine protease 33	PRSS33	Q8NF86	3	8	5	6	2	6	4	5	3	10	5	5
60S ribosomal protein L7a	RPL7A	P62424	6	6	2	4	7	8	7	3	8	4	2	2
Beta-globin	HBB	C8C504	6	6	6	5	4	6	5	6	4	6	6	6
X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6	P12956	0	3	2	4	3	9	13	8	5	3	7	5
Myoferlin	MYOF	Q9NZM1	5	2	0	0	25	3	4	0	20	0	0	0
Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	P54136	6	2	2	0	14	4	5	6	11	2	4	3
Netrin-4	NTN4	Q9HB63	13	5	7	4	6	5	4	0	4	5	6	0
Collagen, type VI, alpha 3	COL6A3	D9ZGF2	7	7	7	5	0	8	4	4	3	8	6	3
Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	P36955	5	7	6	6	5	6	6	5	3	6	5	5
Importin-7	IPO7	O95373	3	8	5	4	5	8	9	3	3	6	7	2
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	Q7Z5T5	4	6	2	5	3	5	9	3	5	5	8	3
Lumican	LUM	P51884	3	9	9	9	0	4	6	5	0	4	5	3
40S ribosomal protein S19	RPS19	B0ZBD0	5	8	5	7	3	8	4	6	0	7	4	8
60S ribosomal protein L3	RPL3	P39023	8	7	3	3	5	10	3	3	5	7	4	0
Epididymis secretory protein Li 37	HEL-S-37	V9HWJ7	0	0	0	0	21	2	8	6	20	0	3	2
LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein	LIMS1	P48059	0	4	8	6	4	6	6	0	5	4	8	2
Dystonin	DST	E9PHM6	0	0	0	0	30	0	4	0	20	0	0	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNP H1	G8JLB6	4	5	3	4	7	7	7	8	6	3	5	5
Apolipoprotein B (Including	APOB	C0JYY2	7	7	7	5	3	6	3	6	2	5	4	3

Ag(X) antigen)														
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A 1	D6RGG3	23	2	4	2	10	2	2	3	1	0	2	2
Junction plakoglobin, isoform CRA_a	JUP	A0A024 R1X8	19	0	0	0	2	0	0	0	33	4	0	0
Inositol 1,4,5- trisphospha te receptor type 3	ITPR3	Q14573		0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	13
Four and a half LIM domains protein 2	FHL2	Q14192		0	0	0	0	2	0	0	0	23	0	5
Actin- related protein 2	ACTR2	P61160		2	0	0	0	32	0	9	3	13	0	0
Intersectin- 2	ITSN2	Q9NZM 3		0	0	0	0	19	0	3	0	0	0	0
Unconventi onal myosin-Va	MYO5A	Q9Y4I1		0	0	0	0	6	0	4	0	25	4	9
PDZ and LIM domain protein 7	PDLIM7	Q9NR12		0	0	0	0	5	0	0	0	30	0	2
Leucine zipper protein 1	LUZP1	Q86V48		0	0	0	0	3	0	0	0	28	0	5

9.2. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom FA i RA u stanicama MDA-MB-435S

U tablici 12 nalaze se rezultati statističke analize podataka dobivenih analizom MS uzoraka proteina FA i RA stanica MDA-MB-435S (poglavlje 9.1.). Rezultate MS-a obradili smo u programu Mascote u programu Scaffold kako bi dobili broj spektara za pojedini protein u uzorku. Statističku analizu rezultata proveo je dr. sc. Dalibor Hršak, znanstveni suradnik Zavoda za elektroniku, Instituta Ruđer Bošković u programu QSpec. Za svaki protein, na temelju broja spektara iz četiri replike, odredio je vrijednost FDR i fold change. Analizu je proveo na svih 745 detektiranih proteina, a statistički značajno promijenjene proteine naveli smo u tablici 12 te prikazali u poglavlju 3.7. u obliku dijagrama vulkano (FDR < 0,05, odnosno $-\log(\text{FDR}) > 1,3$; fold change > -1,5 (manja značajnost) ili > -2 (veća značajnost) te fold change < 1,5 (manja značajnost) ili < 2 (veća značajnost), odnosno $\ln(\text{fold change})$ veći ili manji od 0,405

(manja značajnost) ili veći ili manji od 0,693 (veća značajnost)). Proteini su obojani ovisno o funkciji prema UniProt podacima podacima i podacima baze podataka adhesome.org (<https://adhesome.org/components.html>): proteini citokeleta, proteini koji se vežu na citoskelet ili sudjeluju u njegovoj organizaciji, protini uključeni u endocitozu posredovanu klatrinom, proteini uključeni u međusobnim vezama između stanica, proteini uključeni u vezu stanica sa ECM-om, proteini uključeni u glikolizu i metabolizam, ostalo.

Tablica 12. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom FA i RA u stanicama MDA-MB-435S.

Naziv proteina, kratica	Oznaka	ln (fold change)	-log (FDR)
MYH9	P35579	-4,195	7
KRT1	H6VRF8	-0,528	7
KRT2	P35908	-0,643	7
CLTC	Q00610	-0,497	6
KRT17	Q04695	-1,498	4,7
TUBB4A	P68371	-2,77	4,4
ACTR3	AOA024RAI1	-1,603	3,9
KRT16	P08779	-0,86	3,7
KRT14	P02533	-0,659	3,5
KRT9	P35527	-0,513	3,1
JUP	AOA024R1X8	-2,222	3,6
DSP	P15924	-1,594	3,3
KRT6B	P04259	-2,521	3,4

AP2A1	O95782	-0,775	2,7
AP2A2	O94973	-1,233	2,8
ACTR2	P61160	-1,115	2,2
MYH11	P35749	-0,817	1,8
ARPC2	O15144	-1,124	1,8
ITSN2	Q9NZM3	-1,924	1,7
KRT5	P13647	-0,469	1,4
KRT6C	P48668	-0,517	1,3
TUBA1C	F5H5D3	0,651	1,4
MYO5A	Q9Y411	1,169	1,4
ZYX	Q15942	1,148	1,6
SEPT9	A0A024R8V0	0,865	1,7
PDLIM7	Q9NR12	1,408	1,5
LUZP1	Q86V48	1,807	1,8
VCL	P18206	0,454	2,02
HK1	P19367	0,503	1,8
FHL2	Q14192	1,859	2,1
ITPR3	Q14573	2,388	2,3

PKM2	AOA024R5Z9	2,763	4,2
ACTN1	AOA024R694	0,77	7
ACTN4	AOA0S2Z3G9	0,564	7
PLEC	E9PMV1	2,751	7
FLNB	O75369	0,611	7

9.3. Rezultati MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2

U tablici 13 nalaze se rezultati MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA iz stanica MDA-MB-435S nakon transfekcije s kontrolnom siRNA ili siRNA specifičnom za talin 1, talin 2 ili KANK2. Rezultate MS-a tri replike uzoraka obradili smo u programu Mascot te u programu Scaffold kako bi dobili broj spektara za pojedini protein u uzorku. Prikazano je 296 od ukupno 810 identificiranih proteina.

Tablica 13. Rezultati MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2.

Naziv proteina (engleski)	Kratica	Oznaka	si(-)			si(talin 2)			si(KANK2)			si(talin 1)		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Broj spektara														
Tenascin C	TNC	A0A024 R884	404	364	333	338	346	385	302	314	343	180	249	327
Plectin	PLEC	Q15149	499	394	328	342	255	118	438	303	247	119	128	162
Filamin-A	FLNA	P21333	239	176	144	212	209	105	264	185	124	57	66	68
Vimentin	VIM	P08670	207	173	144	129	134	91	195	158	149	77	87	102
Neuroblast differentiation- associated protein AHNAK	AHNAK	Q09666	274	122	95	197	139	40	243	84	47	46	17	37
Keratin 1	KRT1	H6VRG2	123	133	84	210	123	163	146	106	90	110	170	140
Talin-1	TLN1	A0A1S5 UZ07	193	178	161	162	157	124	138	147	118	16	28	48
Transforming growth factor beta-induced 68kDa isoform 1	TGFBI	A0A0S2 Z4Q2	131	116	106	110	108	130	100	90	114	56	78	96
Thrombospondi n-1	THBS1	P07996	93	105	107	86	95	109	77	103	106	87	96	105
Talin-2	TLN2	Q9Y4G6	181	156	144	35	41	32	131	127	123	46	42	71
ITGAV protein	ITGAV	A5YM53	89	123	87	86	102	101	67	94	114	60	90	114
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	P35908	80	82	67	119	78	109	121	77	66	81	132	103
CYR61 protein	CYR61	Q6FI18	78	104	95	88	97	102	108	101	108	42	59	73
Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	P13645	78	80	58	112	70	108	107	65	59	71	124	92
Clathrin heavy chain	CLTC	A0A087 WVQ6	101	111	99	72	80	75	47	95	72	65	63	104
Filamin-B	FLNB	O75369	133	94	63	128	125	49	121	85	45	20	19	20
Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CRA_a	MYH9	A0A024 R1N1	130	64	46	121	78	55	145	62	50	49	48	40
Microtubule- actin cross- linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	MACF1	H3BPE1	128	66	76	107	72	42	141	54	53	32	14	27
Actinin alpha 4 isoform 1 (Fragment)	ACTN4	A0A0S2 Z3G9	114	79	69	106	102	35	102	90	61	28	30	30
Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	P35527	69	85	53	109	62	87	75	68	43	58	89	81
Spectrin alpha chain, non- erythrocytic 1	SPTAN1	Q13813	138	86	93	101	72	33	101	62	55	17	10	34
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	P60709	89	75	57	73	78	51	101	76	59	40	47	48
Ras GTPase- activating-like protein IQGAP1	IQGAP1	P46940	89	66	64	77	76	49	86	70	43	31	36	40
EMILIN-1	EMILIN1	Q9Y6C2	53	79	61	50	71	66	46	70	76	37	63	55

Spectrin beta chain	SPTBN1	B2ZZ89	122	64	67	81	51	25	97	41	47	9	5	25
Keratin, type II cytoskeletal 5	KRT5	P13647	41	51	31	63	43	67	53	47	27	63	102	57
Actinin, alpha 1, isoform CRA_a	ACTN1	A0A024R694	86	60	49	79	82	31	90	68	48	16	19	15
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	P11142	70	52	49	68	50	51	62	58	56	28	36	45
Serpin peptidase inhibitor, clade E (Nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)	SERPINE2	A0A024R498	58	54	52	40	37	53	55	48	59	51	61	64
Integrin beta	ITGB5	L7RT22	57	57	54	45	56	57	37	49	54	35	46	58
cDNA FLJ46846 fis, clone UTERU3004635, moderately similar to Neuroblast differentiation associated protein AHNAK (Fragment)		Q6ZQN2	107	45	37	77	42	0	89	0	0	0	0	0
Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B	P04259	0	50	0	50	0	0	45	0	0	61	92	38
HCG2039812, isoform CRA_b (Fragment)	KRT6A	A0A0S2Z428	38	50	27	47	33	42	40	37	26	62	92	35
Keratin, type I cytoskeletal 14	KRT14	P02533	38	52	24	59	35	49	38	35	23	50	74	44
Sushi repeat-containing protein SRPX	SRPX	P78539	40	41	44	30	30	41	30	29	42	28	36	69
Annexin	ANXA2	A0A024R5Z7	48	40	42	45	39	42	38	38	38	44	41	49
Semaphorin-3C	SEMA3C	Q99985	39	35	43	29	46	53	32	45	47	23	32	33
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	P68104	37	35	41	48	39	49	31	43	40	33	29	47
Fibronectin 1, isoform CRA_n	FN1	A0A024R462	29	43	27	38	49	43	36	64	36	17	24	21
Keratin, type I cytoskeletal 16	KRT16	P08779	35	50	22	49	29	39	33	31	21	54	63	35
Moesin	MSN	P26038	49	38	26	43	24	30	47	30	30	35	21	43
Elongation factor 2	EEF2	P13639	45	29	30	47	30	38	41	38	36	14	16	21
cDNA FLJ54379, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6E		B4DRY0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Serum albumin	ALB	P02768	21	26	24	45	26	32	32	27	29	29	52	35
Serine protease 23	PRSS23	O95084	41	39	41	30	31	33	26	30	31	26	26	39

Keratin, type I cytoskeletal 17	KRT17	Q04695	24	35	16	38	17	28	21	17	13	48	70	34
Vinculin, isoform CRA_c	VCL	A0A024QZN4	50	47	44	29	27	17	33	49	32	8	9	15
Tubulin beta chain	TUBB	P07437	20	20	35	37	36	41	19	31	27	20	35	32
Semaphorin-3D	SEMA3D	O95025	26	36	35	19	30	30	28	42	47	9	13	17
Hexokinase 1, isoform CRA_c	HK1	A0A024QZK7	7	47	26	17	32	44	2	53	37	9	32	34
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1	Q14204	31	23	29	34	25	28	20	27	20	6	21	17
Nestin, isoform CRA_c	NES	D3DVC4	44	35	26	28	21	7	55	30	26	9	8	17
Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	P68371	0	0	0	0	31	0	0	28	25	18	32	0
Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	Q05639	21	26	27	29	27	27	19	0	26	0	21	27
Radixin	RDX	B0YJ88	34	23	18	29	15	21	29	19	20	23	0	32
cDNA FLJ53698, highly similar to Gelsolin		B7Z992	21	24	26	21	27	24	24	25	24	23	21	21
Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	P68363	20	27	26	29	22	31	22	26	23	17	18	26
Ezrin	EZR	P15311	30	22	15	29	18	20	26	20	20	21	12	25
Annexin A1	ANXA1	P04083	27	24	26	25	22	22	24	24	24	24	20	25
Pyruvate kinase PKM	PKM	P14618	22	22	31	21	19	32	6	26	27	10	23	32
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	ADAMTS1	Q9UHI8	17	22	16	31	32	30	24	27	23	9	11	10
Liprin-beta-1	PPFIBP1	Q86W92	48	24	22	35	21	15	25	8	9	13	6	16
Tubulin alpha chain	TUBA1C	F5H5D3	0	26	0	28	0	29	21	25	0	0	0	25
Utrophin	UTRN	P46939	50	24	23	37	14	7	40	17	16	2	0	9
Unconventional myosin-1c	MYO1C	O00159	15	18	17	24	18	24	14	25	24	21	24	27
Prelamin-A/C	LMNA	P02545	10	17	21	15	17	22	27	20	26	20	17	28
ARP3 actin-related protein 3 homolog (Yeast), isoform CRA_a	ACTR3	A0A024RAI1	35	27	25	24	24	14	33	26	21	10	9	11
Tensin-3	TNS3	Q68CZ2	39	37	36	19	18	11	21	29	21	3	4	16
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A	P62979	25	15	15	18	16	16	22	15	20	12	13	23
Histone H1,2	HIST1H1C	P16403	23	23	22	22	23	20	24	18	27	17	20	19
Histone H1,5	HIST1H1B	P16401	22	20	21	21	20	22	26	17	25	16	23	24
Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	P68366	0	0	0	26	19	27	0	22	21	12	0	0

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P04406	20	17	29	18	16	28	13	20	20	17	22	23
Heat shock 70 kDa protein 1B	HSPA1B	A0A0G2JIW1	25	21	19	22	19	21	24	22	19	14	18	18
Keratin 77	KRT77	Q0IIN1	0	18	15	22	0	24	22	0	0	22	29	21
Alpha-2-macroglobulin	A2M	P01023	17	23	18	16	23	21	14	23	18	17	18	16
Dickkopf-like protein 1	DKK1	I1W660	18	20	21	23	23	23	22	23	25	8	10	14
ELKS/Rab6-interacting/CAS T family member 1	ERC1	Q8IUD2	35	21	13	40	13	11	39	6	14	8	0	9
Major vault protein	MVP	Q14764	5	9	10	7	13	12	7	8	9	26	45	69
Keratin, type II cytoskeletal 79	KRT79	Q5XKE5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0
Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	UACA	Q9BZF9	35	16	19	40	19	14	31	5	8	0	0	4
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	P60842	16	13	15	20	12	20	17	18	17	10	14	17
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	P35625	24	23	18	19	21	22	16	15	16	6	8	15
AP-2 complex subunit alpha-1	AP2A1	O95782	18	23	19	9	15	13	6	19	14	19	16	26
KN motif and ankyrin repeat domains 1	KANK1	Q6PIB3	30	21	15	30	13	10	33	15	11	9	3	5
Secreted frizzled-related protein 1	SFRP1	Q8N474	21	22	20	11	12	20	13	17	19	9	11	17
Keratin, type I cytoskeletal 15	KRT15	P19012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	P78527	9	23	13	12	12	18	6	25	16	2	9	19
Antithrombin-III	SERPINC1	P01008	22	16	15	15	11	14	14	12	16	15	15	19
Desmoplakin	DSP	P15924	3	12	3	27	6	10	6	6	4	27	28	10
Synemin	SYNM	O15061	30	21	18	7	8	3	35	17	13	2	3	5
Semaphorin-3E	SEMA3E	O15041	10	15	24	9	16	19	7	17	21	6	12	22
Semaphorin-3A	SEMA3A	Q14563	11	17	15	9	15	24	10	27	19	6	16	10
Transferrin receptor protein 1	TFRC	P02786	9	13	13	13	16	18	12	19	19	11	13	14
Myosin-10	MYH10	P35580	0	0	0	0	20	13	20	0	0	0	0	0
Complement C4-B	C4B_2	A0A0G2JL54	12	15	14	13	16	14	11	17	17	14	15	13
Keratin, type I cytoskeletal 13	KRT13	K7ERE3	0	18	0	0	17	0	0	0	0	0	23	15
Prothrombin	F2	P00734	17	13	19	14	13	19	9	14	14	11	13	15

Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	LTBP1	Q14766	10	11	18	6	14	24	8	14	17	4	9	20
Keratin, type II cuticular Hb3	KRT83	P78385	11	8	6	7	64	23	9	8	22	0	0	7
Actin-related protein 2	ACTR2	P61160	21	16	15	19	19	12	19	15	13	10	9	6
Vitronectin	VTN	D9ZGG2	12	16	13	12	11	14	8	10	15	13	11	15
Keratin, type II cuticular Hb6	KRT86	O43790	0	0	0	0	61	24	0	0	0	0	0	0
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	P21796	8	23	11	9	16	19	4	25	17	5	16	10
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	O15144	19	15	6	18	15	5	18	15	11	4	5	3
TRIO and F-actin-binding protein	TRIOBP	Q9H2D6	19	16	10	22	17	10	20	10	10	3	3	3
Histone H1,1	HIST1H1A	Q02539	0	0	14	0	0	13	14	0	18	0	13	13
Plasminogen activator	PLAT	B8ZX62	18	16	19	8	6	10	10	8	15	14	13	22
Keratin, type II cuticular Hb5	KRT85	P78386	0	0	0	0	66	16	0	0	19	0	0	0
Complement C3	C3	P01024	11	14	14	9	15	16	10	16	15	10	15	14
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	EIF2S3	P41091	13	9	12	12	10	13	9	7	9	9	12	17
Kinesin-like protein	KIF5B	D3DRX6	10	13	14	8	12	17	11	14	10	10	13	12
Keratin, type I cuticular Ha1	KRT31	Q15323	6	9	5	0	48	14	7	6	22	0	0	13
Mutant hemoglobin alpha 2 globin chain	HBA2	A0A0K2BMD8	11	12	9	10	13	15	13	16	14	8	9	10
Enolase 1, (Alpha), isoform CRA_a	ENO1	A0A024R4F1	13	9	14	16	10	14	13	7	13	8	11	11
Pleckstrin homology-like domain family B member 2	PHLDB2	Q86SQ0	18	13	4	43	2	7	18	0	4	10	0	3
Histone H2B	HIST1H2BD	A0A024QZZ7	8	10	11	12	12	15	6	13	14	8	9	12
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90A B1	P08238	15	8	8	25	3	11	16	5	11	11	6	20
Lymphocyte cytosolic	LCP1	A0A024RDT4	22	10	10	15	12	7	18	11	6	2	2	4

protein 1 (L-plastin), isoform CRA_a														
Keratin, type I cuticular Ha3-II	KRT33B	Q14525	0	0	0	0	39	13	0	0	18	0	0	0
Coagulation factor V	F5	A0A0A0MRJ7	8	11	12	12	12	10	5	14	11	13	12	11
Connective tissue growth factor	CTGF	Q5M8T4	10	10	10	11	10	16	9	10	14	3	4	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNP U	A0A1W2PPS1	2	5	7	9	4	11	6	8	8	19	18	21
Periostin, osteoblast specific factor, isoform CRA_c	P TN	A0A024RDS2	8	15	11	7	13	12	7	14	9	6	7	5
Fatty acid synthase	FASN	P49327	8	6	11	9	9	16	8	11	8	0	8	11
Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA	J3KPS3	10	8	14	15	5	14	7	9	11	6	15	12
AP-2 complex subunit alpha-2	AP2A2	O94973	12	16	0	0	7	0	0	12	8	10	11	22
Uncharacterized protein		A0A1W2PNV4	21	13	11	11	12	4	17	9	7	3	5	3
Collagen alpha-1(VIII) chain	COL8A1	P27658	7	12	6	8	8	13	6	7	7	7	12	13
Slit homolog 2 protein	SLIT2	O94813	13	10	5	5	3	3	21	8	12	5	4	14
Heat shock 60kDa protein 1 (Chaperonin), isoform CRA_a	HSPD1	A0A024R3X4	3	7	13	18	5	26	4	16	8	3	8	16
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X	A0A0D9SF53	11	6	9	18	8	12	13	7	8	13	8	8
Hyaluronan-binding protein 2	HABP2	Q14520	11	9	10	7	10	10	8	9	11	10	8	10
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	P11021	8	7	13	14	8	9	11	8	13	5	11	13
Galectin-1	LGALS1	P09382	10	12	12	8	11	10	8	12	10	5	10	11
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	P02765	8	11	11	8	11	14	9	13	12	10	10	11
Voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a	VDAC2	A0A024QZN9	6	13	7	8	9	14	4	19	12	5	16	9
Src substrate cortactin	CTTN	Q14247	16	14	4	13	10	1	14	13	6	3	0	2
Programmed cell death 6-	PDCD6I P	Q8WU M4	7	8	8	8	10	12	4	9	8	5	9	10

interacting protein														
Liprin-alpha-1	PPFIA1	Q13136	23	10	4	25	6	3	23	0	2	4	0	3
CYTA protein	CYTA	B2RMV2	16	9	4	21	2	1	36	2	5	4	0	2
AP complex subunit beta	AP2B1	A0A140VJE8	7	10	10	7	5	7	1	10	4	3	5	18
Fermitin family homolog 2	FERMT2	Q96AC1	21	12	8	9	6	9	8	12	5	0	0	5
Hornerin	HRNR	Q86YZ3	5	10	6	17	6	8	6	6	6	6	9	10
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	P17844	4	2	9	9	5	10	8	6	7	10	12	17
Keratin, type II cytoskeletal 78	KRT78	Q8N1N4	8	8	5	14	9	11	12	8	0	6	13	10
40S ribosomal protein S3	RPS3	P23396	5	6	9	8	9	10	6	9	10	11	13	12
Histone H4	HIST1H4H	B2R4R0	6	6	9	10	10	13	7	11	12	8	9	11
Actin-related protein 2/3 complex subunit	ARPC1B	A4D275	16	11	9	9	0	5	14	7	7	5	0	5
Unconventional myosin-le	MYO1E	Q12965	11	7	7	8	8	6	6	8	4	11	8	11
Epididymis luminal protein 4	YWHAZ	D0PNI1	12	9	7	11	8	9	10	10	9	6	9	8
Growth/differentiation factor 15	GDF15	Q99988	6	6	10	4	8	7	5	8	13	12	12	12
Integrin-linked protein kinase	ILK	A0A0A0MTH3	14	14	8	13	9	4	8	11	9	0	0	3
Junction plakoglobin, isoform CRA_a	JUP	A0A024R1X8	6	6	1	15	6	7	5	2	1	7	17	6
Dystonin	DST	E9PHM6	25	7	6	14	4	0	18	0	3	0	0	0
Epididymis luminal secretory protein 52	EL52	K9JA46	8	5	3	20	3	9	11	3	7	10	5	15
Nucleolin, isoform CRA_b	NCL	A0A024R4A0	8	4	6	12	4	8	9	6	10	17	7	12
Plasminogen	PLG	A0A0F7G8J1	9	9	8	6	6	7	10	5	9	11	7	9
Polyadenylate-binding protein	PABPC1	A0A024R9C1	5	4	9	8	7	9	5	10	7	7	7	10
Intersectin-2	ITSN2	A0A087WVF7	16	6	4	8	8	1	3	9	2	5	3	11
Inter-alpha (Globulin) inhibitor H2	ITIH2	A2RTY6	7	9	9	6	7	8	7	7	7	8	9	9
Collagen, type VI, alpha 3	COL6A3	D9ZGF2	4	7	7	6	7	8	8	7	7	6	10	8
Integrin beta-1	ITGB1	P05556	8	10	8	6	7	6	8	11	8	2	3	6
KN motif and ankyrin repeat	KANK2	Q63ZY3	16	12	5	19	5	6	0	0	0	6	0	3

domain-containing protein 2														
Keratin, type I cuticular Ha4	KRT34	A0A140TA69	0	0	0	0	37	0	0	0	0	0	0	0
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	PFKP	Q01813	6	7	6	8	5	7	5	6	7	8	9	12
Keratin, type II cytoskeletal 4	KRT4	P19013	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	B5BU24	10	0	8	8	5	6	10	7	7	0	0	6
Tensin-2	TNS2	F8VV64	15	11	10	10	7	5	6	6	4	0	0	0
Keratin, hair, acidic, 5, isoform CRA_a	KRTHA5	A0A024R1T2	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0
ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	P05141	3	2	7	8	4	12	2	11	11	2	10	8
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	Q08211	3	1	8	9	1	14	4	10	8	8	1	10
N-acylglucosamine 2-epimerase	RENBP	P51606	0	7	13	4	5	16	0	9	11	4	8	12
Keratin, type I cuticular Ha6	KRT36	O76013	0	0	0	0	25	10	0	0	10	0	0	0
Histone H1.0	H1FO	P07305	5	7	7	6	4	7	6	7	8	6	8	11
MYO1B variant protein	MYO1B	B0I1S9	14	5	5	11	10	0	18	7	5	0	0	3
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	SPTBN2	O15020	9	0	0	9	0	0	13	0	0	0	0	0
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	Q7KZF4	7	3	10	7	2	7	9	5	6	3	3	9
Elongation factor 1-gamma	EEF1G	P26641	4	3	7	7	5	10	6	7	6	3	3	6
Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	P54136	4	5	5	6	3	8	5	10	6	0	2	7
Sulfhydryl oxidase	QSCN6	A0A140VKE5	7	7	6	6	6	6	6	5	7	6	7	8
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	P62258	9	6	7	10	9	5	4	5	7	4	4	8
Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'' subunit alpha	PPP2R3A	Q06190	18	9	8	7	3	0	12	9	8	0	0	2
Copine III, isoform CRA_a	CPNE3	A0A024R994	6	6	3	5	5	7	5	5	7	7	6	12

Protein disulfide-isomerase	P4HB	A0A024R8S5	4	9	8	4	3	10	5	3	9	2	3	5
ADP/ATP translocase 3	SLC25A6	P12236	0	0	7	0	0	11	0	10	10	0	9	0
Histone H2A	H2AFJ	A0A024RAS2	3	3	8	6	7	8	6	7	7	4	8	8
Histone H3	H3F3B	B2R4P9	4	3	4	6	6	7	2	6	10	3	5	8
Transketolase	TKT	P29401	2	3	10	8	4	8	3	5	9	2	5	5
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	A0A1W2PQ51	0	0	0	5	0	7	5	3	7	7	9	10
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	D6RGG3	6	6	4	8	9	9	5	5	6	1	6	4
VAR5	VAR5	A0A024RCN6	3	5	6	6	5	8	3	6	6	3	5	9
Adenylyl cyclase-associated protein	CAP1	D3DPU2	7	8	4	10	8	4	9	6	5	3	2	6
Spondin-1	SPON1	Q9HCB6	6	7	7	4	5	6	6	6	7	9	8	5
Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	Q08380	3	4	3	4	8	5	5	8	7	3	8	10
Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	EPS15L1	Q9UBC2	11	6	2	4	4	2	7	6	3	8	3	10
Inter-alpha (Globulin) inhibitor H4 (Plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)	ITIH4	B2RMS9	4	6	5	4	4	5	5	6	7	6	7	6
Pleckstrin homology-like domain family B member 1	PHLDB1	Q86UU1	12	3	1	22	0	0	17	0	0	0	0	0
Metalloendopeptidase	BMP1	A5PLK9	8	3	5	4	2	4	6	4	3	4	4	10
14-3-3 protein theta	YWHAQ	P27348	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Protein Wnt-5b	WNT5B	Q9H1J7	5	5	5	5	7	9	5	8	6	2	5	3
WD repeat domain 1, isoform CRA_a (Fragment)	WDR1	Q53GN4	3	2	3	8	4	3	8	7	3	0	2	4
Drebrin-like protein	DBNL	Q9UJU6	9	5	5	9	5	2	10	7	5	0	0	0
Ras GTPase-activating protein nGAP	RASAL2	Q9UJF2	11	5	3	7	3	2	13	4	4	0	0	1
Voltage-dependent anion-selective	VDAC3	Q9Y277	0	7	5	4	6	6	0	11	7	4	6	6

channel protein 3														
CD109 antigen	CD109	Q6YHK3	6	9	4	6	6	7	10	10	9	0	0	0
Septin 9, isoform CRA_a	Sep-09	A0A024R8V0	9	4	3	9	5	1	10	4	3	1	4	4
Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	A0A087X0S5	4	8	6	4	6	4	3	8	4	4	6	5
cDNA FLJ76654, highly similar to Homo sapiens CD44 antigen (homing function and Indian blood group system) (CD44), transcript variant 4, mRNA		A8K309	7	6	5	3	4	6	6	5	3	3	3	4
L-lactate dehydrogenase	HEL-S-133P	V9HWB9	5	3	9	5	2	5	4	5	5	4	6	6
Insulin-like growth factor-binding protein 2	IGFBP2	P18065	6	9	6	2	3	6	4	5	6	7	3	4
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	P00558	3	2	8	6	3	10	4	3	6	3	4	7
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	Q9NR30	2	0	2	2	0	3	2	1	3	10	6	16
Matrilin 2, isoform CRA_b	MATN2	A0A024R9B9	3	6	8	0	0	2	0	4	9	3	9	10
C-type lectin domain family 3, member B, isoform CRA_a	CLEC3B	A0A024R2Q7	6	6	4	5	5	5	3	5	6	4	6	7
Chloride intracellular channel protein	CLIC1	Q5SRT3	8	6	4	8	7	5	10	5	4	4	2	4
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	P67809	3	3	2	3	4	5	2	4	4	4	7	9
Plastin-3	PLS3	P13797	9	5	5	7	6	0	11	4	0	0	0	0
40S ribosomal protein S8	RPS8	P62241	4	4	3	5	5	4	3	3	6	6	5	11
Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	Q15365	7	6	4	5	6	4	7	7	5	4	5	4
Myoferlin	MYOF	Q9NZM1	5	5	4	2	0	1	2	6	5	1	2	5
Copine-1	CPNE1	B0QZ18	4	4	2	3	4	5	4	4	3	5	9	7
AP-2 complex subunit mu	AP2M1	A0A087WY71	4	6	4	2	3	3	2	6	7	4	3	10
Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4	THSD4	Q6ZMP0	6	8	6	5	7	7	0	6	5	0	2	3

ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	P06576	0	0	8	4	0	11	2	8	6	0	7	8
Dynein light chain 1, cytoplasmic	DYNLL1	P63167	5	5	6	5	7	5	6	5	4	2	1	3
Complement decay-accelerating factor	CD55	B1AP13	3	6	4	2	2	5	4	1	4	0	0	6
Vigilin	HDLBP	Q00341	8	2	3	10	3	4	10	4	3	2	0	4
60S ribosomal protein L4	RPL4	P36578	2	3	3	2	2	3	2	6	4	2	4	6
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	B2R5W2	0	0	0	2	0	4	2	2	3	11	12	14
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	P05023	0	0	7	7	2	9	3	7	6	0	0	3
MHC class I antigen (Fragment)	HLA-A	F6IR09	4	3	3	4	4	4	2	4	4	3	3	6
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	P38646	0	0	4	6	3	7	6	6	4	0	3	6
Milk fat globule-EGF factor 8 protein, isoform CRA_a	MFGE8	A0A024RC55	4	2	8	3	5	8	3	2	2	4	4	7
C1QTNF3-AMACR readthrough (NMD candidate)	C1QTNF3-AMACR	E9PGA6	5	5	5	3	6	4	0	5	3	4	6	4
Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	P11216	3	2	9	7	2	9	1	3	5	0	3	8
Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	P21291	9	5	2	7	3	2	8	5	4	0	0	0
CUB domain containing protein 1 (Fragment)		A0A0Y0BS51	6	0	7	4	3	8	4	7	6	0	0	2
NOP56 protein (Fragment)	NOP56	A0PJ92	5	5	3	2	4	4	2	2	5	5	3	6
Neurotrypsin	PRSS12	P56730	3	5	5	2	2	8	0	6	4	2	3	6
Exportin-2	CSE1L	P55060	5	3	2	6	4	5	4	4	5	0	2	1
Adenosylhomocysteinase	AHCY	P23526	5	2	4	4	3	6	3	4	4	3	4	4
Septin 7	Sep-07	Q8TC62	7	4	0	6	4	2	5	4	4	3	0	1
Deleted in autism protein 1	C3orf58	Q8NDZ4	4	5	6	2	4	8	3	4	6	0	0	5

Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB	Q14697	0	0	4	4	0	6	0	1	6	0	2	7
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rho family, small GTP binding protein Rac1)	RAC1	A4D2P0	2	4	4	3	5	5	3	4	3	5	6	7
Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	F8VZX2	4	4	4	5	5	4	6	6	5	4	4	4
Paxillin, isoform CRA_e	PXN	A0A140VJQ8	12	7	2	6	0	0	6	4	3	0	0	0
GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (Yeast), isoform CRA_b	GCN1L1	A0A024RBS1	5	2	4	4	4	3	6	4	0	2	5	7
60S ribosomal protein L6	RPL6	A0A024RBK3	2	3	3	0	4	5	2	3	5	4	6	9
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	P55072	0	0	4	3	3	7	2	4	2	0	2	4
Protein AHNAK2	AHNAK2	Q8IVF2	9	2	0	5	3	0	5	0	0	0	0	0
SYNCRIP protein (Fragment)	SYNCRIP	Q05CK9	3	2	5	6	0	5	3	4	5	3	3	7
PDZ and LIM domain 5, isoform CRA_c	PDLIM5	A0A024RDE8	4	3	3	5	3	2	9	6	3	0	0	0
Annexin (Fragment)	ANXA6	A0A0S2Z2Z6	1	0	5	7	3	7	3	3	7	0	0	3
Hexokinase-2	HK2	P52789	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0
Beta-2-glycoprotein 1	APOH	P02749	3	4	3	4	0	2	2	4	4	3	3	2
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	Q13765	4	3	2	4	3	2	3	3	3	7	5	10
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4-TLL3	F8WCF6	4	3	4	5	4	4	6	5	4	4	2	4
60S ribosomal protein L8	RPL8	P62917	2	4	4	2	3	4	2	3	4	4	6	3
Coronin	CORO1C	A0A024RBI5	8	7	2	4	5	0	8	5	3	2	0	2
Keratinocyte proline-rich protein	KPRP	Q5T749	3	3	2	4	0	3	4	0	0	5	5	3
Apolipoprotein B (Including Ag(X) antigen)	APOB	C0JYY2	0	7	5	4	5	4	0	7	4	3	1	4
Unconventional myosin-Va	MYO5A	G3V394	7	3	6	2	0	0	1	0	2	3	1	4

Agrin	AGRN	A0A087X208	2	6	4	2	5	4	0	4	4	0	3	3
LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1	Q9UHB6	8	4	0	12	4	0	12	4	0	0	0	0
60S ribosomal protein L18 (Fragment)	RPL18	J3QQ67	3	2	3	5	3	3	4	3	5	3	4	5
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	ITIH3	A0A087WW43	4	4	4	3	3	5	3	3	4	2	3	2
60S ribosomal protein L26-like 1 (Fragment)	RPL26L1	E5RIT6	0	3	3	0	0	5	2	5	4	4	4	6
T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	P50991	0	0	6	2	0	6	0	3	4	0	6	6
Delta globin	HBD	A0N071	4	4	3	4	5	5	3	5	4	0	4	4
Protein Wnt	WNT5A	A0A024R316	0	0	0	0	0	6	4	7	5	0	3	3
Beta-2-syntrophin	SNTB2	Q13425	10	6	3	5	5	0	5	3	3	0	0	1
LIM domain-containing protein 1	LIMD1	C9JRJ5	6	5	6	2	3	0	4	4	2	0	0	0
Band 4.1-like protein 2	EPB41L2	E9PHY5	4	0	0	4	0	0	6	0	0	3	2	5
Coatomer subunit alpha	COPA	P53621	3	0	7	5	0	3	3	4	4	0	4	4
Desmoglein-1	DSG1	Q02413	3	3	0	10	0	2	2	0	1	5	5	3
Annexin A5	ANXA5	P08758	3	0	8	3	2	9	2	4	4	2	3	3
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	Q92974	0	0	0	5	2	9	3	5	5	3	2	3
Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	DRG1	Q9Y295	0	2	4	3	2	5	2	3	3	4	7	7
Ribosome-binding protein 1	RRBP1	A0A087WV2	0	3	3	3	3	5	2	7	3	0	0	6
Stromelysin-1	MMP3	P08254	6	0	0	6	4	7	6	2	4	0	0	0
Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3	A0A087WWU8	10	0	0	6	5	0	8	0	0	0	0	0
14-3-3 protein sigma	SFN	P31947	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
Tissue factor pathway inhibitor	TFPI	P10646	3	5	3	3	4	5	3	4	6	2	2	2
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	CNP	A0A024R1T5	0	0	2	2	0	4	0	3	2	3	4	8
Transforming growth factor beta-2	TGFB2	P61812	0	3	2	3	5	5	3	5	5	0	2	3

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	P25705	0	2	5	2	2	8	2	5	5	2	6	5
Semaphorin-3B	SEMA3B	A0A1S5 UZH6	2	7	14	0	0	1	0	2	3	0	0	3
Myosin light polypeptide 6	MYL6	B7Z6Z4	4	4	3	4	3	3	4	3	4	3	3	2
Importin subunit beta-1	KPNB1	Q14974	2	3	4	5	2	5	3	3	3	2	2	4
ADP-ribosylation factor 4	ARF4	P18085	0	0	0	4	2	4	4	5	5	3	2	5
Calpain 1, (Mu/I) large subunit, isoform CRA_a	CAPN1	A0A024 R580	0	0	3	2	0	7	2	4	3	2	4	4
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	P67936	9	0	0	6	3	0	10	2	2	2	0	0
Triosephosphate isomerase	TPI1	P60174	0	2	3	3	0	6	1	0	5	6	4	3
Periostin	POSTN	A0A024 RDS2	8	15	11	7	13	12	7	14	9	6	7	5

9.4. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2

U tablici 14, 15 i 16 nalaze se rezultati statističke analize podataka dobivenih MS analizom uzoraka proteina RA stanica MDA-MB-435S (poglavlje 9.3.). Rezultate MS-a obradili smo u programu Mascot te u programu Scaffold kako bi dobili broj spektara za pojedini protein u uzorku. Statističku analizu rezultata proveo je dr. sc. Dalibor Hršak, znanstveni suradnik Zavoda za elektroniku, Instituta Ruđer Bošković u programu QSpec. Za svaki protein, na temelju broja spektara iz tri replike, odredio je vrijednost FDR i fold change. Analizu je proveo na svih 810 detektiranih proteina, a statistički značajno promijenjene proteine naveli smo u tablici 14, 15 i 16 te prikazali u poglavlju 3.9. u obliku dijagrama vulkano (FDR < 0,05, odnosno $-\log(\text{FDR}) > 1,3$; fold change > -1,5 (manja značajnost) ili > -2 (veća značajnost) te fold change < 1,5 (manja značajnost) ili < 2 (veća značajnost), odnosno $\ln(\text{fold change})$ veći ili manji od 0,405 (manja značajnost) ili veći ili manji od 0,693 (veća značajnost)). Proteini su obojani ovisno o funkciji prema UniProt podacima i podacima baze podataka adhesome.org (<https://adhesome.org/components.html>): **proteini citoskeleta**, **proteini koji se vežu na citoskelet ili sudjeluju u njegovoj organizaciji**, **proteini uključeni u endocitozu posredovanu klatrinom**, **proteini uključeni međusobnim vezama između stanica**, **proteini uključeni u vezu stanica sa ECM-om**. Cilj ovog pokusa bio je utvrditi promjene u sastavnicama retikularnog adhesoma

nakon utišavanja proteina talina 1, talina 2 ili KANK2, stoga svi promijenjeni proteini koji nisu dio konsenzualnog adhesoma i citoskeleta stanice, niti su prethodno predstavljeni kao dio retikularnog adhesoma, nisu označeni bojom.

Tablica 14. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja talina 2.

Naziv proteina, kratica	Oznaka	ln (fold change)	-log (FDR)
PLEC	Q15149	-0,613	7
VIM	P08670	-0,468	7
TLN2	Q9Y4G6	-1,573	7
CLTC	A0A087WVQ6	-0,386	7
SPTAN1	Q13813	-0,506	7
SPTBN1	B2ZZ89	-0,547	7
VCL	A0A024QZN4	-0,735	7
NES	D3DVC4	-0,704	7
TUBB4B	P68371	2,364	7
UTRN	P46939	-0,576	7
TNS3	Q68CZ2	-0,932	7
TUBA4A	P68366	3,189	7
SYNM	O15061	-1,444	7
MYH10	P35580	2,409	7
KRT86	O43790	3,377	7
PLAT	B8ZX62	-0,863	7
KRT85	P78386	3,391	7
KRT31	P78386	1,075	7
KRT33B	Q14525	2,973	7
AP2A2	O94973	-1,29	7
KRT34	A0A140TA69	2,671	7
KRTHA5	A0A024R1T2	2,237	7
KRT36	O76013	2,649	7

PPP2R3A	Q06190	-1,275	7
AP2A1	O95782	-0,573	6
DSP	P15924	0,825	6
ARPC1B	A4D275	-0,975	6
SNTB1	Q13884	-1,533	6
SLIT2	O94813	-1,031	5,5
KRTHB2	Q701L7	1,952	5,4
DST	E9PHM6	-0,786	5
MATN2	A0A024R9B9	-1,601	5
ITGA6	P23229	-1,61	4,6
MYO5A	G3V394	-1,587	4,4
TUBA1C	F5H5D3	0,637	4,4
HSPD1	A0A024R3X4	0,699	4,2
ARHGEF2	Q92974	1,685	4,1
ADAMTS1	Q9UHI8	0,461	4
LIMD1	C9JRJ5	-1,182	3,9
PXN	A0A140VJQ8	-1,096	3,7
MYOF	Q9NZM1	-1,457	3,6
ACTR3	A0A024RAI1	-0,406	3,3
FERMT2	Q96AC1	-0,596	3,3
ADD1	E7ENY0	-1,194	3,3
SFRP1	Q8N474	-0,45	3,2
DAB2IP	H0Y3A3	-1,58	2,8
PARVA	J3KNQ4	-1,291	2,7
TNS2	F8VV64	-0,564	2,5
DDX17	A0A1W2PQ51	1,496	2,2
JUP	A0A024R1X8	0,692	2,1
SVIL	O95425	-1,386	2,1
CORO1B	A0A024R5K1	-1,25	2,1
HSPA9	P38646	0,935	2,1
ADAMTS15	Q8WXS8	-1,423	1,9

EL52	K9JA46	0,618	1,9
IGFBP2	P18065	-0,757	1,7
EPS15L1	Q9UBC2	-0,75	1,7
DHX9	Q08211	0,66	1,7
MMP1	P03956	-1,038	1,7
ANXA6	A0A0S2Z2Z6	0,784	1,7
ARHGAP31	Q2M1Z3	-1,264	1,6
ADD3	Q5VU08	-1,278	1,6
KRT4	P19013	-1,27	1,6
ATP1A1	P05023	0,702	1,6
MICAL3	Q7RTP6	1,328	1,6
ARF4	P18085	1,211	1,6
YWHAQ	P27348	-1,168	1,5
SLC25A5	P05141	0,618	1,4
PTPRF	P10586	0,93	1,3
CTTN	Q14247	-0,424	1,3

Tablica 15. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja proteina KANK2.

Naziv proteina, kratica	Oznaka	ln (fold change)	-log (FDR)
KANK2	Q63ZY3	-2,645	7
CLTC	A0A087WVQ6	-0,413	7
SPTAN1	Q13813	-0,415	7
TUBB4B	P68371	2,927	7
PPFIBP1	Q86W92	-0,852	7
TUBA4A	P68366	2,745	7
MYH10	P35580	2,126	5,7
KRT13	K7ERE3	-2,064	5,5
TNS3	Q68CZ2	-0,504	5,4

SNTB1	Q13884	-1,740	4,7
SEMA3B	A0A1S5UZH6	-1,439	4,4
KRT85	P78386	2,104	4,3
EEF1A2	Q05639	-0,527	4,1
WNT5A	A0A024R316	1,701	3,8
KRT33B	Q14525	1,903	3,7
TNS2	F8VV64	-0,856	3,5
UACA	Q9BZF9	-0,505	3,1
MYO5A	G3V394	-1,561	2,9
DDX17	A0A1W2PQ51	1,669	2,7
PLAT	B8ZX62	-0,505	2,4
ARF4	P18085	1,603	2,4
AP2A1	O95782	-0,481	2,4
KRT36	O76013	1,550	2,3
KRT17	Q04695	-0,418	2,3
DST	E9PHM6	-0,609	2,2
ARHGEF2	Q92974	1,501	2,2
HIST1H1A	Q02539	0,702	1,9
AP2B1	A0A140VJE8	-0,671	1,9
SLC25A6	P05141	0,830	1,9
FERMT2	Q96AC1	-0,531	1,9
IMMT	H7C463	1,269	1,8
EIF4A3	P38919	1,461	1,8
CEMIP	Q8WUJ3	1,345	1,7
HSPA9	P38646	0,969	1,6
WDR1	Q53GN4	0,823	1,6
MMP1	P03956	-1,357	1,6
ITSN2	A0A087WVF7	-0,660	1,5
ADAMTS14	Q8WXS8	-1,326	1,4
ADAMTS15	Q8TE58	-1,387	1,4
TUBA1C	F5H5D3	0,472	1,4

Tablica 16. Statistička obrada rezultata MS-a uzoraka proteina dobivenih izolacijom RA u stanicama MDA-MB-435S nakon utišavanja talina 1.

Naziv proteina, kratica	Oznaka	ln (fold change)	-log (FDR)
PLEC	Q15149	-1,052	7
FLNA	P21333	-1,037	7
VIM	P08670	-0,641	7
AHNAK	Q09666	-1,558	7
TLN1	A0A1S5UZ07	-1,727	7
TLN2	Q9Y4G6	-1,073	7
CYR61	Q6FI18	-0,427	7
FLNB	O75369	-1,559	7
MYH9	A0A024R1N1	-0,521	7
MACF1	H3BPE1	-1,267	7
ACTN4	A0A0S2Z3G9	-1,056	7
SPTAN1	Q13813	-1,612	7
ACTB	P60709	-0,454	7
IQGAP1	P46940	-0,684	7
SPTBN1	B2ZZ89	-1,841	7
KRT5	P13647	0,625	7
ACTN1	A0A024R694	-1,332	7
KRT6B	P04259	1,355	7
KRT6A	A0A0S2Z428	0,531	7
KRT14	P02533	0,434	7
EEF2	P13639	-0,676	7
KRT17	Q04695	0,741	7
VCL	A0A024QZN4	-1,458	7
SEMA3D	O95025	-0,884	7
NES	D3DVC4	-1,099	7
TUBB4B	P68371	2,938	7

PPFIBP1	Q86W92	-0,957	7
UTRN	P46939	-2,082	7
ACTR3	A0A024RAI1	-1,04	7
TNS3	Q68CZ2	-1,569	7
KRT77	Q0IIN1	0,794	7
ERC1	Q8IUD2	-1,321	7
MVP	Q14764	1,816	7
UACA	Q9BZF9	-2,466	7
KANK1	Q6PIB3	-1,348	7
KRT15	P19012	2,316	7
DSP	P15924	1,36	7
SYNM	O15061	-1,939	7
ARPC2	O15144	-1,225	7
TRIOBP	Q9H2D6	-1,613	7
LCP1	A0A024RDT4	-1,67	7
HNRNPU	A0A1W2PPS1	1,503	7
CTTN	Q14247	-1,764	7
PPFIA1	Q13136	-1,546	7
FERMT2	Q96AC1	-1,766	7
ILK	A0A0A0MTH3	-2,026	7
DST	E9PHM6	-2,637	7
TNS2	F8VV64	-2,589	7
PPP2R3A	Q06190	-2,235	7
HNRNPC	B2R5W2	2,652	7
ALB	P02768	0,527	6
DDX21	Q9NR30	1,893	6
CYSA	B2RMV2	-1,447	5,5
KANK2	Q63ZY3	-1,191	5,5
DDX17	A0A1W2PQ51	2,328	5,5
KRT79	Q5XKE5	2,279	5,3
ARPC1B	A4D275	-1,17	5,3

HSPA8	P11142	-0,415	5
TIMP3	P35625	-0,784	4,7
DYNC1H1	Q14204	-0,598	4,6
SEMA3B	A0A1S5UZH6	-1,577	4,5
SNTB1	Q13884	-1,993	4,5
PXN	A0A140VJQ8	-2,038	4,4
CD109	Q6YHK3	-1,891	4,4
RASAL2	Q9UJF2	-1,915	4,3
DDX5	P17844	0,983	4,2
PLS3	P13797	-1,944	4,2
MYO1B	B0I1S9	-1,539	4,2
S100A8	P05109	1,997	4,1
LIMD1	C9JRJ5	-1,839	4,1
DBNL	Q9UJU6	-1,902	4,1
SNTB2	Q13425	-1,936	3,7
ACTR2	P61160	-0,704	3,7
PHLDB2	Q86SQ0	-0,885	3,6
ITGA6	P23229	-1,855	3,5
RPL9	P32969	1,768	3,4
HNRNPUL2-BSCL2	H3BQZ7	1,68	3,3
CTGF	Q5M8T4	-1,032	3,3
TUBA4A	P68366	1,696	3,2
KRT13	K7ERE3	0,722	3,2
KRT83	P78385	-0,998	3,2
PHLDB1	Q86UU1	-1,784	3,2
SERPINB3	P29508	1,808	3,2
PARP4	Q9UKK3	1,761	3
TGM1	P22735	1,707	3
DKK1	I1W660	-0,594	3
FN1	A0A024R462	-0,44	3
ADD1	E7ENY0	-1,637	2,9

CSRP1	P21291	-1,798	2,9
THSD4	Q6ZMP0	-1,217	2,9
SNRPB	B4DVS0	1,226	2,8
JUP	A0A024R1X8	0,889	2,7
RPL5	A2RUM7	1,711	2,7
NCL	A0A024R4A0	0,728	2,6
RPS4X	B2R491	1,296	2,6
ADAMTS1	Q9UHI8	-0,561	2,5
RPL23A	K7EJV9	1,619	2,4
CNP	A0A024R1T5	1,405	2,4
IGHG2	A0A286YFY4	1,532	2,4
SFRP1	Q8N474	-0,504	2,4
MYBBP1A	Q9BQG0	1,615	2,3
MYO1C	O00159	0,422	2,3
YBX1	P67809	0,965	2,3
ITGB1	P05556	-0,85	2,2
NACA	Q13765	0,959	2,2
LIMA1	Q9UHB6	-1,516	2,2
CORO1C	A0A024RBI5	-1,241	2,2
DRG1	Q9Y295	0,998	2,2
DKC1	O60832	1,469	2
RPS25	P62851	1,446	2
RPS3	P23396	0,634	2
RPS3A	A8K4W0	1,119	1,9
RPS7	P62081	1,526	1,9
KRT80	Q6KB66	1,505	1,9
TPM3	A0A087WWU8	-1,45	1,9
RPL6	A0A024RBK3	0,936	1,9
SF3B3	Q15393	1,254	1,8
LGALS3BP	Q08380	0,801	1,8
EIF2S2	B5BU01	1,174	1,8

CPNE1	B0QZ18	0,823	1,8
RPS8	P62241	0,761	1,7
RPS2	H0YEN5	0,958	1,7
GDF15	Q99988	0,546	1,7
CIP2A	A0A087X211	-1,425	1,7
YWHAB	B5BU24	-0,887	1,6
AHNAK2	Q8IVF2	-1,43	1,6
EL52	K9JA46	0,666	1,6
POSTN	A0A024RDS2	-0,607	1,6
SPTBN2	O15020	-1,405	1,6
NOP2	P46087	1,397	1,6
DAB2IP	H0Y3A3	-1,472	1,6
DYNLL1	P63167	-0,99	1,6
TPM1	H7BYY1	-1,392	1,5
OBSL1	A6NN50	-1,39	1,5
RPS9	A0A024R4M0	1,401	1,5
ARPC3	Q2LE71	-1,386	1,5
ARF4	P18085	1,263	1,5
PARVA	J3KNQ4	-1,189	1,5
P4HB	A0A024R8S5	-0,742	1,4
PDLIM5	A0A024RDE8	-1,344	1,4
CORO1B	A0A024R5K1	-1,179	1,4
MMP1	P03956	-1,27	1,4

9.5. Popis korištenih kratica u radu

U poglavlju je naveden popis svih korištenih kratica u doktorskom radu. Uz kratice je naveden hrvatski i/ili engleski naziv ovisno o podrijetlu kratice. Iako smo u doktorskom radu uglavnom koristili pune nazive glavnih proteina u istraživanju, za proteine dužih ili kompleksnih naziva koristili smo isključivo kratice. Osim toga, u popisu se nalaze kratice proteina koji su prikazani na dijagramima vulkano (poglavlje 3.8., 3.10.).

(N)-WASP-engl. *neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*

2D/3D-dvodimenzionalno/trodimenzionalno

Abl-nereceptorska tirozin kinaza Abelson

ABS-engl. *actin binding site*

ACTN- α -aktinin

AJ-adherentni spojevi, engl. *adherens junctions*

ANKRD- domena s ankirinskim ponavljajućim sljedovima, engl. *ankyrin repeat domain*

ANOVA- jednosmjerna analiza varijance, engl. *one-way analysis of variance*

AP2- adaptorni protein 2

ARH-engl. *autosomal recessive hypercholesterolemia* fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PtdIns(4,5)P2)

Arp 2/3-aktin-povezani protein 2/3, engl. *actin related protein 2/3*

ARS-engl. *adhesion recovery solution*

ATCC -engl. *American Type Culture Collection*

BioID- metoda identifikacije interakcija pomoću biotinizacije ovisne o međusobnoj blizini proteina, engl. *proximity-dependent biotin identification*

BP180-engl. *bullous pemphigoid antigen 2*

BP230-engl. *bullous pemphigoid antigen 1*

BRAF-engl. *isoform B of RAF kinase*

BSA-albumin seruma goveda, engl. *bovine serum albumin*

CAM-DR- otpornost na protutumorske lijekove posredovana staničnom adhezijom, engl. *cell adhesion-mediated drug resistance*

CAM-RR-otpornost tumorskih stanica na radioterapiju posredovana staničnom adhezijom, engl. *cell adhesion-mediated radioresistance*

CC- domena smotane zavojnice, engl. *coiled-coil*

CCAC-klatrinom posredovane adhezije, engl. *clathrin containing adhesion complexes*

CDK1- kinaza-1 ovisna o ciklinu, engl. *cyclin-dependent kinase 1*

CDKN2A- kinazni inhibitor 2A ovisan o ciklinu, engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CLASP- engl. cytoplasmic linker associated protein 1

CLIP1-engl. *CAP-Gly-containing cytoplasmic linker protein of 170 kDa*

CLTC-klatrin, engl. *clathrin heavy chain*

CMSC-kortikalni kompleks za stabilizaciju mikrotubula, engl. *cortical microtubule stabilizing complex*

CTLA-4-citotoksični antigen 4 povezan s T-limfocitima, engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*

cyto D-cytochalasin D

Dab2-engl. *disabled homolog 2*

DAB2IP-engl. *DAB2 interactive protein*

DCX-engl. *doublecortin*

DLC1- engl. *deleted in liver cancer 1*

DMEM-Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge, engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO-dimetilsulfoksid

DPDPB-1,4-Bis [3-(2-piridilditio) propionamido] butan

DSM-dezmosom

DSP-ditiobis sukcinimidil propionat

DTBP-dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat

DTT-ditiotreitol

EB1-engl. *end-binding*

ECM-izvanstanični matriks, engl. *extracellular matrix*

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina

EdU-5-etinil-2'-deoksiuridin

EGFR-receptor za epidermalni faktor rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*

ELKS-protein bogat aminokiselinama E, L, K i S

EPS15/EPS15L1-engl. *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15/ epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 like 1*

FA-fokalna adhezija

FAK-kinaza fokalne adhezije, engl. *focal adhesion kinase*

F-aktin-filamentozni aktin

FAT-engl. *focal adhesion targeting*

FB-fibrilarna adhezija

FBS-serum fetusa goveda, engl. *fetal bovine serum*

FC-fokalni kompleks

FCL-ravne klatrinske rešetke, engl. *flat clathrin lattices*

FDR-stopa lažnih pronalazaka, engl. *false discovery rate*

FERM -4.1. protein, ezrin, radiksin i moesin

FERMT/KIND-fermitin/kindlin

FRNK-FAK-povezane nekinaze, engl. *FAK-related nonkinase*

G-aktin-globularni aktin

GEF-H1-engl. *guanine nucleotide exchange factor H1*

GM-CSF-engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

Grb2-engl. *growth factor receptor bound protein 2*

HD-hemidezmosom

HFF-fibroblasti prepucija čovjeka, engl. *human foreskin fibroblast cells*

HIF1 α -engl. *hypoxia-inducible factor 1 α*

IAC-integrinski adhezijski kompleks, engl. *integrin adhesion complex*

IA-jodoacetamid

IBS-engl. *integrin binding site*

ILK- kinaza vezana na integrine, engl. *integrin-linked kinase*

IPP-ILK-PINCH-parvin

IQGAP1-engl. *Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1*

IRM- interferencijska refleksijska mikroskopija

IRSp53-supstrat inzulinskog receptora 53, engl. *insulin receptor substrate 53*

ITSN- intersektin

JAK-Janus-kinaza

KANK-engl. *KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein*

KN-KANK N-terminalna domena

LDH-laktat-dehidrogenaza

LD-leucin-aspartat

LL5 β -engl. *pleckstrin homology like domain family B member 2*

LPAR1-engl. *lipid lysophosphatidic acid receptor 1*

MACF1-engl. *microtubule-actin cross-linking factor 1*

MAPK-mitogenom aktivirana protein kinaza

MARK2-engl. *microtubule affinity regulating kinase 2*

MeOH-metanol

MMP-matriks metaloproteinaza

mRNA-glasnička RNA, engl. *messenger RNA*

MTT-3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-difeniltetrazolijev bromid)

NA-nascentna adhezija

Nck2-Nck adaptorni protein 2

NRAS-engl. *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*

Numb-engl. *NUMB endocytic adaptor protein*

PBS-fosfatni puffer, engl. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

PD-1- ligand za protein programirane stanične smrti, engl. *programmed-cell death-protein-1*

PDS-podosom

PINCH- engl. *interesting new cysteine-histidine-rich protein*

PIP₂ -fosfatidilinozitol- 4,5-difosfat

PLEC-plektin

Pod1-engl. *pollen defective in guidance1*

PSI-pleksin-semaforin-integrin

PtdIns(3,4,5)P₃-fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat

PTEN-engl. *phosphatase-and-tensin homologue*

PTX-paklitaksel

PXN-paksilin

Rac1-engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RAF-engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*

RAP-1-engl. *Ras related protein 1*

RA-retikularna adhezija

RGD- arginin-glicin-aspartat

RhoGDI-engl. *Rho GDP- dissociation inhibitor 1*

RIAM- engl. *Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*

RIPA-engl. *radioimmunoprecipitation assay*

ROCK-engl. *Rho-associated coiled-coil containing kinase*

SB-engl. *sample buffer*

SD-standardna devijacija

SDS-PAGE-natrij-dodecil sulfat elektroforeza u poliakrilamidnom gelu, engl. *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

siRNA-mala interferirajuća RNA, engl. *small interfering RNA*

STAT-engl. *signal-transducer-and-activator-of-transcription*

STED-mikroskopija stimulirane deplecije emisije, engl. *stimulated emission depletion microscopy*.

TEM-tetraspaninom obogaćene mikrodomene, engl. *tetraspanin enriched microdomains*

TERT- telomerazna reverzna transkriptaza

TIAM1-Rac1 specifični gvanin nukleotidni izmjenjujući factor

TLN-talin

TNS-tenzin

TP53-tumor protein 53

Tris-HCl-tris-klorovodična kiselina

T-VEC-Talimogene laherparepvec

UV-ultraljubičasto, engl. *ultraviolet*

VASP-engl. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*

WB-western blot

ZYX-ziksín

10. ŽIVOTOPIS I POPIS RADOVA

Rođena sam 2. veljače 1997. u Zagrebu. Završila sam preddiplomski studij Biotehnologije (2018.) i potom diplomski studij Molekularne biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (2020.), među 10% najboljih studenata. Dobitnik sam Dekanove nagrade (2021.), Stipendije za izvrsnost (2020.) i Državne stipendije za studente u STEM područjima znanosti (2018.). Diplomski rad naslova „Uloga proteina uključenih u adheziju u otpornosti stanica karcinoma prostate DU145 na ionizirajuće zračenje“ sam izradila pod mentorstvom dr. sc. A. Ambriović Ristov u sklopu projekta „Udruživanjem temeljnih i kliničkih znanstvenih istraživanja do poboljšanja tretmana i povećane društvene osviještenosti o raku prostate“ (Moj Zaba Start 2019). Od 13. listopada 2020. zaposlena sam kao doktorand na HrZZ istraživačkom projektu „Integrin $\alpha\beta5$ -povezane fokalne i retikularne adhezije u melanomu (AdMeFoRe)“ pod vodstvom dr. sc. A. Ambriović Ristov. Iste godine upisala sam poslijediplomski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. U prvoj godini doktorata nagrađena sam stipendijom British Scholarship Trust za dvomjesečno istraživanje na Sveučilištu u Manchesteru u laboratoriju prof. dr. sc. M. J. Humphriesa. Tijekom studijskog boravka učila sam pripremati i analizirati uzorke metodom spektrometrije masa, te je istraživanje naknadno nagrađeno „Voya Kondic Memorial“ nagradom (2022.). Isti laboratorij sam posjetila ponovno 2023., gdje sam tijekom dvotjednog boravka pripremila i analizirala dodatne uzorke proteina adhezija. U trećoj godini doktorata (2023.) nagrađena sam stipendijom FEBS Summer Fellowship za šestotjedno istraživanje na Sveučilištu u Leedsu u laboratoriju prof. dr. sc. M. Peckham gdje sam učila pripremati i analizirati uzorke metodom super-rezolucijske mikroskopije STED. Sudjelovala sam na šest međunarodnih i jednom domaćem znanstvenom skupu od kojih bih istaknula: HDBMB22 (Brela, Hrvatska, 2022.; stipendija za sudjelovanje, postersko izlaganje); EMBL: “Microtubules: from atoms to complex systems” (Heidelberg, Njemačka, 2022.; stipendija za putovanje, postersko izlaganje); YSF2023 i FEBS 47th Congress (Tours, Francuska, 2023.; stipendija za sudjelovanje i putovanje, postersko izlaganje) i 8. Simpozij „Apoptoza i novotvorine“ (Zagreb, Hrvatska, 2023., predavanje). Na skupu FEBS 47th Congress sam dobila nagradu za najbolje postersko izlaganje. Sudjelovala sam u organizaciji kongresa Adhere1 (Zadar, Hrvatska, 6.-9. rujna, 2023.) (organizator: dr. sc. A. Ambriović Ristov), prvog u nizu kongresa fokusiranih na adhezije stanica. Kao doktorand Instituta Ruđer Bošković imala sam prilike pohađati tečajeve iz mikroskopije (Zagreb, 2022., Radionica Nikon AX R), spektrometrije masa (Zagreb, 2022., Radionica “1st Mass Spec Workshop”) i komunikacijskih vještina (Zagreb, 2021., Malcolm Love-Soft skills in Science). Kao predavač sam 2023. godine sudjelovala na tečaju “Stanična i molekularna biologija” organiziranom za srednjoškolske profesore

Medicinske škole Varaždin, koji se održao u prostorima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, Institut Ruđer Bošković. Sudjelovala sam Otvorenim danima Instituta Ruđer Bošković (ODI 2021) sa izlaganjem naslova „Napredak tehnologije, napredak je i znanosti?“. Nakon objave članka na kojemu sam prvi autor i u kojemu je predstavljen dio rezultata doktorske disertacije (Lončarić i sur., 2023.) zajedno s kolegicom dr. sc. Nikolinom Stojanović, sudjelovala sam u radijskoj emisiji „Oko znanosti“, HRT, gdje smo imale prilike predstaviti naša istraživanja u području adhezije stanica. Neposredni sam voditelj jednog diplomskog rada u izradi (Mirna Rešetar, studentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). Član sam Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (preko društva i član FEBS-a), Hrvatskog društva za istraživanje raka (preko društva i član EACR-a), Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu i Hrvatskog genetičkog društva. Koautor sam u 8 sažetaka sa znanstvenih skupova i tri znanstvena rada.

Popis radova

1. Talajić, A., Dominko, K., **Lončarić, M.**, Ambriović-Ristov, A., Četković, H. (2024.) The ancestral type of the R-RAS protein has oncogenic potential. *Cell Mol. Biol. Lett.* **29**: 27. doi: 10.1186/s11658-024-00546-0.
2. **Lončarić, M.**, Stojanović, N., Rac-Justament, A., Coopmans, K., Majhen, D., Humphries, J., Humphries, M., Ambriović Ristov, A. (2023.) Talin2 and KANK2 functionally interact to regulate microtubule dynamics, paclitaxel sensitivity and cell migration in the MDA-MB-435S melanoma cell line. *Cell Mol. Biol. Lett.* **28**: 56. doi: 10.1186/s11658-023-00473-6.
3. Tadijan, A., Humphries, J., Samaržija, I., Stojanović, N., Zha, J., Čuljak, K., **Tomić, M.**, Paradžik, M., Nestić, D., Kang, H., Humphries, M. & Ambriović-Ristov, A. (2021.) The Tongue Squamous Carcinoma Cell Line Cal27 Primarily Employs Integrin $\alpha 6\beta 4$ -Containing Type II Hemidesmosomes for Adhesion Which Contribute to Anticancer Drug Sensitivity. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**: 786758. doi:10.3389/fcell.2021.786758.