

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana Ž. Boljević

**Uticaj ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena na  
metastatski potencijal ćelija humanog karcinoma  
jajnika**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Ivana Ž. Boljević

**The effect of *JAM-A*, *ITGAV* and *CALD1* gene  
expression on metastatic potential of human  
ovarian carcinoma cells**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**Mentori:** dr Emina Mališić, Viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

dr Maja Čakić Milošević, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet, Beograd

**Članovi komisije:** dr Emina Mališić, Viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd  
dr Maja Čakić Milošević, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet, Beograd  
dr Radmila Janković, Naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za molekularnu genetiku Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Radmili Janković i dr Siniši Raduloviću na ukazanom poverenju i pruženim prilikama koje su mi omogućile da se usavršavam na profesionalnom planu. Dr Radmili Janković dugujem veliku zahvalnost na razumevanju i podršci koju mi je pružila, kao i na konstruktivnim sugestijama tokom izrade i pisanja teze. Dr Siniši Raduloviću posebno hvala na spremnosti da pomogne u svim važnim trenucima, kao i na optimističnom duhu koji je uticao na stvaranje prijatne atmosfere za rad.

Mentorki dr Emini Mališić zahvaljujem se na uloženom vremenu i pomoći tokom realizacije ove doktorske disertacije kao i na svim savetima i sugestijama. Zahvaljujem se i prof. dr Maji Čakić Milošević na ekspeditivnosti i uloženom trudu, kao i na dragocenim predlozima koji su unapredili ovu disertaciju.

Veliku zahvalnost dugujem svim kolegama sa Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, a najviše dragim kolegamicama i prijateljicama Ani, Mileni, Marijani, Miljani, Jeleni, Mariji i Milici na podršci, lepom druženju, kolegijalnosti i konstruktivnim savetima. Dr Ani Krivokući dugujem posebnu zahvalnost na nesebičnoj pomoći, mudrim savetima i podsticaju kao i na mnogim divnim trenucima provedenim u laboratoriji ali i van nje. Takođe, veliko hvala Mariji Ostojić koja je sa mnom podelila svoje znanje iz bioinformatike. Želela bih da se zahvalim i svim laboratorijskim tehničarima, a posebno Marijani Topalović čija mi je pomoć mnogo značila, naročito u početnim koracima mog eksperimentalnog rada.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem bliskim prijateljima i porodici, pre svega svojim roditeljima, na beskrajnom razumevanju i podršci bez koje ne bih mogla da istrajem.

# Uticaj ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena na metastatski potencijal ćelija humanog karcinoma jajnika

## Sažetak

Karcinom jajnika predstavlja visoko smrtonosan ginekološki malignitet sa velikim potencijalom za metastatsko širenje. Cilj ove doktorske disertacije podrazumevao je ispitivanje ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena, uključenih u ćelijsku adheziju i pokretljivost, kao potencijalnih biomarkera karcinoma jajnika. Ekspresioni nivoi *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* analizirani su RT-qPCR metodom na parafinskim isečcima 20 benignih i 57 malignih tumora jajnika. Dobijeni rezultati validirani su korišćenjem GEPIA, HPA i STRING baza podataka. Nivoi ekspresije *ITGAV* i *CALDI* bili su značajno niži, a nivo ekspresije *JAM-A* gena bio je viši u grupi malignih u odnosu na benigne tumore jajnika. Trend povišene ekspresije *JAM-A* detektovan je u tumorima visokog gradusa i kod bolesnica sa ascitom, a trend snižene ekspresije *ITGAV* u tumorima visokog gradusa, kod bolesnica sa ascitom i onih koje su relapsirale. Takođe, u tumorima visokog gradusa uočen je trend snižene ekspresije *CALDI*. Analiza ROC krivih pokazala je da ekspresija *JAM-A* ima dijagnostički i prognostički potencijal u karcinomu jajnika, dok je Kaplan-Majerovom metodom pokazano da bolesnice sa povišenom ekspresijom *JAM-A* i sniženom ekspresijom *ITGAV* i *CALDI* imaju kraću medijanu ukupnog preživljavanja. Proteinska ekspresija *JAM-A* u karcinomima jajnika potvrđena je imunohistohemijski. Analiza obogaćivanja skupa gena pokazala je da povišena ekspresija *JAM-A* ima negativan prognostički uticaj u karcinomu jajnika potencijalnom aktivacijom EMT programa putem PI3K/AKT signalnog puta. Dobijeni rezultati ukazuju da su povišena ekspresija *JAM-A*, kao i snižena ekspresija *ITGAV* i *CALDI*, povezane sa agresivnijim fenotipom i lošijom prognozom karcinoma jajnika. Ovo bi moglo doprineti adekvatnijem praćenju bolesnica sa karcinomom jajnika.

**Ključne reči:** karcinom jajnika, epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), adhezivni spojni molekul A (*JAM-A*), integrin alfa V (*ITGAV*), kaldezmon 1 (*CALDI*)

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna onkologija

# The effect of *JAMA*, *ITGAV* and *CALDI* gene expression on metastatic potential of human ovarian carcinoma cells

## Abstract

Ovarian carcinoma represents highly lethal gynecological malignancy with a great potential for metastatic spread. This doctoral dissertation aimed to examine expression levels of *JAM-A*, *ITGAV* and *CALDI* genes, which are involved in cell adhesion and motility, as potential biomarkers of ovarian carcinoma. The RT-qPCR method was used to evaluate *JAM-A*, *ITGAV* and *CALDI* expression levels in 20 benign and 57 malignant ovarian tumor FFPE samples. Results were validated using GEPIA, HPA and STRING databases. *ITGAV* and *CALDI* showed significantly lower expression, while the *JAM-A* expression was higher in malignant compared to benign ovarian tumors. There was a trend for higher *JAM-A* expression in high histological grade tumors and patients with ascites, and a trend for lower *ITGAV* expression in tumors with high histological grade, patients with ascites, and those who relapsed. Also, a trend for lower *CALDI* expression was detected in high histological grade tumors. ROC curve analyses showed that *JAM-A* expression exhibits both diagnostic and prognostic performance in ovarian carcinoma, while the Kaplan-Meier method demonstrated that patients with higher expression of *JAM-A* and lower expression of *ITGAV* and *CALDI* have worse overall survival. Protein expression of *JAM-A* in ovarian carcinoma was confirmed by immunohistochemistry. GSEA analysis showed that higher expression of *JAM-A* has a negative prognostic impact in ovarian carcinoma by potentially activating the EMT program through PI3K/AKT signaling pathway. The obtained results indicate that higher *JAM-A* and lower *ITGAV* and *CALDI* expression are associated with more aggressive ovarian carcinoma phenotype and poor prognosis. This could contribute to better ovarian carcinoma patients' follow-up.

**Keywords:** ovarian carcinoma, epithelial-mesenchymal transition (EMT), junctional adhesion molecule A (*JAM-A*), integrin alpha V (*ITGAV*), caldesmon 1 (*CALDI*)

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Molecular oncology

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Histološka građa jajnika</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Faktori rizika za nastanak kancera jajnika</b> .....	<b>1</b>
1.2.1. <i>Genetički faktori rizika</i> .....	1
1.2.2. <i>Starost</i> .....	3
1.2.3. <i>Reproduktivni i hormonalni faktori rizika</i> .....	3
1.2.4. <i>Ostali faktori</i> .....	3
<b>1.3. Epidemiologija kancera jajnika</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. Klasifikacija tumora jajnika</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5. Mehanizam tumorogeneze karcinoma jajnika</b> .....	<b>7</b>
<b>1.6. Skrining karcinoma jajnika</b> .....	<b>8</b>
<b>1.7. Prognostički faktori karcinoma jajnika</b> .....	<b>8</b>
<b>1.8. Terapija karcinoma jajnika</b> .....	<b>9</b>
1.8.1. <i>Ciljana terapija u karcinomu jajnika</i> .....	9
<b>1.9. Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT)</b> .....	<b>10</b>
1.9.1. <i>Ćelijske promene tokom epitelno-mezenhimske tranzicije</i> .....	11
1.9.2. <i>Signalni putevi koji aktiviraju epitelno-mezenhimsku tranziciju</i> .....	13
1.9.3. <i>Glavni transkripcioni faktori epitelno-mezenhimske tranzicije</i> .....	15
<b>1.10. Adhezivni spojni molekul A (JAM-A)</b> .....	<b>17</b>
<b>1.11. Integrin alfa V (ITGAV)</b> .....	<b>19</b>
<b>1.12. Kaldezmon 1 (CALD1)</b> .....	<b>22</b>
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>25</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Materijal</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2. Izolacija ukupne RNK iz parafinskih uzoraka tumora jajnika</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3. Reverzna transkripcija RNK</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5. Imunohistohemijsko bojenje JAM-A proteina u uzorcima tumora jajnika</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6. Bioinformatičke analize JAM-A, ITGAV i CALD1 genske i proteinske ekspresije u karcinomu jajnika</b> .....	<b>34</b>
3.6.1. <i>Poređenje nivoa ekspresije JAM-A, ITGAV i CALD1 gena u normalnom i tumorskom tkivu jajnika – GEPIA baza podataka</i> .....	35
3.6.2. <i>Analiza proteinske ekspresije JAM-A, ITGAV i CALD1 gena u normalnom i tumorskom tkivu jajnika – Humani proteinski atlas</i> .....	35
3.6.3. <i>Analiza interakcija između JAM-A, ITGAV i CALD1 proteina - STRING baza podataka</i> .....	36

3.6.4. Analiza obogaćivanja skupa gena.....	37
3.7. Statistička obrada rezultata .....	37
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>39</b>
4.1. Kvantifikacija ekspresije <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> gena u benignim i malignim uzorcima tumora jajnika.....	39
4.2. Korelacije ekspresije <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> gena i kliničkopatoloških parametara karcinoma jajnika.....	41
4.3. Određivanje diskriminatornog potencijala nivoa ekspresije <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> gena u tumorima jajnika: Analiza ROC krivih.....	45
4.4. Korelacije između ekspresija <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> gena kod bolesnica sa karcinomom jajnika.....	47
4.5. Kaplan-Majerova metoda i log-rank test ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika u odnosu na relativnu ekspresiju <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> gena.....	48
4.6. Univarijantna Koksova regresiona analiza ukupnog preživljavanja.....	51
4.7. Analiza proteinske ekspresije <i>JAM-A</i> u uzorcima tumora jajnika .....	53
4.8. Rezultati bioinformatičkih analiza <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> genske i proteinske ekspresije u karcinomu jajnika .....	54
4.8.1. Rezultati poređenja nivoa <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> genske ekspresije u normalnom i kancerskom tkivu jajnika - GEPIA baza podataka.....	54
4.8.2. Rezultati analize proteinske ekspresije <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> u normalnom i tumorskom tkivu jajnika - Humani proteinski atlas.....	56
4.8.3. Rezultati analize interakcija <i>JAM-A</i> , <i>ITGAV</i> i <i>CALDI</i> proteina - STRING baza podataka.....	56
4.8.4. Rezultati analize obogaćivanja skupa gena .....	57
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>61</b>
5.1. Značaj ispitivanja novih biomarkera u karcinomu jajnika.....	61
5.2. Mehanizmi metastatskog širenja karcinoma jajnika .....	61
5.3. Uloga EMT procesa u patogenezi i metastatskom širenju karcinoma jajnika .....	62
5.4. Uloga ekspresije <i>JAM-A</i> gena u progresiji kancera.....	64
5.5. Uloga ekspresije <i>ITGAV</i> gena u progresiji kancera.....	67
5.6. Uloga ekspresije <i>CALDI</i> gena u progresiji kancera .....	70
5.7. Klinički značaj EMT markera u humanim tumorima .....	73
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>76</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>78</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>98</b>



---

# 1. UVOD

---

Kancer jajnika predstavlja osmi kancer po učestalosti kod žena i globalni zdravstveni problem. Njegova agresivnost objašnjava se velikim potencijalom za širenjem unutar peritonealne šupljine kao i brzim razvojem rezistencije na postojeće hemioterapijske agense. Takođe, usled nepostojanja specifičnih simptoma, ova bolest često se dijagnostikuje u kasnom stadijumu kada je veoma teško postići izlečenje. Epitelni maligni tumori jajnika (karcinomi jajnika) predstavljaju najučestaliji i najsmrtonosniji histološki tip kancera jajnika i čine veoma heterogenu grupu oboljenja. Novija saznanja ukazuju da epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) predstavlja značajan fenomen prilikom razumevanja tumorske progresije i nastanka peritonealnih metastaza u karcinomu jajnika. Ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena nedovoljno su opisane u ovom malignitetu, a ovi geni uključeni su u promene u ćelijskoj adheziji i migraciji kroz koje ćelije prolaze tokom EMT procesa. Ovakav vid istraživanja može pružiti bolji uvid u proces metastatskog širenja karcinoma jajnika ali potencijalno dovesti i do otkrića novih biomarkera i terapijskih ciljeva u ovom malignitetu. Takođe, određivanje nivoa ekspresije EMT markera u primarnom tumoru nudi mogućnost predikcije metastatskog ponašanja tumora što može imati važne implikacije u kliničkoj praksi.

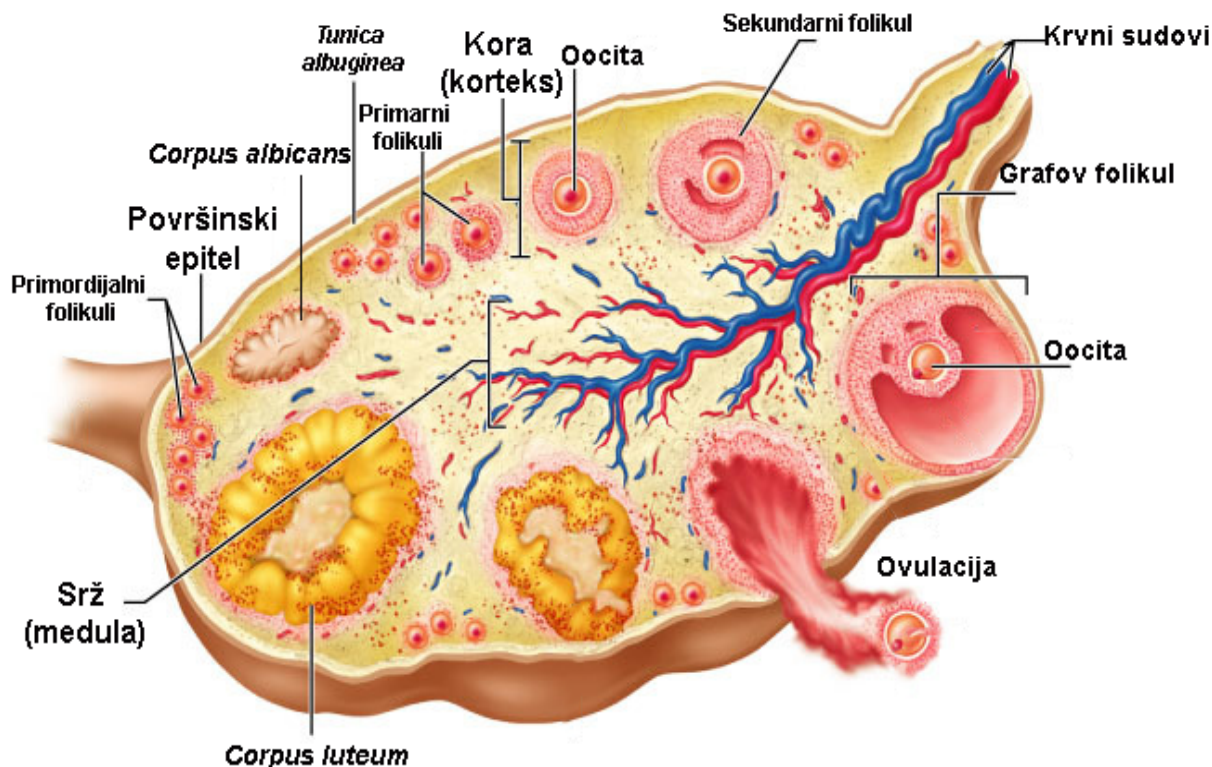
## 1.1. Histološka građa jajnika

Jajnici predstavljaju parne endokrine žlezde ženskog reproduktivnog sistema čija je osnovna funkcija produkcija jajnih ćelija i sekrecija ženskih polnih hormona: estrogena i progesterona. Sastoje se od tri osnovne komponente: površinskog epitela, kore (korteksa) i srži (medule). Površinski (germinativni) epitel nalazi se na površini jajnika, u kontinuitetu je sa mezotelom i pokriva tanak sloj veoma gustog vezivnog tkiva, *tunica albuginea*, ispod koga se nalazi neorganizovano rastresito vezivno tkivo. Unutar strome korteksa nalaze se jajne ćelije u različitim fazama razvoja, pa tako razlikujemo preantralne (primordijalne i primarne jajne folikule) i antralne folikule (sekundarne i Grafove folikule). Nakon ovulacije, Grafov folikul postaje žuto telo (lat. *corpus luteum*) a ukoliko ne dođe do trudnoće, Grafov folikul se transformiše u atretičko telo (lat. *corpus albicans*). U periodu od puberteta do menopauze, u jajnicima se sintetišu i steroidni polni hormoni i to u ćelijama koje čine *corpus luteum*. Medula predstavlja centralni deo jajnika a sastoji se od strome i bogate neurovaskularne mreže (Aguilera-Barrantes i sar., 2007) (Slika 1.1).

## 1.2. Faktori rizika za nastanak kancera jajnika

### 1.2.1. Genetički faktori rizika

Jedan od najznačajnijih faktora rizika za nastanak kancera jajnika jeste porodična istorija kancera jajnika i/ili dojke (Torre i sar., 2018). Nasledne forme kancera jajnika čine preko 20% svih slučajeva kancera jajnika (Walsh i sar., 2011). Većina (65-75%) je povezana sa štetnim germinativnim mutacijama u visoko penetrabilnim *BRCA1* i *BRCA2* genima (engl. *breast cancer gene 1 and 2*) i čine deo sindroma naslednog oblika karcinoma dojke i jajnika (Daly i sar., 2014). Nosioci *BRCA1* mutacija imaju 40-50% šansi za nastanak kancera jajnika do 70. godine života, dok je taj rizik za nosioce *BRCA2* mutacija 10-20% (King i sar., 2003). *BRCA* geni predstavljaju tumor supresore čiji proteinski produkti učestvuju u održavanju integriteta genoma, pre svega popravkom dvolančanih prekida na DNK molekulu putem homologe rekombinacije (O'Donovan i Livingston, 2010). Kod nosioca *BRCA* mutacija kancer jajnika javlja se ranije nego što je to slučaj u opštoj



**Slika 1.1. Histološka građa jajnika.** Jajnici se sastoje od tri osnovne komponente: površinskog epitela, kore (korteksa) i srži (medule). Korteks jajnika čine stromalne ćelije i folikuli u različitim fazama razvoja. Medula je centralni deo jajnika a sastoji se od strome i neurovaskularne mreže (preuzeto sa [https://line.17qq.com/articles/debofhgjz\\_p6.html](https://line.17qq.com/articles/debofhgjz_p6.html))

populaciji, a najčešće je u pitanju uznapredovali visoko-gradusni serozni karcinom (Prat i sar., 2005). Važno je naglasiti da su germinativne *BRCA1/2* mutacije česte i kod bolesnica bez porodične istorije kancera dojke ili jajnika (Eccles i sar., 2016).

Mutacije u drugim genima uključenim u popravku oštećenja na DNK molekulu takođe doprinose povećanom riziku za nastanak kancera jajnika. U pitanju su umereno ili nisko penetrabilni geni kao što su *BRIP1* (engl. *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*), *RAD51C* (engl. *RAD51 paralog C*), *RAD51D* (engl. *RAD51 paralog D*), *BARD1* (engl. *BRCA1 associated RING domain 1*), *CHEK2* (engl. *checkpoint kinase 2*), *MRE11* (engl. *MRE11 homolog, double strand break repair nuclease*), *RAD50*, *PALB2* (engl. *partner and localizer of BRCA2*), *ATM* (engl. *ATM serine/threonine kinase*) (Norquist i sar., 2016).

Drugi nasledni sindromi, kao što je Linčov sindrom, takođe povećavaju rizik za nastanak kancera jajnika. Linčov sindrom, poznat i kao sindrom naslednog nepolipoznog kolorektalnog kancera, vezuje se za prisustvo štetnih mutacija u genima uključenim u popravku pogrešno sparenih baza na DNK molekulu, kao što su mutL homolog 1 (*MLH1*), mutS homolog 2 (*MSH2*), mutS homolog 6 (*MSH6*) i *PMS2* (engl. *postmeiotic segregation increased 2*). Osim kancera jajnika, ovaj sindrom karakteriše se i pojavom kancera kolona, endometrijuma, dojke kao i drugih malignih tumora gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta (Lynch i sar., 1998). Kancer jajnika povezan sa Linčovim sindromom najčešće je neserozne histologije (endometrioidni i svetlo-ćelijski), javlja se u ranijem dobu nego što je to slučaj u opštoj populaciji, a najveći deo čine karcinomi ranog stadijuma, dobre do umerene diferencijacije (Prat i sar., 2005).

Li-Fraumenijev sindrom predstavlja nasledno autozomalno dominantno oboljenje koje se povezuje sa mutacijama u *TP53* genu (engl. *tumor protein p53*) a smatra se da uzrokuje oko 3% svih naslednih kancera jajnika. Povećanje rizika za nastanak kancera jajnika takođe uzrokuju mutacije u *PTEN* genu (engl. *phosphatase and tensin homolog*) (Kaudenov sindrom) kao i u tumor-supresorskom genu koji kodira serin/treonin kinazu 11 (*STK11*) (Pojc-Jegersov sindrom) (Beggs i sar., 2010).

### *1.2.2. Starost*

Kao i u slučaju većine drugih kancera, rizik za nastanak kancera jajnika povećava se sa godinama. Povećana incidenca uočava se kod žena starijih od 65 godina (Chan i sar., 2006). Jedno od objašnjenja jeste da karcinogeneza predstavlja kontinuirani proces koji je povezan sa akumulacijom genetičkih i epigenetičkih oštećenja na DNK tokom vremena (Encinas i sar., 2015).

### *1.2.3. Reproductivni i hormonalni faktori rizika*

Epidemiološka istraživanja jasno ukazuju da reproduktivna istorija i broj ovulatornih ciklusa imaju značajan uticaj na razvoj kancera jajnika (Hunn i Rodriguez, 2012). Faktori koji se povezuju sa povećanim rizikom za oboljevanje su: neplodnost, nuliparitet, lekovi koji stimulišu fertilitet kao i gonadotropini koji se koriste za indukciju ovulacije. Sa druge strane, faktori koji se povezuju sa smanjenim rizikom za oboljevanje su: trudnoća, dojenje i upotreba oralne kontracepcije (Salehi i sar., 2008). Dejstvo većine ovih faktora objašnjavalo se hipotezom „neprekinutih ovulacija”, po kojoj površinski epitel jajnika, tokom brojnih ciklusa ovulacije, iznova prolazi kroz procese destrukcije i reparacije (Fathalla, 1971). Tom prilikom, površinske epitelne ćelije proliferišu čime se povećava verovatnoća nastanka spontanih mutacija u proto-onkogenima i tumor supresorima koje doprinose onkogenezi. S obzirom da novija saznanja ukazuju da kancer jajnika može nastati ne samo malignom transformacijom ćelija jajnika već i drugih organa koji se nalaze u pelvisu (karlici) (Dubeau i Drapkin, 2013) danas se pretpostavlja da procesi destrukcije i reparacije koji se odvijaju prilikom svakog menstrualnog ciklusa stvaraju lokalnu inflamatornu mikrosredinu koja dovodi do oslobađanja različitih citokina i faktora rasta. Na ovaj način, jajnik postaje potencijalni izvor hemotaktičkih faktora koji regrutuju (privlače) premaligne i/ili maligne ćelije koje se nalaze van tkiva jajnika (Cardenas i sar., 2016). Prema tome, veći broj menstrualnih ciklusa u toku života žene povećava rizik za nastanak kancera jajnika (La Vecchia, 2017).

Brojne studije pokazale su da reproduktivni hormoni ispoljavaju značajne efekte na površinski epitel jajnika, delujući na rizik za nastanak kancera jajnika (Hunn i Rodriguez, 2012). Naime, normalni epitel jajnika poseduje receptore za većinu članova familije steroidnih hormona, kao što su estrogeni, progesteron, retinoidi, vitamin D i androgeni. Smatra se da se osnovni mehanizam protektivnog dejstva oralnih kontraceptiva i trudnoće na rizik od nastanka kancera jajnika ogleda u apoptotskom delovanju progestina, sintetičkih progesterona, na ćelije epitela jajnika (Rodriguez i sar., 1998). Takođe, retinoidi i vitamin D, kao i nesteroidni antiinflamatorni lekovi imaju protektivni, dok estrogeni i androgeni imaju stimulatorni efekat, povećavajući rizik za nastanak kancera jajnika (Risch, 1998).

### *1.2.4. Ostali faktori*

Poznato je da određena benigna ginekološka stanja, kao što su endometrijoza, sindrom policističnih jajnika i pelvična inflamacija doprinose povećanom riziku za nastanak kancera jajnika (Brett i sar., 2017).

Endometrijoza je često oboljenje kod žena a karakteriše se prisustvom tkiva endometrijuma van uterusne šupljine (Parasar i sar., 2017). Mehanizam kojim endometrijoza povećava rizik za nastanak kancera jajnika nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da hronična inflamacija koja

odlikuje ovo stanje, može dovesti do neoplastične transformacije endometrijalnih implantata. Studije su pokazale da endometrioza povećava rizik za nastanak endometrioidnog i svetloćelijskog karcinoma (Kondi-Pafiti i sar., 2012). Sličan je slučaj sa sindromom policističnih jajnika (Lee i sar., 2018), kao i sa pelvičnom inflamacijom, kod kojih takođe dolazi do povećanja broja inflamatornih medijatora (Shan i Liu, 2009).

### 1.3. Epidemiologija kancera jajnika

Kancer jajnika predstavlja drugi vodeći uzrok smrtnosti kod žena kada su u pitanju ginekološki maligniteti. Incidencija je najviša u razvijenim zemljama Evrope, Severnoj Americi i Australiji, a najniža u Aziji i Africi (Webb i Jordan, 2016). U centralnoj Srbiji, standardizovana stopa incidencije kancera jajnika iznosi 12 na 100 000 žena (Miljuš i sar., 2017).

Rizik za razvoj kancera jajnika tokom života žene procenjen je na 1 u 70 (1,4%). Ovo maligno oboljenje najčešće se javlja kod žena u postmenopauzi, kod kojih preko 90% svih kancera jajnika čine maligni tumori epitelnog porekla (karcinomi).

Ukupno 5-godišnje preživljavanje bolesnica sa kancerom jajnika iznosi 30-50%, a značajno varira u zavisnosti od stadijuma bolesti u trenutku dijagnoze (Allemani i sar., 2018).

### 1.4. Klasifikacija tumora jajnika

Tumori jajnika predstavljaju izuzetno heterogenu grupu oboljenja koje na osnovu stepena ćelijske proliferacije, nuklearne atipije i prisustva, odnosno odsustva stromalne invazije, možemo podeliti na benigne, granični (engl. *borderline*) i maligne. Benigni tumori jajnika odlikuju se niskom stopom ćelijske proliferacije i odsustvom invazivnog ponašanja. Intermedijarni tumori čine 15% svih tumora jajnika a sadrže delimično transformisane ćelije bez prisustva stromalne invazije. Visoko su proliferativni i često se označavaju kao karcinomi niskog malignog potencijala jer retko metastaziraju i dovode do smrti (Prat, 2012).

Na osnovu histopatologije, tumore jajnika možemo podeliti na:

1. epitelne tumore
2. tumore poreklom od ćelija strome ovarijuma i embrionalnih gonada
3. tumore poreklom od germinativnih ćelija

Tumori poreklom od ćelija strome ovarijuma potiču od ćelija vezivnog tkiva koje proizvode hormone. Relativno su retki i čine svega 5% svih tumora jajnika. Ovi tumori najčešće nisu agresivni, dijagnostikuju se u ranom stadijumu i daju dobar odgovor na hemioterapiju.

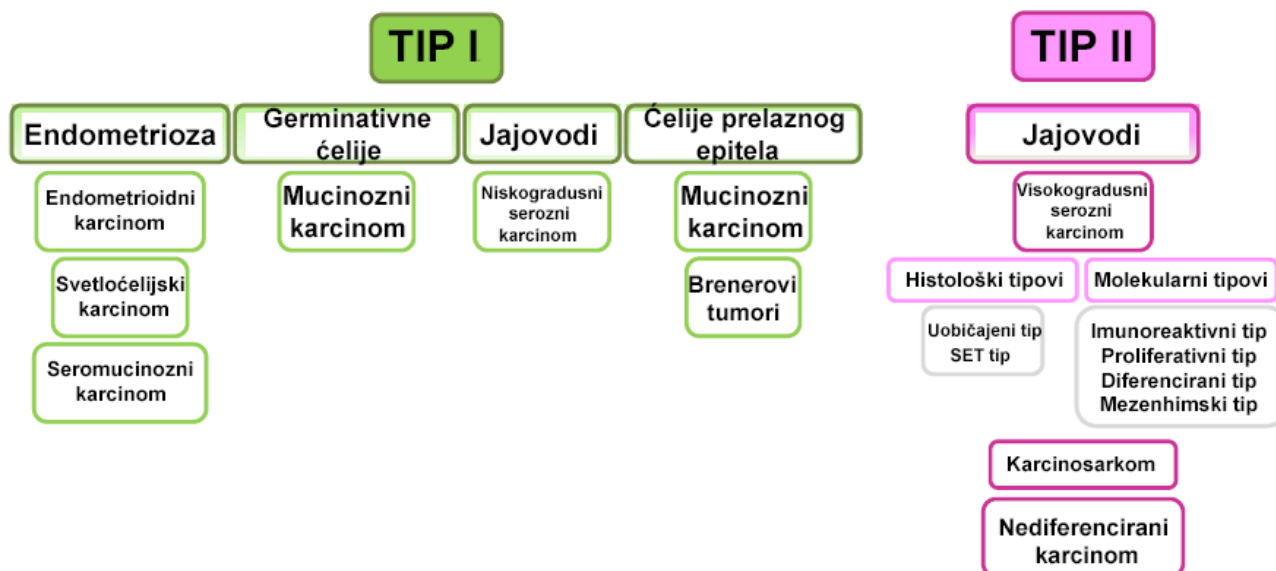
Tumori poreklom od germinativnih ćelija čine 15-20% svih tumora jajnika, javljaju se najčešće kod mladih žena i mogu biti veoma agresivni. Najčešće su u pitanju benigni cistični teratomi dok ostatak tumora iz ove grupe ima visoku incidenciju malignog ponašanja (Romero i Bast, 2012).

Epitelni maligni tumori jajnika (karcinomi jajnika) predstavljaju najučestaliji i najsmrtonosniji histološki tip kancera jajnika, a najčešće se javljaju kod žena starijih od 40 godina (Prat, 2017). Usled nespecifičnog toka bolesti i nepostojanja adekvatnih metoda za rano otkrivanje, bolest se dijagnostikuje u uznapredovaloj fazi kod oko 75% bolesnica (Goff i sar., 2007). Radi se o veoma heterogenoj grupi oboljenja kako u pogledu epidemioloških i genetičkih faktora, tako i prekursorskih lezija, načina širenja, molekularnih promena tokom onkogeneze kao i odgovora na hemioterapiju (Prat, 2017). Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) postoji devet osnovnih histoloških podtipova karcinoma jajnika: visokogradusni serozni, niskogradusni

serozni, mucinozni, endometrioidni, svetloćelijski (engl. *clear cell*), Brennerovi, seromucinozni, karcinosarkomi i nediferencirani karcinomi (Meinhold-Heerlein i sar., 2016).

Na osnovu mehanizma tumorogeneze, kliničkog ponašanja kao i ćelijskog porekla karcinoma jajnika, 2004. godine Kurman i Shih predložili su tzv. dualistički model klasifikacije karcinoma jajnika koji je kasnije izmenjen i proširen (Kurman i Shih, 2016). Svi karcinomi jajnika mogu se svrstati u dva tipa: tip I i tip II. Tip I čine niskogradusni serozni, mucinozni, endometrioidni, svetloćelijski, seromucinozni, i maligni Brennerovi tumori. Oni čine 25% svih malignih tumora jajnika i odgovorni su za 10% smrtnih slučajeva. Najčešće se dijagnostikuju u ranom stadijumu, sporo rastu i ne odgovaraju na standardnu hemioterapiju, ali često pokazuju dobar odgovor na hormonski tretman. Takođe, ovi tumori uglavnom su genetički stabilni, a karakterišu se specifičnim mutacijama u genima kao što su *KRAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*), *BRAF* (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) *ERBB2* (engl. *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*), *CTNNB1* (engl. *catenin beta 1*), *PTEN*, *PIK3CA* (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) i *ARID1A* (engl. *AT-rich interaction domain 1A*) kao i odsustvom *TP53* mutacija. Tip II čine visokogradusni serozni, karcinosarkomi i nediferencirani karcinomi jajnika. Oni čine 75% svih malignih tumora jajnika i odgovorni su za 90% smrtnih slučajeva karcinoma jajnika. Veoma su agresivni, dijagnostikuju se u uznapređovalom stadijumu, inicijalno dobro odgovaraju na hemioterapiju, a retko na hormonsku terapiju. Karakterišu se visokom stopom mutacija u *TP53* genu, a retko nose mutacije u genima koje se detektuju u tumorima tipa I. Takođe, ovi tumori najčešće nose promene u *RAS/MEK*, *RBI* (engl. *retinoblastoma 1*), *FOXM1* (engl. *forkhead box M1*), *NOTCH1* (engl. *notch receptor 1*) i *PI3K* signalnom putu, mutacije u *BRCA* genima kao i drugim genima koji su uključeni u homologu rekombinaciju i veoma su genetički nestabilni. Visokogradusni serozni karcinom jajnika (engl. *high-grade serous ovarian carcinoma*, HGSOC) predstavlja najučestaliji i najagresivniji histološki tip ove podgrupe, a u najvećem broju slučajeva dijagnostikuje se kada je već metastazirao na druga tkiva. Smatra se da preko polovina ovih karcinoma sadrži defekte u homologoj rekombinaciji (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2011) i da gotovo svi HGSOC nose defekte u najmanje jednom od pet glavnih mehanizama za popravku oštećenja na DNK (Gee i sar., 2018).

Novija molekularno-biološka istraživanja pokazala su da se prema izmenjenoj klasifikaciji Kurman-ovog i Shih-ovog modela, tumori tipa I mogu podeliti u tri grupe: 1) karcinomi povezani sa endometriozom (endometrioidni, svetloćelijski i seromucinozni); 2) niskogradusni serozni i 3) mucinozni i Brennerovi tumori (Kurman i Shih, 2016). Takođe, pokazano je da se HGSOC mogu morfološki podeliti na dve grupe: uobičajeni tip (engl. *the usual type*) i SET tip (engl. *solid, pseudo-endometrioid and/or transitional cell carcinoma-like*). U odnosu na uobičajeni tip, SET tumori sadrže veći broj tumor-infiltrirajućih limfocita, veći mitotički indeks i češće se povezuju sa *BRCA* mutacijama. Dodatne analize profila genske ekspresije pokazale su da se HGSOC mogu podeliti na četiri molekularna podtipa: imunoreaktivni, diferencirani, proliferativni i mezenhimski. Podela je izvršena na osnovu ekspresije imunoregulatornih gena kao i gena koje eksprimiraju stromalne ćelije, a ovi podtipovi povezuju se sa različitim kliničkim ishodom bolesti. Smatra se da je preživljavanje najbolje kod imunoreaktivnog podtipa, a najlošije kod mezenhimskog (Verhaak i sar., 2012) (Slika 1.2).



**Slika 1.2. Dualistički model klasifikacije karcinoma jajnika.** Karcinomi jajnika mogu voditi poreklo od tkiva endometrija, jajovoda, germinativnih ćelija jajnika ili prelaznog epitela. Karcinomi jajnika tipa I obuhvataju endometrioidne, svetloćelijske, niskogradusne serozne, mucinozne, seromucinozne karcinome i maligne Brenerove tumore. Karcinomi jajnika tipa II uglavnom čine visokogradusni serozni karcinom, karcinosarkom i nediferencirani karcinom. SET (engl. *solid, pseudo-endometrioid and/or transitional cell carcinoma-like*) (preuzeto iz Kurman i Shih, 2016).

Prilikom dijagnostikovanja kancera jajnika, osim podele na histološke tipove, vrši se i podela na FIGO stadijum i histološki gradus tumora. Određivanje stadijuma kancera jajnika, koji se odnosi na stepen proširenosti bolesti, vrši se prema kriterijumima FIGO (fra. *Federation Internationale de Gynecologie et Obstetrique*) klasifikacije a na osnovu rezultata dobijenih hirurškom eksploracijom, kao i na osnovu konačne histopatološke i citološke analize. FIGO federacija je 2014. godine objavila izmenjen način stadiranja kako bi obuhvatila kancer jajnika, jajovoda i primarni peritonealni kancer u jedinstven sistem na osnovu novih otkrića baziranih na histopatologiji, imunohistohemiji i molekularno genetičkim analizama (Zeppernick i Meinhold-Heerlein, 2014) (Tabela 1). Primarni peritonealni kancer predstavlja redak maligni tumor peritonealne šupljine koji po kliničkim i histološkim karakteristikama veoma podseća na visokogradusni serozni karcinom jajnika (Kurman i Shih, 2016).

Podela na osnovu histološkog gradusa, odnosno stepena dediferencijacije tumora, vrši se samo za karcinome jajnika. U tu svrhu, danas su u upotrebi dva sistema: jedan se koristi za ne-serozne karcinome, koji se prema gradusu tumora mogu podeliti na dobro diferencirane (G1), umereno diferencirane (G2) i slabo diferencirane tumore (G3) (Berek i sar., 2015). Sa druge strane, serozni karcinomi jajnika dele se isključivo na nisko- i visokogradusne (Bodurka i sar., 2012).

**Tabela 1.** FIGO klasifikacija kancera jajnika, jajovoda i peritoneuma (Zeppernick i Meinhold-Heerlein, 2014)

<b>FIGO I</b>	Tumor ograničen na jajnike ili jajovode
<b>FIGO II</b>	Tumor uključuje jedan ili oba jajnika ili jajovoda sa širenjem u pelvis (karlicu)/ Primarni peritonealni kancer
<b>FIGO III</b>	Tumor uključuje jedan ili oba jajnika ili jajovoda, ili se radi o peritonealnom kanceru, sa citološki ili histološki potvrđenim širenjem na peritoneum van pelvisa i/ili metastaze u retroperitonealnim limfnim čvorovima
<b>FIGO IV</b>	Prisustvo udaljenih metastaza izvan peritonealne šupljine

### 1.5. Mehanizam tumorogeneze karcinoma jajnika

Iako se prvobitno smatralo da svi histološki tipovi karcinoma jajnika nastaju iz displastičnih skvamoznih epitelnih ćelija koje se nalaze na površini jajnika ili u okviru inkluzivnih cisti nastalih invaginacijom površinskog epitela (Berchuck i sar., 1993), novije studije ukazale su da različiti podtipovi karcinoma jajnika imaju i različito ćelijsko poreklo (Dubeau i Drapkin, 2013). Danas je poznato da karcinom jajnika može nastati od površinskog epitela jajnika, ali i epitela jajovoda i mezotela koji pokriva peritonealnu šupljinu (Nik i sar., 2014; Zeppernick i Meinhold-Heerlein, 2014). Jednu od veoma značajnih razlika između karcinoma jajnika tipa I i II predstavljaju upravo prekursorske lezije iz kojih nastaju, što možda na najbolji način objašnjava zašto karcinomi tipa I relativno dugo ostaju ograničeni na jajnike i imaju indolentan tok, dok se karcinomi tipa II veoma brzo šire na okolna tkiva. Danas se smatra da se karcinomi tipa I razvijaju iz benignih prekursorskih lezija smeštenih u jajniku ili van tkiva jajnika kao što su endometrioidne ciste ili cistadenomi. Tako je pokazano da niskogradusni serozni karcinom jajnika nastaje iz benignih prekursorskih lezija površinskog epitela jajnika ili jajovoda (Hunter i sar., 2011; Qiu i sar., 2017); svetloćelijski, seromucinozni i niskogradusni endometriodni tip karcinoma jajnika nastaju malignom transformacijom ektopičnih ćelija endometrijuma (Jiang i sar., 1998), dok mucinozni i Brennerovi tumori mogu nastati malignom transformacijom ćelija prelaznog epitela koji se nalazi u okviru tuboperitonealne veze (Slika 1.2) (Kurman i Shih, 2016).

S druge strane, pokazano je da se značajan procenat karcinoma tipa II razvija od intraepitelnih karcinoma jajovoda koji se zatim šire na jajnik i ostala tkiva. Naime, oko 80% visokogradusnih seroznih tumora jajnika nastaje od premalignih lezija smeštenih u distalnom delu jajovoda, a označeni su kao serozni tubalni intraepitelni karcinomi (engl. *serous tubal intraepithelial carcinomas*, STIC) (Kindelberger i sar., 2007; Carlson i sar., 2008). Do ovog otkrića došlo se na osnovu analize histopatoloških uzoraka jajovoda prikupljenih prilikom profilaktičkog zahvata uklanjanja jajovoda i jajnika (salpingooforektomije) kod žena sa naslednom predispozicijom za nastanak karcinoma jajnika (Callahan i sar., 2007). Takodje, STICs su identifikovane u jajovodima 70% žena sa sporadičnim karcinomom jajnika kao i seroznim peritonealnim kancerom, što ukazuje da ova povezanost nije ograničena samo na nosioce *BRCA* mutacija (Kindelberger i sar., 2007). Osim toga, STIC su nađeni i u jajovodima žena koje su se podvrgle histerektomiji i bilateralnoj salpingooforektomiji iz ne-profilaktičkih razloga (Morrison i sar., 2015). Takođe, studije su pokazale da HGSOC i STIC dele brojne genetičke promene, uključujući mutacije u *TP53* i varijacije u broju kopija gena (engl. *copy number variations*) (Testa i sar., 2018).

Najnovija istraživanja pokazala su da HGSOC ima višestruko ćelijsko poreklo, tj. da se odnosi na visoko gradusni serozni karcinom koji može nastati od površinskog epitela jajnika, jajovoda i mezotelne površine peritoneuma (Zhang i sar., 2019; Kim i sar., 2018), kao i da se u zavisnosti od ćelijskog porekla, ovi tumori značajno razlikuju u pogledu genske ekspresije, metastatskog potencijala, patogeneze i odgovora na hemioterapiju. Osim što predstavljaju mesto



ćelijskog porekla HGSOC, smatra se da drugi ćelijski tipovi unutar peritonealne šupljine, upravo putem jajovoda mogu pristupiti jajnicima. Primer su ćelije gastrointestinalnog trakta od kojih mogu nastati mucinozni tumori jajnika (Lee i Nucci, 2003; Khunamornpong i sar., 2006).

## 1.6. Skrining karcinoma jajnika

Trenutno ne postoje efikasne metode za rano otkrivanje karcinoma jajnika (Matulonis i sar., 2016), a jedan od najznačajnih tumor markera kod karcinoma jajnika jeste CA-125 (engl. *cancer antigen 125*). U pitanju je glikozilovani transmembranski mucin visoke molekulske mase koji je značajan za adheziju, pokretljivost i invaziju kancerskih ćelija jajnika a povišen je kod 80-85% bolesnica sa uznapredovalim karcinomom jajnika (Bast i Spriggs, 2011). Ipak, ovaj biomarker često ne pokazuje povišene vrednosti u ranim fazama bolesti, tako da se njegovim korišćenjem može dijagnostikovati samo do 50% ovih slučajeva (Urban i sar., 2003). Takođe, CA-125 može pokazati povišene vrednosti i u slučaju određenih benignih ginekoloških stanja, kao što su endometriozna ili trudnoća (Buamah, 2000), ali i neginekoloških maligniteta kao što su kancer dojke, pluća i gastrointestinalni kanceri (Miralles i sar., 2003). Za razliku od opšteg skrininga, promene nivoa CA-125 nakon inicijalne hemioterapije visoko su specifične i koriste se za praćenje bolesnica u remisiji (Rustin i sar., 2001).

Usled nedovoljne senzitivnosti, CA-125 tumor marker najčešće se koristi u kombinaciji sa drugim biomarkerima, pre svega humanim epididimalnim proteinom 4 (HE4) (Escudero i sar., 2011). HE4 predstavlja sekretorni glikoprotein za koji je pokazano da se prekomerno eksprimira u karcinomu jajnika, ali ne i u normalnom epitelu jajnika (Heliström i sar., 2003). Kombinovanje vrednosti CA-125 i HE4 daje bolje rezultate nego što je to slučaj sa pojedinačnim biomarkerima (Moore i sar., 2008). Na osnovu ovih podataka razvijen je algoritam pod nazivom ROMA (engl. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*), koji istovremeno meri nivoe CA-125 i HE4 tumor markera, a zajedno sa podacima o statusu menopauze koristi se za detekciju karcinoma jajnika kod bolesnica sa prisutnom tumorskom masom u pelvisu (Moore i sar., 2010).

## 1.7. Prognostički faktori karcinoma jajnika

Jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora u kanceru jajnika predstavlja FIGO stadijum koji se utvrđuje tokom operativnog zahvata. Bolest se najčešće javlja u kasnom stadijumu (stadijum III i IV) kada je 5-godišnje preživljavanje samo 29%, a svega 15% slučajeva dijagnostikuje se u lokalizovanom stadijumu (stadijum I) sa 5-godišnjim preživljavanjem od oko 90% (Reid i sar., 2017). Od ostalih prognostičkih faktora izdvajaju se gradus tumora, histološki tip, prisustvo ascita, kao i volumen zaostalog (rezidualnog) tumora nakon primarnog hirurškog lečenja.

Gradus tumora, odnosno stepen ćelijske diferencijacije, koreliše sa prognozom bolesti, pa tako one bolesnice sa tumorima niskog gradusa imaju bolje preživljavanje u odnosu na one sa tumorima visokog gradusa. Ipak, ova korelacija uočava se samo kod bolesnica sa ranim stadijumom karcinoma jajnika (Onal i sar., 2017). Kada je u pitanju uznapredovali karcinom jajnika histološki tip tumora predstavlja značajan prognostički faktor, a pokazano je da su u tom slučaju mucinozni i svetloćelijski karcinomi jajnika povezani sa lošijim ishodom bolesti (Chang i sar., 2018).

Nastanak ascita, odnosno prekomerna akumulacija tečnosti u peritonealnoj šupljini, povezana je sa intraperitonealnim širenjem tumorskih ćelija koje dovodi do opstrukcije limfnih sudova kao i povećanja permeabilnosti tumorske mikrovaskulature sekrecijom vazoaktivnih i angiogenih faktora (Zebrowski i sar., 1999; Feldman i sar., 1972; Davidson i sar., 2002). Detekcija malignih ćelija u ascitu ukazuje da je došlo do degradacije epitelne bazalne membrane. Zbog toga, asciti predstavljaju negativni prognostički faktor u karcinomu jajnika i detektuju se kod oko 80% uznapredovalih slučajeva kancera jajnika (Huang i sar., 2013).



Kada je u pitanju volumen zaostalog tumora nakon primarnog hirurškog lečenja, pokazano je da one bolesnice sa volumenom većim od 2 cm imaju kraće preživljavanje (Onal i sar., 2017).

Starost i performans status bolesnica sa karcinomom jajnika takođe predstavljaju značajne prognostičke faktore (Thigpen i sar., 2010). Performans status odnosi se na opšte zdravstveno stanje bolesnika u trenutku dijagnoze bolesti: 0 - bez simptoma; 1 - simptomatski ali potpuno ambulatorni; 2 - simptomatski, manje od 50% vremena provodi u krevetu; 3 - simptomatski, više od 50% vremena provodi u krevetu, ali nije vezan za krevet; 4 - vezan za krevet. Bolesnice sa performans statusom 0 i 1 imaju značajno duže preživljavanje u odnosu na bolesnice sa statusom 2, 3 i 4 (Onal i sar., 2017).

## 1.8. Terapija karcinoma jajnika

Standard u lečenju karcinoma jajnika predstavlja hirurško uklanjanje tumora praćeno hemioterapijom koja se najčešće bazira na platini (Ledermann i sar., 2013). Izuzetak čine bolesnice sa niskogradusnim karcinomima ograničenim na jajnike, nesvetloćelijske histologije, za koje je indikovano samo hirurški zahvat. Cilj operativnog zahvata jeste kompletna citoredukcija, odnosno uklanjanje svih makroskopski vidljivih tumorski nodusa unutar peritonealne šupljine (Matulonis i sar., 2016). Kod uznapredovalih stadijuma karcinoma jajnika (FIGO III i IV) često nije moguće izvršiti kompletnu citoredukciju pa takve bolesnice, sa neoperabilnim lezijama ili usled lošeg performans statusa, primaju hemioterapiju pre hirurškog zahvata (neoadjuvantna hemioterapija) (Cortez i sar., 2018).

Hemioterapijski režim nakon hirurškog zahvata najčešće čini kombinacija karboplatine i paklitaksela (Goh i sar., 2015). Karboplatina predstavlja alkilirajući agens koji se kovalentno vezuje za DNK i dovodi do nastanka intra- i interlančanih DNK adukta (de Sousa i sar., 2014). Paklitaksel se nekovalentno vezuje za mikrotubule povećavajući njihovu stabilnost što onemogućava formiranje deobnog vretena (Barbuti i sar., 2015). Oba ova agensa indukuju apoptozu.

Uprkos dobrom inicijalnom odgovoru na hemioterapiju, oko 70% bolesnica dobije relaps u roku od dve godine (Giornelli, 2016). U tom slučaju prognoza bolesti, kao i odgovor na narednu liniju hemioterapije, zavisi od vremena koje je proteklo između poslednjeg hemioterapijskog tretmana baziranog na platini i pojave relapsa. Prema važećoj konvenciji, bolesnice se prema odgovoru na primenjenu terapiju platine mogu svrstati u dve grupe: platina-senzitivne su one kod kojih je progresija bolesti nastupila nakon 6 ili više meseci od primene poslednje terapije na bazi platine, a platina-rezistentne one kod kojih je progresija nastupila u okviru 6 meseci od poslednje terapije bazirane na platini. Unutar ove grupe, bolesnice koje su progredirale u toku primene same terapije često se označavaju kao platina-refraktorne (Francis i sar., 2017).

### 1.8.1. Ciljana terapija u karcinomu jajnika

Terapijske opcije u lečenju karcinoma jajnika proširene su uvođenjem ciljanih terapija koje pokazuju veću selektivnost prema kancerskim ćelijama i smanjena neželjena dejstva (Kim i sar., 2012a). Ciljane terapije koje se danas primenjuju u lečenju karcinoma jajnika uključuju humanizovano monoklonsko antitelo (bevacizumab) i oralne inhibitore poli (ADP-riboza) polimeraze (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors*, PARPi) za koje je pokazano da odlažu progresiju bolesti (Burger i sar., 2011; Ledermann i sar., 2012).

Bevacizumab predstavlja antiangiogeni agens koji ostvaruje ciljano terapijsko dejstvo delujući na tumorsku mikrosredinu. Ovo rekombinantno humanizovano monoklonsko antitelo vezuje se i blokira vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) koji je neophodan za stvaranje novih krvnih sudova (neoangiogenezu) tokom tumorskog rasta. U karcinomu jajnika bevacizumab dovodi do inhibicije tumorskog rasta, sprečava formiranje ascita kao i metastatsko širenje bolesti (Kumaran i sar., 2009; Smolle i sar., 2014). Bevacizumab je indikovano kao prva linija u lečenju uznapredovalog karcinoma jajnika i rekurentnog karcinoma

jajnika (rezistentnog ili senzitivnog na platinu), prvobitno u kombinaciji sa hemioterapijom, a zatim kao monoterapija do progresije bolesti (Marchetti i sar., 2019).

Drugi vid ciljane terapije karcinoma jajnika odnosi se na primenu PARP inhibitora. PARP predstavlja grupu enzima koji imaju važnu ulogu u popravci jednolančanih DNK prekida. PARP inhibitori sprečavaju reparaciju jednolančanih prekida što dovodi do nastanka dvolančanih DNK prekida koji se ne mogu popraviti u tumorima sa nefunkcionalnim mehanizmom homologe rekombinacije kao što su tumori koji nose štetne mutacije u *BRCA1/2* genima. Prema tome, upotreba PARP inhibitora dovodi do akumulacije oštećenja na DNK i do smrti tumorskih ćelija (O'Connor, 2015; McCabe i sar., 2006). PARP inhibitori ispoljavaju antitumorsko dejstvo putem tzv. sintetičke letalnosti, a radi se o fenomenu u kojem ćelija može da toleriše dve genetičke mutacije ukoliko se dese nezavisno jedna od druge, ali u kombinaciji dovode do ćelijske smrti (Papa i sar., 2016).

U određenim slučajevima, moguće je identifikovati fenotip koji se odlikuje sličnim kliničkim ponašanjem kao i *BRCA1/2* mutirani karcinomi čak i u odsustvu *BRCA1/2* mutacija, a označava se kao „*BRCAness*” (Lord i Ashworth, 2016). Genomske analize pokazale su da oko 50% visokogradusnih seroznih karcinoma jajnika ima narušen mehanizam homologe rekombinacije, bilo usled germinativnih ili somatskih mutacija u *BRCA1/2* genima, epigenetičke inaktivacije *BRCA1* gena ili drugih molekularnih događaja nezavisnih od *BRCA1/2* gena (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2011). Ovakav molekularni profil tumora povezan je sa dobrim odgovorom na platinske derivate i PARP inhibitore. Prvi oralni PARP inhibitor, olaparib, odobren je kao terapija održavanja kod bolesnica sa *BRCA1/2* mutacijama sa platina-senzitivnim rekurentnim visokogradusnim seroznim karcinomom jajnika koje su primile tri ili više linija hemioterapije (Ledermann i sar., 2012).

## 1.9. Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT)

Uprkos značajnim naprecima na polju dijagnostike i lečenja kancera, metastaze i dalje predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti kod osoba obolelih od malignih tumora (Chaffer i Weinberg, 2011). Invazivno-metastatska kaskada opisuje kompleksan niz događaja koji dovode do širenja kancerskih ćelija na okolna tkiva i udaljene organe, odnosno pojave sekundarnih tumora. Ovaj proces počinje kada tumorske ćelije postanu pokretne, degraduju bazalnu membranu i vanćelijski matriks (VCM), napuste primarni tumor i izvrše invaziju u okolno tkivo. Nakon toga ulaze u cirkulaciju, mehanizmom koji se označava kao intravazacija, gde se suočavaju sa intravaskularnom degradacijom i imunskim sistemom. Samo mali broj diseminovanih neoplastičnih ćelija koje su ušle u cirkulaciju sposobne su da prežive i da putem ekstravazacije napuste vaskularni lumen i migriraju u tkivo udaljenih organa gde će u jednom trenutku proliferisati kako bi dovele do pojave klinički detektabilnih (makroskopskih) metastaza (Massagué i Obenaus, 2016).

Jedna od karakteristika karcinoma jajnika jeste širenje bolesti pasivnim mehanizmom koje podrazumeva da ćelije koje su napustile primarni tumor, nošene peritonealnom tečnošću kroz abdominalnu šupljinu, metastaziraju na peritoneum i omentum (Lengyel, 2010). Iako je peritonealno širenje dominantno, opisani su i drugi mehanizmi širenja karcinoma jajnika. Asciti koji nastaju u peritonealnoj šupljini uglavnom se dreniraju putem limfnih sudova u dijafragmi. Ovo omogućava kancerskim ćelijama prisutnim u ascitu da metastaziraju na limfne čvorove (Paño i sar., 2015). Takođe, iako je davno otkriveno postojanje cirkulišućih tumorskih ćelija jajnika (Judson i sar., 2003), dugo se smatralo da je ovaj način širenja karakterističan za kasne stadijume bolesti. Ipak, noviji podaci ukazuju da su hematogene metastaze u karcinomu jajnika češće nego što se prvobitno mislilo (Coffman i sar., 2016).

Tačni molekularni mehanizmi koji dovode do metastaziranja tumorskih ćelija jajnika nisu u potpunosti razjašnjeni (Lengyel, 2010), a novija istraživanja ukazuju da epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) ima važnu ulogu u metastatskom širenju mnogih malignih tumora epitelnog porekla, uključujući i karcinom jajnika (Davidson i sar., 2012; Heerboth i sar., 2015).

EMT predstavlja složen, višestepeni morfogenetički proces koji omogućava epitelnim ćelijama da putem brojnih biohemijjskih promena postepeno steknu karakteristike mezenhimijskih ćelija kao što su migratorni kapacitet, invazivnost, otpornost na apoptozu i sposobnost produkcije enzima koji razgrađuju VCM (Kalluri i Neilson, 2003). Nakon EMT ćelije prolaze kroz reverzan proces, mezenhimijsko-epitelnu tranziciju, MET, kako bi rekonstruisale epitelni fenotip (Heerboth i sar., 2015). Ovaj fenomen prvobitno je uočen tokom embrionalnog razvića, a kasnije je pokazano da ima ulogu i u adultnom tkivu, kako u normalnim fiziološkim procesima tako i u određenim patološkim stanjima. U zavisnosti od biološkog konteksta, danas razlikujemo tri vrste EMT programa: tip I uočava se tokom embrionalnog razvića, tip II prilikom reparacije tkiva nakon povrede, dok se tip III vezuje za progresiju karcinoma (Zeisberg i Neilson, 2009). Tip I odvija se tokom gastrulacije i migracije ćelija neuralne kreste, a neke od ćelija koje su migrirale prolaze kroz MET kako bi postale epitelne ćelije u organima koji vode poreklo od mezoderma i endoderma. Tip II dovodi do diferencijacije epitelnih ćelija u fibroblaste koji rekonstruišu VCM nakon povrede tkiva (Weber i sar., 2012). U slučaju kontinuirane inflamacije ovaj tip EMT procesa može dovesti i do fibroze tkiva (López-Novoa i Nieto, 2009). Tip III odvija se u pojedinim neoplastičnim ćelijama i omogućava im da steknu karakteristike invazivnih ćelija koje su neophodne za metastatsko širenje bolesti (Kalluri i Weinberg, 2009). Nakon što izvrše invaziju i dospeju do udaljenih organa, tumorske ćelije prolaze kroz MET, nakon kojeg ponovo stiču epitelni fenotip kako bi proliferisale i dovele do nastanka metastaza (Heerboth i sar., 2015). U kontekstu neoplastične transformacije, smatra se da je EMT glavni mehanizam koji dovodi do nastanka kancerskih stem ćelija (Mani i sar., 2008) koje predstavljaju subpopulaciju kancerskih ćelija koje imaju sposobnost inicijacije i propagacije bolesti, kao i da je odgovoran za povećanu rezistenciju na hemio- i imunoterapiju (Singh i Settleman, 2010; Terry i sar., 2017).

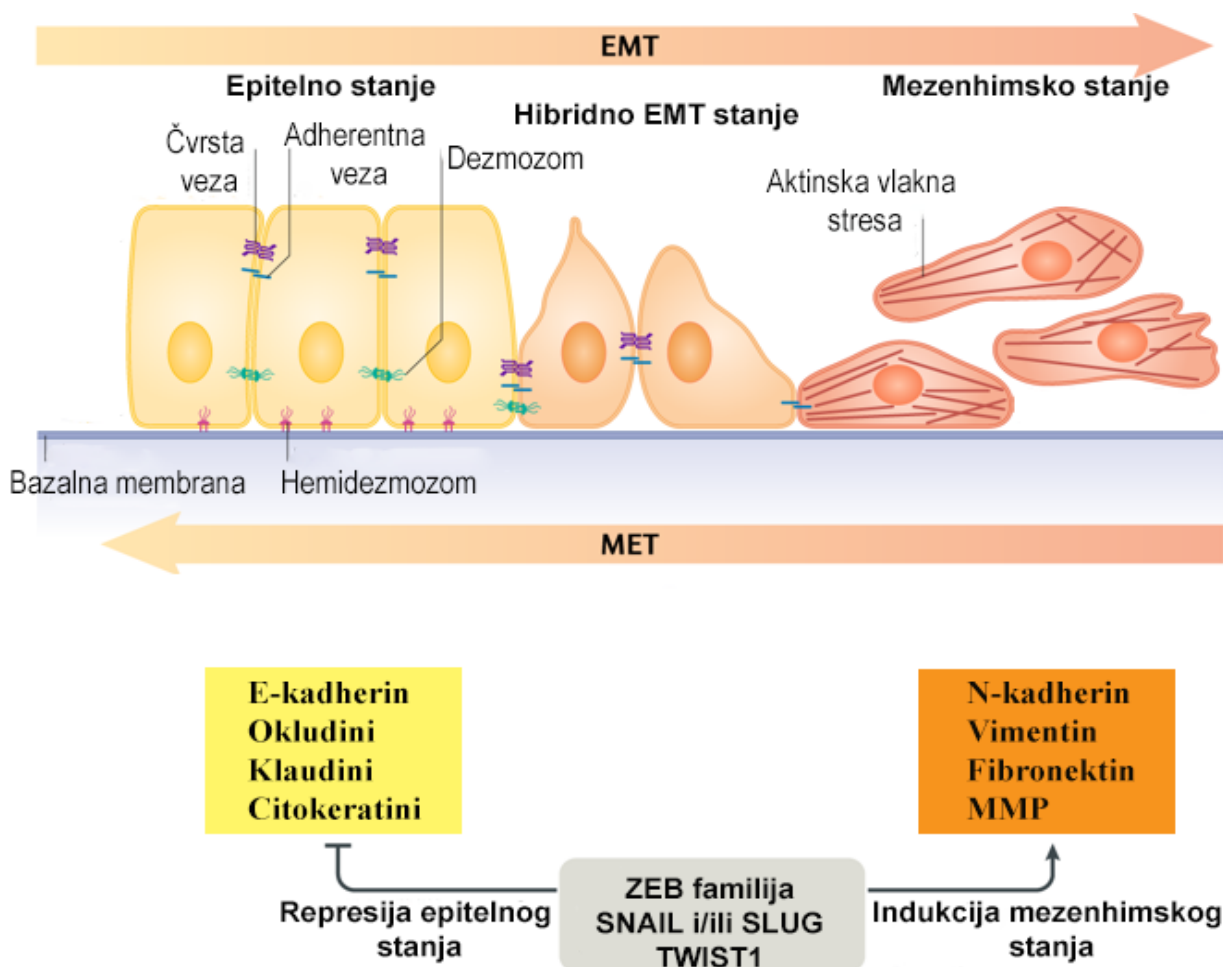
Iako ova tri tipa EMT dovode do različitih bioloških ishoda, još uvek nije poznato koji signali su specifični za svaki od tipova. Ipak, zajednički set stimulusa, puteva signalne transdukcije, transkripcionih faktora i post-translacionih regulatora aktivira i reguliše različite tipove EMT programa (Kalluri i Weinberg, 2009; Zeisberg i Neilson, 2009).

### 1.9.1. Ćelijske promene tokom epitelno-mezenhimijske tranzicije

U normalnim uslovima, epitelne ćelije formiraju organizovane slojeve a međusobno su povezane lateralnim međućelijskim vezama kao što su čvrste veze (lat. *zonula occludens*), pojasne veze (lat. *zonula adherens*), pukotinaste veze (lat. *macula communicans*) i dezmozomi (lat. *macula adherens*). Takođe, epitelne ćelije ekspimiraju specifične citokeratine, intermedijarne filamente citoskeleta, koji stabilizuju dezmozome kako bi osigurali otpornost epitelnih ćelijskih slojeva na različite fizičke uticaje. Ove ćelije odlikuju se apikalno-bazalnom polarnošću koja se ogleda u specifičnoj lokalizaciji adhezivnih molekula, organizaciji specijalizovanih međućelijskih veza, polarizaciji aktinskog citoskeleta i prisustvom bazalne membrane (Dongre i Weinberg, 2019). Vezivanje epitelnih ćelija za bazalnu membranu ostvareno je putem hemidezmozoma koji sadrže integrine a unutar ćelije interaguju sa citokeratinima. Ovakva organizacija izuzetno je značajna za održanje strukturnog integriteta epitela (Schöck i Perrimon, 2002). Za razliku od epitelnih ćelija, mezenhimijske ćelije nisu organizovane u ćelijske slojeve, ne pokazuju organizaciju ćelijskih površinskih molekula kao što je slučaj sa epitelnim ćelijama i ne odlikuju se apikalno-bazalnom polarnošću već ispoljavaju razlike između prednje i zadnje strane ćelije (engl. *front-rear polarity*) (Dongre i Weinberg, 2019). Mezenhimijske ćelije sadrže vimentinske intermedijarne filamente i koriste fokalne adhezije (FA) bogate integrinima kako bi se pričvrstile za VCM. Ove ćelije nalaze se unutar VCM, kontakt sa susednim mezenhimijskim ćelijama ostvaruju isključivo preko FA, a karakterišu se vretenastim oblikom koji im olakšava pokretljivost (Ye i Weinberg, 2015; Lee i Nelson, 2012). U epitelnim ćelijama, aktinski filamenti organizovani su u tanke snopove koji se nalaze neposredno ispod ćelijske membrane i čine kortikalni aktinski citoskelet, dok su u mezenhimijskim ćelijama organizovani u guste kontraktilne snopove aktina koji se označavaju kao stresna vlakna (engl. *stress fibers*) (Kotiyal i Bhattacharya, 2016). Aktinska stresna vlakna imaju

važnu ulogu u morfogenezi, ćelijskoj adheziji i migraciji (Dongre i Weinberg, 2019). Mezenhimske ćelije ključne su tokom razvića s obzirom da mogu da migriraju na udaljena mesta u okviru embriona i dovedu do nastanka organa. Kod adulta, glavna funkcija fibroblasta, prototipskih mezenhimskih ćelija prisutnih u mnogim tkivima, jeste da održavaju strukturni integritet tkiva sekrecijom komponenti VCM (Lee i Nelson, 2012).

EMT proces dovodi do gubitka ekspresije epitelnih markera, pre svega E-kadherina, koji je ključan za održavanje pojasnih međućelijskih veza (Lamouille i sar., 2014). Narušavanje specijalizovanih proteinskih kompleksa koji učestvuju u izgradnji međućelijskih veza praćeno je i smanjenom ekspresijom proteina čvrstih veza, kladina i okladina, a dolazi i do represije gena za dezmozoplakin i razgradnje dezmozoma. Citokeratinski intermedijarni filament, koji održavaju stabilnost dezmozoma, bivaju zamenjeni vimentinom, a dolazi i do povećane ekspresije drugih mezenhimskih markera kao što su neuralni (N)-kadherin, fibronektin, MMP,  $\beta 1$  i  $\beta 3$  integrini (Lee i Nelson, 2012). Epitelne ćelije koje prolaze kroz EMT, uporedo sa gubitkom apikalno-bazalne polarnosti i razgradnjom međućelijskih veza, reorganizuju aktinski citoskelet što im omogućava da steknu vretenastu morfologiju i da postanu pokretljive formiranjem citoplazmatskih produžetaka: lamelipodija, filopodija i invadopodija (Ridley, 2011). Lamelipodije, glavne organele ćelijske pokretljivosti, predstavljaju produžetke ćelijske membrane koji stupaju u kontakt sa okolnom sredinom posredstvom različitih adhezivnih molekula, uključujući integrine i kadherine (Yilmaz i Christofori, 2009). Nasuprot tome, filopodije predstavljaju končaste produžetke lamelipodija koje sadrže čvrste snopove aktinskih vlakana koje prodiru u okolnu sredinu i mogu se smatrati senzornim organima pomoću kojih ćelije detektuju različite signale sredine. Pokazano je da su metastatske ćelije kancera izuzetno bogate strukturama nalik na filopodije i da njihovo prisustvo koreliše sa invazivnošću ovih ćelija (Wang i sar., 2002; Yilmaz i Christofori, 2009). Kako bi se kretale kroz VCM, kancerske ćelije moraju da steknu sposobnost njegovog remodelovanja. To im omogućavaju invadopodije, membranske protruzije bogate aktinom koje ispoljavaju proteolitičku aktivnost, tj. degraduju VCM ekspresijom različitih MMP (Kelly i sar., 1998). Tokom EMT procesa, degradacija bazalne membrane i komponenti VCM olakšava invaziju ćelija u susednu stromu, a u slučaju karcinomskih ćelija, i diseminaciju u udaljena tkiva. Na kraju EMT procesa dolazi do formiranja aktinskih stresnih vlakana, koji čine sastavni deo fokalnih adhezivnih kompleksa, i povećane kontraktilnosti ćelije (Lamouille i sar., 2014). Vimentin, putem interakcije sa mikrotubulama i asociranim motornim proteinima, takođe dovodi do povećanja ćelijske pokretljivosti i promena u ćelijskom obliku i adheziji (Mendez i sar., 2010). Neoplastične ćelije koje prolaze kroz EMT postaju rezistentne na senescenciju i apoptozu (Ansieau i sar., 2008) (Slika 1.3).



**Slika 1.3. Šematski prikaz EMT procesa.** Aktivacija EMT programa dovodi do ekspresije transkripcijskih faktora, ZEB, SNAIL i TWIST, koji inhibiraju ekspresiju gena povezanih sa epitelnim fenotipom (žuti boks) a istovremeno aktiviraju ekspresiju gena povezanih sa mezenhimijskim fenotipom (narandžasti boks). Tokom EMT procesa dolazi do reorganizacije citoskeleta, razgradnje međućelijskih veza, narušavanja apikalno-bazalne polarnosti, ćelije postaju pokretljive i stiču invazivni kapacitet. U tumorima koji spontano nastaju, ćelije karcinoma veoma retko u potpunosti prelaze u mezenhimsko stanje već ispoljavaju hibridni EMT fenotip. Mezenhimske ćelije mogu da se vrte u epitelno stanje prolaskom kroz mezenhimsko-epitelnu tranziciju (MET) (modifikovano prema Dongre i Weinberg, 2019).

### 1.9.2. Signalni putevi koji aktiviraju epitelno-mezenhimsku tranziciju

Različiti signali poreklom iz tumorske mikrosredine mogu pokrenuti signalnu kaskadu događaja koja dovodi do aktivacije EMT procesa. To su pre svega različiti faktori rasta, citokini i hemokini koje sekretuju ćelije tumorske strome (fibroblasti, miofibroblasti, T-limfociti, makrofagi), ali i određeni metabolički faktori (Kang i sar., 2019), hipoksija (Lester i sar., 2007) i oksidativni stres (Prasanphanich i sar., 2014). Pokazano je da stroma visokogradusnih karcinoma u velikoj meri podseća na stromu normalnog epitela tokom inflamacije ili zarastanja rane, a tumor asocirani fibroblasti i makrofagi unutar strome, putem auto- i parakrine signalizacije, indukuju EMT u obližnjim karcinomskim ćelijama (Olumi i sar., 2000). Takođe, karcinomske ćelije koje ekspresiraju EMT markere mogu da modulišu aktivnosti različitih ćelijskih komponenti strome koje formiraju tumorsku mikrosredinu (Terry i sar., 2017).

Pored različitih biohemijskih signala koji regulišu EMT, brojni dokazi ukazuju da mehanički aspekti, kao što je rigidnost VCM, takođe utiču na ćelijsko ponašanje i funkciju (Lee i Nelson, 2012).

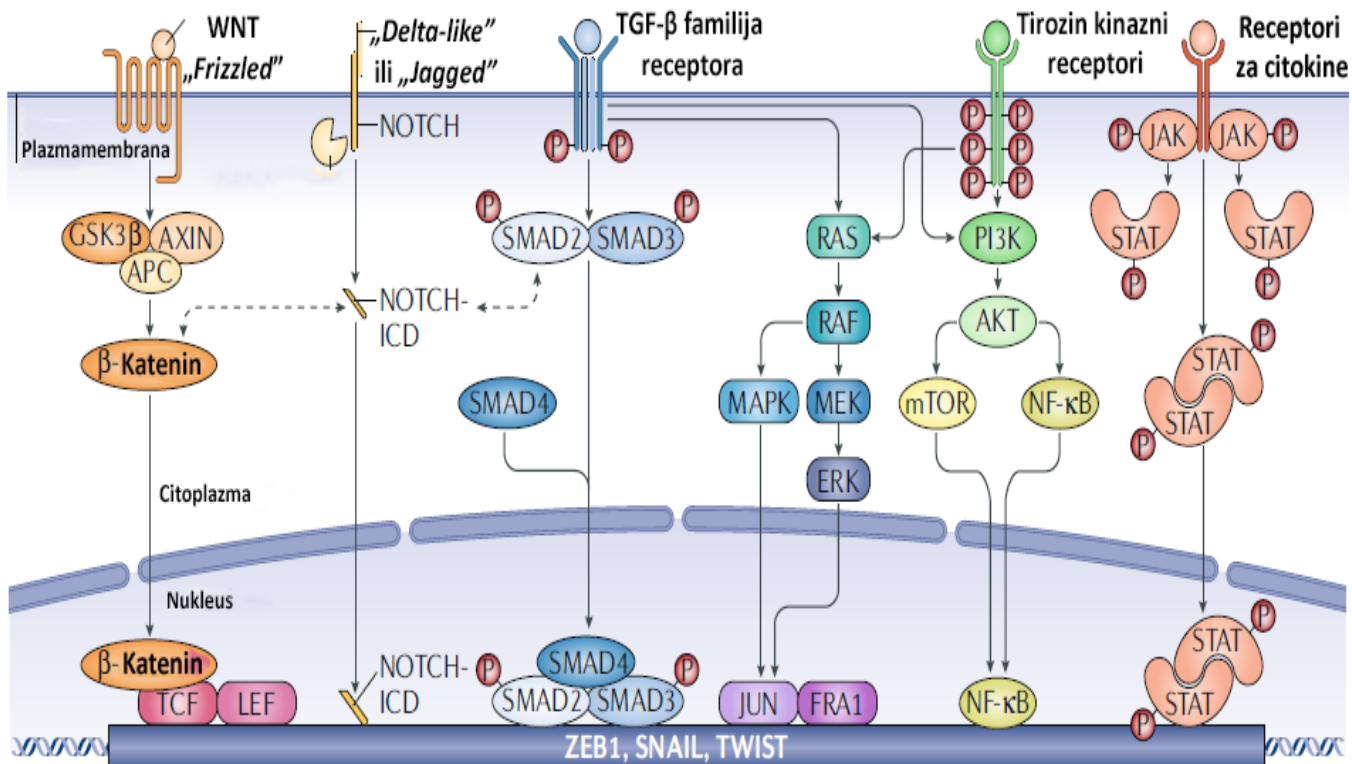
Smatra se da je signalni put koji vodi poreklo od transformišućeg faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) jedan od glavnih pokretača EMT procesa (Xu i sar., 2009). Tokom ranih stadijuma tumorogeneze, TGF- $\beta$  funkcioniše kao tumor supresor, dovodeći do zastoja ćelijskog ciklusa i apoptoze normalnih i premalignih epitelnih ćelija (Zhang i sar., 2017). U kasnijim fazama tumorske progresije, kada su ćelije stekle onkogene mutacije i/ili izgubile funkciju tumor supresornih gena, one postaju otporne na TGF- $\beta$  posredovanu inhibiciju ćelijskog rasta a on, zajedno sa receptorima za koje se vezuje, deluje kao promotor tumorskog rasta i aktivator EMT procesa (Peinado i sar., 2003). Vezivanje liganada za TGF- $\beta$  receptore dovodi do aktivacije SMAD kompleksa koji migriraju u nukleus i kao transkripcioni faktori regulišu ekspresiju velikog broja gena uključenih u sticanje mezenhinskog fenotipa. Pored aktivacije mezehimskih gena, kao što su *VIM* (vimentin) i *FNI* (fibronektin 1), SMAD kompleksi aktiviraju *SNAIL*, *TWIST* i *ZEB* transkripcione faktore (Attisano i Wrana, 2002) koji zajedno dovode do supresije transkripcije *CDH1* (engl. *cadherin 1*), *OCN* (engl. *occludin*) i *CLDN* (engl. *claudin*) gena kao i stimulacije tumorskog rasta (Vincent i sar., 2009). TGF- $\beta$  signalni put interaguje sa drugim signalnim putevima kao što su PI3K-AKT (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase-Akt*), mitogenom-aktivirane protein-kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinases*), Notch, WNT/ $\beta$ -katenin i nuklearni faktor kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) koji takođe doprinose realizaciji EMT programa (Zavadil i Böttinger, 2005; Nawshad i sar., 2005).

Još jedan od signalnih puteva koji može aktivirati EMT jeste WNT (engl. *wingless-related integration site*) signalni put. Ovaj signalni put započinje vezivanjem različitih liganada za „*Frizzled*” familiju ćelijskih površinskih receptora što uzrokuje seriju signalnih događaja koji kulminiraju translokacijom  $\beta$ -katenina u nukleus. Adherentni kompleksi koji formiraju lateralne veze između susednih epitelnih ćelija sadrže E-kadherin koji se sastoji iz N-terminalnog vanćelijskog regiona, transmembranskog i C-terminalnog unutarćelijskog regiona. Putem N-terminalnog domena E-kadherin ostvaruje homotipske interakcije sa E-kadherinom na susednim ćelijama, dok citoplazmatski domen interaguje sa  $\beta$ -kateninom koji ga povezuje sa komponentama aktinskog citoskeleta (Xu i sar., 2009). U normalnim uslovima, E-kadherin sekvstrira celokupan pul  $\beta$ -katenina kojim raspolaže epitelnja ćelija i predstavlja negativnog regulatora kanonskog WNT signalnog puta. Kao posledica razgradnje pojasnih veza i smanjenja E-kadherina, dolazi do oslobađanja  $\beta$ -katenina iz ćelijske membrane, njegovog nakupljanja u citosolu a zatim i relokalizacije u nukleus gde formira komplekse sa transkripcionim faktorima (Balsamo i sar., 1998). Nuklearni  $\beta$ -katenin, delujući kao transkripcioni kofaktor, indukuje ekspresiju brojnih gena uključenih u ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju i tumorsku progresiju (Clevers, 2006).

Brojni dokazi ukazuju na učešće NOTCH signalnog puta u indukciji EMT, kako u normalnim tako i u neoplastično transformisanim ćelijama. Vezivanjem liganada iz familije „*Delta-like*” ili „*Jagged*” za NOTCH receptore pokreće se serija proteolitičkih događaja koji dovode do nastanka unutarćelijskog NOTCH domena (engl. *NOTCH intracellular domain*, NOTCH-ICD) koji zatim prelazi u nukleus gde se udružuje sa vezujućim partnerima i transkripcionim aktivatorima kako bi indukovao ekspresiju ciljnih gena (Kopan, 2002). Smatra se da NOTCH signalni put aktivira EMT transkripcionom regulacijom *SNAIL* i *SLUG* transkripcionih faktora koji suprimiraju ekspresiju E-kadherina a indukuju ekspresiju vimentina i fibronektina (Saad i sar., 2010). Takođe, posredstvom SMAD kompleksa, NOTCH interaguje sa TGF- $\beta$  signalnim putem kako bi indukovao EMT (Blokzijl i sar., 2003).

Još jedan od vidova aktivacije EMT procesa jeste putem vezivanja mitogenih faktora rasta za receptore što dovodi do dimerizacije receptora i aktivacije receptorskih tirozin kinaza koje foforilišu karboksi-terminalni domen ovih receptora. Ovo uzrokuje aktivaciju PI3K/AKT, ERK, p38 MAPK i JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) signalnih puteva koji promovišu ćelijski rast i proliferaciju kao i migraciju ćelija (Domenico i Giordano, 2017). Takođe, vezivanje različitih citokina za svoje receptore uzrokuje fosforilaciju i aktivaciju Janus kinaza (JAK) i signalnih

transduktora i aktivatora transkripcionih proteina (engl. *signal transducer and activator of transcription proteins*, STATs). STAT dimeri aktiviraju transkripciju gena koji kodiraju EMT transkripcione faktore (Slika 1.4).



**Slika 1.4. Različiti signalni putevi koji aktiviraju epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT).**

Interakcijom nekoliko signalnih puteva dolazi do ekspresije transkripcionih faktora (ZEB, SNAIL i TWIST) koji aktiviraju EMT i deluju plejotropno kako bi doveli do tranzicije epitelne ćelije u mezenhimsko ili parcijalno mezenhimsko stanje. Kanonski WNT signalni put aktivira se vezivanjem WNT liganada za „Frizzled“ familiju membranskih receptora. Ovo dovodi do oslobađanja β-katenina vezanog za ćelijsku membranu i do njegovog premeštanja u nukleus gde se vezuje za TCF (engl. *T-cell factor*) i LEF (engl. *lymphoid enhancer-binding factor*) transkripcione faktore koji aktiviraju gene koji pokreću EMT. NOTCH signalni put aktivira se vezivanjem liganada iz „Delta-like“ ili „Jagged“ familije za NOTCH receptore. To prouzrokuje seriju proteolitičkih događaja koji na kraju dovode do oslobađanja aktivnog, unutarćelijskog domena NOTCH receptora (engl. *NOTCH intracellular domain*, NOTCH-ICD) koji ulazi u nukleus i deluje kao transkripcioni koaktivator. Vezivanje TGF-β proteina za TGF-β familiju receptora dovodi do fosforilacije receptora i aktivacije SMAD kompleksa koji aktiviraju EMT program. Vezivanje različitih citokina za svoje receptore uzrokuje fosforilaciju i aktivaciju Janus kinaza (JAK) i signalnih transduktora i aktivatora transkripcionih proteina (engl. *signal transducer and activator of transcription proteins*, STATs). STAT dimeri indukuju ekspresiju EMT transkripcionih faktora (preuzeto iz Dongre i Weinberg, 2019).

### 1.9.3. Glavni transkripcioni faktori epitelno-mezenhimske tranzicije

U odgovoru na različite signale, pokreće se signalna kaskada događaja koja dovodi do aktivacije grupe EMT transkripcionih faktora, koji zajedno sa epigenetičkim, post-transkripcionim i post-translacionim regulatorima upravljaju kompleksnim EMT programom.



Glavni transkripcijski faktori koji regulišu EMT mogu se klasifikovati u transkripcijske faktore sa motivom cinčanih prstiju: SNAIL (engl. *snail family transcriptional repressor*) ((SNAI1 (SNAIL), SNAI2 (SLUG) i SNAI3 (SMUC)) i ZEB (engl. *zinc finger E-box binding homeobox*) (ZEB1 i ZEB2) i heliks-petlja-heliks transkripcijske faktore, odnosno članove TWIST familije (engl. *twist family BHLH transcription factor*) (TWIST 1 i TWIST2) (Garg, 2013). Ovi faktori regulišu međusobnu ekspresiju i u različitim kombinacijama indukuju ekspresiju stotine gena koji su povezani sa mezenhimijskim fenotipom, a inhibiraju ekspresiju epitelnih gena, pre svega E-kadherina (Sánchez-Tilló i sar., 2012). TWIST inhibira ekspresiju E-kadherina indukcijom *SNAIL* i *SLUG* (Smit i sar., 2009). *SNAIL* i *SLUG* vezuju se za promotor *CDH1* gena koji kodira E-kadherin i direktno inhibiraju njegovu transkripciju (Batlle i sar., 2000; Peinado i sar., 2004). *SNAIL* takođe inhibira ekspresiju gena koji regulišu formiranje čvrstih veza i apikalno-bazalnu polarnost (Ikenouchi i sar., 2003; Whiteman i sar., 2008). Sa druge strane, TWIST1 indukuje ekspresiju N-kadherina, kao i citoskeletnih proteina i proteina VCM (Mikheeva i sar., 2010). ZEB familija transkripcijskih faktora inhibira ekspresiju gena čiji su proteini sastavni deo međucelijskih veza, a indukuje ekspresiju mezenhimijskih markera kao što su N-kadherin i vimentin (Sánchez-Tilló i sar., 2012). Pored toga, *SNAIL* i *ZEB2* aktiviraju ekspresiju MMP koji olakšavaju degradaciju bazalne membrane i na taj način promoviraju invaziju ćelija (Miyoshi i sar., 2004). Poslednjih godina, govori se i o postranskripcijskoj regulaciji EMT u koju su uključene mikro RNK (engl. *micro RNA*, miRNA), pre svega članovi miR-200 familije (Gibbons i sar., 2009). Ove miRNK promoviraju epitelni fenotip tako što post-transkripcijski inhibiraju sintezu ZEB1 i ZEB2 proteina. Sa druge strane, ZEB1 i ZEB2 vrše transkripcijsku represiju članova miR-200 familije, uspostavljajući dvostruku negativnu povratnu spregu (Korpál i Kang, 2008).

Iako je EMT dugo posmatrana kao proces koji podrazumeva potpunu transdiferencijaciju epitelnih ćelija u mezenhimijsku, brojne studije pokazale su da se EMT odvija postepeno i da dovodi do nastanka serije fenotipova duž epitelnog-mezenhimijskog (E-M) spektra. Pokazano je da se kompletna EMT odvija samo u nekim tumorskim tipovima, kao što su karcinosarkomi, dok u ostalim tumorima najčešće koegzistiraju hibridna (parcijalna) EMT stanja, odnosno tumorske ćelije koje ekspresiraju mešavinu epitelnih i mezenhimijskih markera (Jordan i sar., 2011; Huang i sar., 2013; Jolly i sar., 2015). Ovakva hibridna stanja pokazuju veću sposobnost metastaziranja nego što je to slučaj sa tumorskim ćelijama koje su u potpunosti stekle mezenhimijske karakteristike (Nieto i sar., 2016; Lambert i sar., 2017). Na osnovu ovih saznanja, predložen je nov termin, epitelnog-mezenhimijska plastičnost (EMP) kako bi se opisala sposobnost ćelija da ispoljavaju E-M odlike kao i da prelaze između različitih E-M fenotipskih stanja duž E-M spektra koja ne možemo lako razlikovati na osnovu postojećih znanja (Yang i sar., 2020b). Postojanje različitih E-M ćelijskih subpopulacija dovodi do pojave značajne fenotipske heterogenosti unutar tumora (Pastushenko i sar., 2018).

Iako se smatralo da je EMT primarno regulisana na transkripcijskom nivou, putem represivne aktivnosti transkripcijskih faktora, mišiji model duktalnog adenokarcinoma pankreasa pokazao je da do gubitka epitelnog fenotipa u većini ovih tumora dolazi post-transkripcijski, odnosno alternativnim mehanizmom koji podrazumeva proteinsku internalizaciju tj. relokalizaciju epitelnih proteina, i dovodi do nastanka parcijalnog EMT fenotipa (Aiello i sar., 2018). Parcijalni program EMT povezan je sa relokalizacijom E-kadherina i drugih epitelnih proteina u unutrašnjost kancerske ćelije, što onemogućava ćelijsku adheziju, ali ostavlja mogućnost njihove preraspodele na površinu ćelije. Karcinomske ćelije koje koriste ovaj EMT program migriraju kao klasteri, što je u suprotnosti sa tradicionalno definisanim EMT mehanizmom koji podrazumeva migraciju pojedinačnih karcinomskih ćelija. Ovi rezultati ukazali su da ćelije karcinoma poseduju različite mehanizme putem kojih gube epitelni fenotip što rezultuje različitim vidovima invazije i diseminacije tumora. Za sada nisu pronađeni dokazi koji bi ukazivali da ova dva programa koegzistiraju u okviru istog tumora, što ukazuje da je tendencija tumorskih ćelija da koriste bilo kompletan bilo parcijalan EMT program specifična i stabilna odlika određenog tumorskog tipa.

Osnovne promene kroz koje prolaze epitelnih ćelija tokom EMT procesa jesu narušavanje međucelijskih veza, izmenjena interakcija sa komponentama VCM kao i promene u citoskeletnoj



organizaciji (Bartis i sar., 2014). Zbog toga se smatra da geni uključeni u procese ćelijske adhezije i migracije mogu biti potencijalni regulatori tumorske invazije i metastatskog širenja karcinoma jajnika (Goetsch i sar., 2013). U ovom radu proučavana su sledeća tri gena: adhezivni spojni molekul A (engl. *junctional adhesion molecule A*, JAM-A), integrin alfa V (engl. *integrin alpha V*, ITGAV) i kaldezmon 1 (engl. *caldesmon 1*, CALD1). JAM-A predstavlja transmembranski glikoprotein koji je važan konstituent čvrstih međućelijskih veza (Zhao i sar., 2014), ITGAV je član familije integrina, molekula važnih za uspostavljanje veza između ćelija i VCM (Bianconi i sar., 2016), dok CALD1 predstavlja aktin-vezujući protein citoskeleta koji ima važnu ulogu u regulaciji aktinomiozinskog kontraktilnog sistema (Mayanagi i Sobue, 2011). Identifikacija ključnih EMT markera od velikog je značaja prilikom prevencije širenja karcinoma jajnika i poboljšanja kliničkog ishoda ovih bolesnica.

### 1.10. Adhezivni spojni molekul A (JAM-A)

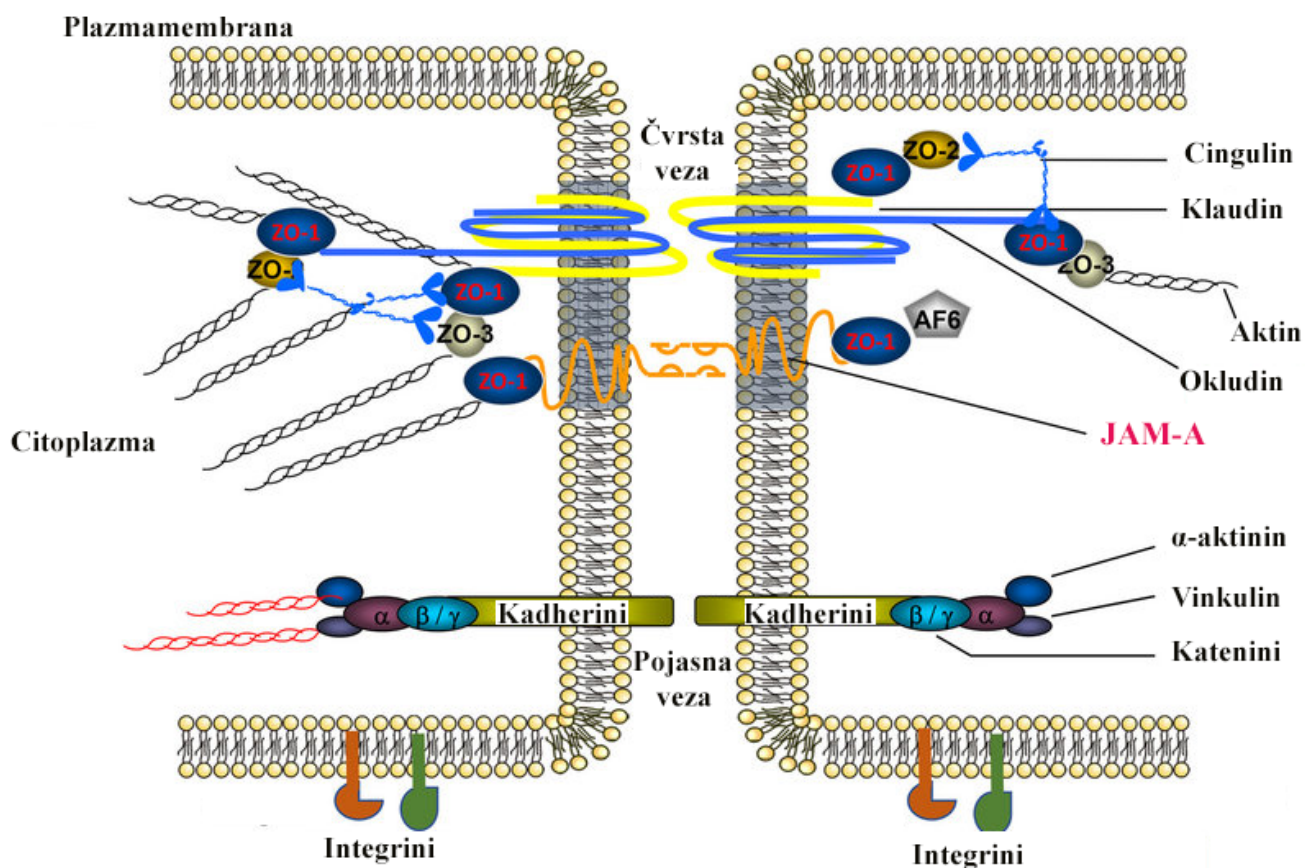
Adhezivni spojni molekuli predstavljaju familiju transmembranskih proteina koji učestvuju u izgradnji čvrstih veza, a povezuju susedne ćelije putem homo- i heterotipskih interakcija (Matter i Balda, 2003). Čvrste veze nalaze se na apikalnom delu lateralnih membrana epitelnih, a među njima i endotelnih ćelija, i predstavljaju dinamične strukture izuzetno značajne za održavanje međućelijske adhezije i pravilne organizacije tkiva (Martin, 2014). Pre svega, čvrste veze funkcionišu kao barijere koje kontrolišu paraćelijsku permeabilnost i regulišu trans-epitelno kretanje jona, vode i drugih molekula (Anderson i Van Itallie, 2009). Takođe, učestvuju u održavanju ćelijske polarnosti, a mogu se posmatrati i kao deo imunskog sistema jer onemogućavaju prodor bakterija i virusa u podepitelno tkivo (Liau, 2006). Putem vezujućih mesta na svom unutarćelijskom C-terminalnom domenu, proteini čvrstih veza, u koje osim spojnih adhezivnih molekula spadaju i kladini i okludini, regrutuju citoplazmatske adaptorne proteine. Ovi proteini povezuju se sa aktinskim citoskeletom (Hartsock i Nelson, 2008), a mogu da regrutuju i druge citosolne partnere kako bi formirali signalne komplekse koji, između ostalog, regulišu proliferaciju i diferencijaciju ćelija (Matter i Balda, 2003). Na ovaj način čvrste veze obezbeđuju povezanost vanćelijske sredine i ćelijskog nukleusa.

Familiju adhezivnih spojnih molekula čine sledeći članovi: JAM-A, JAM-B, JAM-C, JAM-4, JAM-L (engl. *JAM-Like protein*), CAR (engl. *Coxsackie and Adenovirus Receptor*), CLMP (engl. *CAR-Like Membrane Protein*) i ESAM (engl. *Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule*) (Luissint i sar., 2014). Prvi opisani član ove familije je JAM-A (Martin-Padura i sar., 1998), kodiran *JAM-A (F11R)* genom koji se nalazi na humanom hromozomu 1 (Naik i sar., 2001), a prvobitno je otkriven kao receptor za monoklonsko antitelo koje aktivira trombocite (Kornecki i sar., 1990). JAM-A se eksprimira na različitim ćelijskim tipovima (Malergue i sar., 1998; Weber i sar., 2007), uključujući epitelne ćelije, endotelne ćelije, pojedine leukocite i krvne pločice, a funkcioniše kao skela (engl. *scaffold protein*) za ostale proteine čvrstih veza i promovise međućelijsku adheziju (Mandell i Parkos, 2005). JAM-A predstavlja transmembranski glikoprotein koji se sastoji od dva vanćelijska immunoglobulinu slična domena, transmembranskog i kratkog citoplazmatskog domena (Liu i sar., 2000; Mandell i Parkos, 2005). Citoplazmatski domen nema katalitičku aktivnost, ali sadrži mesta fosforilacije kao i PDZ (engl. *post-synaptic density protein 95 (PSD-95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)* and *zona occludens 1 (ZO-1)*) vezujući domen koji su ključni za aktivaciju JAM-A proteina i signalnu kaskadu (Severson i sar., 2009). JAM-A signalizacija započinje dimerizacijom proteina što dovodi do regrutovanja proteina skele kao što su zonula okludens 1 (ZO-1), ZO-2, afadin 6 (AF6) i Par3 (engl. *partitioning defective homolog 3*) koji zatim stimulišu asembliranje multiproteinskih kompleksa čvrstih veza (Bazzoni i sar., 2000; Itoh i sar., 2001) (Slika 1.5).

JAM-A ima važnu ulogu u unutarćelijskoj signalizaciji koja je uključena u brojne fiziološke procese kao što su ćelijska polarnost (Liang i sar., 2000), aktivacija trombocita (Kornecki i sar., 1990), angiogeneza (Naik i Naik, 2006) i migracija leukocita (Ostermann i sar., 2002). Ovaj protein

veoma je značajan za interakciju leukocita i trombocita sa epitelom i endotelom (Babinska i sar., 2002). Naime, prilikom inflamacije dolazi do internalizacije JAM-A proteina, tj. do njegovog povlačenja iz čvrstih veza endotelnih ćelija u reciklirajuće endozome kojima se on premešta na apikalnu površinu endotelnih ćelija koja je u kontaktu sa lumenom krvnog suda (Stamatovic i sar., 2012). Na taj način, JAM-A molekuli mogu da interaguju sa površinskim molekulima leukocita, kao što su integrini, ali i samim JAM-A molekulima, što stimuliše transendotelnu migraciju leukocita (Ostermann i sar., 2002). Smatra se da se sličan proces odvija i tokom prolaska kancerskih ćelija kroz endotelnu barijeru prilikom metastatskog širenja tumora (Reymond i sar., 2013). Prema tome, JAM-A ima dvostruku funkciju: učestvuje u imunskom odgovoru regrutovanjem leukocita na mesto inflamacije i reguliše formiranje međućelijskih veza epitelnih i endotelnih ćelija (Ebnet i sar., 2004).

Poremećaji u regulaciji adhezivnih proteina mogu da naruše barijernu funkciju, ćelijsku adheziju i polarnost kao i da utiču na unutarćelijsku signalizaciju (Matter i Balda, 2003). S obzirom da je narušavanje ćelijske polarnosti jedan od ranih histopatoloških indikatora karcinogeneze, mnoge studije ukazale su na važnu ulogu ćelijskih adhezivnih proteina u inicijaciji i progresiji različitih karcinoma (Bujko i sar., 2015; Morin, 2005; Martin i Jiang, 2009). Pokazano je da gubitak ekspresije proteina čvrstih veza omogućava razdvajanje ćelija neoplastičnog epitela što dovodi do nastanka metastaza (Martin i Jiang, 2009). Sa druge strane, određen broj studija ukazuje da je prekomerna ekspresija ovih proteina povezana sa progresijom tumora, što govori u prilog njihovoj ulozi u unutarćelijskoj signalizaciji koja reguliše apoptozu, proliferaciju i migraciju (Leech i sar., 2015). Brojne studije ispitivale su ulogu ekspresije *JAM-A* u progresiji različitih karcinoma kao i njen prognostički značaj, ali su rezultati ovih studija često bili kontradiktorni (Zhang i sar., 2013; Fong i sar., 2012; Kakuki i sar., 2016; Zhao i sar., 2014).



**Slika 1.5. Proteinski kompleksi uključeni u ćelijsku adheziju.** Čvrste veze predstavljaju multiproteinske komplekse lokalizovane na mestima međućelijskog kontakta a sastoje se od transmembranskih, citosolnih i citoskeletnih proteina. JAM-A predstavlja transmembranski protein koji regrutuje ostale proteine čvrstih veza, kao što su zonula okludens 1 (ZO-1) i afadin 6 (AF6), koji dalje podstiču asembliranje multiproteinskih kompleksa čvrstih veza i aktiviraju unutarćelijsku signalnu kaskadu (modifikovano prema Ronaldson i Davis, 2012).

### 1.11. Integrin alfa V (ITGAV)

Iako ćelije eksprimiraju različite površinske adhezivne receptore, integrinska familija receptora do sada je najbolje opisana i ima ključnu ulogu u ćelijskoj migraciji. Integrini predstavljaju familiju heterodimernih transmembranskih adhezivnih receptora sastavljenih od alfa i beta subjedinice povezane nekovalentnim vezama (Hynes, 2002). U zavisnosti od toga koje alfa i beta subjedinice učestvuju u njegovoj izgradnji, svaki integrinski receptor vezuje specifičan set liganda, uključujući ligande VCM, solubilne ligande kao i ligande na ćelijskoj površini (Plow i sar., 2000). Integrini funkcionišu kao ćelijski adhezivni molekuli tako što se svojim vanćelijskim domenom direktno vezuju za komponente VCM, kao što su fibronektin, vitronektin, laminin i kolagen (Ruoslahti, 1996), a svojim unutarćelijskim domenom vezuju se za komponente citoskeleta, pretežno aktinskog, kao što su paksilin, alfa-aktinin, talin i vinkulin (Delon i Brown, 2007). Takođe, posredstvom svog unutarćelijskog domena koji interaguje sa različitim signalnim molekulima, integrini su uključeni u transdukciju signala koja reguliše brojne funkcije uključujući ćelijsku adheziju, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (Schwartz i sar., 1995). Integrini sa vezanim ligandima VCM prenose signale za preživljavanje, dok nevezani integrini promovišu proapoptotsku kaskadu (Gilmore i sar., 2000). Ukoliko je ćelija čvrsto i na adekvatan način vezana za VCM, ligandi vezani za integrinske receptore prenose signale koji obezbeđuju preživljavanje ćelije. Odsustvo kontakta između VCM i ćelije dovodi do gubitka signala preživljavanja što

rezultuje programiranom ćelijskom smrću – anoikisu (Frisch i Ruoslahti, 1997). Sposobnost kancerskih ćelija da izbegnu anoikis je ključan mehanizam koji im omogućava da prežive i metastaziraju (Kim i sar., 2012c).

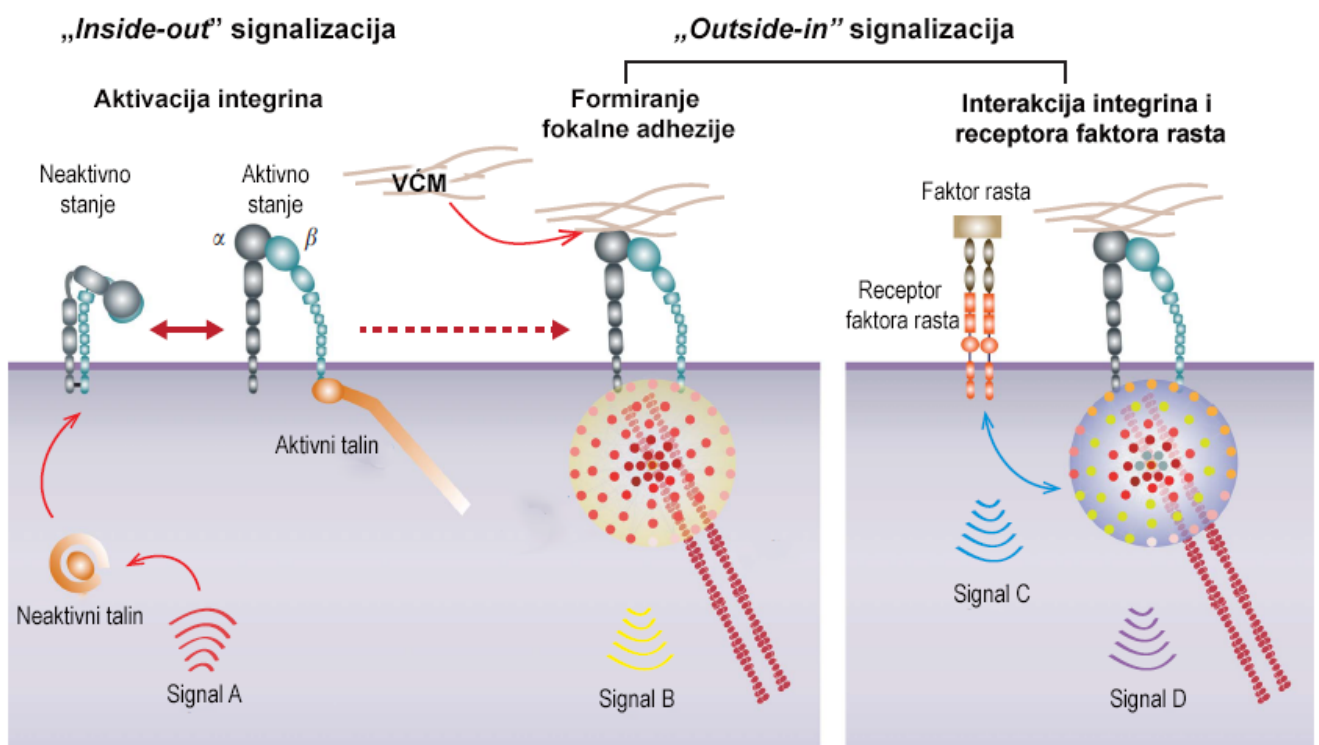
U zavisnosti od tipa ćelije, integrini mogu biti u aktivnom stanju, kao što je slučaj sa većinom adherentnih ćelija koje su vezane za bazalnu laminu, ili u neaktivnom stanju, kao što je slučaj sa trombocitima i leukocitima koji slobodno cirkulišu sve dok ne dođe do njihove aktivacije prilikom agregacije trombocita ili indukcije inflamatornog odgovora leukocita (Ratnikov i sar., 2005). U neaktivnom stanju integrini najčešće nisu vezani za komponente VCM, niti za aktinski citoskelet, već su difuzno raspoređeni širom ćelijske površine. Vezivanjem za VCM, dolazi do grupisanja integrina, njihovog povezivanja sa aktinskim citoskeletom i prenosa signala u zavisnosti od svojstava VCM (Schoenwaelder i Burridge, 1999).

Integrini se karakterišu bidirekcionom signalizacijom prilikom koje unutarćelijski signali indukuju promene u konformaciji integrina, a samim tim i afinitetu za vezivanje različitih liganda („*inside - out*” signalizacija), dok vezivanje liganda za integrine utiče na unutarćelijske procese aktivacijom kaskade signalnih događaja („*outside - in*” signalizacija) (Ginsberg, 2014) (Slika 1.6). Različiti signali unutar ćelije mogu da dovedu do aktivacije integrina tako što promovišu regrutovanje aktivatora, kao što je talin, na citoplazmatski rep beta subjedinice integrina. Vezivanje talina za integrine uzrokuje konformacionu promenu iz savijene, neaktivne forme u otvorenu, aktivnu formu koja favorizuje vezivanje liganda. Sa druge strane, interakcija integrina i komponenti VCM indukuje formiranje FA i reorganizaciju aktinskog citoskeleta koji dalje utiču na nizvodne ćelijske procese. FA predstavljaju mesta kontakta ćelijske površine i VCM, a sastoje se od klastera integrinskih receptora udruženih sa velikim kompleksima signalnih i strukturnih proteina koji se povezuju sa aktinskim citoskeletom (Yamada i Geiger, 1997). Vezivanje FA za VCM generiše silu koja je neophodna za pomeranje tela ćelije tokom ćelijske migracije. Takođe, ćelije moraju da se odvoje od VCM kako bi nastavile kretanje. Prema tome, formiranje i razgradnja FA je dinamičan proces koji podrazumeva koordinisanu aktivnost FA i aktinskog citoskeleta. Aktinska citoskeletna mreža odlikuje se kontinuiranom direkcionom polimerizacijom i razgradnjom. Monomeri aktina označavaju se kao globularni aktin (G-aktin), dok su polimeri aktina poznati kao filamentozni aktin (F-aktin) a sastoje se od dva proteinska lanca spiralno uvijena jedan oko drugog (Zhang i sar., 2017a). Pokazano je da integrinski adhezivni kompleksi sadrže svu mašineriju neophodnu za aktinsku polimerizaciju. Ovo uključuje Arp2/3 kompleks koji ima ulogu u stimulaciji aktinske polimerizacije (Butler i sar., 2006). U kancerskim ćelijama koje prolaze kroz EMT proces, G-aktin se polimerizuje u F-aktin kako bi se iniciralo formiranje vodeće ivice (engl. *leading edge*), tj. dela ćelije koji je najbliži smeru kretanja. Novoformirani aktinski filamenti interaguju sa kontraktilnim proteinima kao što je miozin II i formiraju aktinska stresna vlakna čija je funkcija da rastezanjem i uspostavljanjem napetosti stvaraju kontrakcije koje ćelija koristi za migraciju (Parsons i sar., 2010).

S obzirom da integrini nemaju kinaznu aktivnost, transdukcija signala zahteva kinazne partnere. Fokalna adheziona kinaza (FAK) je ključna komponenta prilikom prenosa signala koji potiču od integrinskih receptora. Ova tirozin kinaza veoma je važna za regulaciju FA, a samim tim i za ćelijsku migraciju i invaziju (Guan, 1997). Pored FAK, FA sadrže i druge kinaze koje regulišu ćelijsku migraciju kao što su Src kinaza, p21-aktivirana kinaza (engl. *p21-activated kinase*, PAK) i Rho (engl. *Ras homologous*) familija GTP-aza (Ridley, 1994). Rho GTP-aze aktiviraju se vezivanjem GTP-a, dok su neaktivne u GDP-vezanoj formi. Najbolje proučeni članovi ove familije su RhoA (engl. *Ras homolog family member A*), Rac1 (engl. *Rac family small GTPase 1*) i CDC42 (engl. *cell division cycle 42*) (Etienne-Manneville i Hall, 2002). Pokazano je da RhoA stimuliše formiranje aktinskih stresnih vlakana (Hall, 1998), dok Rac1 i CDC42, promovišu formiranje lamelipodija i filopodija (Hall, 2005; Ridley, 2006).

Nakon vezivanja specifičnih liganada, dolazi do grupisanja integrina, regrutovanja i fosforilacije FAK i Src kinaze, regrutovanja FAK-vezujućih proteina i aktivacije nizvodnih signalnih puteva kao što su MAPK/ERK, Ras/Rho i PI3K/AKT (Vachon, 2011). Zahvaljujući njihovoj aktivaciji, integrini regulišu apoptozu i preživljavanje ćelija (Mitra i Schlaepfer, 2006). Prema tome, integrini regulišu dva procesa koja su ključna za preživljavanje kancerskih ćelija i

progresiju kancera: to su regulacija ćelijske adhezije i migracije kao i regulacija signala preživljavanja (Raab-Westphal i sar., 2017). Pokazano je da  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha V$  i  $\alpha 5$  integrini imaju važnu ulogu u metastatskom širenju kancera i prognozi onkoloških oboljenja (Hosotani i sar., 2002; Takayama i sar., 2005). Osim toga, nekoliko kinaznih receptora koji stimulišu preživljavanje i rast kancerskih ćelija, kao što su EGFR i receptor za faktor rasta poreklom iz krvnih pločica (engl. *platelet-derived growth factor receptor*, PDGFR) povezani su sa integrinskom signalizacijom (Zemskov i sar., 2009; Balanis i Carlin, 2012). Takođe, integrini promovišu invaziju i metastatsko širenje kancerskih ćelija putem interakcije sa drugim ćelijskim tipovima u tumorskoj mikrosredini, kao što su endotelne ćelije i fibroblasti. Tokom tumorske progresije, faktori rasta, kao što je VEGF, oslobođen iz tumorskih ćelija, indukuje ekspresiju integrina u endotelnim ćelijama i na taj način promoviše formiranje novih krvnih sudova (Avraamides i sar., 2008).



**Slika 1.6. Integrini kao bidirekcionni ćelijski površinski signalni molekuli.** U neaktivnom stanju, integrini se nalaze u savijenoj konformaciji u kojoj su transmembranski i citoplazmatski region receptora u neposrednoj blizini. Brojni signali unutar ćelije (signal A) mogu da pokrenu aktivaciju integrina tako što promovišu regrutovanje aktivatora, kao što je talin, na citoplazmatski rep beta subjedinice integrina. Vezivanje talina za integrin dovodi do konformacione promene iz neaktivne u otvorenu, aktivnu formu integrina koja favorizuje vezivanje liganda („inside - out” signalizacija). Sa druge strane, interakcija integrina i vanćelijskog matriksa prouzrokuje unutarćelijske signale (signal B) koji indukuju formiranje fokalnih adhezija i reorganizaciju aktinskog citoskeleta koji utiču na nizvodne signalne puteve („outside - in” signalizacija). Receptori za faktore rasta imaju sposobnost da pokrenu specifične signale (signal C) ili da u sadejstvu sa integrinima utiču na iste signalne puteve kako bi generisali jedinstvene signale (signal D) u odgovoru na promene vanćelijskog matriksa (preuzeto iz Hamidi i sar., 2016).

Integrin alfa V (*ITGAV*) gen kodira alfa V subjedinicu integrina i nalazi se na hromozomu 2 (Waisberg i sar., 2014). Alfa V podfamiliju integrina čini najmanje pet članova, uključujući  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ , i  $\alpha V\beta 8$ . Alfa V integrini predstavljaju članove familije RGD-vezujućih integrina. Ovi integrini vezuju se za sekvencu arginin-glicin-asparaginska kiselina (RGD) prisutnu

na pojedinim proteinima VCM, kao što su fibronektin, vitronektin, osteopontin, kolageni i trombospondin (Weis i Cheresch, 2011). Ovi integrini ispoljavaju uobičajene integrinske funkcije kao što su regulacija ćelijske adhezije i migracije (Hynes, 2002). Takođe, članovi alfa V familije integrina uključeni su u preživljavanje i diferencijaciju endotelnih ćelija vaskulature, odnosno imaju važnu ulogu u procesu angiogeneze koja je ključna za rast i širenje tumora (Brooks i sar., 1994). Pokazano je da nedostatak alfa V integrina uzrokuje anomalije tokom embriogeneze (Bader i sar., 1998). Prekomerna ekspresija ITGAV detektovana je u brojnim humanim kancerima kao što su melanom (Kageshita i sar., 2000), kancer dojke (Arihiro i sar., 2000), bubrega (Markovic-Lipkovski i sar., 2001), želuca (Kawashima i sar., 2003) i prostate (Cooper i sar., 2002), a često se povezuje sa lošijim preživljavanjem bolesnika.

## 1.12. Kaldezmon 1 (CALD1)

EMT proces podrazumeva strogu kontrolu ćelijske pokretljivosti koja se odvija na različitim nivoima, a uključuje regulaciju genske ekspresije, post-translacione modifikacije i reorganizaciju citoskeleta (Morris i Machesky, 2015). Reorganizacija aktinskog citoskeleta predstavlja neophodan korak tokom migracije i invazije kancerskih ćelija (Sun i sar., 2015). Kaldezmon 1 je protein koji reguliše kontraktilnost i remodelovanje aktinskog citoskeleta u glatkim mišićnim i nemišićnim ćelijama (Mayanagi i Sobue 2011). Ovaj protein, zajedno sa tropomiozinom, vezuje i stabilizuje aktinske filamente, a reguliše i interakciju aktina sa miozinom. Pored aktina i tropomiozina, kaldezmon interaguje sa Ca-kalmodulinom, miozinom i fosfolipidima u ćelijskoj membrani (Bryan, 1990). S obzirom na to da je ključan za asembliranje i regulaciju aktinskih filamenata, ovaj protein deluje kao važan modulator različitih ćelijskih funkcija, uključujući ćelijsku pokretljivost, proliferaciju, migraciju i invaziju (Zheng i sar., 2007). CALD1 deluje kao supresor ćelijskog kretanja tako što blokira interakciju aktina i miozina inhibicijom aktin-zavisne ATP-azne aktivnosti miozina (Chalovich i sar., 1998).

Humani *CALD1* gen nalazi se na hromozomu 7, a alternativnim splajsovanjem 13 egzona daje najmanje 5 izoformi informacione RNK (Hayashi i sar., 1992). Nivo ekspresije *CALD1* gena regulisan je sa najmanje tri različita signalna puta. U glatkim mišićnim i nemišićnim ćelijama, transkripcija *CALD1* gena primarno zavisi od faktora odgovora seruma (engl. *serum response factors*, SRFs) koji se vezuju za promotor *CALD1* gena i aktiviraju njegovu transkripciju (Momiyama i sar., 1998). U nemišićnim ćelijama, miokardinu pridruženi transkripcioni faktori (engl. *myocardin-related transcription factors*, MRTFs) aktiviraju transkripciju gena aktinskog citoskeleta, uključujući i *CALD1*, putem Rho-MRTF-SRF signalnog puta (Morita i sar., 2007b). Drugi signalni put koji je uključen u aktivaciju *CALD1* genske transkripcije posredovan je glukokortikoidnim receptorom (Mayanagi i sar., 2008), a treći mehanizam predstavlja aktivaciju *CALD1* gena putem TP53 proteina (Mukhopadhyay i sar., 2009). Pokazano je da TP53 posredstvom povišene ekspresije *CALD1* suprimira formiranje podozoma i invadopodija, promovise stabilnost stresnih vlakana i smanjuje ćelijsku migraciju i invaziju. Ovi rezultati ukazuju da je CALD1 jedan od glavnih ciljeva TP53 proteina prilikom prevencije tumorske invazije i metastatskog širenja bolesti.

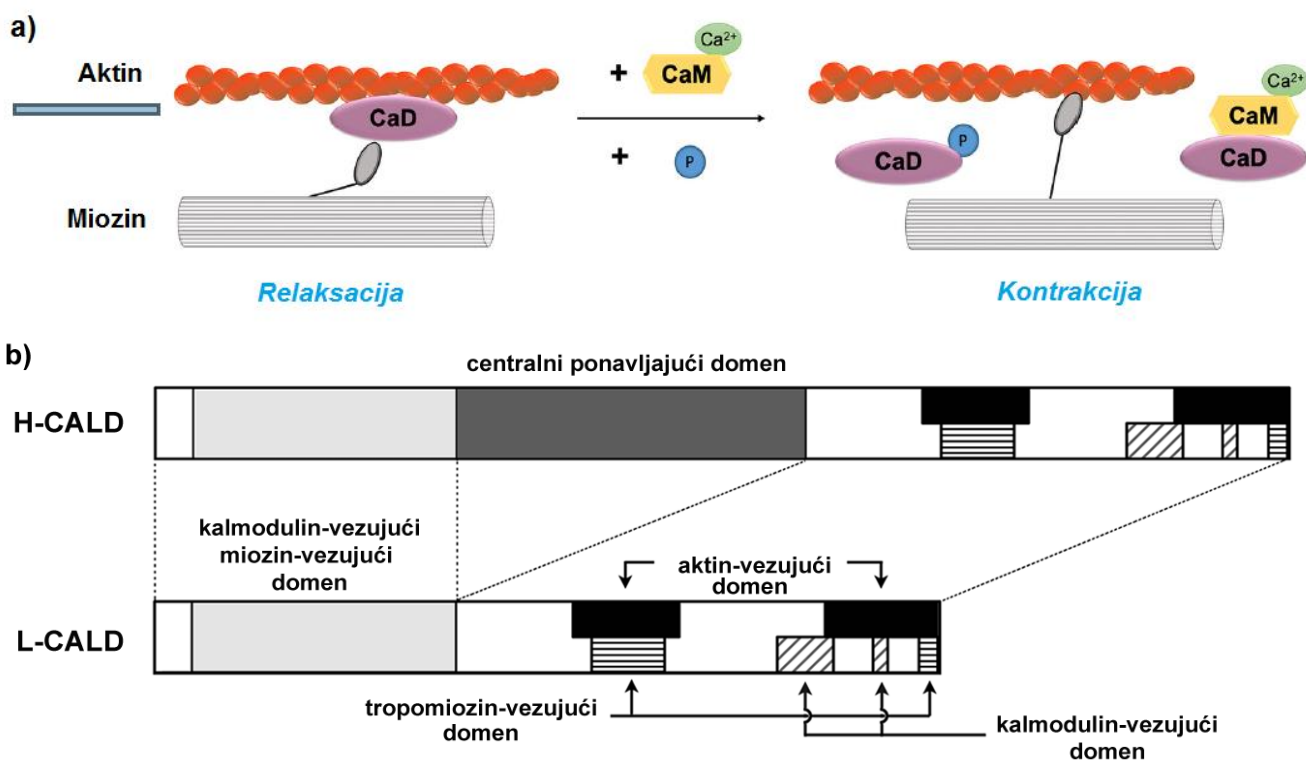
Postoje dve različite proteinske izoforme CALD1 proteina: kaldezmon visoke molekulske mase (engl. *high-molecular-weight CALD*, h-CALD), veličine 120-150 kilodaltona i kaldezmon niske molekulske mase (engl. *low-molecular-weight CALD*, l-CALD), veličine 70 - 80 kilodaltona (Payne i sar., 1995). Obe izoforme sadrže identični amino i karboksi-terminalni domen, ali se razlikuju po inserciji centralnog regiona koji je prisutan isključivo u h-CALD (Slika 1.7.b). Iako h-CALD i l-CALD imaju slične funkcionalne domene, razlikuju se u tkivnoj distribuciji. H-CALD pretežno se eksprimira u glatkim mišićima gde simultano vezuje miozin i aktin i moduliše aktinomiozinsku kontrakciju, dok je l-CALD prisutan u nemišićnim ćelijama, gde se vezuje za aktin i stabilizuje aktinska stresna vlakna, a posreduje i u interakciji između aktina i nemišićnog miozina



II (Kordowska i sar., 2006). Takođe, l-CALD je prisutan i kao citoskeletna komponenta u dinamičnim strukturama kao što su podozomi i invadopodije (Hayashi i sar., 1992; Mayanagi i Sobue, 2011). Pokazano je da ekspresija kaldezmona suprimira formiranje ovih struktura, degradaciju VCM kao i invaziju nekoliko ćelijskih linija kancera (Yoshio i sar., 2007).

Aktivnost kaldezmona regulisana je  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulinom i fosforilacijom. Vezivanje  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina za kaldezmon smanjuje afinitet kaldezmona za aktin i na taj način blokira njegov inhibitorni efekat na aktinomiozinski sistem (Sobue i sar., 1985). U zavisnosti od koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , kaldezmon se vezuje ili za  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin kompleks ili za aktinske filamente. Pri niskim koncentracijama  $\text{Ca}^{2+}$  (<1 mM) kaldezmon se vezuje za aktinske filamente, dok pri višim koncentracijama  $\text{Ca}^{2+}$  (>1 mM),  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin se vezuje za kaldezmon a zatim dolazi do oslobađanja ovog kompleksa sa aktinskih filamenata (Sobue i Sellers, 1991). Takođe, fosforilacija kaldezmona dovodi do njegove disocijacije sa aktinskih filamenata (Umekawa i Hidaka, 1985) (Slika 1.7.a). Fosforilacija može indirektno da smanji inhibitornu aktivnost kaldezmona tako što slabi vezivanje za  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin, a pokazano je da efekat  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina na aktivnost kaldezmona zavisi od kombinacije fosforilisanih aminokiselinskih ostataka (Hamden i sar., 2010). Nekoliko protein kinaza mogu da fosforilišu kaldezmon i tako regulišu njegovu aktivnost. Između ostalih, to su PAK, protein kinaza C (PKC), protein kinaza A (PKA), ERK, p38 MAPK i Ca-kalmodulin zavisna protein kinaza. ERK fosforiliše kaldezmon što onemogućava kaldezmonu da stabilizuje aktinske filamente, a praćena je konformacionim promenama kaldezmona koje uzrokuju delimičnu disocijaciju kaldezmona sa aktina. Ovakva strukturna promena u h-CALD izlaže miozin-vezujuća mesta na aktinskoj površini i omogućava aktinomiozinsku kontrakciju u glatkim mišićima. U slučaju ne mišićnih ćelija, konformaciona promena l-CALD smanjuje stabilnost aktinskih filamenata i olakšava njihovu razgradnju (Kordowska i sar., 2006).

Uloga CALD1 ekspresije ispitivana je u različitim solidnim tumorima, ali sa oprečnim rezultatima (Lee i sar., 2015; Kim i sar., 2012b; Chang i sar., 2013).



**Slika 1.7. a) Uloga kaldezmona u kontrakciji glatkih mišića.** Pri niskim koncentracijama  $\text{Ca}^{2+}$ , kaldezmon (CaD) se vezuje za aktinske filamente što onemogućava vezivanje miozina za aktin i održava mišić u relaksiranom stanju. Pri višim koncentracijama  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin (CaM) kompleks vezuje se za kaldezmon što uzrokuje njegovo oslobađanje od aktina. Na taj način, dolazi do interakcije miozina i aktina i mišićne kontrakcije. Fosforilacija kaldezmona može da umanja njegovu inhibitornu aktivnost što omogućava aktomiozinsku interakciju i mišićnu kontrakciju (preuzeto i modifikovano prema Lodish i sar., 2000) **b) Šematski prikaz strukture CALD1 proteinskih izoformi.** Humani kaldezmon sadrži N-terminalni, C-terminalni i centralni ponavljajući domen koji je prisutan samo u h-CALD izoformi. N-terminalni domen sadrži miozin-vezujuća mesta i ostvaruje slabe interakcije sa aktinom i kalmodulinom. C-terminalni domen sadrži mesta za vezivanje aktina, kalmodulina i tropomiozina (preuzeto iz Mayanagi i Sobue, 2011).



---

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

S obzirom na nerazjašnjenu ulogu ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena uključenih u EMT proces, na metastatsko širenje i prognozu karcinoma jajnika, ciljevi rada bili su sledeći:

- Utvrđivanje razlika u nivou relativne ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena između benignih i malignih uzoraka tumora jajnika
- Ispitivanje korelacija između *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* nivoa relativne genske ekspresije i karakteristika bolesnica, histopatoloških karakteristika tumora, kliničkih karakteristika bolesti i ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika
- Utvrđivanje dijagnostičkog i prognostičkog diskriminatornog potencijala nivoa ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u karcinomu jajnika, odnosno sposobnost razlikovanja benignih od malignih uzoraka tumora jajnika, tj. dobrog od lošeg ishoda bolesti
- Utvrđivanje prisustva proteinske ekspresije u uzorcima tumora jajnika za gen(e) od interesa
- Bioinformatičke analize *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* genske i proteinske ekspresije u karcinomu jajnika

Sticanje novih znanja o ulozi EMT gena u patogenezi karcinoma jajnika doprinelo bi boljem razumevanju procesa metastatskog širenja bolesti, potencijalnom otkriću novih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera kao i terapijskih ciljeva u lečenju ovog maligniteta. Takođe, informacije o nivoima ekspresije ispitivanih EMT markera u primarnom tumoru mogle bi omogućiti procenu rizika za širenje karcinoma jajnika, predviđanje kliničkog ishoda bolesti i doprineti određivanju adekvatnog pristupa u lečenju bolesnica sa karcinomom jajnika.

---

## 3. MATERIJAL I METODE

---

### 3.1. Materijal

Istraživanje je sprovedeno na uzorcima primarnih tumora jajnika, bolesnica operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od maja 2007. do maja 2015. godine koje nisu primale neoadjuvantnu terapiju pre hirurškog zahvata. Grupu je činilo 77 uzoraka tkiva fiksiranog formalinom i ukalupljenog u parafin (engl. *formalin-fixed paraffin embedded*, FFPE) od kojih 57 malignih epitelnih tumora (karcinoma) jajnika i 20 benignih tumora jajnika. Medijana starosti bolesnica u prvoj grupi iznosila je 57 godina (opseg 25 - 79 godina), a u drugoj 56 godina (opseg 17 - 79 godina). Najveći procenat karcinoma jajnika činili su karcinomi seroznog histološkog tipa (73,6%) i uznapređovalog FIGO stadijuma (FIGO III i IV) (59,6%). Od kliničkih parametara bolesti analizirani su: FIGO stadijum, prisustvo rezidualne bolesti, prisustvo ascita, prisustvo limfnih, peritonealnih i udaljenih metastaza i prisustvo relapsa. Od histopatoloških karakteristika tumora analizirani su histološki tip i histološki gradus, dok su od karakteristika bolesnica analizirani starost, status menopauze, kao i ukupno preživljavanje. U cilju analize ukupnog preživljavanja, bolesnice su praćene od maja 2007. godine do maja 2018, a medijana praćenja iznosila je 41 mesec (opseg: 4 - 106 meseci). Detaljan opis karakteristika bolesnica, kao i kliničkih i histopatoloških karakteristika karcinoma jajnika prikazan je u tabeli 3.1.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu.

**Tabela 3.1.** Karakteristike bolesnica, kliničke i histopatološke karakteristike karcinoma jajnika

Karakteristike	n (%) n=57
<b>Starost</b>	
≤60	33 (57,9)
>60	24 (42,1)
<b>Status menopauze</b>	
Premenopauza	16 (28,1)
Postmenopauza	36 (63,1)
NA	5 (8,8)
<b>FIGO stadijum</b>	
I+II	22 (38,6)
III+IV	34 (59,6)
NA	1 (1,8)
<b>Histološki podtip tumora</b>	
Serozni	42 (73,6)
Ostali	14 (24,6)
NA	1 (1,8)
<b>Histološki gradus</b>	
1	17 (29,8)
2+3	34 (59,7)
NA	6 (10,5)

<b><i>Metastaze u limfnim čvorovima</i></b>	
Da	9 (15,8)
Ne	34 (59,6)
NA	14 (24,6)
<b><i>Peritonelane metastaze</i></b>	
Da	36 (63,1)
Ne	18 (31,6)
NA	3 (5,3)
<b><i>Udaljene metastaze</i></b>	
Da	8 (14,0)
Ne	47 (82,5)
NA	2 (3,5)
<b><i>Asciti</i></b>	
Da	24 (42,1)
Ne	31 (54,4)
NA	2 (3,5)
<b><i>Prisustvo rezidualne bolesti</i></b>	
Da	20 (35,1)
Ne	24 (42,1)
NA	13 (22,8)
<b><i>Relaps</i></b>	
Da	15 (26,3)
Ne	31 (54,4)
NA	11 (19,3)

### 3.2. Izolacija ukupne RNK iz parafinskih uzoraka tumora jajnika

Uzorci tumora jajnika fiksirani su formaldehidom i kalupljeni u parafin radi očuvanja morfoloških karakteristika tkiva kao i integriteta proteina. Parafinski kalupi isečeni su na preseke debljine 10  $\mu\text{m}$  i u preseku po četiri preseka stavljana su u mikrotubu zapremine 1,5 mL (*Eppendorf*, Germany). Ukupna RNK iz uzoraka tumora jajnika izolovana je korišćenjem komercijalnog kita RNeasy FFPE Kit (*Qiagen*, Nemačka) koji poboljšava kvalitet i prinos izolovane RNK iz ovog tipa uzorka.

Protokol za izolaciju ukupne RNK iz parafinskih uzoraka korišćenjem komercijalnog RNeasy FFPE kita:

1. U mikrotubu sa presecima dodati 1 mL ksilola, zatim vorteksovati 10 sekundi i centrifugirati 2 min na 20 800 x g (*5417 R Centrifuge*, *Eppendorf*, Germany). Pažljivo ukloniti supernatant pipetiranjem ne dodirujući talog, a zatim dodati 96-100% etanola, vorteksovati i centrifugirati 2 minuta na 20 800 x g.

2. Ukloniti supernatant pipetom, ne dodirujući talog, a zatim i preostali etanol. Inkubirati uzorke na sobnoj temperaturi 10 minuta ili dok sav etanol ne ispari, držeći otvoren poklopac mikrotube.
3. Dodati 240  $\mu\text{L}$  pufera PKD i 10  $\mu\text{L}$  proteinaze K a zatim promešati pipetiranjem. Inkubirati na 56 °C 15 minuta a zatim na 80 °C 15 minuta. Donju, bistru fazu prebaciti u novu mikrotubu zapremine 2 mL, inkubirati na ledu a zatim centrifugirati 15 minuta na 19 400 x g.
4. Prebaciti supernatant u novu mikrotubu, a zatim dodati *DNase booster* pufer u količini jednakoj desetini ukupne zapremine uzorka i 10  $\mu\text{L}$  DNase I rastvora. Smešu izmešati okretanjem mikrotube, kratko je centrifugirati, a zatim inkubirati na sobnoj temperaturi 15 min.
5. Dodati 500  $\mu\text{L}$  RBC pufera i 1200  $\mu\text{L}$  etanola (100%) i dobro izmešati pipetiranjem.
6. Prebaciti 700  $\mu\text{L}$  uzorka u kolonu koja se nalazi u 2 mL kolekcionoj tubi. Centrifugirati 15 sekundi na preko 10 600 x g. Prosuti tečnost koja prođe kroz kolonu, i ponoviti prethodan postupak sve dok celokupan uzorak ne prođe kroz RNeasy MinElute spin kolonu.
7. Dodati 500  $\mu\text{L}$  RPE pufera u kolonu i centrifugirati 15 sekundi na preko 10 600 x g. Prosuti tečnost koja prođe kroz kolonu. Ponovo dodati 500  $\mu\text{L}$  RPE pufera u kolonu i centrifugirati 2 minuta na preko 10 600 x g kako bi se isprala membrana kolone. Nakon centrifugiranja pažljivo izvaditi kolonu kako ne bi došla u kontakt sa tečnošću koja je prošla kroz nju, a tečnost koja je prošla baciti zajedno sa kolekcionom tubom.
8. Kolonu staviti u novu kolekcionu tubu zapremine 2 mL i centrifugirati 5 minuta na 20 800 x g sa otvorenim poklopcem kolone. Baciti kolekcionu tubu sa tečnošću.
9. Kolonu staviti u novu kolekcionu tubu i dodati 25  $\mu\text{L}$  vode oslobođene od ribonukleaza (engl. *RNase-free water*) direktno na membranu kolone. Zatvoriti poklopac i centrifugirati 1 minut na 20 800 x g kako bi se eluirala ukupna RNK.

Određivanje koncentracije i čistoće izolovane RNK vršeno je spektrofotometrijskom metodom pomoću uređaja BioSpec-nano UV-VIS Spectrophotometer (*Schimadzu*, Nemačka). Spektrofotometrijsko određivanje količine RNK zasniva se na osobini purinskih i pirimidinskih baza RNK da apsorbuju svetlost talasne dužine 260 nm, pri čemu je intenzitet apsorbovane svetlosti direktno proporcionalan koncentraciji RNK u rastvoru čija se apsorbancija meri. Spektrofotometrija omogućava nam da odredimo i prisustvo proteina u RNK izolatu, s obzirom da aromatične aminokiseline koje ulaze u sastav proteina apsorbuju na talasnoj dužini 280 nm. Merenjema apsorbancije RNK na 260 nm i 280 nm utvrđeno je da uzorci imaju zadovoljavajuću čistoću, pošto je odnos A260/A280 bio u opsegu 1,8-2,0. Koncentracija uzoraka izražena je u ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.3. Reverzna transkripcija RNK

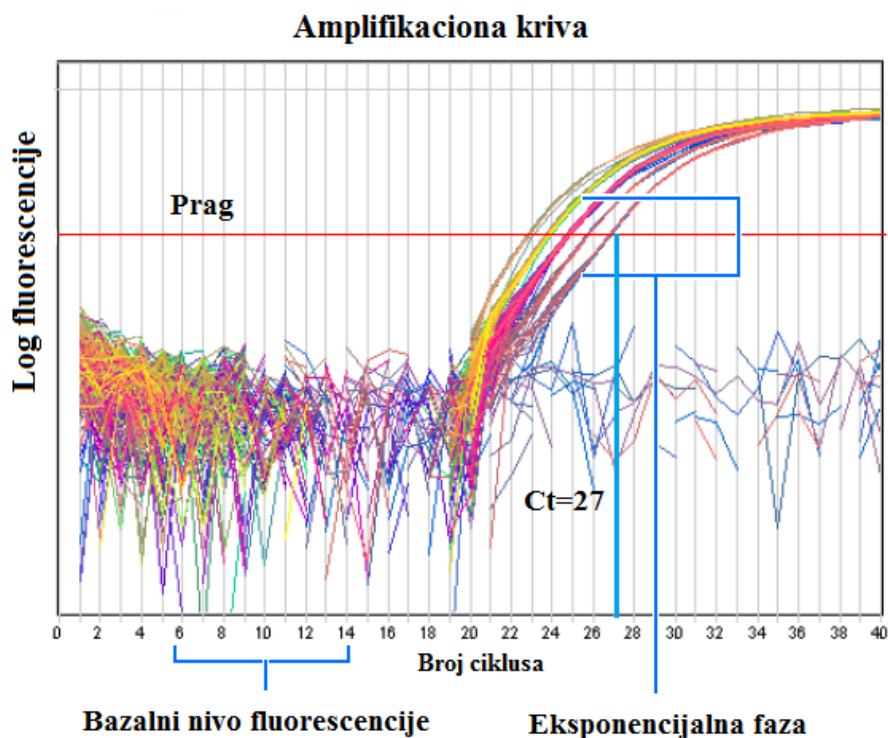
Reverzna transkripcija (RT) je reakcija katalizovana enzimom reverznom transkriptazom koja sintetiše molekule jednolančane DNK (engl. *complementary DNA*, cDNA), koristeći molekul RNK kao matricu (Brajuskovic, 2012). U reakciji reverzne transkripcije moguće je koristiti tri vrste prajmera: kratke, nasumične prajmere, oligo d(T) prajmere i sekvencno-specifične prajmere. Kratki nasumični prajmeri vezuju se bilo gde u genomu i omogućavaju reverznoj transkriptazi da popuni praznine što rezultuje većim prinosom cDNK. Oligo d(T) prajmeri vezuju se za poli-A rep RNK i transkribuju samo ovu vrstu RNK molekula. Na ovaj način onemogućena je kontaminacija genomskom DNK. Takođe, upotreba ovih prajmera dovodi do nastanka većeg broja kompletnih transkripata, s obzirom da se poli-A rep nalazi na samom kraju gena. Specifični prajmeri vezuju se isključivo za transkripte od interesa. Kombinacija nasumičnih i oligo d(T) prajmera daje najveći prinos kao i najduže transkripte, dok specifični prajmeri transkribuju samo specifične RNK ali smanjuju prinos (Pfaffl, 2004).

Prevođenje izolovane ukupne RNK u cDNK urađeno je korišćenjem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD). Reakcionu smešu činilo je 2 µg RNK, 2 µL 10x RT pufera, 1 µL 10 x nasumičnih heksamera kao prajmera, 1 µL mešavine 10X dNTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe*<sup>TM</sup> reverzne transkriptaze, 1 µL inhibitora ribonukleaza i voda oslobođena od ribonukleaza do zapremine od 20 µL. Reakcija reverzne transkripcije odvijala se prema sledećem programu: 10 minuta na 25 °C, 2 h na 37 °C i 5 minuta na 85 °C u PCR aparatu *MasterCycler Gradient* (*Eppendorf*, Germany).

### 3.4. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze

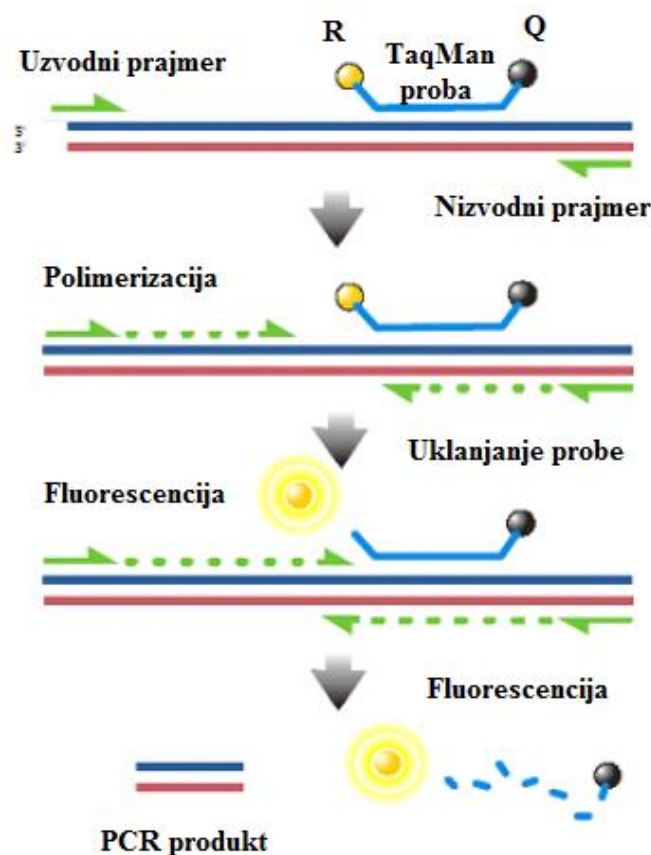
Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) ili PCR u realnom vremenu (engl. *real-time PCR*) je senzitivna i efikasna metoda koja omogućava preciznu kvantifikaciju količine ciljne sekvence ili gena prisutnog u datom uzorku nakon svakog završenog ciklusa PCR reakcije, tj. u realnom vremenu. Merenje količine produkta vrši se u toku eksponencijalne faze reakcije, kada prilikom svakog PCR ciklusa dolazi do dupliranja količine PCR produkta, za razliku od klasične PCR metode kod koje se određivanje količine dobijenog produkta vrši isključivo na kraju PCR reakcije. Svaka reakcija kvantitativnog PCR-a sadrži fluorescentni reporterski molekul kako bi se pratila akumulacija PCR produkta. Naime, nakon svakog PCR ciklusa, fluorescentni molekuli (reporteri) daju rastući fluorescentni signal koji je u direktnoj proporciji sa brojem nastalih PCR produkata (amplikona). U početnim PCR ciklusima nema velikih promena u intenzitetu fluorescencije pa se on naziva bazalni ili osnovni nivo fluorescencije. Tokom eksponencijalne faze, instrument beleži dve vrednosti: prag (engl. *threshold*) i Ct (engl. *threshold cycle*) vrednost. Prag predstavlja nivo fluorescencije iznad bazalnog nivoa, dok PCR ciklus u kojem dolazi do značajnog povećanja reporterskog signala, tj. ciklus u kome amplifikaciona kriva seče prag fluorescencije, označava se kao Ct (Slika 3.1.). Vrednost Ct-a obrnuto je proporcionalna količini ciljne sekvence u uzorku. Ukoliko je početni broj kopija odabrane sekvence veći, ranije će se javiti značajno povećanje fluorescentnog signala, tj. detektovana Ct vrednost biće niža, i obrnuto (Brajuskovic, 2012).

Fluorescentni reporteri koji se koriste u kvantitativnom PCR-u mogu biti boje koje se direktno vezuju za dvolančanu DNK (npr. *SYBR Green*) i boje vezane za PCR probe koje hibridizuju sa PCR produktima tokom amplifikacije (npr. *TaqMan* probe). *SYBR Green* je interkalirajuća boja visoko specifična za dvolančanu DNK, a fluorescira samo kada je vezana za DNK. Kako bi došlo do amplifikacije ciljne sekvence, pored boje, neophodan je i par specifičnih prajmera, a količina boje koja se ugradi proporcionalna je količini ciljne sekvence koja se proizvodi. Nedostatak ove tehnike jeste njena nedovoljna specifičnost, odnosno vezivanje boje za sve dvolančane DNK, što za posledicu može imati detekciju i nespecifičnih PCR produkata. Specifičnost reakcije moguće je proveriti nakon završenog PCR-a analizom krive topljenja koja daje informaciju o broju produkata amplifikacije. Osnovni princip ove metode jeste da svaki PCR produkt ima različitu temperaturu disocijacije u zavisnosti od veličine i baznog sastava. Ukoliko je prisutan samo jedan pik fluorescencije znači da je došlo do amplifikacije specifičnog PCR produkta (Brajuskovic, 2012).



**Slika 3.1. Grafički prikaz reakcije kvantitativnog PCR-a.** U početnim PCR ciklusima nema značajnih promena u intenzitetu fluorescencije pa se on naziva bazalni nivo. Povećanje fluorescencije iznad bazalnog nivoa označava se kao prag, a postavlja se u okviru ekspancijalne faze reakcije. Mesto gde amplifikaciona kriva seče prag označava se kao Ct (engl. *threshold cycle*) vrednost za dati uzorak (preuzeto sa <https://www.ualberta.ca/biological-sciences/media-library/mbsu/abi-qrt-pcr/relative-quantificationgetting-started.pdf>).

Uvođenjem fluorescentno obeleženih proba koje koriste 5'→3' egzonukleaznu aktivnost *Taq* DNK polimeraze u značajnoj meri poboljšana je specifičnost metode kvantitativnog PCR-a. *TaqMan* proba je dvostuko obeležena hidrolitička proba, dužine oko 20 - 30 nukleotida, koja se vezuje nizvodno od prajmera i komplementarna je delu sekvence koja se umnožava. Ova proba na 5' kraju sadrži reportersku boju, dok se na 3' kraju nalazi nefluorescentni prigušivač (engl. *quencher, Q*). Pre početka PCR reakcije, *TaqMan* proba je intaktna i tada blizina prigušivača u značajnoj meri redukuje fluorescenciju koju emituje reporteska boja putem transfera fluorescentne rezonantne energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*). Tokom PCR-a prajmeri i probe vezuju se za ciljnu sekvencu, a uklanjanjem probe 5'→3' nukleaznom aktivnošću *Taq* DNK polimeraze tokom ekstenzije, dolazi do razdvajanja reporterske boje od prigušivača što rezultuje povećanim fluorescentnim signalom. Prilikom svakog narednog ciklusa, dodatni reporterski molekuli bivaju uklonjeni sa probe, što za posledicu ima povećanje intenziteta fluorescencije koja je proporcionalna količini umnoženih amplikona (Slika 3.2.) (Brajuskovic, 2012).



**Slika 3.2. Princip TaqMan probe.** Pre početka PCR reakcije, TaqMan proba je intaktna a prigušivač (Q) u značajnoj meri redukuje fluorescenciju koju emituje reporterska boja (R). Tokom PCR-a prajmeri i probe vezuju se za ciljnu sekvencu, a prilikom ekstenzije dolazi do uklanjanja probe nukleaznom aktivnošću Taq DNK polimeraze i oslobađanja reporterske boje što rezultuje povećanim fluorescentnim signalom (preuzeto sa <https://www.gene-quantification.de/qiagen-qpcr-sample-assay-tech-guide-2010.pdf>)

Kvantifikacija genske ekspresije dobijene qPCR metodom može biti apsolutna i relativna. U apsolutnoj kvantifikaciji, ekspresioni nivo određenog gena izražava se kao apsolutni broj kopija ciljne sekvence, a dobija se korišćenjem standardne krive konstruisane na osnovu kvantifikacije uzoraka poznate koncentracije. U slučaju relativne kvantifikacije, nivo genske ekspresije datog uzorka izražava se u odnosu na referentni uzorak - kalibrator. Oba pristupa zahtevaju normalizaciju eksperimentalnih rezultata, pa se paralelno sa umnožavanjem ciljne sekvence vrši i umnožavanje endogene kontrole. Endogena kontrola je najčešće konstitutivno eksprimiran (engl. *housekeeping*) gen koji pokazuje stabilnu ekspresiju u svim uzorcima koji se kvantifikuju (Brajuskovic, 2012).

Analiza ekspresionih profila *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u parafinskim uzorcima tumora jajnika izvršena je metodom kvantitativnog PCR-a. U tu svrhu korišćeni su komercijalno dostupni eseji TaqMan gene expression assays (Thermo Fisher Scientific, SAD) za *JAM-A* (Hs00170991\_m1), *ITGAV* (Hs00233808\_m1), *CALDI* (Hs00921982\_m1) i *GAPDH* (Hs02758991\_g1) gen, koji je odabran kao konstitutivno eksprimiran gen (Tabela 3.2). Reakciona smeša, ukupne zapremine 20 µL, sadržala je 1 µL sintetisane cDNK, 10 µL 2 x TaqMan Universal Master Mix-a (Applied Biosystems, SAD), 1 µL 20 x TaqMan gene expression Assay-a i vode oslobođene od nukleaza. TaqMan gene expression Assay-i sastoje se iz TaqMan probe i prajmera. Eksperimenti su rađeni u duplikatu na aparatu 7500 Real Time PCR System Thermocycler (Applied

*Biosystems*, SAD) prema sledećim uslovima: 2 minuta na 50 °C, 10 minuta na 95 °C a zatim 40 sukcesivnih ciklusa denaturacije 15 sekundi na 95 °C i ekstenzije 1 minut na 60 °C.

Relativna ekspresija ciljnih gena (*JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI*) preračunata je na osnovu komparativne  $\Delta\Delta C_t$  metode koju su definisali Livak i Schmittgen (Livak i Schmittgen, 2001). Ova metoda zahteva normalizaciju eksperimentalnih podataka u odnosu na endogenu kontrolu, kao i odabir kalibratora. U ovom istraživanju kao kalibrator izabran je benigni uzorak tumora jajnika.

**Tabela 3.2.** Spisak komercijalno dostupnih *TaqMan* eseja korišćenih za merenje relativne ekspresije *JAM-A*, *ITGAV*, *CALDI* i *GAPDH* gena

Naziv gena	Naziv eseja	Dužina amplikona, bp	Boja
<i>JAM-A</i>	Hs00170991_m1	81	FAM-MGB
<i>ITGAV</i>	Hs00233808_m1	64	FAM-MGB
<i>CALDI</i>	Hs00921982_m1	76	FAM-MGB
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	93	FAM-MGB

Ekspresioni nivoi ciljnih gena za svaki od uzoraka preračunati su na sledeći način:

1.  $C_t$  vrednost endogene kontrole oduzeta je od  $C_t$  vrednosti ciljnog gena. Ova razlika označena je kao  $\Delta C_t$ , a preračunava se za sve uzorke kao i za kalibrator.

$$\Delta C_t (\text{uzorka/kalibratora}) = C_t (\text{ciljnog gena}) - C_t (\text{GAPDH})$$

2. Razlika između  $\Delta C_t$  vrednosti uzorka i  $\Delta C_t$  vrednosti kalibratora prikazana je kao  $\Delta\Delta C_t$ .

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{uzorka}) - \Delta C_t (\text{kalibratora})$$

3. Količina ciljne sekvence u datom uzorku, normalizovana prema endogenoj kontroli i relativna u odnosu na kalibrator izražava se formulom:

$$\text{Relativna ekspresija} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Ova vrednost koristi se za poređenje nivoa relativne genske ekspresije između uzoraka.

### 3.5. Imunohistohemijsko bojenje *JAM-A* proteina u uzorcima tumora jajnika

Imunohistohemijsko bojenje predstavlja tehniku koja se koristi za utvrđivanje prisustva i lokalizacije antigena od interesa u tkivnim preseccima, a zasniva se na specifičnoj reakciji između antitela i antigena. Kompleks antitelo-antigen može se vizuelizovati na dva načina: hromogenom detekcijom i fluorescentnom detekcijom. U slučaju hromogene detekcije, za antitelo vezan je enzim koji u reakciji sa odgovarajućim supstratom daje obojeni produkt koji se može videti pod svetlosnim mikroskopom. U slučaju fluorescentne detekcije, za antitelo vezana je fluorofora koja se vizuelizuje fluorescentnom mikroskopijom (Binch i sar., 2020).



Parafinski tkivni blokovi sečeni su na mikrotomu na preseke debljine 4  $\mu\text{m}$ , a zatim su montirani na visokoadherentna predmetna stakla (SuperFrost, *Thermo Scientific*, SAD) i sušeni 60 minuta na temperaturi od 60 °C. Imunohistohemijski postupak podrazumevao je sledeće korake: deparafinizaciju i rehidrataciju tkiva, demaskiranje antigena, blokiranje endogene peroksidaze, inkubaciju sa kozijim serumom, inkubaciju sa primarnim antitelom, inkubaciju sa sekundarnim antitelom i vizuelizaciju pomoću hromogena.

#### Proces deparafinizacije tkivnih preseka

Proces deparafinizacije i rehidratacije preseka izvršen je korišćenjem ksilola i serije alkohola opadajuće koncentracije 100% - 70%.

- ksilol I 5 min
- ksilol II 5 min
- 100% alkohol 5min
- 96% alkohol 5 min
- 70% alkohol 5min
- Destilovana voda 5 min

#### Demaskiranje antigenih determinanti

Pre imunohistohemijskog bojenja, većina tkiva fiksiranih formalinom zahteva korak demaskiranja antigenih determinanti, s obzirom da prilikom fiksacije dolazi do formiranja metilenskih mostova i unakrsnog povezivanja proteina, a samim tim i maskiranja antigenih mesta. Termičkom obradom tkivnih preseka moguće je izvršiti demaskiranje antigena. Nakon deparafinizacije, tkivni preseci stavljeni su u citratni pufer i termički obrađeni u mikrotalasnoj pećnici 10 minuta, a zatim hlađeni dodavanjem destilovane vode 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja, preseci su isprani najpre u destilovanoj vodi, a zatim u fosfatnom puferu (engl. *phosphate-buffered-saline*, PBS) dva puta po 5 minuta.

#### Blokiranje endogene peroksidaze

Preparati su potopljeni u smešu 3% vodonik-peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i metanola u trajanju od 10 minuta, a zatim isprani u PBS.

Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (ABC Kit, *Abcam*, Velika Britanija) koji se zasniva na primeni streptavidin-biotin tehnike. Specifično antitelo, vezano za antigen od interesa u tkivnim presecima, lokalizuje se pomoću sekundarnog antitela konjugovanog sa biotinom. Zatim se dodaje streptavidin-enzim konjugat koji se vezuje za biotin prisutan na sekundarnom antitelu. Kompleks kojeg čine specifično antitelo, sekundarno antitelo i streptavidin-enzim kompleks vizuelizuje se odgovarajućim supstratom, odnosno hromogenom.

Bojenje se odvijalo po sledećoj proceduri:

Nakon ispiranja, preseci su inkubirani u *Protein Block*-u (*Abcam*, Velika Britanija) 30 minuta na sobnoj temperaturi radi sprečavanja nespecifičnog vezivanja. Potom su inkubirani preko noći na 4 °C sa primarnim mišijim monoklonskim anti-JAM-A antitelom, dilucije 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*R&D Systems*, SAD). Nakon ispiranja u TBS-T (engl. *Tris Buffered Saline-Tween*), preseci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi u univerzalnoj smeši biotiniziranih sekundarnih antitela kože (anti-mišje i anti-zečje antitelo) (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus, *Abcam*, Velika Britanija) razblaženih u protein blokeru u odnosu 1:20. Preseci su ispirani PBS-om i inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi sa konjugatom streptavidina i peroksidaze rena (Streptavidin Peroxidase Plus, *Abcam*, Velika Britanija). Detekcija mesta vezivanja antitela za odgovarajuće proteine u tkivu

izvršena je inkubacijom preseka u 0.05% diaminobenzidinu (DAB) rastvorenom u TBS-u, u prisustvu 0.012% vodonik-peroksida u mraku sve do pojave bojene reakcije a najduže 10 minuta. Reakcija je prekinuta ispiranjem česmenskom vodom, a kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom. Nakon rutinske dehidracije, napravljeni su trajni preparati montiranjem u DPX medijumu (*Sigma-Aldrich*, SAD).

Prilikom imunohistohemijskog bojenja korišćene su negativne i pozitivne kontrole. Negativni kontrolni uzorak tretiran je kao i tkivni preseki tumora jajnika, s tim što je u slučaju negativne kontrole inkubacija sa primarnim antitelom zamenjena inkubacijom sa puferom. Kao pozitivna kontrola korišćeni su tkivni preseki humanog karcinoma endometrija.

Skorovanje, ocenjivanje imunopozitivnosti, vršeno je sa preseka na kojima je JAM-A obeležen DAB imunohistohemijski. Preseci su posmatrani Leica DMLB mikroskopom (*Leica Microsystems*, Nemačka) na uvećanju od 40 puta. Dva nezavisna posmatrača, koristeći okularnu mrežicu, nepristrasno su ocenila JAM-A imunopozitivnost celog tkivnog preseka. Ocene su zadate u okviru 0 - 3, pri čemu su negativna kontrola (izostavljanje primarnog antitela) i pozitivna kontrola (tkivo poznatog ekspimiranja proteina) služile kao referentna imunopozitivnost 0 i 3, respektivno.

### 3.6. Bioinformatičke analize JAM-A, ITGAV i CALD1 genske i proteinske ekspresije u karcinomu jajnika

Kako bi validirali eksperimentalno dobijene rezultate, nivoi ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena u karcinomu jajnika, kao i istoimenih proteina, analizirani su korišćenjem javno dostupnih baza podataka kao što su GEPIA (engl. *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*), HPA (engl. *Human Protein Atlas*), GEO (engl. *Gene Expression Omnibus*) i STRING (engl. *The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*), a sprovedena je i analiza obogaćivanja skupa gena (engl. *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA). Spisak korišćenih javno dostupnih baza podataka kao i bioinformatičkih softvera prikazan je u tabeli 3.3.

**Tabela 3.3.** Spisak korišćenih baza podataka i softvera

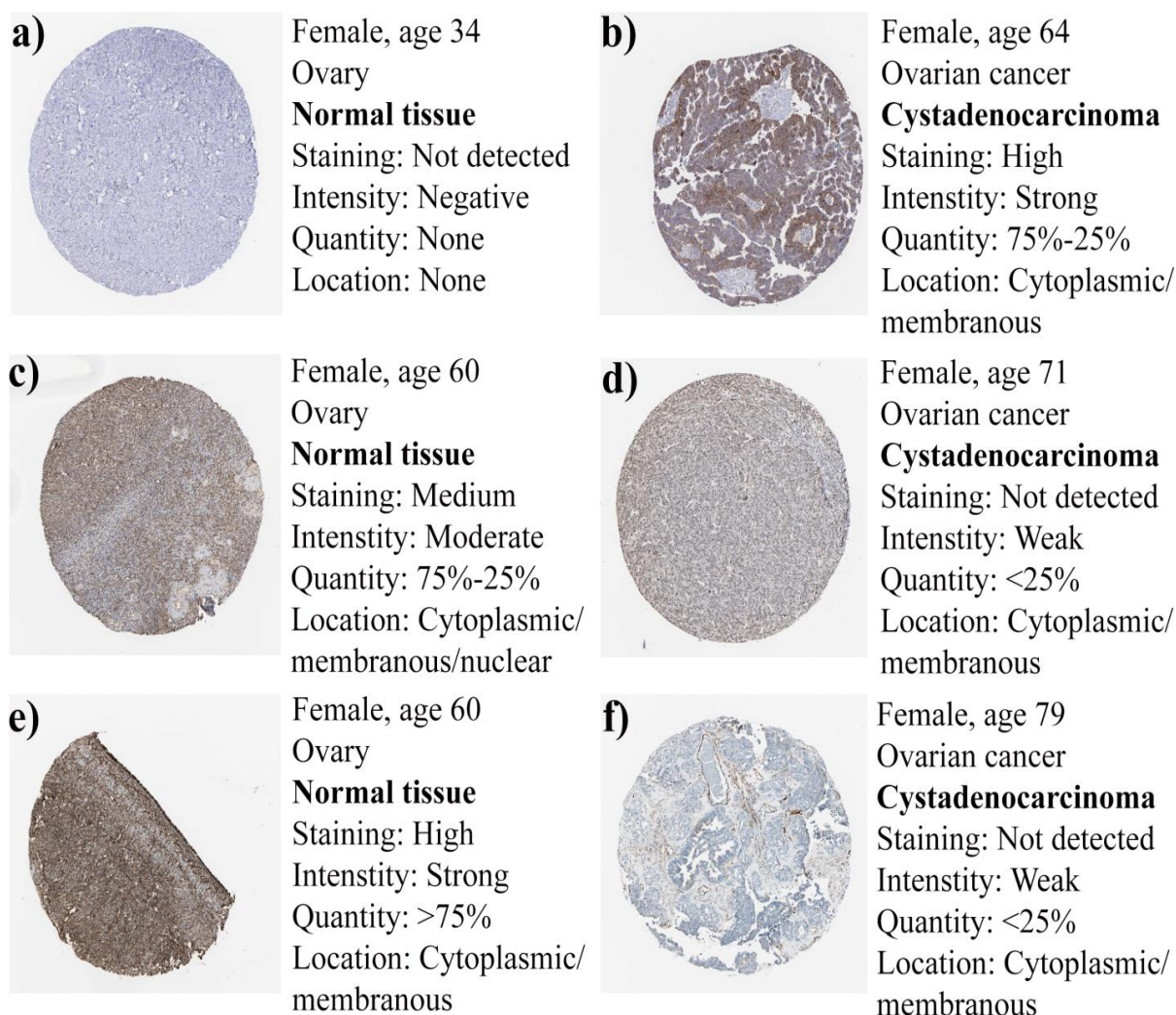
Naziv baze podataka/softvera	Izvor
<b>GEPIA</b> (engl. <i>Gene Expression Profiling Interactive Analysis</i> )	<a href="http://gepia.cancer-pku.cn/">http://gepia.cancer-pku.cn/</a>
<b>GEO</b> (engl. <i>Gene Expression Omnibus</i> )	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>
<b>HPA</b> (engl. <i>Human Protein Atlas</i> )	<a href="http://www.humanatlas.org">www.humanatlas.org</a>
<b>STRING</b> (engl. <i>The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes</i> )	<a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a>
<b>GSEA</b> (engl. <i>Gene Set Enrichment Analysis</i> )	<a href="https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp">https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp</a>

### 3.6.1. Poređenje nivoa ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u normalnom i tumorskom tkivu jajnika – GEPIA baza podataka

U cilju poređenja nivoa ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u normalnom i tumorskom tkivu jajnika korišćena je GEPIA baza podataka (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). GEPIA predstavlja internet server za analizu ekspresionih podataka preko 9500 tumorskih i 8500 normalnih uzorka TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas*) i GTEX (engl. *Genotype-Tissue Expression*) projekata dobijenih RNK sekvenciranjem (Tang i sar., 2017). GEPIA pruža mogućnost analize diferencijalne ekspresije gena u tumorskom i normalnom tkivu, poređenje nivoa genske ekspresije u različitim tumorskim tipovima, stadijumima bolesti, preživljavanja bolesnika kao i mogućnost korelacionih analiza. Uz pomoć ove baze analizirani su ekspresioni nivoi *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u tumorskom (n=426) i normalnom tkivu jajnika (n=88).

### 3.6.2. Analiza proteinske ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u normalnom i tumorskom tkivu jajnika – Humani proteinski atlas

Humani proteinski atlas (HPA) ([www.humanatlas.org](http://www.humanatlas.org)) predstavlja javno dostupnu bazu podataka koja sadrži informacije o ekspresiji i prostornoj distribuciji velikog broja humanih proteina u različitim normalnim i tumorskim tkivima kao i ćelijskim linijama, a nastala je integracijom TCGA podataka i podataka dobijenih u okviru samog HPA projekta (Uhlen i sar., 2015). Ova baza korišćena je u cilju poređenja ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u normalnom i tumorskom tkivu jajnika na proteinskom nivou, na osnovu imunohistohemijskog bojenja 3 uzorka normalnog tkiva jajnika i 12 uzoraka karcinoma jajnika (Slika 3.3).



**Slika 3.3.** Prikaz proteinske ekspresije JAM-A (a, b), ITGAV (c, d) i CALD1 (e, f) u normalnom i tumorskom tkivu jajnika na osnovu imunohistochemijskih podataka Humanog proteinskog atlasa (HPA).

### 3.6.3. Analiza interakcija između JAM-A, ITGAV i CALD1 proteina - STRING baza podataka

STRING (engl. *The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*) (<https://string-db.org/>) predstavlja bazu podataka proteinskih interakcija koje zajedno doprinose specifičnoj biološkoj funkciji, a uključuju direktne (fizičke) i indirektno (funkcionalne) interakcije. Ova baza ima za cilj da prikupi i integriše sve javno dostupne izvore informacija o poznatim međuproteinskim interakcijama kao i da ove informacije dopuni kompjuterskim predikcijama. Osnovna jedinica interakcije u STRING bazi je „funkcionalna asocijacija” koja se definiše kao interakcija između dva proteina koji zajedno doprinose specifičnoj biološkoj funkciji. Sve funkcionalne asocijacije označene su skorovima poverenja koji izražavaju pouzdanost tačnosti asocijacije, tj. ukazuju na procenjenju verovatnoću, na skali od 0 do 1, da je data interakcija biološki značajna, specifična i reproducibilna na osnovu dostupnih dokaza (Szklarczyk i sar., 2019). JAM-A, ITGAV i CALD1 proteinska mreža izgrađena je na osnovu najvišeg skora poverenja (engl. *confidence score*) ( $\geq 0.9$ ) a na osnovu STRING v.11.0 baze podataka. Mreža je proširena prikazom do 10 interakcija direktno povezanih sa proteinima od interesa kako bi se ispitalo i indirektno

interakcije, grupisanje *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* sa drugim proteinima kao i mogući efekti ovih interakcija.

### 3.6.4. Analiza obogaćivanja skupa gena

Kako bi identifikovali potencijalne mehanizme putem kojih ekspresija *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena utiče na progresiju karcinoma jajnika, sprovedena je analiza obogaćivanja skupa gena (engl. *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). GSEA je statistička metoda koja se koristi kako bi se utvrdilo da li prethodno definisani setovi gena pokazuju statistički značajne, kordinisane promene u ekspresiji između dva biološka stanja (fenotipa) (Subramanian i sar., 2005). Hipoteza koja se nalazi u osnovi ove analize jeste da geni koji su uključeni u slične biološke procese ili signalne puteve pokazuju korelisano ponašanje, odnosno regulisani su na koordinisan način. GSEA algoritam zasniva se na rangiranju gena na osnovu njihove ekspresije i pripadnosti određenom signalnom putu. Primarni rezultat GSEA jeste skor obogaćenja (engl. *Enrichment Score*, ES) a oslikava stepen u kojem je određena grupa gena obogaćena na vrhu ( $ES > 0$ ) ili na dnu ( $ES < 0$ ) rangirane liste gena. Ipak, kao jedan od osnovnih pokazatelja prilikom analize GSEA rezultata koristi se NES (engl. *Normalized Enrichment Score*) koji se preračunava za svaki genski set na osnovu njegove veličine, a oslikava stepen u kojem je određena grupa gena obogaćena na vrhu ( $NES > 0$ ) ili na dnu ( $NES < 0$ ) rangirane liste gena. Drugi značajan pokazatelj je stopa lažno pozitivnih (engl. *False Discovery Rate*, FDR) koja predstavlja procenjenu verovatnoću da skup gena sa datim NES-om predstavlja lažno pozitivan nalaz. Nominalna p vrednost procenjuje statističku značajnost skora obogaćenja za pojedinačni genski set. Ipak, ovaj parametar, za razliku od FDR vrednosti, nije korigovan u odnosu na veličinu genskog seta i testiranje višestrukog broja hipoteza (genskih setova), pa samim tim ima ograničen značaj prilikom poređenja genskih setova.

Podaci o genskoj ekspresiji u karcinomu jajnika koji su korišćeni prilikom ove analize preuzeti su sa GEO sajta. Grupa od 285 bolesnica sa karcinomom jajnika iz ekspresionog seta GSE9891 (Tothill i sar., 2008) podeljena je na osnovu *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* genske ekspresije tako što su vrednosti ekspresije poređane od najveće ka najmanjoj, a zatim je 25% vrednosti na vrhu i 25% vrednosti na dnu odabrano kao grupa sa visokom, odnosno niskom ekspresijom ispitivanog gena. U ovom radu korišćena je GSEA verzija 4.0.3. i „hallmark” genski setovi<sup>1</sup>. Broj fenotipskih permutacija podešen je na 1000. Genski setovi sa nominalnom p-vrednošću  $< 0,05$  i FDR  $< 25\%$  smatrani su kao statistički značajno obogaćeni.

### 3.7. Statistička obrada rezultata

Prilikom opisa parametara od značaja korišćene su mere deskriptivne statistike: medijana i opseg (raspon). Testiranje normalne distribucije vrednosti kontinuiranih varijabli izvršeno je Kolmogorov-Smirnov i Šapiro-Vilk testom. Vrednost  $\alpha = 0,05$  usvojena je kao nivo statističke značajnosti. S obzirom da je pokazano da vrednosti kontinuiranih varijabli nemaju normalnu distribuciju, za testiranje razlika u genskoj ekspresiji između analiziranih grupa korišćen je neparametrijski test, Vilkoksonov test sume rangova. Korelacija između ekspresionih nivoa *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena analizirana je Spirmanovim testom korelacije rangova, a jačina i smer korelacije iskazana je korelacionim ( $\rho$ ) koeficijentom. Za ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog diskriminatornog potencijala genskih ekspresija korišćena je analiza ROC (engl. *Receiver Operating Characteristics*) krivih po DeLong metodi. ROC kriva daje grafički prikaz senzitivnosti i specifičnosti za svaku moguću vrednost parametra od interesa (vrednosti genskih ekspresija), tako

---

<sup>1</sup> „Hallmark” genski setovi predstavljaju specifična, dobro definisana biološka stanja ili procese koja se odlikuju koherentnom ekspresijom (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collections.jsp>)

što na ordinati prikazuje vrednosti senzitivnosti, a na apscisi vrednosti specifičnosti oduzete od 1. Jedan od važnih elemenata ROC analize jeste površina ispod ROC krive (engl. *Area Under the Curve ROC*, AUC-ROC) koja predstavlja meru kvaliteta prediktivnog modela. Površina ispod krive pokazatelj je verovatnoće da će na osnovu testa veću vrednost za slučajno odabranog ispitanika imati osoba sa datim kvalitetom, nego osoba bez kvaliteta. U slučaju kada parametar od interesa nije u mogućnosti da pravi razliku između dve grupe ispitanika, površina ispod ROC krive iznosiće 0,5, što odgovara dijagonali na ROC grafiku, dok će u slučaju kada postoji savršena separacija, površina iznositi 1. Što je površina ispod krive bliža ovoj vrednosti to je parametar diskriminativniji, tj. bolje razlikuje dve grupe jer se vrednosti senzitivnosti i specifičnosti za svaki granični skor približavaju idealnim. Kada se radi o najboljim graničnim vrednostima genskih ekspresija, usvojene su one za koje je na osnovu ROC analize dostignuta maksimalna suma specifičnosti i senzitivnosti (Janicic i Novovic, 2011). Za analize krivih ukupnog preživljavanja korišćena je Kaplan-Majerova metoda, a za opis korišćene su medijane preživljavanja i odgovarajući intervali poverenja (95%). Za testiranje razlika u ukupnom preživljavanju u odnosu na nivo ekspresije korišćen je log-rank test. S obzirom da se Kaplan-Majerova metoda i log-rank test mogu primeniti samo na kategoričke varijable, bolesnice su na osnovu medijane ekspresije podeljene u grupe sa niskom i visokom ekspresijom ispitivanih gena. Univarijanta Koksova regresiona analiza korišćena je za procenu statistički značajnih faktora koji imaju uticaj na ukupno preživljavanje. Beta koeficijent (B) i odnos rizika (engl. *Hazard Ratio*, HR) sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja korišćeni su za deskripciju, dok je Valdo test korišćen za statističko testiranje. Pozitivna vrednost beta koeficijenta ( $B > 0$ ) i odnos rizika veći od jedan ( $HR > 1$ ) ukazuju da je rizik od smrti veći kod ispitanika sa većom vrednošću ispitivane varijable. Sve statističke analize, izuzev analize ROC krivih, urađene su uz pomoć programa SPSS v. 22.0 (*IBM SPSS Statistics, SAD*). ROC analiza urađena je u R programu v. 3.3.2.

---

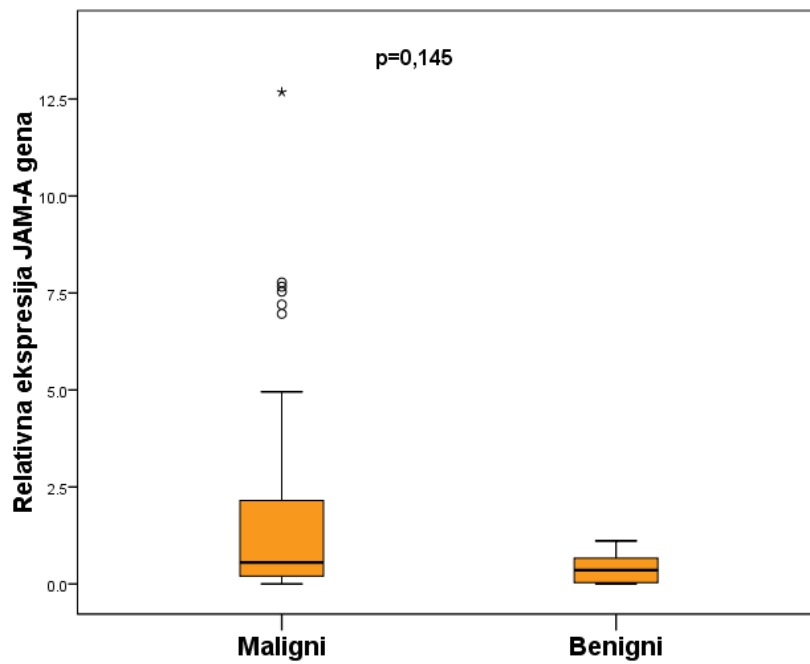
## 4. REZULTATI

---

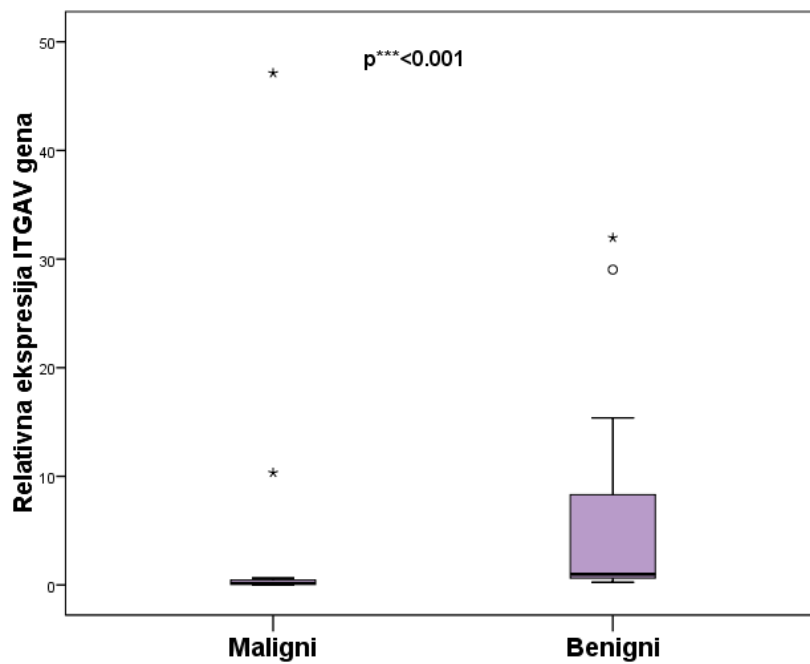
U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je relativna ekspresija odabranih gena uključenih u procese vezane za EMT u uzorcima humanog karcinoma jajnika u cilju pronalaska novih molekularnih biomarkera ovog maligniteta. Metodom kvantitativnog PCR-a analizirano je 77 parafinskih uzoraka tumora jajnika, od kojih 57 malignih i 20 benignih. Usled neadekvatnog kvaliteta izolovane RNK, ekspresija *JAM-A* gena analizirana je kod 44 maligna i 12 benignih uzoraka; ekspresija *ITGAV* gena kod 46 malignih i 17 benignih; dok je ekspresija *CALDI* gena analizirana kod 47 malignih i 19 benignih uzoraka tumora jajnika.

### 4.1. Kvantifikacija ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u benignim i malignim uzorcima tumora jajnika

Medijana nivoa ekspresije *JAM-A* gena u grupi malignih uzoraka bila je viša (0,55 (0,002-12,68)) u odnosu na benigne uzorke tumora jajnika (0,355 (0,01-1,11)), ali bez statistički značajne razlike ( $p=0,145$ ) (Slika 4.1.). Nivo ekspresije *ITGAV* gena kod malignih uzoraka tumora jajnika iznosio je 0,14 (0,002-75,99). Ovaj nivo značajno je niži u odnosu na nivo ekspresije koji je detektovan u grupi benignih uzoraka (0,98 (0,24-31,96),  $p<0,001$ ) (Slika 4.2). Takođe, detektovan je značajno niži nivo ekspresije *CALDI* gena u malignim uzorcima sa medijanom od 0,26 (0,004-19,93) u odnosu na benigne tumore jajnika (9,48 (0,91-99,12),  $p<0,001$ ) (Slika 4.3). Rezultati su grafički prikazani Box-plotom koji se sastoji od pravougaonika koji prikazuje podatke od donjeg do gornjeg kvartila (središnjih 50% podataka), dok horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Na grafiku, vrednosti udaljene 1,5 dužine od ivica pravougaonika nazivaju se atipične i predstavljene su kružićima, a vrednosti udaljene 3 dužine od ivica pravougaonika nazivaju se ekstremne i predstavljene su zvezdicama.

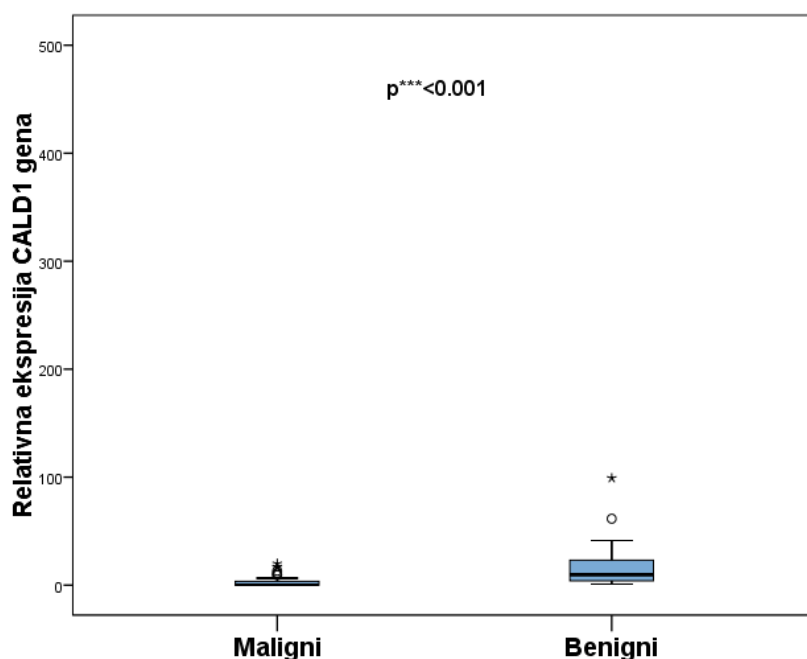


**Slika 4.1.** Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije *JAM-A* gena kod malignih i benignih uzoraka tumora jajnika



**Slika 4.2.** Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije *ITGAV* gena kod malignih i benignih uzoraka tumora jajnika





**Slika 4.3.** Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije *CALD1* gena kod malignih i benignih uzoraka tumora jajnika

#### 4.2. Korelacije ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena i kliničkopatoloških parametara karcinoma jajnika

Nivoi ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena korelisani su sa karakteristikama bolesnica, kliničkim parametrima bolesti i histopatološkim karakteristikama tumora. U ispitivanoj grupi nije pokazana statistički značajna korelacija ovih parametara i različitih nivoa ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena (Tabela 4.1; Tabela 4.2; Tabela 4.3). Ipak, zabeležen je statistički trend povišene ekspresije *JAM-A* gena u tumorima visokog gradusa ( $p=0,070$ ) kao i u uzorcima karcinoma jajnika kod kojih je zabeleženo prisustvo ascita ( $p=0,051$ ) (Tabela 4.1). Statistički trend snižene ekspresije *ITGAV* gena detektovan je u tumorima visokog gradusa (gradus 2 i 3) ( $p=0,053$ ), u uzorcima karcinoma jajnika kod kojih je zabeleženo prisustvo ascita ( $p=0,055$ ), kao i u uzorcima bolesnica koje su relapsirale ( $p=0,083$ ) (Tabela 4.2). Takođe, statistički trend snižene ekspresije *CALD1* gena uočen je u tumorima visokog gradusa ( $p=0,075$ ) (Tabela 4.3).

**Tabela 4.1.** Korelacije relativne ekspresije *JAM-A* gena u odnosu na karakteristike bolesnica i kliničkopatološke parametre bolesti

Karakteristike	n (%) n=44	Relativna ekspresija <i>JAM-A</i> gena	
		Medijana (opseg)	P-vrednost <sup>#</sup>
<i>Starost</i>			
≤60	26 (59,1)	0,57 (0,002-12,68)	0,703
>60	18 (40,9)	0,54 (0,002-7,77)	

<b>Status menopauze</b>			
Premenopauza	12 (27,3)	1,12 (0,002-12,68)	
Postmenopauza	27 (61,3)	0,69 (0,002-7,77)	0,584
NA	5 (11,4)		
<b>FIGO stadijum</b>			
I+II	17 (38,6)	0,37 (0,002-7,66)	
III+IV	27 (61,4)	1,33 (0,002-12,68)	0,145
<b>Histološki podtip tumora</b>			
Serozni	33 (75,0)	0,72 (0,002-12,68)	
Ostali	10 (22,7)	0,32 (0,004-7,66)	0,741
NA	1 (2,3)		
<b>Histološki gradus tumora</b>			
1	14 (31,8)	0,30 (0,002-7,66)	
2+3	26 (59,1)	1,42 (0,002-12,68)	0,070
NA	4 (9,1)		
<b>Metastaze u limfnim čvorovima</b>			
Da	8 (18,2)	1,65 (0,021-7,53)	
Ne	22 (50,0)	0,40 (0,002-12,68)	0,277
NA	14 (31,8)		
<b>Peritonealne metastaze</b>			
Da	27 (61,4)	1,52 (0,004-12,68)	
Ne	14 (31,8)	0,38 (0,002-7,66)	0,235
NA	3 (6,8)		
<b>Udaljene metastaze</b>			
Da	7 (15,9)	1,52 (0,013-6,96)	
Ne	35 (79,5)	0,41 (0,002-12,68)	0,487
NA	2 (4,6)		
<b>Prisustvo ascita</b>			
Da	18 (40,9)	1,72 (0,004-12,68)	
Ne	24 (54,5)	0,32 (0,002-7,66)	0,051
NA	2 (4,6)		
<b>Prisustvo rezidualne bolesti</b>			
Da	16 (36,4)	1,01 (0,002-7,53)	
Ne	20 (45,4)	0,55 (0,002-12,68)	0,886
NA	8 (18,2)		
<b>Relaps bolesti</b>			
Da	13 (29,6)	1,88 (0,002-7,77)	
Ne	23 (52,2)	0,37 (0,002-12,68)	0,766
NA	8 (18,2)		

# Wilkoxsonov test sume rangova

**Tabela 4.2.** Korelacije relativne ekspresije *ITGAV* gena u odnosu na karakteristike bolesnica i kliničkopatološke parametre bolesti

Karakteristike	n (%) n=46	Relativna ekspresija <i>ITGAV</i> gena	
		Medijana (opseg)	P-vrednost <sup>#</sup>
<b><i>Starost</i></b>			
≤60	25 (54,3)	0,12 (0,002-47,12)	0,749
>60	21 (45,7)	0,20 (0,004-75,99)	
<b><i>Status menopauze</i></b>			
Premenopauza	12 (26,1)	0,10 (0,005-1,57)	0,337
Postmenopauza	29 (63,0)	0,15 (0,002-75,99)	
NA	5 (10,9)		
<b><i>FIGO stadijum</i></b>			
I+II	18 (39,1)	0,28 (0,005-75,99)	0,290
III+IV	28 (60,9)	0,12 (0,002-47,12)	
<b><i>Histološki podtip tumora</i></b>			
Serozni	34 (73,9)	0,14 (0,002-47,12)	0,702
Ostali	11 (23,9)	0,11 (0,02-75,99)	
NA	1 (2,2)		
<b><i>Histološki gradus tumora</i></b>			
1	14 (30,4)	0,43 (0,02-75,99)	0,053
2+3	29 (63,1)	0,10 (0,002-26,06)	
NA	3 (6,5)		
<b><i>Metastaze u limfnim čvorovima</i></b>			
Da	8 (17,4)	0,11 (0,002-47,12)	0,496
Ne	25 (54,3)	0,15 (0,004-75,99)	
NA	13 (28,3)		
<b><i>Peritonealne metastaze</i></b>			
Da	30 (65,2)	0,12 (0,002-47,12)	0,332
Ne	14 (30,4)	0,28 (0,02-75,99)	
NA	2 (4,4)		
<b><i>Udaljene metastaze</i></b>			
Da	8 (17,4)	0,08 (0,002-1,32)	0,523
Ne	37 (80,4)	0,15 (0,004-7,99)	
NA	1 (2,2)		
<b><i>Prisustvo ascita</i></b>			
Da	19 (41,3)	0,11 (0,002-1,32)	0,055
Ne	26 (56,5)	0,17 (0,02-75,99)	
NA	1 (2,2)		
<b><i>Prisustvo rezidualne bolesti</i></b>			
Da	15 (32,6)	0,15 (0,03-0,64)	0,690
Ne	19 (41,3)	0,10 (0,002-10,33)	
NA	12 (26,1)		

<i>Relaps</i>			
Da	13 (28,3)	0,10 (0,002-26,06)	0,083
Ne	24 (52,1)	0,30 (0,005-75,99)	
NA	9 (19,6)		

# *Vilkoksonov test sume rangova*

**Tabela 4.3.** Korelacije relativne ekspresije *CALDI* gena u odnosu na karakteristike bolesnica i kliničkopatološke parametre bolesti

Karakteristike	n (%) n=47	Relativna ekspresija <i>CALDI</i> gena	
		Medijana (opseg)	P-vrednost <sup>#</sup>
<b><i>Starost</i></b>			
≤60	30 (63,8)	0,24 (0,006-17,07)	0,842
>60	17 (36,2)	0,44 (0,004-19,93)	
<b><i>Status menopauze</i></b>			
Premenopauza	15 (31,9)	0,20 (0,006-17,07)	0,541
Postmenopauza	28 (59,6)	0,28 (0,004-19,93)	
NA	4 (8,5)		
<b><i>FIGO stadijum</i></b>			
I+II	16 (34,0)	0,33 (0,007-13,21)	0,704
III+IV	30 (63,9)	0,19 (0,004-19,93)	
NA	1 (2,1)		
<b><i>Histološki podtip tumora</i></b>			
Serozni	34 (72,4)	0,23 (0,004-19,93)	0,707
Ostali	12 (25,5)	0,24 (0,022-16,59)	
NA	1 (2,1)		
<b><i>Histološki gradus tumora</i></b>			
1	11 (23,4)	1,17 (0,021-9,19)	0,075
2+3	30 (63,8)	0,13 (0,004-19,93)	
NA	6 (12,8)		
<b><i>Metastaze u limfnim čvorovima</i></b>			
Da	7 (16,7)	0,19 (0,007-17,07)	0,677
Ne	27 (56,2)	0,26 (0,004-16,59)	
NA	13 (27,1)		
<b><i>Peritonealne metastaze</i></b>			
Da	32 (68,1)	0,21 (0,004-19,93)	0,335
Ne	13 (27,7)	0,94 (0,01-16,59)	
NA	2 (4,2)		

<b>Udaljene metastaze</b>			
Da	8 (17,0)	0,16 (0,013-9,73)	
Ne	38 (80,9)	0,33 (0,004-19,93)	0,324
NA	1 (2,1)		
<b>Prisustvo ascita</b>			
Da	22 (46,8)	0,17 (0,004-16,59)	
Ne	24 (51,1)	0,59 (0,007-19,93)	0,257
NA	1 (2,1)		
<b>Prisustvo rezidualne bolesti</b>			
Da	16 (34,0)	0,33 (0,004-19,93)	
Ne	20 (42,6)	0,20 (0,007-13,21)	0,626
NA	11 (23,4)		
<b>Relaps</b>			
Da	13 (27,7)	0,20 (0,004-19,93)	
Ne	25 (53,2)	0,29 (0,007-16,59)	0,903
NA	9 (19,1)		

# *Vilkoksonov test sume rangova*

#### 4.3. Određivanje diskriminatornog potencijala nivoa ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u tumorima jajnika: Analiza ROC krivih

Analiza ROC krivih korišćena je za ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog potencijala ekspresionih nivoa odabranih gena. Primenom ove analize ispitivano je postojanje granične vrednosti ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena koja razdvaja benigne od malignih tumora jajnika (dijagnostički potencijal) kao i granične vrednosti koja razdvaja dobar od lošeg ishoda bolesti (prognostički potencijal). Loš ishod bolesti definisan je kao relaps i/ili smrtni ishod. Od svih parametara, ROC analizom pokazano je da samo ekspresija *JAM-A* gena ima dijagnostički i prognostički potencijal (Tabela 4.4). U slučaju dijagnostičkog potencijala, ustanovljeno je da nivo ekspresije *JAM-A* gena od 1,14 sa površinom ispod krive od 0,640 (95% CI 0,488-0,792,  $p=0,014$ ) ima optimalnu graničnu vrednost (engl. *ROC cut-off value*) (senzitivnost 0,43 i specifičnost 1). U slučaju diskriminatornog potencijala za predviđanje ishoda bolesti, ova vrednost iznosila je 1,80 sa površinom ispod krive od 0,621 (95% CI 0,427-0,816,  $p=0,013$ ) (senzitivnost 0,53 i specifičnost 0,85) (Tabela 4.5) (Slika 4.4). Primenom ROC analize nije utvrđeno postojanje diskriminatornog potencijala za nivo ekspresija ostalih gena u odnosu na prethodno definisane parametre (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4.** ROC analiza dijagnostičkog (benigni/maligni) i prognostičkog (dobar/loš ishod bolesti) diskriminatornog potencijala za *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gensku ekspresiju kod bolesnica sa tumorom jajnika

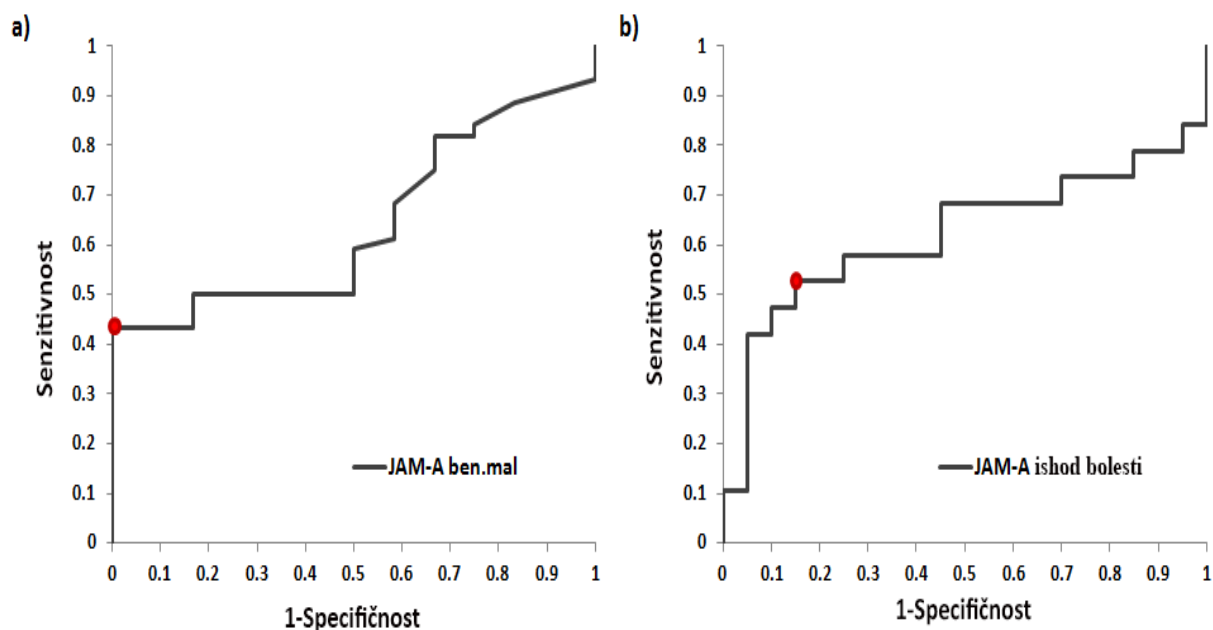
Nivo genske ekspresije	benigni/maligni		dobar/loš ishod bolesti	
	AUC ROC (95% CI)(%)#	Test	AUC ROC (95% CI)(%)	Test
<i>JAM-A</i>	64,02 (48,79-79,24)	<b>p=0,014*</b>	62,11 (42,65-81,56)	<b>p= 0,013*</b>
<i>ITGAV</i>	87,23 (77,9-96,56)	ns	69,49 (50,34-88,63)	ns
<i>CALDI</i>	85,58 (76,70-94,46)	ns	46,68 (28,60-64,77)	ns

#Area Under the ROC curve (DeLongova metoda); CI= interval poverenja (engl. Confidence Interval); \*Statistički značajan rezultat, ns=nije statistički značajno

**Tabela 4.5.** Rezultati ROC analize dijagnostičkog i prognostičkog diskriminatornog potencijala *JAM-A* ekspresije kod bolesnica sa tumorom jajnika

	benigni/maligni	dobar/loš ishod bolesti
<b>AUC ROC (95% CI)(%)*</b>	64,02 (48,79-79,24)	62,11 (42,65-81,56)
<b>Test količnika verodostojnosti</b>	<b>p= 0,014*</b>	<b>p= 0,013*</b>
<b>ROC granična vrednost#</b>	1,14	1,80
<b>Senzitivnost (%)</b>	43,18 (29,55-59,09)	52,63 (31,25-81,25)
<b>Specifičnost (%)</b>	100 (100-100)	85,00 (70-100)

\*Area Under the ROC curve (DeLongova metoda); # Relativni nivo ekspresije *JAM-A* gena koji ima maksimalnu sumu specifičnosti i senzitivnosti; \*Statistički značajan rezultat



**Slika 4.4.** ROC analiza nivoa ekspresije *JAM-A* gena za a) diskriminativni potencijal između benignih i malignih uzoraka tumora jajnika i b) dobrog, odnosno lošeg ishoda bolesti. Crvene tačke na graficima predstavljaju optimalnu graničnu vrednost *JAM-A* genske ekspresije

#### 4.4. Korelacije između ekspresija *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena kod bolesnica sa karcinomom jajnika

U cilju analize međusobnih odnosa ekspresije ispitivanih gena, korišćen je Spirmanov test korelacije rangova. Vrednost Spirmanovog koeficijenta korelacije rho ( $\rho$ ) kreće se od +1 (savršena pozitivna korelacija) do -1 (savršena negativna korelacija). Za značajnu korelaciju smatrana je ona kod koje je  $\rho > 0,50$ , odnosno  $\rho < -0,50$ , a vrednost  $p < 0,05$ . Međusobni odnosi analiziranih gena u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika predstavljeni su u tabeli 4.6. Ekspresije *ITGAV* i *CALDI* gena su statistički značajno pozitivno korelisane ( $\rho=0,585$ ;  $p < 0,001$ ), dok su negativno korelisane sa ekspresijom *JAM-A* gena ( $\rho = -0,877$ ;  $p = 0$  i  $\rho = -0,632$ ;  $p < 0,001$  redom).

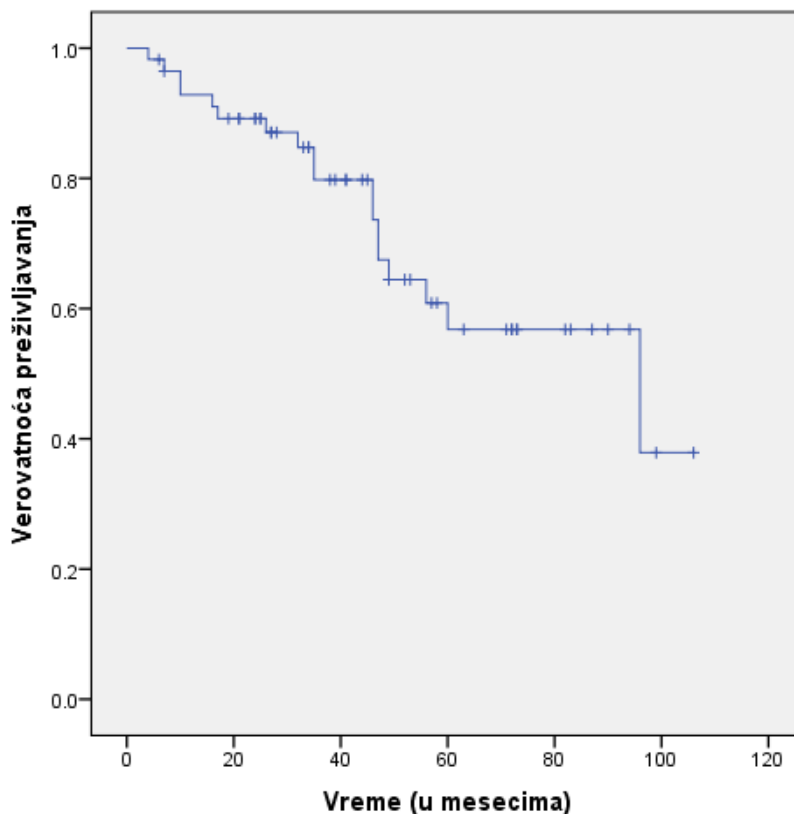
**Tabela 4.6.** Korelacije između ekspresija *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena kod bolesnica sa karcinomom jajnika

		<i>ITGAV</i>	<i>CALDI</i>	<i>JAM-A</i>
<i>ITGAV</i>	rho	1	0,585	-0,877
	p	/	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0*</b>
<i>CALDI</i>	rho	0,585	1	-0,632
	p	<b>&lt;0,001*</b>	/	<b>&lt;0,001*</b>
<i>JAM-A</i>	rho	-0,877	-0,632	1
	p	<b>0*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	/

\*Statistički značajan rezultat

#### 4.5. Kaplan-Majerova metoda i log-rank test ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika u odnosu na relativnu ekspresiju *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena

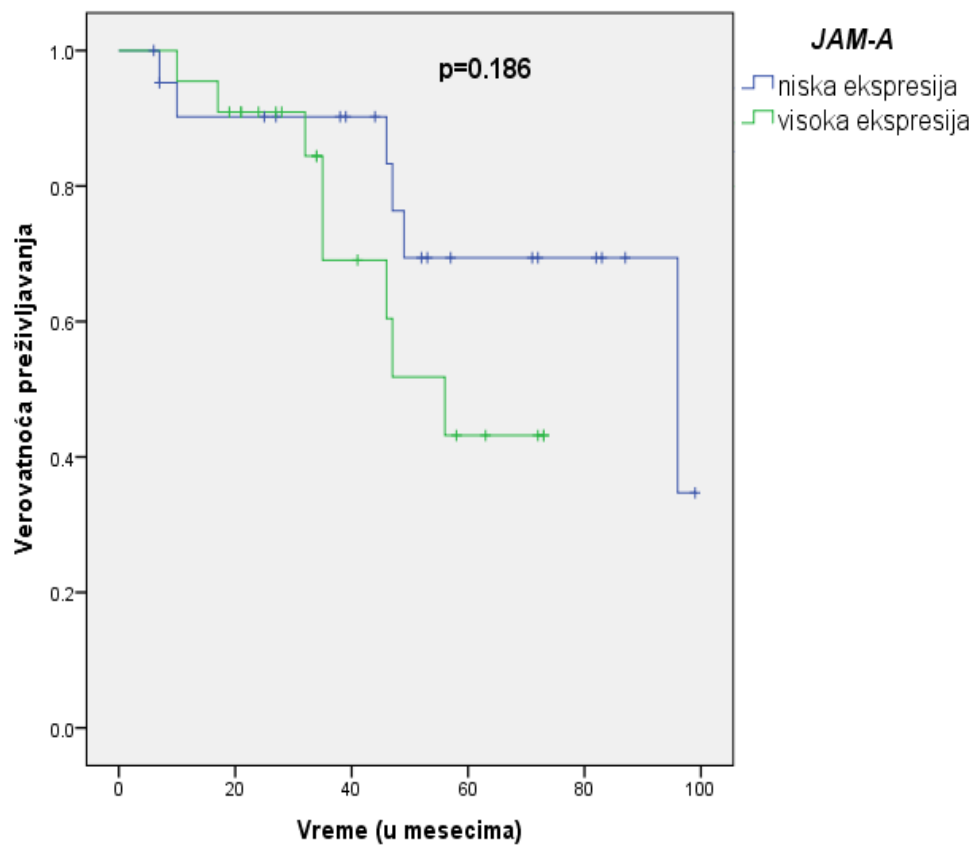
U grupi od 57 bolesnica obolelih od karcinoma jajnika, od čega 18 umrlih, medijana praćenja iznosila je 41 mesec (4-106), a medijana ukupnog preživljavanja iznosila je 96 meseci sa 95% intervalom poverenja (95% CI) (34,6-157,4) (Slika 4.5). Medijana preživljavanja predstavlja vreme za koje se očekuje da je 50% bolesnica živo.



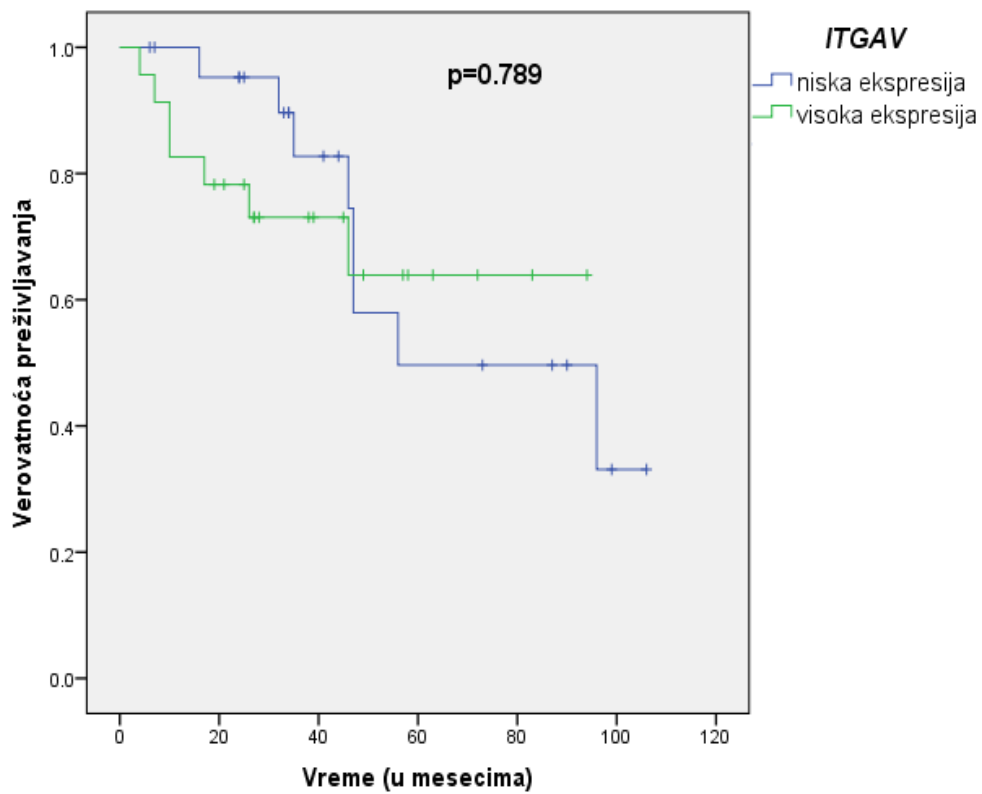
**Slika 4.5.** Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja za ispitivane bolesnice sa karcinomom jajnika (n=57). Cenzurisane bolesnice predstavljene su vertikalnim crtama na grafiku

Kako bi ispitali vezu između nivoa ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena i ukupnog preživljavanja bolesnica urađena je Kaplan-Majerova analiza i log-rank test. Ukupno preživljavanje definisano je kao vreme između datuma dijagnoze bolesti (operacije) i datuma smrti ili poslednje kontrole. S obzirom da se Kaplan-Majerova metoda i log-rank test mogu primeniti samo na kategoričke varijable, bolesnice su na osnovu medijane ekspresije podeljene u grupe sa niskom i visokom ekspresijom ispitivanih gena. Rezultati u ispitivanoj grupi bolesnica nisu pokazali statistički značajnu vezu između ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena i ukupnog preživljavanja bolesnica ( $p=0,186$ ,  $p=0,789$  i  $p=0,064$ ). Ipak, bolesnice sa višom u odnosu na one sa nižom ekspresijom *JAM-A* gena, imale su kraću medijanu preživljavanja (56 prema 96 meseci) (Slika 4.6). Takođe, medijana preživljavanja bila je kraća u grupi bolesnica sa nižom ekspresijom *ITGAV* (56 meseci) i *CALDI* gena (47 meseci) u odnosu na višu ekspresiju (medijana nije dostignuta) (Slika 4.7. i Slika 4.8).

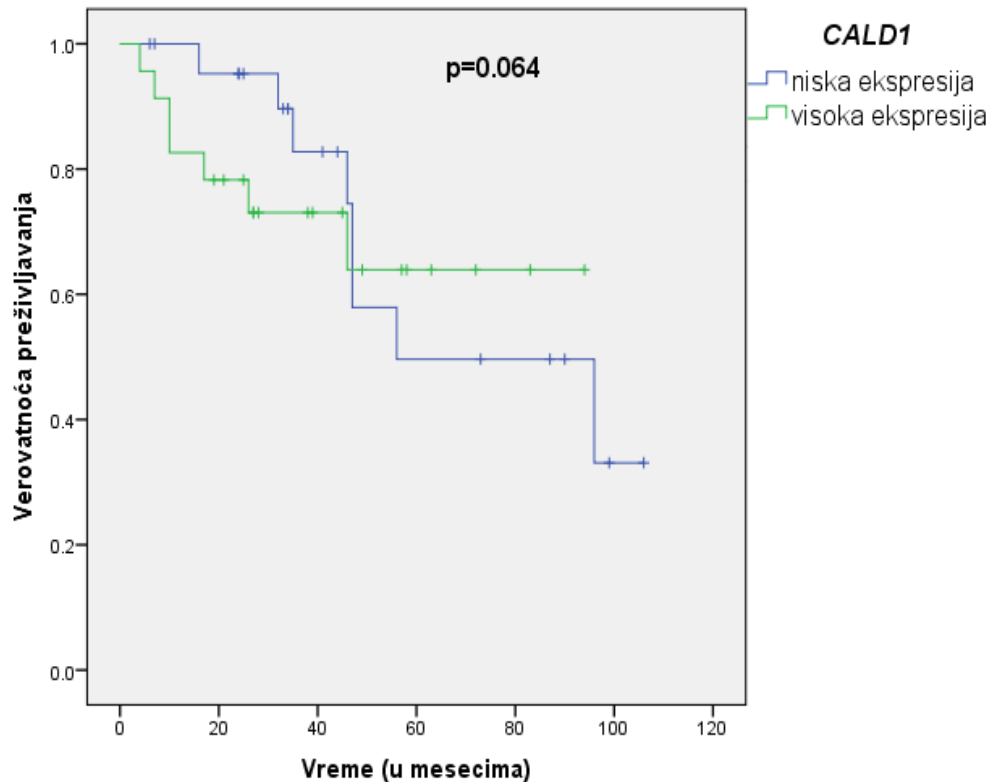




**Slika 4.6.** Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika u odnosu na nisku/visoku *JAM-A* gensku ekspresiju



**Slika 4.7.** Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika u odnosu na nisku/visoku *ITGAV* gensku ekspresiju



**Slika 4.8.** Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika u odnosu na nisku/visoku *CALD1* gensku ekspresiju

#### 4.6. Univarijantna Koksova regresiona analiza ukupnog preživljavanja

U cilju utvrđivanja odnosa između ekspresije ispitivanih gena i pojedinih kliničkopatoloških parametara bolesti sa jedne strane, i ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika sa druge, primenjena je univarijantna Koksova regresiona analiza. Asocijacije su izražene kao odnosi rizika (engl. *Hazards Ratio*, HR) sa 95% intervalom poverenja. U ispitivanoj grupi bolesnica pokazano je da statistički značajan efekat na preživljavanje ostvaruju sledeće kliničke promenljive: FIGO stadijum (HR=3.207, 95% CI 1,755-6,671, p=0,003), peritonealne metastaze (HR=13,5, 95% CI 1,8-102,7, p=0,012) i rezidualni tumor (HR=3,6, 95% CI 1,1-12,1, p=0,037) (Tabela 4.7). S obzirom na nedovoljan broj događaja (smrtnih ishoda) po prediktorskoj varijabli u ispitivanoj grupi bolesnica, parametri koji su se pokazali značajnim u univarijantnoj Koksovoj regresionoj analizi, nisu ubacivani u multivarijantni Koksov regresioni model. Svrha ovog modela jeste da proceni simultani efekat različitih faktora na preživljavanje, sa ciljem da se utvrdi da li neki od faktora ima nezavisan uticaj.

**Tabela 4.7.** Univarijantna Koksova regresiona analiza ukupnog preživljavanja u odnosu na pojedine kliničkopatološke karakteristike bolesnica sa karcinomom jajnika i ekspresiju *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena

Faktor	Univarijantna Koksova regresija		
	B	HR (95%CI)	p*
<b>Starost</b>			
≤60 vs >60	0,637	1,9 (0,7-5,0)	0,194
<b>Status menopauze</b>			
Post vs Premenopauza	0,351	1,4 (0,5-4,1)	0,514
<b>Histološki podtip tumora</b>			
Serozni vs Ostali	1,306	3,7 (0,8-16,5)	0,088
<b>FIGO stadijum</b>			
I-IV	1,042	3,207 (1,755-6,671)	<b>0,003</b>
<b>Histološki gradus tumora</b>			
2+3 vs 1	1,449	4,3 (1,0-18,8)	0,056
<b>Peritonealne metastaze</b>			
Da vs Ne	2,601	13,5 (1,8-102,7)	<b>0,012</b>
<b>Udaljene metastaze</b>			
Da vs Ne	0,397	1,5 (0,3-6,8)	0,608
<b>Prisustvo rezidualne bolesti</b>			
Da vs Ne	1,284	3,6 (1,1 -12,1)	<b>0,037</b>
<b>JAM-A ekspresija</b>			
Visoka vs niska	0,736	2,1 (0,7-6,4)	0,201
<b>ITGAV ekspresija</b>			
Visoka vs niska	-0,856	0,4 (0,1-1,3)	0,141
<b>CALDI ekspresija</b>			
Visoka vs niska	-0,828	0,4 (0,2-1,3)	0,132

*B*, regresioni koeficijent; *HR*, odnos rizika; *CI*, interval poverenja; \*Valdov test;

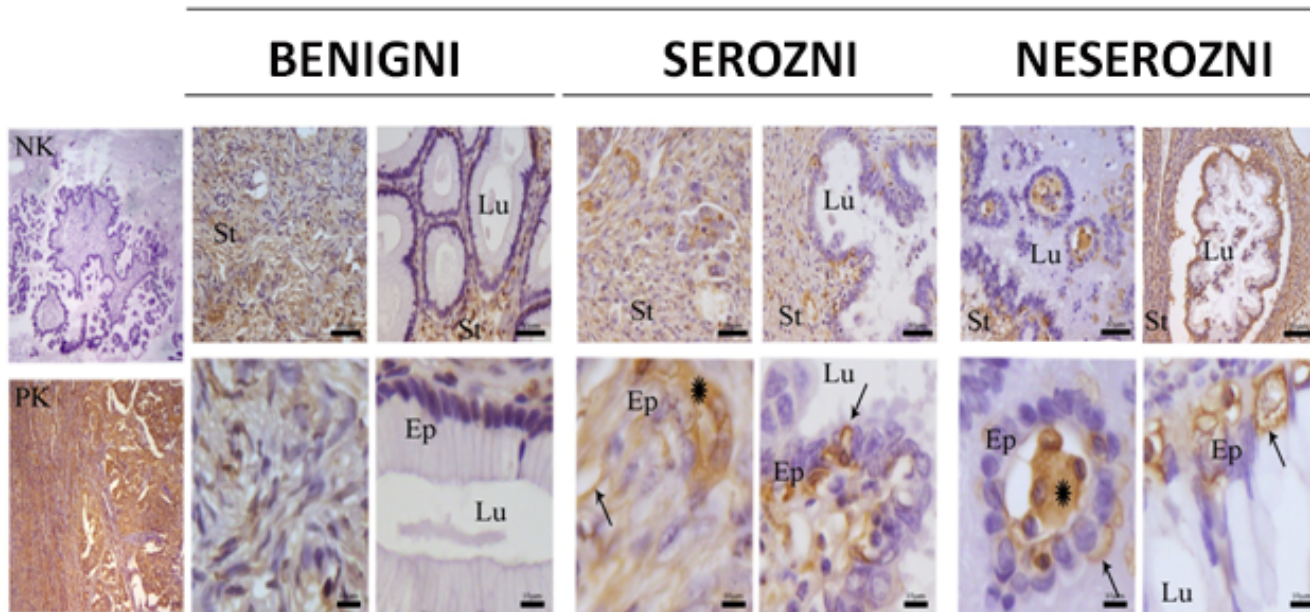
#### 4.7. Analiza proteinske ekspresije JAM-A u uzorcima tumora jajnika

S obzirom da je pokazano da *JAM-A* ima dijagnostički i prognostički potencijal u ispitivanoj grupi bolesnica, analizirana je i proteinska ekspresija JAM-A. Imunohistohemijska ekspresija JAM-A evaluirana je u 19 uzoraka tumora jajnika, od kojih u jednom nije bilo moguće izvršiti procenu usled nekroze tkiva. Preostalih 18 uzoraka činila su 2 benigna i 16 malignih tumora jajnika, od kojih je većina pripadala seroznom histološkom tipu (81,3%). Pozitivna ekspresija JAM-A proteina u grupi benignih uzoraka tumora jajnika detektovana je u epitelu i u stromi, s tim što je intenzitet bojenja bio veći u stromi. Takođe, kod seroznog i neseroznih tipova karcinoma jajnika JAM-A imunoekspresija detektovana je kako u stromi, tako i u epitelu (Tabela 4.8). Imunopozitivnost je lokalizovana u membrani i citoplazmi epitelnih ćelija karcinoma jajnika (Slika 4.9).

**Tabela 4.8.** Imunopozitivnost JAM-A proteina u epitelu i stromi benignih i malignih (seroznih i ne seroznih) tumora jajnika

	IHC SKOR EPITEL				IHC SKOR STROMA			
	%				%			
n=18 n (%)	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
<b>BENIGNI TUMORI</b> 2 (11,1%)	0	100	0	0	0	0	50	50
<b>SEROZNI KARCINOMI</b> 13 (81,3%)	0	46,2	46,2	7,6	0	46,2	46,2	7,6
<b>NESEROZNI KARCINOMI</b> 3 (16,7%)	0	66,7	33,3	0	0	33,3	66,7	0

## JAM-A

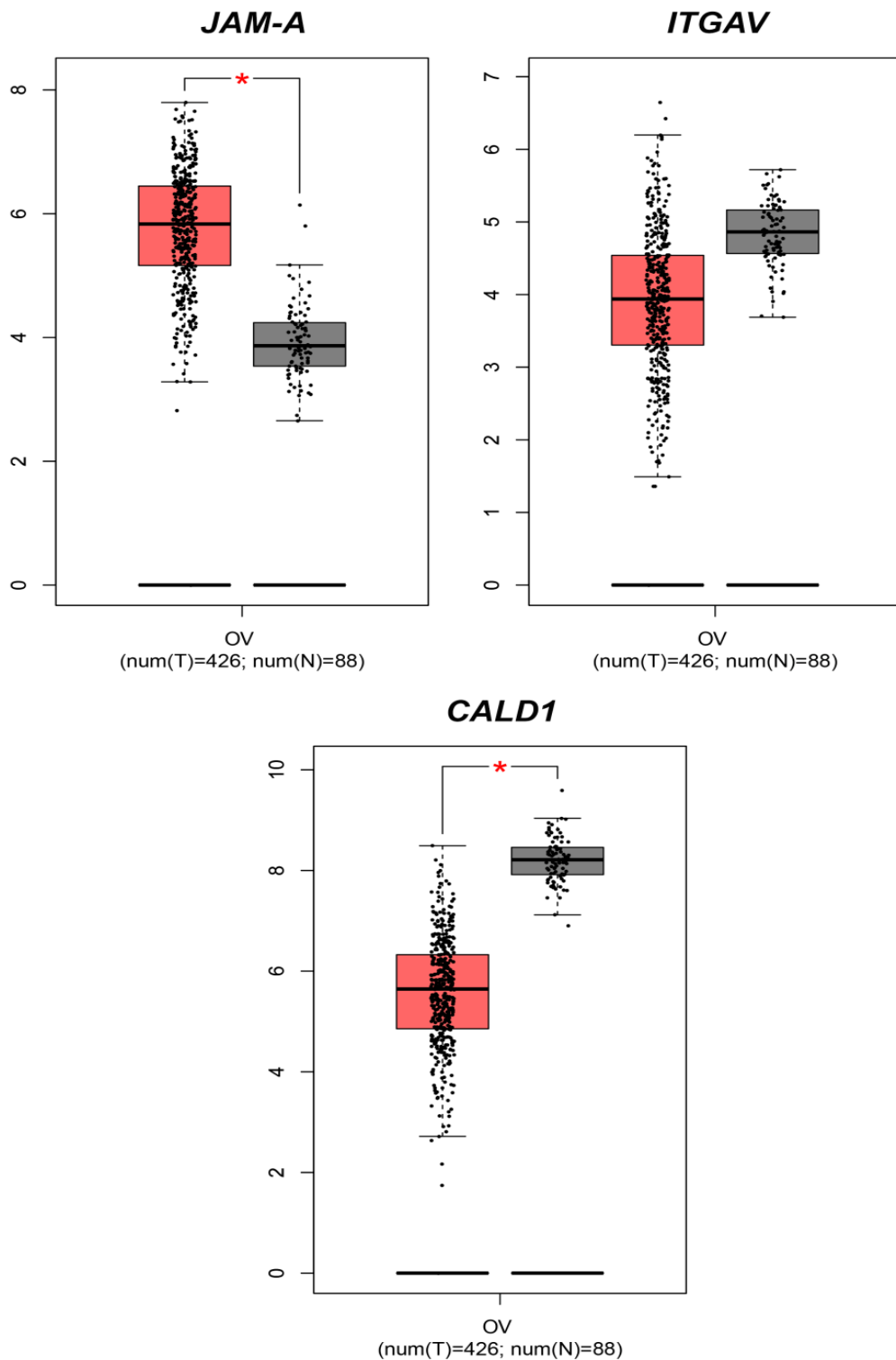


**Slika 4.9.** Reprezentativne slike benignog tumora, seroznog i neseroznog tipa karcinoma jajnika u odnosu na JAM-A imunopozitivnost. Mesta specifičnog vezivanja antitela su smeđe boje, dok hematoksilin boji plavom bojom jedra svih ćelija za koje se nespecifično veže. NK – negativna kontrola, PK – pozitivna kontrola, Ep – epitel, St – stroma, Lu – lumen, Strelice na slici označavaju membransku, a zvezdice citoplazmatsku imunopozitivnost. Vrednost bara iznosi 10  $\mu\text{m}$ .

### 4.8. Rezultati bioinformatičkih analiza JAM-A, ITGAV i CALD1 genske i proteinske ekspresije u karcinomu jajnika

#### 4.8.1. Rezultati poređenja nivoa JAM-A, ITGAV i CALD1 genske ekspresije u normalnom i kancerskom tkivu jajnika - GEPIA baza podataka

Na osnovu GEPIA baze podataka, uočena je statistički značajno povišena ekspresija *JAM-A* gena u kancerskom u odnosu na normalno tkivo jajnika. U slučaju *ITGAV* i *CALD1* gena uočena je snižena ekspresija u kancerskom tkivu jajnika, dok je u slučaju *CALD1* gena ta razlika bila i statistički značajna ( $p < 0.05$ ) (Slika 4.10).



**Slika 4.10.** Razlike u ekspresiji *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena u tumorskom (T) i normalnom (N) tkivu jajnika na osnovu GEPIA baze podataka. Crveni i sivi box-plotovi predstavljaju tumorsko i normalno tkivo jajnika, redom. \*P<0.05

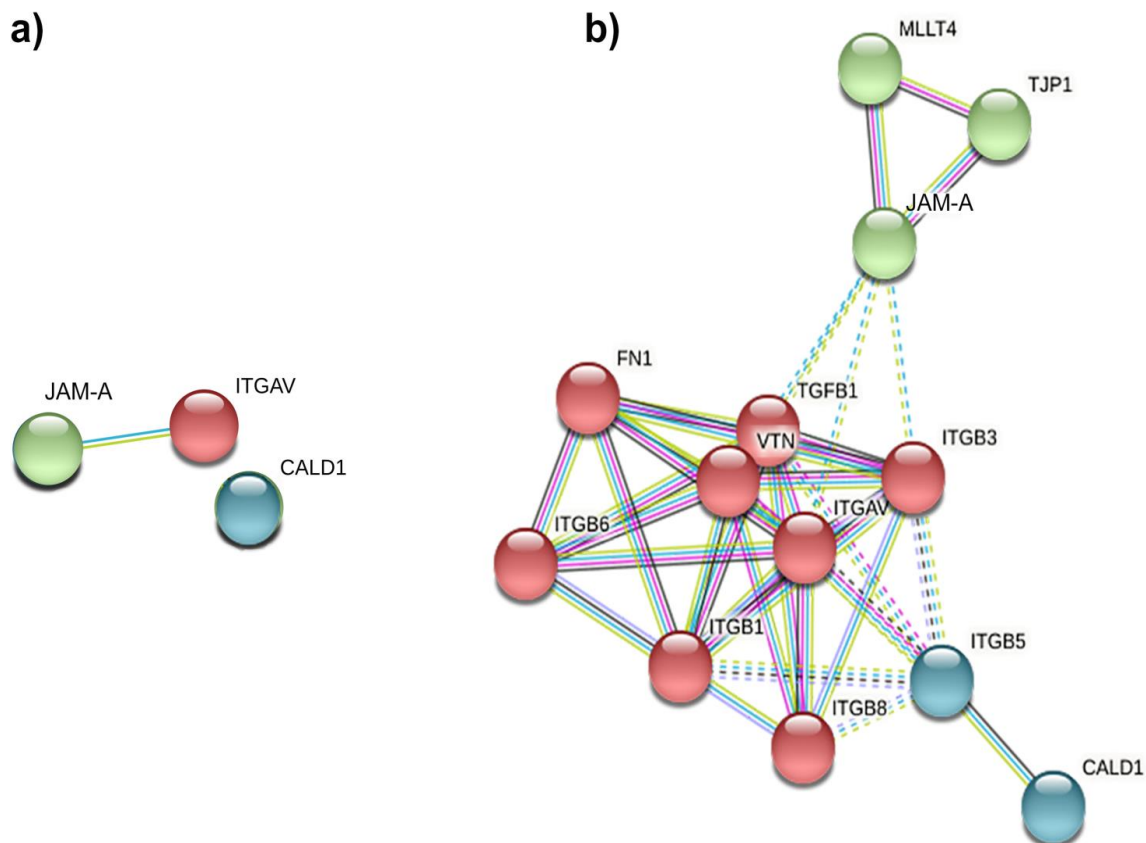
#### 4.8.2. Rezultati analize proteinske ekspresije JAM-A, ITGAV i CALD1 u normalnom i tumorskom tkivu jajnika - Humani proteinski atlas

Na osnovu podataka iz HPA pokazano je da preko 70% uzoraka karcinoma jajnika pokazuje umeren ili jak intenzitet imunohistohemijskog bojenja JAM-A proteina, dok se on ne detektuje u normalnim ćelijama jajnika (antitelo HPA061700). U slučaju ekspresije ITGAV i CALD1 proteina situacija je obrnuta: normalne ćelije jajnika pokazuju umeren do jak intenzitet bojenja, dok je ekspresija slaba ili odsutna u svim analiziranim isečcima karcinoma jajnika (antitela HPA004856 i HPA008066) (Slika 3.3). U uzorcima gde je detektovana proteinska ekspresija JAM-A, ITGAV i CALD1, lokalizacija ovih proteina bila je na membrani i u citoplazmi, dok je ITGAV protein detektovan i u nukleusu normalnih ćelija jajnika.

#### 4.8.3. Rezultati analize interakcija JAM-A, ITGAV i CALD1 proteina - STRING baza podataka

STRING analiza pokazala je da JAM-A i ITGAV ostvaruju funkcionalne interakcije na osnovu podataka metaboličkih baza, baza signalnih puteva kao i literaturnih podataka i to sa visokim skorom poverenja ( $\geq 0.9$ ) (Slika 4.11). Dodatna analiza klastera proširena sa do 10 primarnih interakcija pokazala je da JAM-A, ITGAV i CALD1 ostvaruju brojne indirektno interakcije i formiraju biološke klustere zajedno sa proteinima: MLLT4 (engl. *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to 4*), TJP1 (engl. *tight junction protein 1*), FN1, TGFB1, ITGB3 (engl. *integrin B 3*), ITGB6, VTN (engl. *vitronectin*), ITGB1, ITGB8, ITGB5) (Slika 4.11). Proširena mreža statistički je značajno obogaćena interakcijama ( $p < 0.001$ ) što pokazuje da JAM-A, ITGAV i CALD1 međusobno interaguju značajno više nego što se to očekuje za nasumični set gena slične veličine. Klaster analiza pokazala je da ITGAV formira poseban klaster i da interaguje sa JAM-A kao i sa CALD1 posredstvom ITGB5.





**Slika 4.11.** STRING analiza interakcije JAM-A, ITGAV i CALD1 proteina. (a) Proteinska mreža JAM-A, ITGAV i CALD1 funkcionalnih interakcija izgrađena je na osnovu skora visoke pouzdanosti ( $\geq 0,9$ ). b) Proteinska JAM-A, ITGAV i CALD1 mreža proširena je sa do 10 primarnih interakcija koje su statistički značajno obogaćene ( $p < 0,001$ ). Proteini su prikazani čvorovima označenim HGNC (engl. *HUGO Gene Nomenclature Committee*) genskim simbolima, a linije predstavljaju poznate i predviđene funkcionalne asocijacije potkrepljene različitim vrstama dokaza: ljubičasta - eksperimentalni dokazi, crna – podaci o koekspresijama, žuta – „textmining” tehnike i plava - naučne baze podataka. Crveni čvorovi – članovi ITGAV klastera; zeleni čvorovi – članovi JAM-A klastera; plavi čvorovi – članovi CALD1 klastera. Isprekidanim linijama prikazane su interakcije između klastera. MLLT4 (engl. *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to 4*), TJP1 (engl. *tight junction protein 1*), FN1 (engl. *fibronectin 1*), TGFB1 (engl. *transforming growth factor beta 1*), ITGB3 (engl. *integrin B 3*), ITGB6 (engl. *integrin B 6*), VTN (engl. *vitronectin*), ITGB1 (engl. *integrin B 3*), ITGB8 (engl. *integrin B 8*), ITGB5 (engl. *integrin B 5*).

#### 4.8.4. Rezultati analize obogaćivanja skupa gena

Kako bi identifikovali signalne puteve vezane za regulatorne mehanizme *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* genske ekspresije u karcinomu jajnika, korišćena je GSEA metoda grupu od 50 prethodno definisanih genskih setova („hallmark” genski setovi). U ovom radu, GSEA sprovedena je na GEO ekspresionom setu (GSE9891) koji je sadržao 285 bolesnica obolelih od karcinoma jajnika podeljenih u grupe sa visokom i niskom ekspresijom *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* gena. Statistički značajno obogaćeni putevi odabrani su na osnovu  $|NES| > 1$ ,  $FDR < 0,25$  i nominalne  $p$  vrednosti  $< 0,05$ .

U grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom ekspresijom *JAM-A* gena, ukupan broj obogaćenih puteva bio je 26 od ukupno 50 genskih setova, od čega je 12 funkcionalnih grupa gena bilo statistički značajno obogaćeno sa  $FDR < 0,25$ , a 5 funkcionalnih grupa gena sa nominalnom  $p$  vrednošću  $< 0,05$ . U grupi sa niskom ekspresijom *JAM-A* gena obogaćena su 24 genska seta, ali

nijedan nije bio statistički značajno obogaćen. Lista gena eksprimirana u grupi sa visokom ekspresijom *JAM-A* gena bila je visoko obogaćena genima uključenim u popravku oštećenja na DNK, glikolizu, deobno vreteno, proteinsku sekreciju i PI3K/AKT/mTOR signalizaciju. Pet najznačajnijih diferencijalno eksprimiranih genskih setova u grupi bolesnica sa visokom ekspresijom *JAM-A* gena prikazana je u tabeli 4.9.

U grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom ekspresijom *ITGAV* gena ukupan broj obogaćenih puteva bio je 46, od čega je 40 funkcionalnih grupa gena bilo statistički značajno obogaćeno sa  $FDR < 0.25$ , a 29 funkcionalnih grupa gena sa nominalnom  $p$  vrednošću  $< 0.05$ . Lista gena eksprimirana u grupi sa visokom ekspresijom *ITGAV* gena bila je obogaćena genima uključenim u adipogenezu, proteinsku sekreciju, reaktivne kiseonične vrste, apoptozu i sistem komplementa. Pet najznačajnijih diferencijalno eksprimiranih genskih setova u grupi bolesnica sa visokom ekspresijom *ITGAV* gena prikazana je u tabeli 4.10. Pored toga, među statistički značajno obogaćenim putevima našli su se i geni uključeni u TNF- $\alpha$  signalizaciju putem NF- $\kappa$ B ( $NES=1.71$ , nom.  $p$  vrednost=0,  $FDR=0.04$ ) i IL6-JAK-STAT3 signalizaciju ( $NES=1.71$ , nom.  $p$  vrednost=0,  $FDR=0.03$ ). U grupi sa sniženom ekspresijom *ITGAV* gena bila su obogaćena 4 genska seta ali bez statističke značajnosti.

U grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom ekspresijom *CALDI* gena ukupan broj obogaćenih signalnih puteva bio je 45 od ukupno 50 genskih setova, od čega je 24 funkcionalnih grupa gena bilo statistički značajno obogaćeno sa  $FDR < 0.25$ , a 16 funkcionalnih grupa gena sa nominalnom  $p$  vrednošću  $< 0.05$ . Genski setovi vezani za UV odgovor, adipogenezu, apikalne veze, EMT i miogenezu bili su diferencijalno zastupljeni u grupi sa visokom *CALDI* ekspresijom. Pored toga, statistički značajno obogaćen skup gena bio je vezan za TGF- $\beta$  signalizaciju ( $NES=1.75$ , nom.  $p$  vrednost=0.01,  $FDR=0.03$ ). U grupi sa niskom ekspresijom *CALDI* gena bilo je obogaćeno 5 genskih setova ali bez statističke značajnosti. Pet najznačajnijih diferencijalno eksprimiranih genskih setova u grupi bolesnica sa visokom ekspresijom *CALDI* gena prikazana je u tabeli 4.11.

Prikaz pojedinih statistički značajno obogaćenih EMT signalnih puteva u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom ekspresijom *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena dat je na slici 4.12.

**Tabela 4.9.** Pet najznačajnijih genskih setova statistički značajno obogaćenih u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom *JAM-A* ekspresijom. NES (engl. *Normalized Enrichment Score*), nom. P vrednost= nominalna P vrednost, FDR (engl. *False Discovery Rate*)

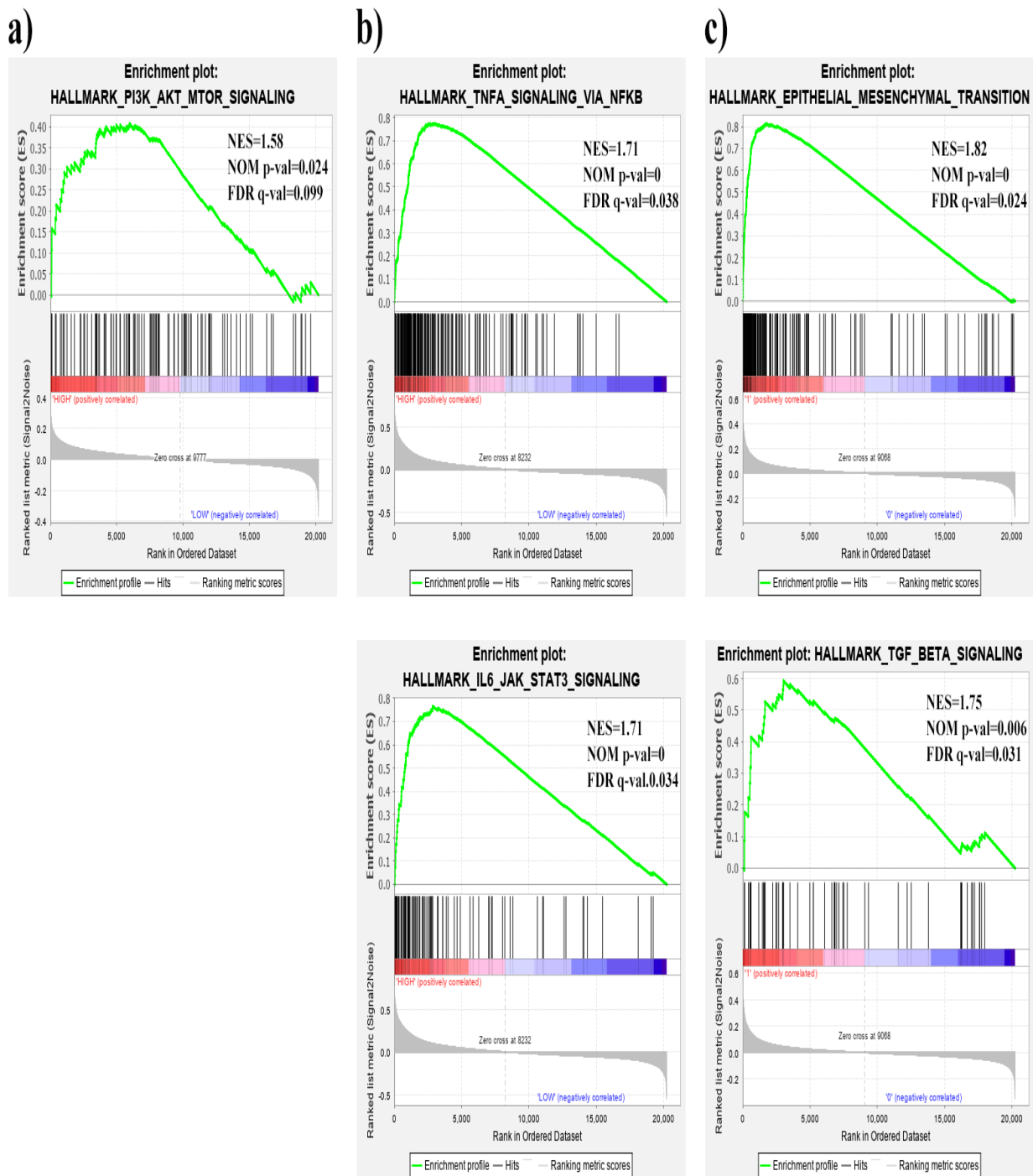
Genski set	NES	nom. P vrednost	FDR
<b>1. POPRAVKA OŠTEĆENJA NA DNK</b>	1.81	0.00	0.11
<b>2. GLIKOLIZA</b>	1.64	0.00	0.20
<b>3. DEOBNO VRETENO</b>	1.61	0.02	0.11
<b>4. PROTEINSKA SEKRECIJA</b>	1.59	0.04	0.11
<b>5. PI3K/AKT/mTOR SIGNALIZACIJA</b>	1.58	0.02	0.10

**Tabela 4.10.** Pet najznačajnijih genskih setova statistički značajno obogaćenih u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom *ITGAV* ekspresijom. NES (engl. *Normalized Enrichment Score*), nom. P vrednost= nominalna P vrednost, FDR (engl. *False Discovery Rate*)

Genski set	NES	nom. P vrednost	FDR
<b>1. ADIPOGENEZA</b>	1.86	0.00	0.07
<b>2. PROTEINSKA SEKRECIJA</b>	1.78	0.01	0.09
<b>3. REAKTIVNE KISEONIČNE VRSTE</b>	1.78	0.00	0.06
<b>4. APOPTOZA</b>	1.77	0.00	0.05
<b>5. SISTEM KOMPLEMENTA</b>	1.75	0.00	0.04

**Tabela 4.11.** Pet najznačajnijih genskih setova statistički značajno obogaćenih u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom *CALDI* ekspresijom. NES (engl. *Normalized Enrichment Score*), nom. P vrednost= nominalna P vrednost, FDR (engl. *False Discovery Rate*)

Genski set	NES	nom. P vrednost	FDR
<b>1. UV ODGOVOR</b>	1.93	0.00	0.04
<b>2. ADIPOGENEZA</b>	1.92	0.00	0.02
<b>3. APIKALNE VEZE</b>	1.84	0.00	0.03
<b>4. EPITELNO-MEZENHIMSKA-TRANZICIJA</b>	1.82	0.00	0.02
<b>5. MIOGENEZA</b>	1.78	0.00	0.03



**Slika 4.12.** Prikaz pojedinih statistički značajno obogaćenih EMT signalnih puteva u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika (GSE9891) sa visokom ekspresijom a) *JAM-A*, b) *ITGAV* i c) *CALDI* gena na osnovu GSEA analize.

---

## 5. DISKUSIJA

---

### 5.1. Značaj ispitivanja novih biomarkera u karcinomu jajnika

Karcinom jajnika predstavlja najzastupljeniji i najsmrtonosniji histološki tip kancera jajnika (Prat, 2017). Za razliku od većine solidnih tumora čija je prognoza značajno poboljšana, petogodišnje preživljavanje bolesnica sa karcinomom jajnika, uprkos razvoju ciljanih terapija poput antiangiogenih agenasa i PARP-inhibitora, nije se značajnije promenilo u poslednjih 40 godina, tačnije od uvođenja hemioterapije bazirane na platini (Lheureux i sar., 2019). Usled odsustva specifičnih simptoma u početnim fazama bolesti kao i nepostojanja adekvatnih metoda za rano otkrivanje, oko 75% slučajeva karcinoma jajnika dijagnostikuje se u kasnoj fazi, sa prisutnim peritonealnim metastazama kada je prognoza znatno lošija (Cortez i sar., 2018). Uprkos novim saznanjima vezanim za patogenezu i heterogenost ovog oboljenja, većina bolesnica i dalje se leči standardnim metodama, koje podrazumevaju citoreduktivnu hirurgiju i hemioterapiju baziranu na platini (Suh i sar., 2014). Takođe, uprkos senzitivnosti na prvu liniju hemioterapije, kod oko 70% slučajeva karcinoma jajnika javlja se relaps bolesti u okviru dve godine nakon inicijalnog tretmana (Giornelli, 2016).

Iako metastaze predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti obolelih od malignih bolesti, saznanja o ovom procesu u karcinomu jajnika i dalje nisu potpuna (Mitra, 2016). Peritonealna diseminacija karcinoma jajnika u vezi je sa lošijom prognozom bolesti, a molekularni mehanizmi koji omogućavaju kancerskim ćelijama jajnika da se odvoje od primarnog tumora, izvrše invaziju na peritonealnu površinu i dovedu do pojave sekundarnih tumora, nisu u potpunosti razjašnjeni. Zbog nepotpunih saznanja bilo je interesantno opredeliti se za ovo maligno oboljenje kao predmet proučavanja. Bolje razumevanje molekularnih događaja koji doprinose tumorskoj invaziji i metastatskom širenju bolesti od ključne je važnosti za razvoj novih terapijskih strategija u lečenju karcinoma jajnika.

### 5.2. Mehanizmi metastatskog širenja karcinoma jajnika

Usled nedostatka anatomske barijere, karcinom jajnika karakteriše se velikim potencijalom za širenje unutar peritonealne šupljine (Lengyel, 2010). Peritoneum predstavlja dvoslojnu seroznu membranu koja oblaže abdominalnu i pelvičnu šupljinu, obavija organe trbušne duplje i povezuje anatomske odeljke (Tsuruchi i sar., 1993). Peritonealno širenje karcinoma jajnika podrazumeva odvajanje tumorskih ćelija od primarnog tumora, formiranje multićelijskih agregata (sferoida), preživljavanje u ascitnoj tečnosti i interakcije sa ćelijama mikrosredine (Weidle i sar., 2016). Odvajanje kancerskih ćelija od primarnog tumora olakšavaju i mehaničke sile, kao što je protok peritonealne tečnosti i trenje okolnih peritonealnih organa tokom respiratornih pokreta (Lengyel, 2010). Kod zdravih osoba, najveći deo peritonealne tečnosti vraća se u cirkulaciju putem limfne drenaže. S obzirom da je u početnim fazama bolesti prisutna samo mala količina peritonealne tečnosti, širenje bolesti uglavnom je ograničeno na organe koji se nalaze u blizini primarnog tumora (Yeung i sar., 2015). Kod bolesnica sa kancerom jajnika, povećana propustljivost vaskulature uzrokovana produkcijom VEGF, kao i opstrukcija limfnih sudova kancerskim ćelijama, dovodi do formiranja ascita (Ahmed i Stenvers, 2013). Usled prisustva kancerskih ćelija, ovi asciti označavaju se kao maligni. Sa napredovanjem bolesti, produkuje se sve više ascitne tečnosti što omogućava širenje kancerskih ćelija jajnika na udaljenija mesta unutar abdomena.

Ključan korak za uspešnu metastatsku kolonizaciju jeste interakcija tumorskih ćelija jajnika sa mezotelnim ćelijama peritoneuma (Kenny i sar., 2007) a ovaj proces posredovan je integrinima. Integrini eksprimirani na metastatskim ćelijama kancera pomažu im da se vežu za proteine VCM koje sekretuju mezotelne ćelije (Iwatsuki i sar., 2010). Jedno od najčešćih mesta metastaziranja karcinoma jajnika jeste omentum. Omentum predstavlja dvostruki nabor visceralnog peritoneuma koji sadrži regione sa masnim tkivom i pokriva abdominalne organe (Meza-Perez i Randall, 2017). Najznačajnije i najzastupljenije ćelijske komponente omentalnog tkiva predstavljaju adipociti (Meza-Perez i Randall, 2017). Pokazano je da adipociti sekretuju adipokine, pre svega interleukin 6 (IL-6) i IL-8, koji privlače kancerske ćelije jajnika na omentum i podržavaju njihov metastatski rast (Nieman i sar., 2011). Sa druge strane, kancerske ćelije dovode do metaboličkog reprogramiranja adipocita i do indukcije lipolize u ovim ćelijama. Adipociti, zauzvrat, indukuju ekspresiju vezujućeg proteina masnih kiselina 4 (engl. *fatty acid binding protein 4*, FABP4) u kancerskim ćelijama. Kao rezultat, kancerske ćelije preuzimaju slobodne masne kiseline koje oslobađaju adipociti i koriste ih kao izvor energije i gradivne blokove kako bi promovisali tumorski rast (Nieman i sar., 2011). Ovo objašnjava zašto je u uznapredovalim stadijumima kancera jajnika najčešće čitav omentum pokriven tumorskim nodusima (Lengyel, 2010). Takođe je pokazano da adipociti omentuma, pored IL-6 i IL-8, luče i leptin, hormon uključen u regulaciju telesne masnoće, i da ovi adipokini zajednički mogu dovesti do aktivacije EMT procesa (Kipps i sar., 2013; Kato i sar., 2015; Yin i sar., 2015).

Iako se smatra da je peritonealna diseminacija najzastupljeniji način širenja kancera jajnika, opisani su i drugi mehanizmi. Pradeep i saradnici (2014) otkrili su nov mehanizam hematogenog metastaziranja kancerskih ćelija jajnika na omentum korišćenjem mišijeg modela koji podrazumeva hirurško spajanje dva miša u cilju razmene cirkulacije.

### 5.3. Uloga EMT procesa u patogenezi i metastatskom širenju karcinoma jajnika

Smatra se da je EMT jedan od ključnih faktora koji doprinosi progresiji različitih karcinoma, uključujući i karcinom jajnika (Sawada i sar., 2008; Klymenko i sar., 2017; Hojo i sar., 2018). Ćelijske linije karcinoma jajnika mezenhinskog tipa (pozitivne na N-kadherin) mogle su da formiraju veliki broj metastatskih lezija u miševima *in vivo* (Mitra i sar., 2015). Imunohistohemijske analize primarnih i metastatskih karcinoma jajnika utvrdile su da je EMT povezana sa razvojem peritonealnih metastaza kao i preživljavanjem bolesnica sa karcinomom jajnika (Takai i sar., 2014; Davidson i sar., 2015). Pokazano je da faktori koji mogu da pokrenu EMT u karcinomskim ćelijama jajnika istovremeno promovišu progresiju ovog karcinoma, dok faktori koji suprimiraju EMT imaju suprotan efekat (Ponnusamy i sar., 2010; Chen i sar., 2013). Podaci koji se tiču razlike između primarnih karcinoma i solidnih metastaza nisu dosledni, sa izuzetkom ekspresije E-kadherina za koju je pokazano da je najniža u primarnim karcinomima (Davidson i sar., 2000), kao i da se najčešće povezuje sa boljim preživljavanjem bolesnica (Faleiro-Rodrigues i sar., 2004). Još jedan od primera koji govori o značaju EMT procesa u progresiji karcinoma jajnika jeste činjenica da hemiolezistentne ćelije karcinoma jajnika često pokazuju mezenhimske osobine (Ahmed i sar., 2010). Pored toga, pokazano je da čak 70% svih gena koji su prekomerno eksprimirani, a povezani su sa lošom prognozom karcinoma jajnika, ima neku ulogu u EMT programu (Yoshida i sar., 2009). EMT u karcinomu jajnika može biti inicirana različitim stimulusima, uključujući TGF- $\beta$ , koji je prisutan u folikularnoj tečnosti koja se oslobađa prilikom ovulacije (Newsted i sar., 2019). Pokazano je da indukcija EMT dovodi do represije PAX2 (engl. *paired box protein 2*) transkripcionog faktora koji je odgovoran za očuvanje diferenciranog stanja epitelnih ćelija jajovoda. Ovo dovodi do nastanka premalignih lezija kao što je STIC (Alwosaibai i sar., 2017).

Takođe, nedavno je pokazano da maligni asciti mogu da indukuju EMT u dve ćelijske linije karcinoma jajnika (Pakuła i sar., 2019).

Kompleksna peritonealna mikrosredina pruža raznovrsnu biohemijsku i biomehaničku podlogu, koja zajedno sa karakterističnom fenotipskom plastičnošću ćelija karcinoma jajnika, promovise EMT i MET u različitim fazama metastatske progresije (Klymenko i sar., 2017). Jedan od najbolje okarakterisanih faktora uključenih u karcinogenezu i metastatsko širenje karcinoma jajnika jeste lizofosfatidna kiselina (engl. *lysophosphatidic acid*, LPA), bioaktivni molekul koji je u značajnoj meri zastupljen u ascitu kod bolesnica sa karcinomom jajnika (Westermann i sar., 1998). Pokazano je da LPA produkuje mezotelne ćelije peritoneuma i da povećavaju adhezivne, migratorne i invazivne karakteristike ćelija karcinoma jajnika (Ren i sar., 2006). U kontekstu EMT programa, LPA dovodi do isecanja vanćelijskog domena E-kadherina što narušava međućelijske veze i promovise mezenhimski fenotip (Gil i sar., 2008). Takođe, LPA dovodi do inicijacije EMT procesa u karcinomu jajnika aktivacijom WNT/ $\beta$ -katenin signalnog puta (Burkhalter i sar., 2015).

Nakon što se tumorske ćelije jajnika odvoje od primarnog tumora i dospeju u peritonealnu tečnost, moraju da izbegnu anoikis. Pokazano je da EMT indukovana različitim faktorima, kao što je prisustvo TGF- $\beta$  u ascitu, može dovesti do rezistencije kancerskih ćelija jajnika na anoikis i njihovog preživljavanja u ascitu (Rafehi i sar., 2016). Takođe, kada kancerske ćelije stignu do mesta gde će formirati metastatske kolonije, EMT indukuje povišenu ekspresiju integrina  $\alpha 5$ , dela receptora za fibronektin, koji posreduje u vezivanju ovih ćelija za mezotelni sloj peritoneuma (Burlison i sar., 2005). Nakon invazije submezotelnog matriksa, kancerske ćelije prolaze kroz MET kako bi dovele do formiranja makroskopski vidljivih metastaza (Koensgen i sar., 2010).

Ćelijama koje napuste primarni tumor i stignu do udaljenih organa neophodno je vreme kako bi dovele do nastanka metastaza koje su klinički detektabilne (Hanahan i Weinberg, 2011). Zbog toga, mnogi bolesnici mogu imati nedetektabilne metastaze u trenutku operacije primarnog tumora. Određivanjem nivoa ekspresije EMT markera u primarnom tumoru karcinoma jajnika potencijalno možemo dobiti informacije o postojanju ćelija koje su sposobne da metastaziraju, čak i u slučajevima kada se metastaze još uvek ne mogu detektovati (Busch i sar., 2014). Ova pretpostavka delom se zasniva na studiji koju su sproveli Ramaswamy i saradnici (2003). Naime, autori su utvrdili postojanje ekspresionog zapisa (engl. *signature*) od 128 gena na osnovu kog je moguće razlikovati primarne od metastatskih karcinoma, a ovaj zapis identifikovan je i u nekim primarnim tumorima što ukazuje da može biti prisutan i u trenutku dijagnoze. Takođe, bolesnici čiji su primarni tumori sadržali genski ekspresioni profil povezan za nastankom metastaza imali su kraće preživljavanje u odnosu na one bolesnike u čijim tumorima ovaj ekspresioni profil nije identifikovan (Ramaswamy i sar., 2003). Ovi rezultati su od velikog značaja jer ukazuju da su neki primarni tumori predodređeni da metastaziraju i da se ova sklonost može detektovati u trenutku inicijalne dijagnoze.

Nezavisno od toga da li se radi o hematogenom ili pasivnom mehanizmu širenja karcinoma jajnika, oba se zasnivaju na sticanju pokretljivosti kancerskih ćelija, koja podrazumeva cikluse polimerizacije aktina, ćelijsku adheziju i aktinomiozinsku kontrakciju (Olson i Sahai, 2009). Upravo zbog toga, u ovom radu proučavana je ekspresija *JAM-A* gena, koji kodira protein čvrstih međućelijskih veza, *ITGAV* gena, koji kodira protein koji učestvuje u međućelijskim interakcijama kao i interakcijama ćelije i VCM i *CALDI* gena koji kodira protein koji ima važnu ulogu u regulaciji aktomiozinske kontrakcije. Brojne studije u različitim tumorskim tipovima pokazale su statistički značajne korelacije između promena u ekspresiji različitih EMT markera, uključujući i gene koje ispituujemo, i prognoze bolesti (De Souza Viana i sar., 2012; Hou i sar., 2013; Zhang i sar., 2013; Busch i sar., 2014; Steinestel i sar., 2014).

U ovoj doktorskoj disertaciji ekspresija ispitivanih gena proučavana je na parafinskim uzorcima tumora jajnika. Arhivirani uzorci tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafin predstavljaju izuzetno dragocen materijal prilikom sprovođenja retrospektivnih studija (Ahlfen i sar., 2007). Međutim, izolacija nukleinskih kiselina iz ovih uzoraka predstavlja izazov, s obzirom da

sam proces fiksacije i kalupljenja, kao i dugotrajno čuvanje ovih uzoraka, imaju negativan uticaj na kvalitet i integritet nukleinskih kiselina, posebno RNK. Tom prilikom, dolazi do fragmentacije nukleinskih kiselina, hemijske modifikacije baza, kao i unakrsnog povezivanja nukleinskih kiselina sa proteinima i drugim biomolekulima (Kashofer i sar., 2013). Upravo usled nedovoljnog kvaliteta izolovane RNK, na pojedinim uzorcima često nije moguće sprovesti određene molekularno-biološke tehnike, uključujući i kvantitativni PCR, koji je korišćen u ovom radu. To objašnjava zašto je analiza ekspresionih profila za svaki od ispitivanih gena uspjela samo za određen procenat uzoraka (oko 80%).

S obzirom na mali broj uzoraka obuhvaćenih ovom studijom, a sa ciljem što boljeg upoznavanja uloge ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena u karcinomu jajnika, pored originalnih rezultata ovog rada dobijenih analizom genske ekspresije parafinskih uzoraka tumora jajnika, u ovom radu prezentovani su i rezultati bioinformatičkih analiza koji su korišćeni prilikom obrade ekspresionih profila dostupnih u okviru javnih baza podataka. Bioinformatika predstavlja naučnu disciplinu koja koristi kompjuterske tehnike u cilju organizacije i analize podataka vezanih za biološke procese (Luscombe i sar., 2001). Bioinformatika omogućava analizu velike količine genomskih, transkriptomskih i proteomskih podataka nastalih usled razvoja novijih tehnologija kao što su sekvenciranje nove generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) i tehnike tkivnog mikroniza (engl. *tissue microarrays*, TMA). Ovakav pristup ima za cilj da na sistemskom nivou pruži uvid u kompleksne biološke procese koji leže u osnovi različitih oboljenja, uključujući i kancer. Brojne studije bazirane na ekspresionim profilima hiljade diferencijalno ekspimiranih gena u karcinomu jajnika koristile su različite bioinformatičke metode kako bi doprinele boljem razumevanju mehanizama koji leže u osnovi ovog oboljenja kao i pronalaženju novih biomarkera i terapijskih ciljeva (Bowen i sar., 2009; Li i sar., 2017; Zhou i sar., 2018; Yang i sar., 2020a). S obzirom da u ovom radu nije bilo moguće analizirati uzorke normalnog tkiva jajnika, korišćena je GEPIA baza podataka koja je omogućila poređenje ekspresionih nivoa ispitivanih gena u normalnom i tumorskom tkiva jajnika. Kako bi rezultate validirali na proteinskom nivou korišćena je HPA, baza koja u najvećoj meri obuhvata podatke o ekspresiji i prostornoj distribuciji proteina u humanim tkivima i ćelijama. Ova baza pruža neprocenljiv izvor prilikom analize ekspresionih profila sa ciljem da se u potpunosti razume biologija, molekularni repertoar i arhitektura svake humane ćelije. Podaci o međusobnim interakcijama *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* proteina dobijene su korišćenjem STRING baze podataka koja ima za cilj da integriše sve dostupne informacije o fizičkim i funkcionalnim interakcijama proteina. Na kraju, kako bi ispitali potencijalne funkcionalne uloge *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* genske ekspresije u karcinomu jajnika korišćena je analiza obogaćivanja skupa gena, poredeći uzorke sa niskom i visokom ekspresijom ispitivanih gena. Ova metoda razvijena je kako bi olakšala analizu i interpretaciju dugačkih lista gena nastalih kao rezultat eksperimenata transkriptoma sa izrazito velikim brojem uzoraka (engl. *high-throughput*). Ovakav tip analize, zasnovan na upotrebi genskih setova a ne pojedinačnih gena, pomaže nam da interpretiramo dobijene rezultate u kontekstu bioloških procesa, signalnih puteva i mreža. Rezultati dobijeni ovom metodom omogućili su identifikaciju statistički značajno izmenjenih funkcionalnih setova gena kao i bolji uvid u patofiziološku osnovu karcinoma jajnika.

#### **5.4. Uloga ekspresije *JAM-A* gena u progresiji kancera**

Poslednjih godina, sve više podataka govori o značajnoj ulozi *JAM-A* ekspresije u prognozi različitih tipova tumora (Fong i sar., 2012b; Koshiba i sar., 2009; McSherry i sar., 2009; Zhang i sar., 2013). U ovom radu ispitivan je klinički značaj ekspresije *JAM-A* gena u karcinomu jajnika a rezultati su validirani korišćenjem javno dostupnih baza podataka. Metodom kvantitativnog PCR-a utvrđeno je da je nivo ekspresije *JAM-A* gena u grupi malignih uzoraka bio viši u odnosu na benigne uzorke tumora jajnika, ali bez statistički značajne razlike. Takođe, zabeležen je statistički



trend povišene ekspresije *JAM-A* gena u karcinomima visokog gradusa kao i u uzorcima karcinoma jajnika kod kojih je zabeleženo prisustvo ascita, što ukazuje da bi ekspresija *JAM-A* gena mogla biti uključena u progresiju ovog maligniteta. Od tri gena koja su ispitivana u ovom radu, ROC analizom pokazano je da samo ekspresija *JAM-A* gena ima dijagnostički i prognostički potencijal, tj. da na osnovu njegove vrednosti možemo da razlikujemo benigne od malignih uzoraka tumora jajnika, kao i dobar od lošeg ishoda bolesnica sa karcinomom jajnika. S obzirom na diskriminatorsni potencijal *JAM-A* ekspresije, analizirana je i proteinska ekspresija *JAM-A* u parafinskim uzorcima tumora jajnika. Metodom imunohistohemije, na određenom procentu uzoraka (41,3%), pokazano je da se *JAM-A* ekspresira kako u membrani tako i u citoplazmi ćelija karcinoma jajnika. Kaplan-Majerova analiza pokazala je da bolesnice sa povišenom ekspresijom *JAM-A* gena imaju kraću medijanu ukupnog preživljavanja, što dodatno govori u prilog negativnoj prognostičkoj ulozi *JAM-A* ekspresije u karcinomu jajnika. Podaci javnih baza podataka vezanih za ulogu *JAM-A* ekspresije u karcinomu jajnika u skladu su sa dobijenim rezultatima u ovom radu. Na osnovu GEPIA baze podataka, uočena je statistički značajno povišena ekspresija *JAM-A* gena u tumorskom u odnosu na normalno tkivo jajnika. Rezultati su validirani na proteinskom nivou uz pomoć HPA gde je pokazano da se proteinska ekspresija *JAM-A* ne detektuje u normalnim ćelijama jajnika, dok je preko 70% uzoraka karcinoma jajnika pokazivalo visok do srednji intenzitet bojenja. Ovi rezultati pokazuju da je ekspresija *JAM-A* povišena u tumorskom tkivu jajnika, kako na genskom tako i na proteinskom nivou, što ukazuje da bi *JAM-A* mogao biti potencijalni terapijski cilj u lečenju ovog karcinoma. Analiza obogaćivanja skupa gena pokazala je da visoka ekspresija *JAM-A* kod bolesnica sa karcinomom jajnika pokazuje statistički značajne pozitivne korelacije sa popravkom oštećenja na DNK, glikolizom, deobnim vretenom, proteinskom sekrecijom kao i PI3K/AKT/mTOR signalizacijom. Na osnovu toga, moguće je pretpostaviti da jedan od mehanizama putem kojeg povišena *JAM-A* genska ekspresija dovodi do aktivacije EMT procesa u karcinomu jajnika, a ujedno i lošije prognoze bolesti, jeste putem PI3K/AKT/mTOR signalnog puta. Tian i saradnici (2015) po prvi put su pokazali da prekomerna ekspresija *JAM-A* dovodi do indukcije EMT u ćelijama kancera nazofarinksa upravo aktivacijom PI3K/AKT signalnog puta. U prilog tome govore i podaci dobijeni imunohistohemijskim bojenjem, na osnovu kojih možemo pretpostaviti da tokom progresije karcinoma jajnika ne dolazi do gubitka ekspresije *JAM-A* proteina u okviru čvrstih veza, s obzirom da je njegova imunopozitivnost lokalizovana na membrani karcinomskih ćelija. Dakle, ovaj protein učestvuje u izgradnji čvrstih veza u karcinomskim ćelijama jajnika, ali moguće je da njegova prekomerna ekspresija dovodi do pokretanja PI3K/AKT/mTOR signalnog puta koji reguliše ćelijski rast, diferencijaciju i proliferaciju i rezultuje lošijim ishodom bolesnica sa karcinomom jajnika. Mehanizmi koji uzrokuju izmenjenu ekspresiju *JAM-A* u karcinomima još uvek nisu razjašnjeni, ali možemo pretpostaviti da specifični signalni putevi koji su izmenjeni u karcinomu jajnika mogu dovesti i do prekomerne ekspresije *JAM-A*. Poznato je da *JAM-A* ekspresija može biti regulisana određenim proinflamatornim citokinima, kao što je TNF- $\alpha$  (Ozaki i sar., 1999), koji je uključen i u progresiju karcinoma jajnika (Macciò and Madeddu, 2012).

Navedeni rezultati u saglasnosti su sa velikim brojem studija koje su pokazale da je povišena *JAM-A* ekspresija povezana sa agresivnijim ponašanjem različitih maligniteta kao i sa kraćim preživljavanjem onkoloških bolesnika (Zhao i sar., 2017; Murakami i sar., 2011; Tian i sar., 2015; McSherry i sar., 2009).

Uloga ekspresije *JAM-A* gena do sada je najbolje opisana u karcinomu dojke. Prvobitno je pokazano da je ekspresija *JAM-A* značajno snižena u metastatskim tumorima dojke u odnosu na normalni epitel kao i da visoka ekspresija *JAM-A* dovodi do smanjenja migratornih i invazivnih sposobnosti metastatskih ćelijskih linija karcinoma dojke. Prema ovim rezultatima, gubitak ekspresije *JAM-A* mogao bi da predstavlja biomarker agresivnog podtipa karcinoma dojke (Naik i sar., 2008), što je u saglasnosti sa hipotezom da je gubitak proteina čvrstih veza neophodan za diseminaciju tumorskih ćelija tokom početnih faza invazivno-metastatske kaskade. Ipak, studije na većem broju uzoraka pokazale su jaku korelaciju između povišene ekspresije *JAM-A* proteina i loše prognoze karcinoma dojke (Götte i sar., 2010; McSherry i sar., 2009; Murakami i sar., 2011). Takođe je pokazano da je povišena *JAM-A* ekspresija povezana sa visokim gradusom tumora i

povišenom ekspresijom receptora za VEGF kao i receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2) (McSherry i sar., 2009). Brennan i saradnici (2013) spekuliraju da bi JAM-A mogao biti uključen u regulaciju HER2 ekspresije *in vitro* tako što inhibira proteozomalnu degradaciju HER2 proteina. Ovi podaci mogu da objasne način na koji JAM-A ekspresija promovira proliferaciju i inhibira apoptozu tumorskih ćelija, s obzirom da je upravo HER2 signalizacija odgovorna za regulaciju ovih procesa putem PI3K i MAPK signalnih puteva. Ipak, McSherry i saradnici (2011) naglašavaju da prekomerna ekspresija JAM-A može biti posledica tumorigeneze karcinoma dojke, a ne uzrok inicijacije i invazije tumora. Funkcionalne studije pokazale su da inhibicija JAM-A ekspresije dovodi do smanjenja migracije ćelija karcinoma dojke *in vitro*, a pokazano je i da je smanjenje ekspresije JAM-A praćeno i sniženom proteinskom ekspresijom  $\beta$ 1-integrina, što predstavlja jedno od mogućih objašnjenja smanjene pokretljivosti ovih ćelija nakon gubitka JAM-A proteina.  $\beta$ 1-integrin interaguje sa adaptornim proteinima u citosolu, kao što je paksilin, koji se zatim udružuju sa vlaknima F-aktina kako bi promovisali ćelijsku migraciju (Deakin i Turner, 2008).

Mehanizam kojim tumorske ćelije održavaju visoku ekspresiju JAM-A tokom tumorske progresije ostaje da se utvrdi, ali je pokazano da je JAM-A ciljni molekul miR-145 čija ekspresija je snižena u ćelijskim linijama karcinoma dojke (Götte i sar., 2010). Ovi podaci donekle mogu objasniti visoke nivoe JAM-A u ovom tipu tumora. Na kraju, studija iz 2020. godine pokazala je da JAM-A protein može biti potencijalni terapijski cilj u lečenju metastatskog karcinoma dojke (Bednarek i sar., 2020). Korišćenje JAM-A antagonističkog peptida dovelo je do blokade transendotelne migracije ćelija karcinoma dojke, odnosno blokade homofilnih JAM-A interakcija prilikom formiranja čvrstih veza između kancerskih ćelija i endotelnih ćelija krvnih sudova.

Dvojaka uloga JAM-A ekspresije u karcinomu dojke potencijalno se može objasniti na sledeći način. Gubitak ćelijske adhezije, usled snižene ekspresije JAM-A proteina, olakšava disocijaciju kancerskih ćelija i promovira migratorna svojstva, kao što su pokazali Naik i saradnici (2008). Zbog toga povećanje JAM-A ekspresije u ćelijskoj liniji karcinoma dojke koja eksprimira nizak nivo JAM-A proteina može dovesti do smanjenja invazivnih karakteristika kancerskih ćelija. Ipak, rezultati McSherry i saradnika (2011) nude drugačije objašnjenje, a to je da prekomerna ekspresija JAM-A u karcinomu dojke promovira ćelijsku pokretljivost putem nizvodnih efekata na  $\beta$ 1-integrin. Zbog toga smanjenje visokih nivoa JAM-A ekspresije u ćelijskim linijama karcinoma dojke može dovesti do smanjenja ćelijske pokretljivosti. Ovo ukazuje na mogućnost da u pojedinim karcinomima dojke ekspresija JAM-A ima značajniju ulogu u regulaciji patofizioloških događaja koji se odnose na interakcije ćelija i VCM nego što je to slučaj sa međućelijskim interakcijama. Ipak, možemo zaključiti da u većini slučajeva visoka ekspresija JAM-A u karcinomu dojke predstavlja prognostički faktor lošeg ishoda bolesnika.

Osim u karcinomu dojke, povišena ekspresija JAM-A detektovana je i u drugim solidnim tumorima, kao što je slučaj sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (Zhang i sar., 2013), kancerom nazofarinksa (Tian i sar., 2015) i karcinomom glave i vrata (Kakuki i sar., 2016). Studija sprovedena u karcinomu glave i vrata po prvi put merila je nivoe solubilnog JAM-A proteina u serumu ovih bolesnika i zdravih kontrola. Iako je gupa ispitanika bila mala, preliminarni rezultati pokazali su da je prosečna vrednost solubilnog JAM-A bila značajno veća kod bolesnika sa karcinomom glave i vrata nego kod zdravih kontrola. Ovi rezultati ukazuju da bi se JAM-A mogao koristiti kao dijagnostički marker, kao što je i pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji, i to ne samo merenjem nivoa ekspresije JAM-A proteina u tumoru, već i iz krvi pacijenata.

Goetsch i saradnici (2013) pokazali su da JAM-A predstavlja jedinstveni terapijski cilj 6F4 monoklonskog antitela i da njegovim vezivanjem za JAM-A dolazi do smanjenja ćelijske proliferacije *in vitro* i *in vivo* i ispoljavanja značajnih antitumorskih svojstava u različitim ksenografskim modelima humanih tumora. S obzirom da usled visokog nivoa ekspresije JAM-A nije došlo do ispoljavanja antitumorskog efekta ispitivanog antitela u svim ispitivanim tumorskim modelima, jasno je da je neophodna kosignalizacija sa drugim receptorima kako bi se postigla *in vivo* aktivnost ovog antitela. Ovi rezultati nisu iznenađujući s obzirom da je poznato da je JAM-A

član kompleksne signalne mreže uključene u nastanak kancera. Ipak, ova studija je značajna s obzirom da je po prvi put pokazano da JAM-A ima važnu ulogu u kontroli *in vivo* proliferacije humanih tumora i da ne utiče samo na ćelijsku migraciju.

Sa druge strane, nekoliko studija u različitim tipovima karcinoma, uključujući i karcinom jajnika, ukazalo je na povezanost niske ekspresije JAM-A i loše prognoze bolesti. Communal i saradnici (2020) ispitivali su ekspresiju ćelijskih površinskih proteina protočnom citometrijom na ćelijskim linijama HGSOc, a rezultate su validirali u nekoliko različitih kohorti bolesnica. Od svih ispitivanih markera, JAM-A se pokazao kao najbolji prognostički prediktor. Niska ekspresija JAM-A korelirala je sa lošijim kliničko-patološkim parametrima, agresivnijim fenotipom tumora i kraćim preživljavanjem bolesnica sa karcinomom jajnika. Iako se navedeni parametri poklapaju sa onima koji su ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji, a to su stadijum bolesti, prisustvo rezidualnog tumora i ukupno preživljavanje bolesnica, teško je izvesti poređenje ove studije sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Naime, pomenuta studija odnosila se samo na jedan histološki tip karcinoma jajnika, i merena je isključivo proteinska ekspresija JAM-A. Sa druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su nivoi JAM-A genske ekspresije u okviru histološki heterogene grupe karcinoma jajnika, dok je proteinska ekspresija validirana na malom broju uzoraka.

Korelacije između snižene ekspresije JAM-A i loše prognoze bolesti nađene su i u karcinomu pankreasa (Fong i sar., 2012), tiroidee (Orlandella i sar., 2019), endometrijuma (Koshiba i sar., 2009) i karcinomu bubrega (Gutwein i sar., 2009).

Dvojaka uloga ekspresije JAM-A proteina u tumorogenezi može se potencijalno objasniti time da niska ekspresija JAM-A favorizuje inicijaciju tumora putem narušavanja ćelijske adhezije i polarnosti, dok prekomerna ekspresija favorizuje tumorsku progresiju promovisanjem migratornih događaja posredovanih integrinima ili pokretanjem određenih signalnih puteva koji promovišu širenje tumora. Jedan od tih signalnih puteva svakako je i PI3K/AKT/mTOR, kao što je pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji, ali i u studijama koje su se bavile proučavanjem JAM-A ekspresije u nekim drugim karcinomima. Na osnovu studija u različitim tipovima tumora, čini se da JAM-A ekspresija varira u zavisnosti od ćelijskog tipa. Takođe, često kontradiktorni rezultati koji se tiču odnosa JAM-A ekspresije i kliničkog ishoda onkoloških bolesnika mogu biti se objasniti učešćem citoplazmatskog domena JAM-A u različitim signalnim putevima koji ispoljavaju različite efekte na kancersku progresiju (Brennan i sar., 2010). Iako citoplazmatski domen JAM-A nema katalitičku aktivnost, on sadrži PDZ-vezujući motiv koji interaguje sa različitim proteinima (Steinbacher i sar., 2018). Moguće je da se ove interakcije odvijaju na kontekstno-zavisanim načinom tako što ili promovišu ili inhibiraju određene događaje značajne za tumorogenezu. Evidentno je da je uloga JAM-A u humanim tumorima kompleksna i da različite funkcije JAM-A mogu biti posredovane različitim signalnim molekulima koji se aktiviraju u zavisnosti od genetičke pozadine ćelija ili njihove mikrosredine, a praćeni su različitim funkcionalnim odgovorima JAM-A.

## 5.5. Uloga ekspresije *ITGA V* gena u progresiji kancera

Interakcija neoplastičnih ćelija sa VCM predstavlja ključan događaj prilikom invazije i metastatskog širenja kancera, a važne učesnike ovih interakcija čine integrini (Koivisto i sar., 2000). Poremećaji u regulaciji integrin-posredovane ćelijske adhezije za VCM uključeni su u svaki korak tumorogeneze, od početne hiperplazije do lokalne invazije, metastatskog širenja i kolonizacije udaljenih organa. Kako bi metastazirale, ćelije karcinoma jajnika moraju uspešno da se vežu za površinu organa obloženih mezotelom koji se nalaze u peritonealnoj šupljini. Poznato je da ovo vezivanje olakšavaju integrini prisutni na površini metastatskih ćelija jajnika, vezivanjem za proteine VCM koje sekretuju mezotelne ćelije peritoneuma (Mitra, 2016).

Integrini utiču na preživljavanje i migraciju tumorskih ćelija (Hehlgers i sar., 2007) a samim tim i na rast i širenje tumora (Felding-Habermann, 2003). Iako integrini ne mogu direktno dovesti do maligne transformacije ćelije, pa prema tome nemaju onkogenu funkciju, pojedini integrini interaguju sa onkogenima ili tirozin kinaznim receptorima i tako utiču na tumorsku progresiju i povećanje metastatskog potencijala tumora (Guo i sar., 2006, Huveneers i sar., 2007).

Promene u ekspresiji ITGAV, u vidu snižene ili povišene ekspresije, detektovane su u većini malignih tumora, a značajno variraju u pogledu ćelijskog porekla neoplazmi (Sanders i sar., 1998). Alfa V integrini promoviraju ćelijsku adheziju i pokretljivost i najčešće su lokalizovani na mestima gde tumor prodire u okolno zdravo tkivo (engl. *invasive tumor front*) (Vacca, 2001). Smatra se da je modulacija FAK aktivnosti značajan mehanizam putem kojeg ITGAV doprinosi metastatskom potencijalu tumorskih ćelija (Vacca, 2001). Alfa V subjedinica integrina može da formira receptore sa bilo kojom od 5 beta subjedinica, koji, u zavisnosti od kombinacije, prepoznaju i vezuju različite ligande (Hynes, 2002). Zbog toga se smatra da ekspresija alfa V integrina omogućava tumorskim ćelijama da migriraju uz pomoć velikog repertoara liganada što može predstavljati prednost prilikom invazije. Pored toga, vezivanje ITGAV za tako raznolik repertoar molekula VCM, može dovesti do transdukcije brojnih signala koji modulišu različite ćelijske funkcije (Liu i sar., 2018).

U ovom radu, proučavana je ekspresija *ITGAV* gena s obzirom da u literaturi postoji vrlo malo podataka vezanih za ulogu ovog integrina u karcinomu jajnika. Statistički značajno niža ekspresija *ITGAV* gena detektovana je u malignim u odnosu na benigne uzorke tumora jajnika. Takođe, na osnovu GEPIA baze podataka, uočena je snižena ekspresija *ITGAV* gena u tumorskom tkivu u odnosu na normalno tkivo jajnika, ali bez statistički značajne razlike. Statistički trend snižene ekspresije *ITGAV* gena detektovan je u karcinomima jajnika visokog histološkog gradusa, u uzorcima kod kojih je zabeleženo prisustvo ascita kao i u uzorcima sa rezidualnim tumorom. Iako nisu nađene statistički značajne razlike između nivoa ekspresije *ITGAV* gena i ukupnog preživljavanja bolesnica sa karcinomom jajnika, medijana ukupnog preživljavanja bila je kraća u grupi bolesnica sa nižom ekspresijom *ITGAV* gena. Prema podacima HPA, normalne ćelije jajnika pokazivale su srednji do visok intenzitet bojenja, dok je ekspresija *ITGAV* proteina bila snižena ili se nije mogla detektovati u analiziranim isečcima karcinoma jajnika. Ovi rezultati ukazuju da snižena ekspresija *ITGAV* gena može biti povezana sa agresivnijim fenotipom karcinoma jajnika i lošijom prognozom bolesti.

Ipak, većina studija koje su proučavale ulogu ekspresije *ITGAV* gena u različitim malignitetima pokazala je da je prekomerna ekspresija ovog gena povezana sa lošijim kliničkopatološkim karakteristikama tumora i kraćim preživljavanjem bolesnika. Takođe, rezultati dobijeni analizom obogaćivanja skupa gena u ovom radu, pokazali su da su, između ostalih, genski setovi povezani sa TNF- $\alpha$  signalizacijom putem NF- $\kappa$ B i IL6-JAK-STAT3 signalnim putem, obogaćeni u uzorcima sa visokom *ITGAV* ekspresijom. Na osnovu ovih rezultata, moguće je pretpostaviti da je visoka ekspresija *ITGAV* gena uključena u indukciju EMT procesa u karcinomu jajnika posredstvom NF- $\kappa$ B signalizacije ili posredstvom IL6-JAK-STAT3 signalnog puta, kao što je to slučaj u nekim drugim karcinomima (Li i sar., 2012; Yadav i sar., 2011).

Prema trenutnim saznanjima, jedina studija koja je proučavala ulogu ekspresije *ITGAV* gena u uzorcima karcinoma jajnika jeste studija koju su izveli Goldberg i saradnici (2001). Oni su pokazali da je pozitivna ekspresija *ITGAV* gena povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem bolesnica sa uznapredovalim karcinomom jajnika. Ipak, ova studija obuhvatila je mali broj bolesnica, sa svega 18 bolesnica u grupi sa kraćim i 16 bolesnica u grupi sa dužim preživljavanjem.

Ekspresija integrina alfa V najbolje je opisana u kolorektalnom karcinomu. Studija koja se bavila analizom ekspresije različitih integrina u kolorektalnom karcinomu, pokazala je da prekomerna ekspresija *ITGAV* na genskom i proteinskom nivou koreliše sa tumorima sa neuralnom infiltracijom kao i sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima (Denadai i sar., 2013). Neuralna infiltracija, odnosno prisustvo malignih ćelija oko ili duž nerava, povezuje se sa značajno kraćim preživljavanjem pacijenta kao i sa povećanom stopom relapsa (Ceyhan i sar., 2010). Ovi rezultati u saglasnosti su sa nekoliko studija koje su takođe analizirale prognostičku ulogu *ITGAV* u

kolorektalnom karcinomu metodom imunohistohemije, a koje su utvrdile da povišena ekspresija ITGAV predstavlja negativni prognostički faktor (Ha i sar., 2014, Linhares i sar., 2015).

Slični rezultati dobijeni su u karcinomu jednjaka (Liu i sar., 2018), želuca (Wang i sar., 2019) i dojke (Cheuk i sar., 2020). Funkcionalne studije korišćenjem malih interferirajućih RNK (engl. *short interfering RNA*, siRNA) pokazale su da inhibicija ITGAV dovodi do supresije proliferacije, migracije i invazije ćelija karcinoma želuca. U karcinomu dojke, Cheuk i saradnici (Cheuk i sar., 2020) pokazali su da ITGAV doprinosi nastanku metastaza putem povećanja ekspresije paksilina. Paksilin je adaptorni protein koji interaguje sa integrinima prilikom organizacije VCM i remodelovanja tkiva (Turner, 2000), a pokazano je da je prekomerna ekspresija ovog proteina uočena kod mnogih kancera i da dovodi do aktivacije ERK i Src signalnih puteva (Chen i sar., 2013). Ekspresija ITGAV proučavana je i u malignom melanomu gde je ITGAV identifikovan kao marker tumorske progresije (Hsu i sar., 1998). Interesantna je bila i studija koja je pokazala da tokom progresije melanoma, može doći do gubitka ili do povećanja ekspresije ITGAV u zavisnosti od receptora koji formira tj.  $\beta$  subjedinice sa kojom interaguje (Danen i sar., 1995).

Studija koja je poredila proteinsku ekspresiju integrina između biopsija primarnih i metastatskih tumora, pokazala je da je povišena ekspresija ITGAV povezana sa nastankom moždanih metastaza kod melanoma, karcinoma dojke, pluća i bubrega (Vogetseder i sar., 2013). Pretpostavlja se da ITGAV učestvuje u ranim fazama metastatske kaskade, pre svega regulacijom adhezije metastatskih ćelija za moždanu vaskulaturu. Utvrđivanje nivoa ekspresije ITGAV u biopsiji primarnog tumora, zajedno sa procenom migratorne sposobnosti kancerskih ćelija *in vitro*, moglo bi se koristiti u cilju predviđanja metastatskog ishoda bolesti *in vivo*.

Promene u ekspresiji integrina nisu uočene samo na tumorskim ćelijama, već i u ćelijama tumorske strome, kao što su endotelne ćelije, perivaskularne ćelije, fibroblasti i inflamatorne ćelije (Friedlander i sar., 1995; Horioka i sar., 2016), a pokazano je da stromalna ekspresija integrina takođe utiče na maligno ponašanje tumora. Tako su Horioka i saradnici (2016) otkrili da je visoka ekspresija ITGAV u stromalnim ćelijama kancera pankreasa, a ne u tumorskim ćelijama, povezana sa većim malignim potencijalnom tumora i kraćim preživljavanjem bolesnika. Ovi rezultati ukazuju da stromalne ćelije mogu stimulisati rast tumora putem ekspresije ITGAV.

Zahvaljujući svojoj lokalizaciji na površini ćelije i činjenici da se nivo njihove ekspresije menja tokom tumorske progresije, integrini predstavljaju potencijalne ciljeve u lečenju malignih tumora. Do sada je razvijeno nekoliko sintetičkih peptida i humanizovanih antitela koji blokiraju interakcije integrina i njihovih liganada. Dva anti-ITGAV antitela, abituzumab i intetumumab, inhibirala su vezivanje liganda i rast tumora u ksenografskim modelima (Raab-Westphal i sar., 2017). Uprkos dobrim rezultatima *in vitro* i prekliničkih studija (van der Horst i sar., 2014), kliničke studije u kasnoj fazi nisu bile uspešne. S obzirom na kompleksnost funkcije integrina, moguće je da bi ciljano delovanje na signalne molekule koji se nalaze nizvodno od integrinskih receptora, kao što su FAK ili Src kinaza, predstavljalo bolji terapijski pristup (Hamidi i sar., 2016).

Jedan od mehanizama koji objašnjava ulogu ITGAV u stimulaciji tumorske progresije jeste njegova sposobnost aktivacije TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  stimuliše progresiju tumora na različite načine, uključujući i aktivaciju EMT procesa (Massagué, 2008). TGF- $\beta$  se sekretuje u latentnoj, neaktivnoj formi u kompleksu sa latentnim vezujućim peptidima (engl. *latency-associated peptide*, LAP). Integrini, posebno oni koji sadrže alfa V subjedinicu, potentni su aktivatori latentnog, neaktivnog TGF- $\beta$  koji se nalazi u VCM (Munger i sar., 1999). ITGAV se vezuje za RGD motiv u okviru LAP što uzrokuje njegovu konformacionu promenu a zatim i strukturnu deformaciju latentnog kompleksa i dovodi do oslobađanja aktivnog TGF- $\beta$  (Munger i sar., 1999). Nakon vezivanja za receptore, TGF- $\beta$  suprimira ekspresiju E-kadherina, a indukuje ekspresiju mezenhimskih markera. Sa druge strane, pokazano je da TGF- $\beta$  može indukovati ekspresiju ITGAV i na taj način dovesti do stimulacije migratornih i invazivnih karakteristika kancerskih ćelija (Scaffidi i sar., 2004).

Iako su navedeni rezultati koji se tiču prognostičke uloge ekspresije ITGAV u različitim karcinomima u suprotnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu, važno je napomenuti da je većina pomenutih studija bila bazirana na ćelijskim linijama, a ne na humanim uzorcima tumora. Takođe, ispitivani su nivoi proteinske ekspresije ITGAV, dok je u ovom radu analizirana isključivo genska

ekspresija. Na osnovu rezultata dobijenih u drugim malignitetima, logično je pretpostaviti da povećana ekspresija ITGAV na površini tumorskih ćelija doprinosi i povećanoj adheziji ovih ćelija za komponente VCM tokom metastatskog širenja i da se stoga povezuje sa lošijom prognozom bolesti. Ipak, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da smanjena ekspresija *ITGAV* u tumoru može biti marker agresivnije populacije kancerskih ćelija jajnika. Jedno od potencijalnih objašnjenja snižene ekspresije *ITGAV* u karcinomu jajnika u vezi je sa procesima destrukcije i reparacije epitela jajnika tokom brojnih ciklusa ovulacije. Ovaj proces uključuje adheziju, širenje i proliferaciju ćelija, a upravo integrini mogu biti posrednici ovih procesa. Prema tome, kako tokom progresije tumora dolazi do gubitka karakteristika normalnih ćelja, možemo pretpostaviti da u slučaju tumora jajnika dolazi i do gubitka ekspresije pojedinih integrina, uključujući *ITGAV*. Ovo zapažanje u skladu je sa rezultatima dobijenim iz GEPIA i HPA baza podataka, gde je pokazana smanjena ekspresija *ITGAV* u tumorskom u odnosu na normalno tkivo jajnika, kao i sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji gde je pokazana smanjena ekspresija *ITGAV* u tumorima koji su lošije diferencirani, tj. koji nisu očuvali karakteristike normalnih ćelija jajnika. Pored toga, na osnovu HPA podataka, zaključujemo da se osim u membrani, *ITGAV* eksprimira i u citoplazmi i u nukleusu normalnih ćelija jajnika. Imunopozitivnost lokalizovana u membrani ukazuje na postojanje funkcionalnog heterodimera na mestima gde posreduje u ćelijskoj adheziji i signalnoj transdukciji. Sa druge strane, funkcionalna uloga citoplazmatske i nuklearne *ITGAV* ekspresije je manje jasna, a moguće je spekulirati da bi gubitak ove ekspresije mogao biti značajan za proces tumorogeneze karcinoma jajnika. Takođe je moguće da je gubitak *ITGAV* ekspresije u uznapredovalim karcinomima jajnika povezan sa degradacijom specifičnih liganada u VCM do koje dolazi dejstvom MMP tokom progresije ovog maligniteta. Pored toga, jedno od mogućih objašnjenja koja se tiču razlike literaturnih podataka i eksperimentalno dobijenih rezultata u ovom radu koji ukazuju da je niska ekspresija *ITGAV* negativni prognostički faktor u karcinomu jajnika, jeste da integrini, u zavisnosti od tipa tkiva i receptora koje formiraju interagujući sa različitim subjedinicama, mogu imati različite uloge u tumorskoj progresiji. Pokazano je da ekspresija integrina značajno varira u zavisnosti od tipa tumora, ali i u različitim delovima unutar istog tumora (Koistinen i Heino, 2013).

## 5.6. Uloga ekspresije *CALD1* gena u progresiji kancera

Ćelijska adhezija i migracija modulirana je kompleksnim promenama u citoskeletu, posebno aktinskom, a regulacija ovih procesa ključna je prilikom progresije i metastatskog širenja tumora (Pantaloni i sar., 2001; Chang i sar., 2013). Brojni podaci ukazuju da citoskeletni proteini, uključujući *CALD1*, mogu imati važnu ulogu u tumorskoj progresiji (Yoshio i sar., 2007; Hou i sar., 2013; Chang i sar., 2013). S obzirom da učestvuje u asembliranju i stabilizaciji mreže aktinskih filamenata, *CALD1* deluje kao značajan regulator različitih ćelijskih funkcija, uključujući ćelijsku pokretljivost. U prilog važnoj ulozi *CALD1* proteina u ćelijskoj pokretljivosti govori veliki broj vezujućih partnera, kao i to da ovaj protein predstavlja supstrat mnogih protein kinaza (Wang, 2008; Sobue i Sellers, 1991).

Snižena ekspresija *CALD1* kako na RNK, tako i na proteinskom nivou, detektovana je u mnogim ćelijskim linijama različitih kancera (Novy i sar., 1993; Ross i sar., 2000; Tanaka i sar., 1993). Iako značaj snižene *CALD1* ekspresije nije u potpunosti jasan, smatra se da je odgovoran za gubitak stresnih vlakana i fokalnih adhezija kao i da omogućava pokretljivost kancerskih ćelija. Otkriće da je *CALD1* važna komponenta podozoma, mesta aktivnog remodelovanja VCM, kao i da je sposoban da moduliše asembliranje i dinamiku podozoma, govori u prilog ovom konceptu (Eves i sar., 2006; Gu i sar., 2007).

Nekoliko studija analiziralo je ekspresiju *CALDI* u različitim solidnim tumorima, ali su rezultati bili oprečni. Tako je *CALDI* ekspresija povezana sa lošom prognozom karcinoma usne duplje (Chang i sar., 2013) i kolorektuma (Kim i sar., 2012b), dok su studije na ćelijskim linijama karcinoma kolona i dojke pokazali da *CALDI* funkcioniše kao represor ćelijske migracije i/ili invazije. Različiti rezultati studija sprovedenih na ćelijskim linijama i humanim uzorcima tumora mogu biti posledica drugačijih obrazaca genske ekspresije signalnih i metaboličkih puteva u ćelijskim linija u odnosu na tumorsko tkivo. Tipični medijum u kome se gaje ćelije u kulturi odlikuje se izobiljem metabolita, faktora rasta, citokina, i drugih molekula za koje normalno postoji kompeticija u sistemima *in vivo*. Prema tome, razlike u selekcionom pritisku sredine mogu da objasne i razlike u obrascima genske ekspresije u tumorskom tkivu i ćelijskim linijama.

Prema dosadašnjim saznanjima, u ovom radu po prvi put opisana je ekspresija *CALDI* gena u karcinomu jajnika. Metodom kvantitativnog PCR-a detektovan je statistički značajno niži nivo ekspresije *CALDI* gena u malignim uzorcima u odnosu na benigne tumore jajnika. Ekspresija *CALDI* gena nije značajno korelisala sa karakteristikama bolesnica, kliničkim parametrima bolesti i histopatološkim karakteristikama tumora, ali je detektovan statistički trend snižene ekspresije *CALDI* gena u karcinomima jajnika visokog gradusa. U ispitivanoj grupi nije pokazan statistički značajan uticaj ekspresije *CALDI* gena na ukupno preživljavanje bolesnica, ali je medijana preživljavanja bila kraća u grupi bolesnica sa nižom ekspresijom u odnosu na višu ekspresiju *CALDI* gena. Dobijeni rezultati validirani su na osnovu javno dostupnih baza podataka. Na osnovu GEPIA baze, uočena je statistički značajno snižena ekspresija *CALDI* gena u tumorskom tkivu u odnosu na normalno tkivo jajnika. Kada je u pitanju proteinska ekspresija CALD1, rezultati HPA pokazali su da normalne ćelije jajnika pokazuju srednji do visok intenzitet bojenja, dok je ekspresija CALD1 proteina bila niska ili se nije mogla detektovati u analiziranim isečcima karcinoma jajnika. Ovi rezultati ukazuju da je *CALDI* potencijalno uključen u progresiju karcinoma jajnika, tako što tokom progresije bolesti dolazi do smanjenja ekspresije ovog gena, a s obzirom da CALD1 deluje kao supresor ćelijskog kretanja, njegova smanjena ekspresija doprinosi povećanju pokretljivosti i invaziji kancerskih ćelija jajnika.

Dobijeni rezultati u skladu su sa nekoliko studija koje su proučavale funkcionalnu i prognostičku ulogu CALD1 ekspresije u različitim malignitetima (Yoshio i sar., 2007; Hou i sar., 2013). Analizom proteoma četiri ćelijske linije karcinoma želuca Hou i saradnici (2013) pokušali su da identifikuju biomarkere odgovorne za nastanak metastaza u ovom tipu karcinoma. Tom prilikom, ustanovljeno je da je ekspresija l-CALD snižena u metastatskim ćelijskim linijama u odnosu na linije primarnog karcinoma želuca, a ovi rezultati potvrđeni su imunohistohemijskim bojenjem 9 parova uzoraka primarnog tumora i metastatskih limfnih čvorova. Slični rezultati dobijeni su na osnovu studije kojom je utvrđeno da inhibicija ekspresije *CALDI* (engl. *knockdown*) u ćelijskim linijama karcinoma dojke i kolona promoviše ćelijsku migraciju i invaziju (Yoshio i sar., 2007; Hou i sar., 2013). Ovi rezultati ukazuju da je u slučaju odsustva ekspresije l-CALD proteina moguće metastatsko širenje karcinoma.

Rezultati studija koje su proučavale ekspresiju l-CALD u drugim tipovima karcinoma, pokazale su da on može imati suprotan efekat od prethodno opisanog, tj. da povišena ekspresija ovog citoskeletnog proteina doprinosi tumorskoj progresiji. U karcinomu usne duplje, pokazano je da je ekspresija l-CALD značajno viša u metastatskim limfnim čvorovima u odnosu na ćelije primarnog tumora. Pored toga, visok nivo l-CALD ekspresije korelisao je sa lošijim kliničkopatološkim parametrima, a *in vitro* eksperimenti pokazali su da l-CALD promoviše proliferaciju, migraciju i invaziju ćelija karcinoma usne duplje (Chang i sar., 2013). Takođe, Kim i saradnici (2012b) uočili su povezanost između prekomerne ekspresije l-CALD proteina i malignog ponašanja kolorektalnog karcinoma. Interesantno je pomenuti da je ova studija pokazala i da l-



CALD smanjuje osetljivost kancerskih ćelija na hemioradioterapiju. Prema tome, ekspresija l-CALD može da posluži kao prediktor odgovora na neoadjuvantnu terapiju. Prognostički i funkcionalni značaj ekspresije *CALD1* gena proučavan je i u karcinomu bešike. Pokazano je da je proteinska ekspresija l-CALD statistički značajno viša kod invazivnih karcinoma bešike u odnosu na one koji ne zahvataju mišićni sloj, a analiza preživljavanja utvrdila je značajnu povezanost između l-CALD ekspresije i lošije prognoze bolesti (Lee i sar., 2015). Jedan od mogućih razloga koji bi mogao objasniti visok nivo CALD1 ekspresije u pojedinim karcinomima jeste da TGF- $\beta$  signalni put dovodi do prekomerne ekspresije CALD1 (Morita i sar., 2007a). Naime, TGF- $\beta$  dovodi do translokacije MRTF transkripcionih faktora koji formiraju komplekse sa SMAD3, a zatim se vezuju za promotor SLUG gena i aktiviraju njegovu transkripciju što uzrokuje disocijaciju međućelijskih kontakata supresijom E-kadherina (Barrallo-Gimeno i Nieto, 2005). Takođe, MRTF transkripcioni faktori uzrokuju povećanje ekspresije citoskeletnih gena, uključujući *CALD1*, što dovodi do reorganizacije aktinskog citoskeleta i formiranja stresnih vlakana. Prema tome, MRTF su ključni medijatori aktivacije EMT programa posredstvom TGF- $\beta$  (Morita i sar., 2007b). Analiza obogaćivanja skupa gena, koja je sprovedena kao deo bioinformatičkih analiza u ovoj doktorskoj disertaciji, takođe je pokazala da se među genskim setovima koji su diferencijano zastupljeni u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa visokom *CALD1* ekspresijom nalaze upravo oni vezani za EMT i TGF- $\beta$  signalni put.

Još jedan od mehanizama putem kojeg l-CALD promovise ćelijsku pokretljivost jeste fosforilacija ovog proteina različitim protein kinazama, kao što su ciklin-zavisna kinaza 2 (engl. *Cyclin-dependent kinase 2*, CDK2), MAPK/ERK i PAK što dovodi do reorganizacije aktinskih stresnih vlakana i uzrokuje promene u ćelijskoj morfologiji i pokretljivosti. CDK2 ima važnu ulogu prilikom razgradnje aktinskog citoskeleta tokom ćelijske deobe (Yamashiro i sar., 2001; Eppinga i sar., 2006; Kordowska i sar., 2006), pa se smatra da poremećaji u regulaciji l-CALD mogu dovesti do promena proliferativnih karakteristika kancerskih ćelija u odgovoru na radijaciju ili antikancerske lekove. Takođe je pokazano da CDK5 degraduje CALD1 i na taj način stimuliše invaziju kancerskih ćelija (Quintavalle i sar., 2011).

Ipak, bez obzira na nivo ekspresije CALD1, uloga kaldezmona u inhibiciji invazivnih karakteristika kancerskih ćelija zavisi i od dostupnosti Ca<sup>2+</sup>, fosforilacije ali i nivoa ekspresije kalmodulina. Ovi podaci ukazuju na potrebu da se u budućnosti ispituju i nivoi fosforilacije CALD1 proteina kao i nivo ekspresije kalmodulina kako bi se u potpunosti razjasnio mehanizam njegovog dejstva u različitim karcinomima. Oprečni rezultati pomenutih sudija mogu se delimično objasniti i različitim funkcijama CALD1 izoformi u zavisnosti od *CALD1* splajsing varijanti, iako tačan mehanizam još uvek nije poznat.

U ovom radu analizirane su i korelacije između ekspresija ispitivanih gena, pa je tako pokazano da su ekspresije *ITGAV* i *CALD1* gena međusobno pozitivno korelisane, a da negativno korelišu sa ekspresijom *JAM-A* gena. Prema tome, moguće je pretpostaviti da *ITGAV* i *CALD1* geni učestvuju u istom signalnom putu. STRING analiza, sa visokim skorom poverenja, pokazala je da *JAM-A* i *ITGAV* ostvaruju funkcionalne interakcije. Proširena mreža bila je statistički značajno obogaćena interakcijama, što pokazuje da *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* međusobno interaguju značajno više nego što se to očekuje za nasumični set gena slične veličine i mogu se smatrati biološki povezanom grupom proteina.

Pored uticaja *JAM-A*, *ITGAV* i *CALD1* genske ekspresije na ukupno preživljavanje bolesnica sa karcinomom jajnika, ispitan je i uticaj pojedinih kliničkopatoloških parametara koristeći univarijantnu Koksovu regresionu analizu. U ispitivanoj grupi bolesnica pokazano je da statistički



značajan efekat na preživljavanje ostvaruju sledeće kliničke promenljive: FIGO stadijum, peritonealne metastaze i rezidualni tumor. Ovakvi rezultati nisu iznenađujući, s obzirom da se upravo stadijum bolesti i prisustvo/odsustvo rezidualnog tumora ubrajaju među najznačajnije prognostičke faktore u karcinomu jajnika (Ezzati i sar., 2014). Takođe, ovi podaci ukazuju da je istraživanje sprovedeno na reprezentativnom uzorku bolesnica sa karcinomom jajnika.

S obzirom da su rezultati dobijeni na malom broju bolesnica sa karcinomom jajnika neophodne su dodatne studije kako bi se ovi rezultati validirali na proteinskom nivou i većem broju uzoraka, ali i utvrdila funkcionalna uloga *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* genske ekspresije u karcinomu jajnika. Na osnovu dobijenih rezultata ne možemo sa sigurnošću utvrditi da li *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* geni učestvuju u EMT procesu. Kako bi dobili pouzdanije podatke o njihovoj ulozi u EMT, buduća istraživanja trebala bi da obuhvate i ispitavanje korelacija ekspresija ovih gena sa ekspresijom poznatih markera EMT procesa u karcinomu jajnika, kao što su N-kadherin, fibronektin, Snail, Slug i ZEB1. Takođe, s obzirom na veliku heterogenost kojom se odlikuje ovaj malignitet, istraživanja bi trebalo sprovesti isključivo u okviru jednog histološkog tipa sa klinički dobro okarakterisanom grupom bolesnica. Osim toga, pored uzoraka primarnih karcinoma jajnika, analiza bi trebalo da obuhvati i metastatske uzorke i to korišćenjem panela EMT markera. Ovakav pristup može da pruži pouzdanije informacije vezane za pojavu i klinički značaj EMT programa u karcinomu jajnika kao i njegovu ulogu u metastatskom širenju ovog maligniteta.

## 5.7. Klinički značaj EMT markera u humanim tumorima

Glavni dokaz koji govori u prilog ulozi EMT procesa u metastatskom širenju tumora potiče od funkcionalnih studija koje su pokazale da karcinomske ćelije sa mezenhimskim karakteristikama imaju veću sposobnost da napuste primarni tumor i iniciraju nastanak metastaza u odnosu na tumorske ćelije sa epitelnim karakteristikama (Dongre i Weinberg, 2019). Ova zapažanja dodatno su potkrepljena saznanjima da su tumori mezenhinskog porekla često veoma invazivni (gliom) kao i da se karakterišu ranom pojavom metastaza (melanom) (Tan i sar., 2014). Ipak, uprkos brojnim novim saznanjima o ulozi EMT procesa i ćelijske plastičnosti u tumorskoj biologiji, i dalje ostaju otvorena najmanje dva ključna pitanja: 1) Da li su EMT i MET neophodne za metastatski proces *in vivo* i 2) Koliko je relevantna EMT u kliničkoj praksi? (Santamaria i sar., 2017). Uprkos rezultatima dobijenih na osnovu prekliničkih modela koji se odnose na ulogu EMT u metastatskom procesu (Trimboli i sar., 2008; Puram i sar., 2017) jedan od najvećih izazova prilikom proučavanja ovog fenomena jeste pouzdana identifikacija tumorskih ćelija koje su aktivirale EMT *in vivo*. Razlozi za poteškoće prilikom identifikacije ovih ćelija su brojni: heterogenost samih tumora, razlike u metastatskom ponašanju različitih tipova tumora, dinamična i prolazna priroda EMT koja podrazumeva širok spektar intermedijarnih fenotipova zastupljenih na vremenski i prostorno zavisani način. Takođe, novija saznanja ukazuju da karcinomske ćelije koje prolaze kroz parcijalnu EMT mogu da redukuju epitelne karakteristike post-translacionim modifikacijama (Aiello i sar., 2018) što u značajnoj meri otežava interpretaciju onih studija koje su zasnovane na proučavanju EMT promena isključivo na nivou transkriptoma. Zahvaljujući naprecima u tehnologiji sekvenciranja pojedinačne ćelije, u kliničkim uzorcima tumora pokazano je da, iako je prisustvo parcijalne EMT evidentno u određenim ćelijama, većina tumorskih ćelija u velikoj meri zadržava epitelne odlike koje se uočavaju u normalnim ćelijama čijom transformacijom su nastale (Puram i sar., 2017). Kontroverze vezane za ulogu EMT programa u metastatskom procesu potiču i od

brojnih poteškoća u pronalaženju dokaza koji bi pokazali da su epitelne ćelije prisutne u metastazama zaiste prošle kroz EMT (Fischer i sar., 2015; Ye i sar., 2017).

Tumorske ćelije koje u potpunosti steknu mezenhimski fenotip liče na stromalne ćelije tumora koje su mezenhimskog porekla, što otežava njihovu identifikaciju konvencionalnim histopatološkim tehnikama (Tarin i sar., 2005). Ekspresija određenih EMT transkripcionih faktora, kao što je SNAIL, osim u tumorskim ćelijama, detektovana je i u aktiviranim stromalnim fibroblastima što otežava utvrđivanje EMT statusa putem pojedinačnih EMT markera (Alba-Castellón i sar., 2016). Takođe, iako se snižena ekspresija E-kadherina smatra obeležjem EMT procesa, pokazano je da se ona uočava u mnogim karcinomima, posebno onim visokog gradusa i da nije povezana sa određenom mikroanatomskom lokalizacijom ili sa mezenhimskim karakteristikama. Prema tome, gubitak E-kadherina može se posmatrati kao nespecifični efekat dediferencijacije pre nego transdiferencijacije epitelne ćelije u mezenhimsku. Sa druge strane, u pojedinim karcinomima ekspresija vimentina predstavlja potvrdu mezenhimskog fenotipa, ali se ovo ne može primeniti na karcinome nastale malignom transformacijom epitela koji normalno eksprimira vimentin kao što su karcinomi endometrija i većina endometrioidnih adenocarcinoma jajnika (Stewart i Mccluggage, 2013). Kada se radi o karcinomu jajnika, subpopulacija ćelija koja se nalazi u hibridnom E-M stanju identifikovana je *in vivo*, a pokazano je da istovremeno eksprimira epitelne i mezenhimske markere kao i da poseduje kapacitet za samoobnavljanjem (Strauss i sar., 2011). Prema tome, jedan od velikih praktičnih problema koji se tiče uloge EMT procesa u humanim karcinomima jeste utvrđivanje morfoloških, imunohistoloških i molekularnih kriterijuma koji definišu EMT u kliničkoj praksi. Zbog toga su se mnoge studije fokusirale na identifikaciju genskih ili proteinskih EMT zapisa uz pomoću kojih je moguće razlikovati epitelni od mezenhimskog fenotipa tumorskih ćelija.

Kada se radi o karcinomu jajnika, jednu od prvih studija na ovom polju sproveli su Tothill i saradnici (2008). Na osnovu analize genske ekspresije 285 seroznih i endometrioidnih karcinoma jajnika, ova grupa autora utvrdila je postojanje šest molekularnih podtipova (C1-C6), od kojih su četiri zastupljena u visoko gradusnom seroznom karcinomu jajnika. To su: C1 (reaktivna stroma), C2 (povećani imuno-infiltrat), C4 (nizak stromalni odgovor) i C5 (mezenhimski). U nezavisnoj meta-analizi, Tan i saradnici (2013) identifikovali su pet EMT molekularnih podtipova: epitelni tip A, epitelni tip B, mezenhimski tip, stem tip A i stem tip B od kojih se svaki karakteriše različitim ekspresionim zapisom i kliničkom prognozom. Interesantno je da su obe studije utvrdile postojanje mezenhimskog podtipa koji je obogaćen genima koji pripadaju evolutivno konzervisanom EMT putu. Tako je pokazano da mezenhimski podtip koreliše sa TGF- $\beta$  signalnim putem i kraćim preživljavanjem bolesnika (Tothill i sar., 2008), (Thiery i sar., 2009), a pokazuje i intenzivne dezmostatične stromalne reakcije (Tothill i sar., 2008) koje se povezuju sa regulatornom mrežom miRNK koja kontroliše ekspresiju *CDHI*, *VIM* i *SLUG* gena (Yang i sar., 2013).

S obzirom da mnogi važni aspekti EMT procesa nisu dovoljno istraženi, napredak na ovom polju zahteva tehnološke inovacije kako bi se omogućilo proučavanje EMT procesa na nivou pojedinačne ćelije. Ove inovacije uključuju tehnike prikaza pojedinačne žive ćelije (engl. *single cell live imaging*), kao i tehnike identifikacije i praćenja ćelijskih populacija *in vivo* (engl. *lineage tracing methods*). Sekvenciranje pojedinačne ćelije (engl. *single cell sequencing*), uključujući ćelije normalnog tkiva, primarnog tumora, cirkulišuće tumorske ćelije i metastatske ćelije, u kombinaciji sa funkcionalnim studijama, omogućići će nam da obuhvatimo raznolikost i plastičnost EMT procesa kao i da otkrijemo molekularne promene koje se nalaze u osnovi tumorske progresije i različitog odgovora na terapiju (Yang i sar., 2020b).

Bolje poznavanje EMT mehanizama nudi mogućnost za razvoj ciljanih terapija koje će sprečiti razvoj metastaza u humanim tumorima. Tako na primer, inhibicija EMT procesa, kao deo

adjuvantne terapije za karcinome ranog stadijuma, mogla bi da dovede do smanjenja diseminacije kancerskih ćelija, dok bi inhibicija MET u diseminovanim tumorskim ćelijama mogla da inhibira metastatski rast sekundarnih tumora čija je pojava karakteristična za kasne stadijume bolesti. Neke od mogućnosti uključuju i razvoj terapija koje ciljano deluju na jedinstvene aspekte hibridnih E-M fenotipova ili fiksiraju ćelije u mezenhimskom stanju kako bi sprečili progresiju kancera mehanizmima koji su povezani sa plastičnošću tumorskih ćelija (Yang i sar., 2020b). Sa razvojem inhibitora signalnih puteva koji imaju veću specifičnost, novih kombinacija agenasa i strategija koje uključuju i komponente imunskog sistema, moguće je očekivati značajan napredak u pogledu antikancerskih terapija koje ciljano deluju na programe E-M plastičnosti.

---

## 6. ZAKLJUČAK

---

Na osnovu dobijenih rezultata analize *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* genske ekspresije u uzorcima bolesnica sa tumorom jajnika, kao i na osnovu rezultata bioinformatičkih analiza, moguće je izvesti sledeće zaključke:

- Povišen nivo ekspresije *JAM-A* gena detektovan je u malignim u odnosu na benigne uzorke tumora jajnika, bez statistički značajne razlike. Nivo ekspresije *ITGAV* i *CALDI* gena bio je statistički značajno niži u grupi malignih uzoraka u odnosu na nivoe ekspresije koji su detektovani u grupi benignih uzoraka tumora jajnika. Ovi rezultati u skladu su sa rezultatima dobijenih na osnovu analize GEPIA baze podataka, prilikom koje je uočena statistički značajno povišena ekspresija *JAM-A* gena u tumorskom tkivu jajnika. Takođe, uočena je snižena ekspresija *ITGAV* i *CALDI* gena u tumorskom u odnosu na normalno tkivo jajnika, a u slučaju *CALDI* gena ta razlika bila je i statistički značajna.
- Statistički trend povišene ekspresije *JAM-A* gena zabeležen je u karcinomima jajnika visokog gradusa, kao i u uzorcima kod kojih je zabeleženo prisustvo ascita. Takođe, detektovan je statistički trend snižene ekspresije *ITGAV* gena u karcinomima visokog gradusa, u uzorcima kod kojih je zabeleženo prisustvo ascita kao i u uzorcima bolesnica koje su relapsirale. Statistički trend snižene ekspresije *CALDI* gena uočen je u karcinomima jajnika visokog gradusa.
- Analiza ROC krivih pokazala je da od svih ispitivanih gena jedino *JAM-A* ekspresija ima diskriminatorski potencijal prilikom razlikovanja benignih od malignih uzoraka tumora jajnika, odnosno dobrog od lošeg ishoda bolesti kod bolesnica sa karcinomom jajnika. To ukazuje da ekspresija ovog gena može imati ne samo prognostički, već i dijagnostički potencijal.
- Kaplan-Majerova metoda i log-rank test ukupnog preživljavanja u ispitivanoj grupi nisu pokazali statistički značajan uticaj ekspresije *JAM-A*, *ITGAV* i *CALDI* gena na ukupno preživljavanje bolesnica sa karcinomom jajnika. Ipak, bolesnice sa višom ekspresijom *JAM-A* gena i nižom ekspresijom *ITGAV* i *CALDI* gena imale su kraću medijanu preživljavanja. Ovi rezultati ukazuju da bi povišena ekspresija *JAM-A* gena, odnosno snižena ekspresija *ITGAV* i *CALDI* gena, mogli biti markeri loše prognoze karcinoma jajnika.
- Univarijantna Koksova regresiona analiza ukupnog preživljavanja pokazala je da statistički značajan efekat na preživljavanje ostvaruju sledeće kliničke promenljive: FIGO stadijum, peritonealne metastaze i rezidualni tumor
- Metodom imunohistohemije proteinska ekspresija *JAM-A* potvrđena je kako u stromi, tako i u epitelu ćelija karcinoma jajnika, a pozitivno imunohistohemijsko bojenje uočeno je u citoplazmi i membranama ovih ćelija. Analizom HPA podataka pokazano je da je proteinska ekspresija *JAM-A* povišena u uzorcima karcinoma jajnika u odnosu na normalno tkivo jajnika.
- Analiza obogaćivanja skupa gena pokazala je da potencijalni mehanizam putem kojeg povišena ekspresija *JAM-A* gena ostvaruje negativan prognostički uticaj u karcinomu jajnika jeste aktivacijom EMT programa putem PI3K/AKT signalnog puta.

- STRING analiza pokazala je da JAM-A, ITGAV i CALD1 proteini međusobno interaguju značajno više nego što se to očekuje za nasumični set gena slične veličine pa se mogu smatrati biološki povezanom grupom proteina.

Dobijeni rezultati ukazuju da su povišena ekspresija *JAM-A*, kao i snižena ekspresija *ITGAV* i *CALDI*, povezane sa agresivnijim fenotipom karcinoma jajnika i lošijom prognozom bolesti. Određivanje nivoa ekspresije ovih biomarkera u primarnom tumoru moglo bi doprineti adekvatnijem praćenju bolesnica sa karcinomom jajnika.

---

## 7. LITERATURA

---

- Aguilera-Barrantes, I., Euscher, B., Morisson, C., and Nuovo, G. (2007). Female Reproductive System, In *The Cancer Handbook 2e*, M. Alison, ed. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 644–675.
- Ahlfen, S. Von, Missel, A., Bendrat, K., and Schlumpberger, M. (2007). Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One* 2, 1–7.
- Ahmed, N., and Stenvers, K.L. (2013). Getting to know ovarian cancer ascites: Opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front. Oncol.* 3, 256.
- Ahmed, N., Abubaker, K., Findlay, J., and Quinn, M. (2010). Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 10, 268–278.
- Aiello, N.M., Maddipati, R., Norgard, R.J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Yamazoe, T., Black, T., Sahmoud, A., Furth, E.E., et al. (2018). EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration. *Dev. Cell* 45, 681–695.e4.
- Alba-Castellón, L., Olivera-Salguero, R., Mestre-Farrera, A., Peña, R., Herrera, M., Bonilla, F., Casal, J.I., Baulida, J., Peña, C., and García de Herreros, A. (2016). Snail1-dependent activation of cancer-associated fibroblast controls epithelial tumor cell invasion and metastasis. *Cancer Res.* 76, 6205–6217.
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., Bonaventure, A., Valkov, M., Johnson, C.J., Estève, J., et al. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 391, 1023–1075.
- Alwosaibai, K., Abedini, A., Al-Hujaily, E.M., Tang, Y., Garson, K., Collins, O., and Vanderhyden, B.C. (2017). PAX2 maintains the differentiation of mouse oviductal epithelium and inhibits the transition to a stem cell-like state. *Oncotarget* 8, 76881–76897.
- Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002584.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14, 79–89.
- Arihiro, K., Kaneko, M., Fujii, S., Inai, K., and Yokosaki, Y. (2000). Significance of  $\alpha 9\beta 1$  and  $\alpha v\beta 6$  integrin expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* 7, 19–26.
- Attisano, L., and Wrana, J.L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 296, 1646–1647.
- Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B., and Varner, J.A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 604–617.
- Babinska, A., Kedees, M.H., Athar, H., Ahmed, T., Batuman, O., Ehrlich, Y.H., Hussain, M.M., and Kornecki, E. (2002). F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: Role in inflammatory thrombosis. *Thromb. Haemost.* 88, 843–850.
- Bader, B.L., Rayburn, H., Crowley, D., and Hynes, R.O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 95, 507–519.
- Balanis, N., and Carlin, C.R. (2012). Mutual cross-talk between fibronectin integrins and the EGF receptor. *Cell. Logist.* 2, 46–51.
- Balsamo, J., Arregui, C., Leung, T.C., and Lilien, J. (1998). The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin

linkage. *J. Cell Biol.* *143*, 523–532.

Barbuti, A.M., Chen, Z.-S., and Baumert, B. (2015). Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers (Basel)* *7*, 2360–2371.

Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* *132*, 3151–3161.

Bartis, D., Mise, N., Mahida, R.Y., Eickelberg, O., and Thickett, D.R. (2014). Epithelial–mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax* *69*, 760–765.

Bast, R.C., and Spriggs, D.R. (2011). More than a biomarker: CA125 may contribute to ovarian cancer pathogenesis. *Gynecol. Oncol.* *121*, 429–430.

Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and De Herreros, A.G. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* *2*, 84–89.

Bazzoni, G., Martínez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., and Dejana, E. (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J. Biol. Chem.* *275*, 20520–20526.

Bednarek, R., Selmi, A., Wojkowska, D., Karolczak, K., Popielarski, M., Stasiak, M., Salifu, M.O., Babinska, A., and Swiatkowska, M. (2020). Functional inhibition of F11 receptor (F11R/junctional adhesion molecule-A/JAM-A) activity by a F11R-derived peptide in breast cancer and its microenvironment. *Breast Cancer Res. Treat.* *179*, 325–335.

Beggs, A.D., Latchford, A.R., Vasen, H.F.A., Moslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bertario, L., Blanco, I., Bülow, S., Burn, J., et al. (2010). Peutz - Jeghers syndrome: A systematic review and recommendations for management. *Gut* *59*, 975–986.

Berchuck, A., Kohler, M.F., Boente, M.P., Rodriguez, G.C., Whitaker, R.S., and Bast, R.C. (1993). Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. *Cancer* *71*, 545–551.

Berek, J.S., Crum, C., and Friedlander, M. (2015). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* *131*, S111–S122.

Bianconi, D., Unseld, M., and Prager, G. (2016). Integrins in the spotlight of cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 2037.

Binch, A., Snuggs, J., and Le Maitre, C.L. (2020). Immunohistochemical analysis of protein expression in formalin fixed paraffin embedded human intervertebral disc tissues. *Protoc. Methods, Resour.* *3*, 1–9.

Blokzijl, A., Dahlqvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U., and Ibáñez, C.F. (2003). Cross-talk between the Notch and TGF- $\beta$  signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J. Cell Biol.* *163*, 723–728.

Bodurka, D.C., Deavers, M.T., Tian, C., Sun, C.C., Malpica, A., Coleman, R.L., Lu, K.H., Sood, A.K., Birrer, M.J., Ozols, R., et al. (2012). Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* *118*, 3087–3094.

Bowen, N.J., Walker, L.D., Matyunina, L. V., Logani, S., Totten, K.A., Benigno, B.B., and McDonald, J.F. (2009). Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent and capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *BMC Med. Genomics* *2*, 71.

Brennan, K., Offiah, G., McSherry, E.A., and Hopkins, A.M. (2010). Tight Junctions: A barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 1–16.

Brennan, K., McSherry, E.A., Hudson, L., Kay, E.W., Hill, A.D.K., Young, L.S., and Hopkins, A.M. (2013). Junctional adhesion molecule-A is co-expressed with HER2 in breast tumors and acts as a novel regulator of HER2 protein degradation and signaling. *Oncogene* *32*, 2799–2804.

- Brett M., R., Jennifer B., P., Thomas A., S., Brett M., R., Jennifer B., P., and Thomas A., S. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. Med.* *14*, 9–32.
- Brooks, P.C., Clark, R.A.F., and Cheresh, D.A. (1994). Requirement of vascular integrin  $\alpha v\beta 3$  for angiogenesis. *Science*. *264*, 569–571.
- Bryan, J. (1990). Caldesmon: fragments, sequence, and domain mapping. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *599*, 100–110.
- Buamah, P. (2000). Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *J. Surg. Oncol.* *75*, 264–245.
- Bujko, M., Kober, P., Mikula, M., Ligaj, M., Ostrowski, J., and Siedlecki, J.A. (2015). Expression changes of cell-cell adhesion-related genes in colorectal tumors. *Oncol. Lett.* *9*, 2463–2470.
- Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E., et al. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2473–2483.
- Burkhalter, R.J., Westfall, S.D., Liu, Y., and Stack, M.S. (2015). Lysophosphatidic acid initiates epithelial to mesenchymal transition and Induces  $\beta$ -Catenin-mediated transcription in epithelial ovarian carcinoma. *J. Biol. Chem.* *290*, 22143–22154.
- Burleson, K.M., Hansen, L.K., and Skubitz, A.P.N. (2005). Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin. Exp. Metastasis* *21*, 685–697.
- Busch, E.L., McGraw, K.A., and Sandler, R.S. (2014). The potential for markers of epithelial-mesenchymal transition to improve colorectal cancer outcomes: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *23*, 1164–1175.
- Butler, B., Gao, C., Mersich, A.T., and Blystone, S.D. (2006). Purified integrin adhesion complexes exhibit actin-polymerization activity. *Curr. Biol.* *16*, 242–251.
- Callahan, M.J., Crum, C.P., Medeiros, F., Kindelberger, D.W., Elvin, J.A., Garber, J.E., Feltmate, C.M., Berkowitz, R.S., and Muto, M.G. (2007). Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J. Clin. Oncol.* *25*, 3985–3990.
- Cancer Genome Atlas Research Network, and The Cancer Genome Atlas Research Network (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* *474*, 609–615.
- Cardenas, C., Alvero, A.B., Yun, B.S., and Mor, G. (2016). Redefining the origin and evolution of ovarian cancer: A hormonal connection. *Endocr. Relat. Cancer* *23*, R411–R422.
- Carlson, J.W., Miron, A., Jarboe, E.A., Parast, M.M., Hirsch, M.S., Lee, Y., Muto, M.G., Kindelberger, D., and Crum, C.P. (2008). Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. *J. Clin. Oncol.* *26*, 4160–4165.
- Ceyhan, G.O., Liebl, F., Maak, M., Schuster, T., Becker, K., Langer, R., Demir, I.E., Hartel, M., Friess, H., and Rosenberg, R. (2010). The severity of neural invasion is a crucial prognostic factor in rectal cancer independent of neoadjuvant radiochemotherapy. *Ann. Surg.* *252*, 797–804.
- Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. *331*, 1559–1564.
- Chalovich, J.M., Sen, A., Resetar, A., Leinweber, B., Fredricksen, R.S., Lu, F., and Chen, Y.D. (1998). Caldesmon: binding to actin and myosin and effects on elementary steps in the ATPase cycle. *Acta Physiol. Scand.* *164*, 427–435.
- Chan, J.K., Urban, R., Cheung, M.K., Osann, K., Shin, J.Y., Husain, A., Teng, N.N., Kapp, D.S., Berek, J.S., and Leiserowitz, G.S. (2006). Ovarian cancer in younger vs older women: a population-based analysis. *Br. J. Cancer* *95*, 1314–1320.
- Chang, K.-P., Wang, C.-L.A., Kao, H.-K., Liang, Y., Liu, S.-C., Huang, L.-L., Hseuh, C., Hsieh,



Y.-J., Chien, K.-Y., Chang, Y.-S., et al. (2013). Overexpression of caldesmon is associated with lymph node metastasis and poorer prognosis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Cancer* *119*, 4003–4011.

Chang, L.C., Huang, C.F., Lai, M.S., Shen, L.J., Wu, F.L.L., and Cheng, W.F. (2018). Prognostic factors in epithelial ovarian cancer: A population-based study. *PLoS One* *13*.

Chen, D., Zhang, Y., Wang, J., Chen, J., Yang, C., Cai, K., Wang, X., Shi, F., and Dou, J. (2013a). MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *J. Ovarian Res.* *6*.

Chen, D. liang, Wang, Z. qiang, Ren, C., Zeng, Z. lei, Wang, D. shen, Luo, H. yan, Wang, F., Qiu, M. zhen, Bai, L., Zhang, D. sheng, et al. (2013b). Abnormal expression of paxillin correlates with tumor progression and poor survival in patients with gastric cancer. *J. Transl. Med.* *11*, 277.

Cheuk, I.W., Siu, M.T., Ho, J.C., Chen, J., and Shin, V.Y. (2020). Original Article ITGAV targeting as a therapeutic approach for treatment of metastatic breast cancer. *Am J Cancer Res* *10*, 211–223.

Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* *127*, 469–480.

Coffman, L.G., Burgos-Ojeda, D., Wu, R., Cho, K., Bai, S., and Buckanovich, R.J. (2016). New models of hematogenous ovarian cancer metastasis demonstrate preferential spread to the ovary and a requirement for the ovary for abdominal dissemination. *Transl. Res.* *175*, 92–102.e2.

Communal, L., Medrano, M., Sircoulomb, F., Paterson, J., Köbel, M., Rahimi, K., Hoskins, P., Tu, D., Lheureux, S., Oza, A., et al. (2020). Low junctional adhesion molecule-A expression is associated with an epithelial to mesenchymal transition and poorer outcomes in high-grade serous carcinoma of uterine adnexa. *Mod. Pathol.* *33*, 2361–2377.

Cooper, C.R., Chay, C.H., and Pienta, K.J. (2002). The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia* *4*, 191–194.

Cortez, A.J., Tudrej, P., Kujawa, K.A., and Lisowska, K.M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *81*, 17–38.

Daly, M.B., Pilarski, R., Axilbund, J.E., Buys, S.S., Crawford, B., Friedman, S., Garber, J.E., Horton, C., Kaklamani, V., Klein, C., et al. (2014). Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 1.2014. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* *12*, 1326–1338.

Danen, E.H.J., Jansen, K.F.J., Van Kraats, A.A., Cornelissen, I.M.H.A., Ruiters, D.J., and Van Muijen, G.N.P. (1995).  $\alpha$  v-Integrins in human melanoma: Gain of  $\alpha$ v $\beta$ 3 and loss OF  $\alpha$ v $\beta$ 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. *Int. J. Cancer* *61*, 491–496.

Davidson, B., Berner, A., Nesland, J.M., Risberg, B., Berner, A., Tropé CG, Kristensen, G.B., Bryne, M., and Ann Florenes V (2000). E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression is up-regulated in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *J. Pathol.* *192*, 460–469.

Davidson, B., Reich, R., Kopolovic, J., Berner, A., Nesland, J.M., Kristensen, G.B., Tropé, C.G., Bryne, M., Risberg, B., van de Putte, G., et al. (2002). Interleukin-8 and vascular endothelial growth factor mRNA and protein levels are down-regulated in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Clin. Exp. Metastasis* *19*, 135–144.

Davidson, B., Tropé, C.G., and Reich, R. (2012). Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Front. Oncol.* *2*, 33.

Davidson, B., Holth, A., Hellesylt, E., Tan, T.Z., Huang, R.Y.-J., Tropé, C., Nesland, J.M., and Thiery, J.P. (2015). The clinical role of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Hum. Pathol.* *46*, 1–8.

Deakin, N.O., and Turner, C.E. (2008). Paxillin comes of age. *J. Cell Sci.* *121*, 2435–2444.

Delon, I., and Brown, N.H. (2007). Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 43–50.

- Denadai, M.V., Viana, L.S., Affonso, R.J., Silva, S.R., Oliveira, I.D., Toledo, S.R., and Matos, D. (2013). Expression of integrin genes and proteins in progression and dissemination of colorectal adenocarcinoma. *BMC Clin. Pathol.* *13*, 16.
- Domenico, M. Di, and Giordano, A. (2017). Signal transduction growth factors: The effective governance of transcription and cellular adhesion in cancer invasion. *Oncotarget* *8*, 36869–36884.
- Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 69–84.
- Dubeau L, and Drapkin, R. (2013). Coming into focus: the nonovarian origins of ovarian cancer. *Ann Oncol.* *24*, viii28–viii35.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., and Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* *117*, 19–29.
- Eccles, D.M., Balmaña, J., Clune, J., Ehlken, B., Gohlke, A., Hirst, C., Potter, D., Schroeder, C., Tyczynski, J.E., and Gomez Garcia, E.B. (2016). Selecting patients with ovarian cancer for germline BRCA mutation testing: findings from guidelines and a systematic literature review. *Adv. Ther.* *33*, 129–150.
- Encinas, G., Maistro, S., Pasini, F.S., Katayama, M.L.H., Brentani, M.M., Bock, G.H. de, and Folgueira, M.A.A.K. (2015). Somatic mutations in breast and serous ovarian cancer young patients: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Assoc. Med. Bras.* *61*, 474–483.
- Eppinga, R.D., Li, Y., Lin, J.J.-C.J.L.-C.J.J.-C., and Mak, A.S. (2006). Requirement of reversible caldesmon phosphorylation at P21-activated kinase-responsive sites for lamellipodia extensions during cell migration. *Cell Motil. Cytoskeleton* *63*, 543–562.
- Escudero, J.M., Auge, J.M., Filella, X., Torne, A., Pahisa, J., and Molina, R. (2011). Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin. Chem.* *57*, 1534–1544.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.
- Eves, R., Webb, B.A., Zhou, S., and Mak, A.S. (2006). Caldesmon is an integral component of podosomes in smooth muscle cells. *J. Cell Sci.* *119*, 1691–1702.
- Ezzati, M., Abdullah, A., Sharifabrizi, A., Hou, J., Kopf, M., Stedman, J.K., Samuelson, R., and Shahabi, S. (2014). Recent advancements in prognostic factors of epithelial ovarian carcinoma. *ISRN Obstet. Gynecol.* *2014*.
- Faleiro-Rodrigues, C., Macedo-Pinto, I., Pereira, D., and Lopes, C.S. (2004). Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. *Ann Oncol* *15*, 1535-1542.
- Fathalla, M.F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet (London, England)* *2*, 163.
- Felding-Habermann, B. (2003). Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* *20*, 203–213.
- Feldman, G.B., Knapp, R.C., Order, S.E., and Hellman, S. (1972). The role of lymphatic obstruction in the formation of ascites in a murine ovarian carcinoma. *Cancer Res.* *32*, 1663–1666.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* *527*, 472–476.
- Fong, D., Spizzo, G., Mitterer, M., Seeber, A., Steurer, M., Gastl, G., Brosch, I., and Moser, P. (2012). Low expression of junctional adhesion molecule A is associated with metastasis and poor survival in pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* *19*, 4330–4336.
- Francis, J., Coakley, N., Elit, L., Mackay, H., and Gynecologic Cancer Disease Site Group, T.G.C.D.S. (2017). Systemic therapy for recurrent epithelial ovarian cancer: a clinical practice

guideline. *Curr. Oncol.* 24, e540–e546.

Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., and Cheresch, D.A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha$ v integrins. *Science*. 270, 1500–1502.

Frisch, S.M., and Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 701–706.

Garg, M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J. Stem Cells* 5, 188–195.

Gee, M.E., Faraahi, Z., McCormick, A., and Edmondson, R.J. (2018). DNA damage repair in ovarian cancer: unlocking the heterogeneity. *J. Ovarian Res.* 11.

Gibbons, D.L., Lin, W., Creighton, C.J., Rizvi, Z.H., Gregory, P.A., Goodall, G.J., Thilaganathan, N., Du, L., Zhang, Y., Pertsemliadis, A., et al. (2009). Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes Dev.* 23, 2140–2151.

Gil, O.D., Lee, C., Ariztia, E. V., Wang, F.Q., Smith, P.J., Hope, J.M., and Fishman, D.A. (2008). Lysophosphatidic acid (LPA) promotes E-cadherin ectodomain shedding and OVCA429 cell invasion in an uPA-dependent manner. *Gynecol. Oncol.* 108, 361–369.

Gilmore, A.P., Metcalfe, A.D., Romer, L.H., and Streuli, C.H. (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell Biol.* 149, 431–445.

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

Giornelli, G.H. (2016). Management of relapsed ovarian cancer: a review. *Springerplus* 5, 1197.

Goetsch, L., Haeuw, J.-F., Beau-Larvor, C., Gonzalez, A., Zanna, L., Malissard, M., Lepecquet, A.-M., Robert, A., Bailly, C., Broussas, M., et al. (2013). A novel role for junctional adhesion molecule-A in tumor proliferation: modulation by an anti-JAM-A monoclonal antibody. *Int. J. Cancer* 132, 1463–1474.

Goff, B.A., Mandel, L.S., Drescher, C.W., Urban, N., Gough, S., Schurman, K.M., Patras, J., Mahony, B.S., and Andersen, M.R. (2007). Development of an ovarian cancer symptom index. *Cancer* 109, 221–227.

Goh, J., Mohan, G.R., Ladwa, R., Ananda, S., Cohen, P.A., and Baron-Hay, S. (2015). Frontline treatment of epithelial ovarian cancer. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* 11 Suppl 6, 1–16.

Goldberg, I., Davidson, B., Reich, R., Gotlieb, W.H., Ben-Baruch, G., Bryne, M., Berner, A., Nesland, J.M., and Kopolovic, J. (2001).  $\alpha$ v integrin expression is a novel marker of poor prognosis in advanced-stage ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 4073–4079.

Götte, M., Mohr, C., Koo, C.-Y., Stock, C., Vaske, A.-K., Viola, M., Ibrahim, S.A., Peddibhotla, S., Teng, Y.H.-F., Low, J.-Y., et al. (2010). miR-145-dependent targeting of junctional adhesion molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene* 29, 6569–6580.

Gu, Z., Kordowska, J., Williams, G.L., Wang, C.L.A., and Hai, C.M. (2007). Erk1/2 MAPK and caldesmon differentially regulate podosome dynamics in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* 313, 849–866.

Guan, J.L. (1997). Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1085–1096.

Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W.J., Inghirami, G., and Giancotti, F.G. (2006).  $\beta$ 4 Integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 126, 489–502.

Gutwein, P., Schramme, A., Voss, B., Abdel-Bakky, M.S., Doberstein, K., Ludwig, A., Altevogt, P., Hansmann, M.-L., Moch, H., Kristiansen, G., et al. (2009). Downregulation of junctional adhesion molecule-A is involved in the progression of clear cell renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 387–391.

- Ha, S.Y., Shin, J., Kim, J.H., Kang, M.S., Yoo, H.Y., Kim, H.H., Um, S.H., and Kim, S.H. (2014). Overexpression of integrin  $\alpha v$  correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.* *67*, 576–581.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. *279*, 509–514.
- Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. In *Biochemical Society Transactions*, (Biochem Soc Trans), pp. 891–895.
- Hamden, S.S., Schroeter, M.M., and Chalovich, J.M. (2010). Phosphorylation of caldesmon at sites between residues 627 and 642 attenuates inhibitory activity and contributes to a reduction in  $Ca^{2+}$ -Calmodulin affinity. *Biophys. J.* *99*, 1861–1868.
- Hamidi, H., Pietilä, M., and Ivaska, J. (2016). The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *Br. J. Cancer* *115*, 1017–1023.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1778*, 660–669.
- Hayashi, K., Yano, H., Hashida, T., Takeuchi, R., Takeda, O., Asada, K., Takahashi, E., Kato, I., and Sobue, K. (1992). Genomic structure of the human caldesmon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 12122–12126.
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., and Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clin. Transl. Med.* *4*, 6.
- Hehlgans, S., Haase, M., and Cordes, N. (2007). Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* *1775*, 163–180.
- Heliström, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J.A., Schummer, M., McIntosh, M., Drescher, C., Urban, N., and Hellström, K.E. (2003). The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* *63*, 3695–3700.
- Hojo, N., Huisken, A.L., Wang, H., Chirshev, E., Kim, N.S., Nguyen, S.M., Campos, H., Glackin, C.A., Ioffe, Y.J., and Unternaehrer, J.J. (2018). Snail knockdown reverses stemness and inhibits tumour growth in ovarian cancer. *Sci. Rep.* *8*.
- Horioka, K., Ohuchida, K., Sada, M., Zheng, B., Moriyama, T., Fujita, H., Manabe, T., Ohtsuka, T., Shimamoto, M., Miyazaki, T., et al. (2016). Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* *48*, 1499–1508.
- van der Horst, G., van den Hoogen, C., Buijs, J.T., Cheung, H., Bloys, H., Pelger, R.C.M., Lorenzon, G., Heckmann, B., Feyen, J., Pujuguet, P., et al. (2011). Targeting of  $\alpha v$ -Integrins in stem/progenitor cells and supportive microenvironment impairs bone metastasis in human prostate cancer. *Neoplasia* *13*, 516–IN9.
- van der Horst, G., Bos, L., van der Mark, M., Cheung, H., Heckmann, B., Clément-Lacroix, P., Lorenzon, G., Pelger, R.C.M., Bevers, R.F.M., and van der Pluijm, G. (2014). Targeting of alpha-v integrins reduces malignancy of bladder carcinoma. *PLoS One* *9*, e108464.
- Hosotani, R., Kawaguchi, M., Masui, T., Koshiba, T., Ida, J., Fujimoto, K., Wada, M., Doi, R., and Imamura, M. (2002). Expression of integrin  $\alpha v \beta 3$  in pancreatic carcinoma: Relation to mmp-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas* *25*, e30–e35.
- Hou, Q., Tan, H.T., Lim, K.H., Lim, T.K., Khoo, A., Tan, I.B.H., Yeoh, K.G., and Chung, M.C.M. (2013). Identification and functional validation of caldesmon as a potential gastric cancer metastasis-associated protein. *J. Proteome Res.* *12*, 980–990.
- Hsu, M.Y., Shih, D.T., Meier, F.E., Van Belle, P., Hsu, J.Y., Elder, D.E., Buck, C.A., and 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.

Huang, H., Li, Y.J., Lan, C.Y., Huang, Q.D., Feng, Y.L., Huang, Y.W., and Liu, J.H. (2013a). Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma* *60*, 546–552.

Huang, R.Y.-J., Wong, M.K., Tan, T.Z., Kuay, K.T., Ng, A.H.C., Chung, V.Y., Chu, Y.-S., Matsumura, N., Lai, H.-C., Lee, Y.F., et al. (2013b). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis.* *4*, e915–e915.

Hunn, J., and Rodriguez, G.C. (2012). Ovarian Cancer: etiology, risk factors and epidemiology. *Clin. Obstet. Gynecol.* *55*, 3–23.

Hunter, S.M., Anglesio, M.S., Sharma, R., Gilks, C.B., Melnyk, N., Chiew, Y.E., DeFazio, A., Longacre, T.A., Huntsman, D.G., Gorringer, K.L., et al. (2011). Copy number aberrations in benign serous ovarian tumors: A case for reclassification? *Clin. Cancer Res.* *17*, 7273–7282.

Huveneers, S., Van Den Bout, I., Sonneveld, P., Sancho, A., Sonnenberg, A., and Danen, E.H.J. (2007). Integrin  $\alpha\beta3$  controls activity and oncogenic potential of primed c-Src. *Cancer Res.* *67*, 2693–2700.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.

Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: Direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.* *116*, 1959–1967.

Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3. *J. Cell Biol.* *154*, 491–498.

Iwatsuki, M., Mimori, K., Yokobori, T., Ishi, H., Beppu, T., Nakamori, S., Baba, H., and Mori, M. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* *101*, 293–299.

Janicic, B., and Novovic, Z. (2011). Procena uspešnosti u klasifikovanju rezultata na osnovu graničnih (cut-off) skorova: Receiver operating characteristic curve. *Primenj. Psihol.* *4*, 335–351.

Jiang, X., Morland, S.J., Hitchcock, A., Thomas, E.J., and Campbell, I.G. (1998). Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage<sup>1</sup>. *Cancer Res.* *58*(8), 1707–1712.

Jolly, M.K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., Onuchic, J.N., and Levine, H. (2015). Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Front. Oncol.* *5*, 155.

Jordan, N.V., Johnson, G.L., and Abell, A.N. (2011). Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle* *10*, 2865–2873.

Judson, P.L., Geller, M.A., Bliss, R.L., Boente, M.P., Downs, L.S., Argenta, P.A., and Carson, L.F. (2003). Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *91*, 389–394.

Kageshita, T., Hamby, C. V., Hirai, S., Kimura, T., Ono, T., and Ferrone, S. (2000). Differential clinical significance of alpha(v)Beta(3) expression in primary lesions of acral lentiginous melanoma and of other melanoma histotypes. *Int. J. Cancer* *89*, 153–159.

Kakuki, T., Kurose, M., Takano, K., and Kondoh, A. (2016). Dysregulation of junctional adhesion molecule-A via p63 / GATA-3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* *7*, 33887–33900.

Kalluri, R., and Neilson, E.G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* *112*, 1776–1784.

Kalluri, R., and Weinberg, R. a (2009). Review series the basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.

- Kang, H., Kim, H., Lee, S., Youn, H., and Youn, B. (2019). Role of metabolic reprogramming in epithelial–mesenchymal transition (EMT). *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Kashofer, K., Viertler, C., Pichler, M., and Zatloukal, K. (2013). Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: Implications for RT-PCR and microarray analysis. *PLoS One* *8*, e70714.
- Kato, S., Abarzua-Catalan, L., Trigo, C., Delpiano, A., Sanhueza, C., García, K., Ibañez, C., Hormazábal, K., Diaz, D., Brañes, J., et al. (2015). Leptin stimulates migration and invasion and maintains cancer stem-like properties in ovarian cancer cells: An explanation for poor outcomes in obese women. *Oncotarget* *6*, 21100–21119.
- Kawashima, A., Tsugawa, S., Boku, A., Kobayashi, M., Minamoto, T., Nakanishi, I., and Oda, Y. (2003). Expression of alphav integrin family in gastric carcinomas: increased alphavbeta6 is associated with lymph node metastasis. *Pathol. Res. Pract.* *199*, 57–64.
- Kelly, T., Yan, Y., Osborne, R.L., Athota, A.B., Rozypal, T.L., Colclasure, J.C., and Chu, W.S. (1998). Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. *Clin. Exp. Metastasis* *16*, 501–512.
- Kenny, H.A., Krausz, T., Yamada, S.D., and Lengyel, E. (2007). Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. *Int. J. Cancer* *121*, 1463–1472.
- Khunamornpong, S., Suprasert, P., Na Chiangmai, W., and Siriaunkgul, S. (2006). Metastatic tumors to the ovaries: A study of 170 cases in northern Thailand. *Int. J. Gynecol. Cancer* *16*, 132–138.
- Kim, A., Ueda, Y., Naka, T., and Enomoto, T. (2012a). Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *31*, 14.
- Kim, J., Park, E.Y., Kim, O., Schilder, J.M., Coffey, D.M., Cho, C.H., and Bast, R.C. (2018). Cell origins of high-grade serous ovarian cancer. *Cancers (Basel)*. *10*, 1–28.
- Kim, K.-H., Yeo, S.-G., Kim, W.K., Kim, D.Y., Yeo, H.Y., Hong, J.P., Chang, H.J., Park, J.W., Kim, S.Y., Kim, B.C., et al. (2012b). Up-regulated expression of l-caldesmon associated with malignancy of colorectal cancer. *BMC Cancer* *12*, 601.
- Kim, Y.-N., Hee Koo, K., Young Sung, J., Yun, U.-J., and Kim, H. (2012c). Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int. J. Cell Biol.* *2012*, 306879.
- Kindelberger, D.W., Lee, Y., Miron, A., Hirsch, M.S., Feltmate, C., Medeiros, F., Callahan, M.J., Garner, E.O., Gordon, R.W., Birch, C., et al. (2007). Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. *Am. J. Surg. Pathol.* *31*, 161–169.
- King, M.-C., Marks, J.H., Mandell, J.B., and New York Breast Cancer Study Group (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. *302*, 643–646.
- Kipps, E., Tan, D.S.P., and Kaye, S.B. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: New avenues for therapy and research. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 273–282.
- Klymenko, Y., Kim, O., and Stack, M.S. (2017). Complex determinants of epithelial: Mesenchymal phenotypic plasticity in ovarian cancer. *Cancers (Basel)*. *9*, 104.
- Koensgen, D., Freitag, C., Klaman, I., Dahl, E., Mustea, A., Chekerov, R., Braicu, I., Lichtenegger, W., and Sehouli, J. (2010). Expression and localization of E-cadherin in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* *30*, 2525–2530.
- Koistien P, H.J., Koistinen, P., and Heino, J. (2013). Integrins in cancer cell invasion (Austin: Landes Bioscience).
- Koivisto, L., Grenman, R., Heino, J., and Larjava, H. (2000). Integrins  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 1$ , and  $\alpha v\beta 6$  collaborate in squamous carcinoma cell spreading and migration on fibronectin. *Exp. Cell Res.* *255*, 10–17.

- Kondi-Pafiti, A., Papakonstantinou, E., Iavazzo, C., Grigoriadis, C., Salakos, N., and Gregoriou, O. (2012). Clinicopathological characteristics of ovarian carcinomas associated with endometriosis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 285, 479–483.
- Kopan, R. (2002). Notch: a membrane-bound transcription factor. *J. Cell Sci.* 115.
- Kordowska, J., Huang, R., and Wang, C.L.A. (2006). Phosphorylation of caldesmon during smooth muscle contraction and cell migration or proliferation. *J. Biomed. Sci.* 13, 159–172.
- Kornecki, E., Walkowiak, B., Naik, U.P., and Ehrlich, Y.H. (1990). Activation of human platelets by a stimulatory monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 265, 10042–10048.
- Korpai, M., and Kang, Y. (2008). The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biol.* 5, 115–119.
- Koshiba, H., Hosokawa, K., Kubo, A., Tokumitsu, N., Watanabe, A., and Honjo, H. (2009). Junctional adhesion molecule A expression in human endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 19, 208–213.
- Kotiyal, S., and Bhattacharya, S. (2016). Events of molecular changes in epithelial-mesenchymal transition. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 26, 163–171.
- Kumaran, G.C., Jayson, G.C., and Clamp, A.R. (2009). Antiangiogenic drugs in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 100, 1–7.
- Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2016). The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *Am. J. Pathol.* 186, 733–747.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell* 168, 670–691.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.
- Landau, D. (2006). Epithelial paracellular proteins in health and disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 15, 425–429.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., et al. (2012). Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 1382–1392.
- Ledermann, J.A., Raja, F.A., Fotopoulou, C., Gonzalez-Martin, A., Colombo, N., and Sessa, C. (2013). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 24.
- Lee, K., and Nelson, C.M. (2012). New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis (Elsevier Inc.).
- Lee, K.R., and Nucci, M.R. (2003). Ovarian mucinous and mixed epithelial carcinomas of mullerian (endocervical-like) Type: A clinicopathologic analysis of four cases of an uncommon variant associated with endometriosis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 22, 42–51.
- Lee, H.J., Bahr, J.M., Bitterman, P., Basu, S., Sharma, S., Abramowicz, J.S., and Barua, A. (2018). Polycystic ovarian condition may be a risk factor for ovarian tumor development in the laying hen model of spontaneous ovarian cancer. *J. Immunol. Res.* 2018:25909.
- Lee, M.-S., Lee, J., Kim, J.H., Kim, W.T., Kim, W.-J., Ahn, H., and Park, J. (2015). Overexpression of caldesmon is associated with tumor progression in patients with primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget* 6, 40370–40384.
- Leech, A.O., Cruz, R.G.B., Hill, A.D.K., and Hopkins, A.M. (2015). Paradigms lost—an emerging role for over-expression of tight junction adhesion proteins in cancer pathogenesis. *Ann. Transl. Med.* 3, 184.
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *Am. J. Pathol.* 177, 1053–1064.
- Lester, R.D., Jo, M., Montel, V., Takimoto, S., and Gonias, S.L. (2007). uPAR induces epithelial–

mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J. Cell Biol.* 178, 425–436.

Lheureux, S., Braunstein, M., and Oza, A.M. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA. Cancer J. Clin.* 69, caac.21559.

Li, C.W., Xia, W., Huo, L., Lim, S.O., Wu, Y., Hsu, J.L., Chao, C.H., Yamaguchi, H., Yang, N.K., Ding, Q., et al. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- $\alpha$  requires NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* 72, 1290–1300.

Li, L., Cai, S., Liu, S., Feng, H., and Zhang, J. (2017). Bioinformatics analysis to screen the key prognostic genes in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 10, 27.

Liang, T.W., DeMarco, R.A., Mrsny, R.J., Gurney, A., Gray, A., Hooley, J., Aaron, H.L., Huang, A., Klassen, T., Tumas, D.B., et al. (2000). Characterization of huJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1733-43.

Linhares, M.M., Affonso, R.J., Viana, L. de S., Silva, S.R.M., Denadai, M.V.A., de Toledo, S.R.C., and Matos, D. (2015). Genetic and immunohistochemical expression of integrins ITGA5, ITGA6, and ITGA3 as prognostic factor for colorectal cancer: Models for global and disease-free survival. *PLoS One* 10, e0144333.

Liu, J., Han, S., Hu, R., Huang, J., Zhang, R., Li, K., Li, L., Zhang, G., and Zhao, H. (2018). CD51 is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 214, 1352–1355.

Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C.A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* 113, 2363–2374.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). Muscle: A specialized contractile machine.

López-Novoa, J.M., and Nieto, M.A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol. Med.* 1, 303–314.

Lord, C.J., and Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nat. Rev. Cancer* 16, 110–120.

Luissint, A.C., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2014). JAM-related proteins in mucosal homeostasis and inflammation. *Semin. Immunopathol.* 36, 211–226.

Luscombe, N.M., Greenbaum, D., and Gerstein, M. (2001). What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf. Med.* 40, 346–358.

Lynch, H.T., Casey, M.J., Lynch, J., White, T.E., and Godwin, A.K. (1998). Genetics and ovarian carcinoma. *Semin. Oncol.* 25, 265–280.

Macciò, A., and Madeddu, C. (2012). Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine* 58, 133–147.

Malergue, F., Galland, F., Martin, F., Mansuelle, P., Aurrand-Lions, M., and Naquet, P. (1998). A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets. *Mol. Immunol.* 35, 1111–1119.

Mandell, K.J., and Parkos, C.A. (2005). The JAM family of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 857–867.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.

Marchetti, C., Muzii, L., Romito, A., and Panici, P.B. (2019). First-line treatment of women with advanced ovarian cancer: Focus on bevacizumab. *Onco. Targets. Ther.* 12, 1095–1103.

Markovic-Lipkovski, J., Brasanac, D., Müller, G.A., and Müller, C.A. (2001). Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Tumori* 87, 173–178.

Martin, T.A. (2014). The role of tight junctions in cancer metastasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 224–231.

Martin, T.A., and Jiang, W.G. (2009). Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *BBA - Biomembr.* 1788, 872–891.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., et al. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates



monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* *142*, 117–127.

Massagué, J., and Obenauf, A.C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* *529*, 298–306.

Matter, K., and Balda, M.S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 225–236.

Matulonis, U.A., Sood, A.K., Fallowfield, L., Howitt, B.E., Sehouli, J., and Karlan, B.Y. (2016). Ovarian cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* *2*, 16061.

Mayanagi, T., and Sobue, K. (2011). Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adh. Migr.* *5*, 150–159.

Mayanagi, T., Morita, T., Hayashi, K., Fukumoto, K., and Sobue, K. (2008). Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* *283*, 31183–31196.

McCabe, N., Turner, N.C., Lord, C.J., Kluzek, K., Białkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M.J., Tutt, A.N., Zdzienicka, M.Z., et al. (2006). Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* *66*, 8109–8115.

McSherry, E.A., McGee, S.F., Jirstrom, K., Doyle, E.M., Brennan, D.J., Landberg, G., Dervan, P.A., Hopkins, A.M., and Gallagher, W.M. (2009). JAM-A expression positively correlates with poor prognosis in breast cancer patients. *Int. J. Cancer* *125*, 1343–1351.

McSherry, E.A., Brennan, K., Hudson, L., Hill, A.D., and Hopkins, A.M. (2011). Breast cancer cell migration is regulated through junctional adhesion molecule-A-mediated activation of Rap1 GTPase. *Breast Cancer Res.* *13*, R31.

Meinhold-Heerlein, I., Fotopoulou, C., Harter, P., Kurzeder, C., Mustea, A., Wimberger, P., Hauptmann, S., and Sehouli, J. (2016). The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch. Gynecol. Obstet.* *293*, 695–700.

Mendez, M.G., Kojima, S., and Goldman, R.D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* *24*, 1838–1851.

Meza-Perez, S., and Randall, T.D. (2017). Immunological functions of the omentum. *Trends Immunol.* *38*, 526–536.

Mikheeva, S.A., Mikheev, A.M., Petit, A., Beyer, R., Oxford, R.G., Khorasani, L., Maxwell, J.-P., Glackin, C.A., Wakimoto, H., González-Herrero, I., et al. (2010). TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol. Cancer* *9*, 194.

Miljuš, D., Vukičević, A., Živković, S., Mickovski-Katalina, N., Rakočević, I., and Plavšić, S. (2017). Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2015. *Beogr. Inst. Za Javno Zdr. Srb.*

Miralles, C., Orea, M., España, P., Provencio, M., Sánchez, A., Cantos, B., Cubedo, R., Carcereny, E., Bonilla, F., and Gea, T. (2003). Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies. *Ann. Surg. Oncol.* *10*, 150–154.

Mitra, A.K. (2016). Ovarian cancer metastasis: A unique mechanism of dissemination. *Tumor Metastasis*, pp. 43–58.

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

Mitra, A.K., Davis, D.A., Tomar, S., Roy, L., Gurler, H., Xie, J., Lantvit, D.D., Cardenas, H., Fang, F., Liu, Y., et al. (2015). In vivo tumor growth of high-grade serous ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* *138*, 372–377.

Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y., and Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br. J. Cancer* *90*, 1265–1273.

Momiyama, T., Hayashi, K., Obata, H., Chimori, Y., Nishida, T., Ito, T., Kamiike, W., Matsuda, H., and Sobue, K. (1998). Functional involvement of serum response factor in the transcriptional regulation of caldesmon gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *242*, 429–435.

Moore, R.G., Brown, A.K., Miller, M.C., Skates, S., Allard, W.J., Verch, T., Steinhoff, M., Messerlian, G., DiSilvestro, P., Granai, C.O., et al. (2008). The use of multiple novel tumor

biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol. Oncol.* *108*, 402–408.

Moore, R.G., Scott Mcmeekin, D., Brown, A.K., Disilvestro, P., Miller, M.C., Allard, W.J., Gajewski, W., Kurman, R., Bast, R.C., and Skates, S.J. (2010). A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol. Oncol.* *112*, 40–46.

Morin, P.J. (2005). Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* *65*, 9603–9606.

Morita, T., Mayanagi, T., and Sobue, K. (2007a). Reorganization of the actin cytoskeleton via transcriptional regulation of cytoskeletal/focal adhesion genes by myocardin-related transcription factors (MRTFs/MAL/MKLs). *Exp. Cell Res.* *313*, 3432–3445.

Morita, T., Mayanagi, T., and Sobue, K. (2007b). Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J. Cell Biol.* *179*, 1027–1042.

Morris, H.T., and Machesky, L.M. (2015). Actin cytoskeletal control during epithelial to mesenchymal transition: Focus on the pancreas and intestinal tract. *Br. J. Cancer* *112*, 613–620.

Morrison, J.C., Blanco, L.Z., Vang, R., and Ronnett, B.M. (2015). Incidental serous tubal intraepithelial carcinoma and early invasive serous carcinoma in the nonprophylactic setting analysis of a case series. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 442–453.

Mukhopadhyay, U.K., Eves, R., Jia, L., Mooney, P., and Mak, A.S. (2009). p53 suppresses src-induced podosome and rosette formation and cellular invasiveness through the upregulation of caldesmon. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3088–3098.

Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., et al. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* *96*, 319–328.

Murakami, M., Giampietro, C., Giannotta, M., Corada, M., Torselli, I., Orsenigo, F., Cocito, A., d'Ario, G., Mazzarol, G., Confalonieri, S., et al. (2011). Abrogation of junctional adhesion molecule-A expression induces cell apoptosis and reduces breast cancer progression. *PLoS One* *6*, e21242.

Naik, M.U., and Naik, U.P. (2006). Junctional adhesion molecule-A-induced endothelial cell migration on vitronectin is integrin alpha v beta 3 specific. *J. Cell Sci.* *119*, 490–499.

Naik, M.U., Naik, T.U., Suckow, A.T., Duncan, M.K., and Naik, U.P. (2008). Attenuation of junctional adhesion molecule-A is a contributing factor for breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* *68*, 2194–2203.

Naik, U.P., Naik, M.U., Eckfeld, K., Martin-DeLeon, P., and Szychala, J. (2001). Characterization and chromosomal localization of JAM-1, a platelet receptor for a stimulatory monoclonal antibody. *J. Cell Sci.* *114*, 539–547.

Nawshad, A., LaGamba, D., Polad, A., and Hay, E.D. (2005). Transforming growth factor- $\beta$  signaling during epithelial-mesenchymal transformation: Implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* *179*, 11–23.

Newsted, D., Banerjee, S., Watt, K., Nersesian, S., Truesdell, P., Blazer, L.L., Cardarelli, L., Adams, J.J., Sidhu, S.S., and Craig, A.W. (2019). Blockade of TGF- $\beta$  signaling with novel synthetic antibodies limits immune exclusion and improves chemotherapy response in metastatic ovarian cancer models. *Oncoimmunology*, e1539613.

Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C. V, Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., Romero, I.L., Carey, M.S., Mills, G.B., Hotamisligil, G.S., et al. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* *17*, 1498–1503.

Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* *166*, 21–45.

Nik, N.N., Vang, R., Shih, I.-M., and Kurman, R.J. (2014). Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary Peritoneal) serous carcinoma. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *9*, 27–45.

Norquist, B.M., Harrell, M.I., Brady, M.F., Walsh, T., Lee, M.K., Gulsuner, S., Bernards, S.S., Casadei, S., Yi, Q., Burger, R.A., et al. (2016). Inherited mutations in women with ovarian

- carcinoma. *JAMA Oncol* 2, 482–490.
- Novy, R.E., Lin, J.J.J.L., Lin, C. -S, and Lin, J.J.J.L. (1993). Human fibroblast tropomyosin isoforms: Characterization of cDNA clones and analysis of tropomyosin isoform expression in human tissues and in normal and transformed cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 25, 267–281.
- O'Connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol. Cell* 60, 547–560.
- O'Donovan, P.J., and Livingston, D.M. (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 31, 961–967.
- Olson, M.F., and Sahai, E. (2009). The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 273–287.
- Olumi, A., Grossfeld, G., Hayward, S., Carroll, P., Cunha, G., Hein, P., and Tlsty, T. (2000). Carcinoma-associated fibroblasts stimulate tumor progression of initiated human epithelium. *Breast Cancer Res.* 2.
- Onal, Y., Kostek, O., Hacıoglu, M.B., Erdogan, B., Kodaz, H., Bekmez, E.T., Hacibekiroglu, I., Uzunoglu, S., and Cicin, I. (2017). Assessment of prognostic factors in epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Med. Gynecol.* 1, 61–68.
- Orlandella, F.M., Mariniello, R.M., Iervolino, P.L.C., Auletta, L., De Stefano, A.E., Ugolini, C., Greco, A., Mirabelli, P., Pane, K., Franzese, M., et al. (2019). Junctional adhesion molecule-A is down-regulated in anaplastic thyroid carcinomas and reduces cancer cell aggressiveness by modulating p53 and GSK3  $\alpha/\beta$  pathways. *Mol. Carcinog.* 58, 1181–1193.
- Ostermann, G., Weber, K.S.C., Zerneck, A., Schröder, A., and Weber, C. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* 3, 151–158.
- Ozaki, H., Ishii, K., Horiuchi, H., Arai, H., Kawamoto, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kita, T. (1999). Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J. Immunol.* 163, 553–557.
- Pakuła, M., Mikuła-Pietrasik, J., Witucka, A., Kostka-Jeziorny, K., Uruski, P., Moszyński, R., Naumowicz, E., Sajdak, S., Tykarski, A., and Książek, K. (2019). The epithelial-mesenchymal transition initiated by malignant ascites underlies the transmesothelial invasion of ovarian cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 137.
- Paño, B., Sebastià, C., Ripoll, E., Paredes, P., Salvador, R., Buñesch, L., and Nicolau, C. (2015). Pathways of lymphatic spread in gynecologic malignancies. *RadioGraphics* 35, 916–945.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science*. 292, 1502–1506.
- Papa, A., Caruso, D., Strudel, M., Tomao, S., and Tomao, F. (2016). Update on poly-ADP-ribose polymerase inhibition for ovarian cancer treatment. *J. Transl. Med.* 14, 267.
- Parasar, P., Ozcan, P., and Terry, K.L. (2017). Endometriosis: epidemiology, diagnosis and clinical management. *Curr. Obstet. Gynecol. Rep.* 6, 34–41.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 633–643.
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., et al. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 463–468.
- Payne, A.M., Yue, P., Pritchard, K., and Marston, S.B. (1995). Caldesmon mRNA splicing and isoform expression in mammalian smooth-muscle and non-muscle tissues. *Biochem. J.* 305, 445.
- Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor  $\beta$ -1 induces Snail transcription factor in epithelial cell lines. Mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 278, 21113–21123.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.-J., Fusenig, N., Nieto, M.A., and Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J. Cell Sci.* 117, 2827–2839.
- Pfaffl, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In *A-Z of Quantitative PCR*, pp.

87–112.

Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. (2000). Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* *275*, 21785–21788.

Ponnusamy, M.P., Lakshmanan, I., Jain, M., Das, S., Chakraborty, S., Dey, P., and Batra, S.K. (2010). MUC4 mucin-induced epithelial to mesenchymal transition: A novel mechanism for metastasis of human ovarian cancer cells. *Oncogene* *29*, 5741–5754.

Prasanphanich, A.F., Arencibia, C.A., and Kemp, M.L. (2014). Redox processes inform multivariate transdifferentiation trajectories associated with TGF $\beta$ -induced epithelial–mesenchymal transition. *Free Radic. Biol. Med.* *76*, 1–13.

Prat, J. (2012). New insights into ovarian cancer pathology. *Ann. Oncol.* *23* 23, 111–117.

Prat, J. (2017). Pathology of borderline and invasive cancers. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *41*, 15–30.

Prat, J., Ribé, A., and Gallardo, A. (2005). Hereditary ovarian cancer. *Hum. Pathol.* *36*, 861–870.

Puram, S. V., Tirosh, I., Parikh, A.S., Patel, A.P., Yizhak, K., Gillespie, S., Rodman, C., Luo, C.L., Mroz, E.A., Emerick, K.S., et al. (2017). Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell* *171*, 1611–1624.e24.

Qiu, C., Lu, N., Wang, X., Zhang, Q., Yuan, C., Yan, S., Dongol, S., Li, Y., Sun, X., Sun, C., et al. (2017). Gene expression profiles of ovarian low-grade serous carcinoma resemble those of fallopian tube epithelium. *Gynecol. Oncol.* *147*, 634–641.

Quintavalle, M., Elia, L., Price, J.H., Heynen-Genel, S., and Courtneidge, S.A. (2011). A cell-based high-content screening assay reveals activators and inhibitors of cancer cell invasion. *Sci. Signal.* *4*.

Raab-Westphal, S., Marshall, J., and Goodman, S. (2017). Integrins as therapeutic targets: Successes and cancers. *Cancers (Basel)*. *9*, 110.

Rafehi, S., Valdes, Y.R., Bertrand, M., McGee, J., Préfontaine, M., Sugimoto, A., Dimattia, G.E., and Shepherd, T.G. (2016). TGF $\beta$  signaling regulates epithelial-mesenchymal plasticity in ovarian cancer ascites-derived spheroids. *Endocr. Relat. Cancer* *23*, 147–159.

Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S., and Golub, T.R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* *33*, 49–54.

Ratnikov, B.I., Partridge, A.W., and Ginsberg, M.H. (2005). Integrin activation by talin. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 1783–1790.

Reid, B.M., Permuth, J.B., and Sellers, T.A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* *14*, 9–32.

Ren, J., Xiao, Y.J., Singh, L.S., Zhao, X., Zhao, Z., Feng, L., Rose, T.M., Prestwich, G.D., and Xu, Y. (2006). Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res.* *66*, 3006–3014.

Reymond, N., D'Água, B.B., and Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 858–870.

Ridley, A.J. (1994). Membrane ruffling and signal transduction. *BioEssays* *16*, 321–327.

Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* *16*, 522–529.

Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* *145*, 1012–1022.

Risch, H.A. (1998). Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *90*, 1774–1786.

Rodriguez, G.C., Walmer, D.K., Cline, M., Krigman, H., Lessey, B.A., Whitaker, R.S., Dodge, R., and Hughes, C.L. (1998). Effect of progestin on the ovarian epithelium of macaques: cancer prevention through apoptosis? *J. Soc. Gynecol. Investig.* *5*, 271–276.

Romero, I., and Bast, R.C. (2012). Minireview: Human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* *153*, 1593–1602.

Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S.S., Van De Rijn, M., Waltham, M., et al. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat. Genet.* *24*, 227–235.

- Ruoslahti, E. (1996). Rgd and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *12*, 697–715.
- Rustin, G.J.S., Marples, M., Nelstrop, A.E., Mahmoudi, M., and Meyer, T. (2001). Use of CA-125 to define progression of ovarian cancer in patients with persistently elevated levels. *J. Clin. Oncol.* *19*, 4054–4057.
- Saad, S., Stanners, S.R., Yong, R., Tang, O., and Pollock, C.A. (2010). Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 1115–1122.
- Salehi, F., Dunfield, L., Phillips, K.P., Krewski, D., and Vanderhyden, B.C. (2008). Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* *11*, 301–321.
- Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D.S., Dean, D.C., Castells, A., and Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 3429–3456.
- Sanders, R.J., Mainiero, F., and Giancotti, F.G. (1998). The role of integrins in tumorigenesis and metastasis. *Cancer Invest.* *16*, 329–344.
- Sawada, K., Mitra, A.K., Radjabi, A.R., Bhaskar, V., Kistner, E.O., Tretiakova, M., Jagadeeswaran, S., Montag, A., Becker, A., Kenny, H.A., et al. (2008). Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via 5-Integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* *68*, 2329–2339.
- Schöck, F., and Perrimon, N. (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 463–493.
- Schoenwaelder, S.M., and Burridge, K. (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 274–286.
- Schwartz, M.A., Schaller, M.D., and Ginsberg, M.H. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 549–599.
- Severson, E.A., Lee, W.Y., Capaldo, C.T., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2009). Junctional adhesion molecule A interacts with Afadin and PDZ-GEF2 to activate Rap1A, regulate beta1 integrin levels, and enhance cell migration. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1916–1925.
- Shan, W., and Liu, J. (2009). Inflammation: A hidden path to breaking the spell of ovarian cancer. *Cell Cycle* *8*, 3107–3111.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* *29*, 4741–4751.
- Smit, M.A., Geiger, T.R., Song, J.-Y., Gitelman, I., and Peeper, D.S. (2009). A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3722–3737.
- Smolle, E., Taucher, V., and Haybaeck, J. (2014). Malignant ascites in ovarian cancer and the role of targeted therapeutics. *Anticancer Res.* *34*, 1553–1562.
- Sobue, K., and Sellers, J.R. (1991). Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. *J. Biol. Chem.* *266*, 12115–12118.
- Sobue, K., Takahashi, K., and Wakabayashi, I. (1985). Caldesmon150 regulates the tropomyosin-enhanced actin-myosin interaction in gizzard smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *132*, 645–651.
- de Sousa, G.F., Wlodarczyk, S.R., and Monteiro, G. (2014). Carboplatin: Molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian J. Pharm. Sci.* *50*, 693–702.
- De Souza Viana, L., Affonso, R.J., Silva, S.R.M., Denadai, M.V.A., Matos, D., Salinas De Souza, C., and Waisberg, J. (2012). Relationship between the expression of the extracellular matrix genes SPARC, SPP1, FN1, ITGA5 and ITGAV and clinicopathological parameters of tumor progression and colorectal cancer dissemination. *Oncol.* *84*, 81–91.
- Stamatovic, S.M., Sladojevic, N., Keep, R.F., and Andjelkovic, A. V. (2012). Relocalization of junctional adhesion molecule A during inflammatory stimulation of brain endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3414–3427.
- Steinbacher, T., Kummer, D., and Ebnet, K. (2018). Junctional adhesion molecule-A: functional

diversity through molecular promiscuity. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 1393–1409.

Steinestel, K., Eder, S., Schrader, A., and Steinestel, J. (2014). Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clin. Transl. Med.* 3, 17.

Stewart, C.J.R., and Mccluggage, W.G. (2013). Epithelial-mesenchymal transition in carcinomas of the female genital tract. *Histopathology* 62, 31–43.

Strauss, R., Li, Z.Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Möller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P., et al. (2011). Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* 6, e16186.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–15550.

Suh, D.H., Kim, J.-W., Kang, S., Kim, H.J., and Lee, K.-H. (2014). Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2013. *J. Gynecol. Oncol.* 25, 236–248.

Sun, B., Fang, Y., Li, Z., Chen, Z., and Xiang, J. (2015). Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed. Reports* 3, 603–610.

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., et al. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47, D607–D613.

T. Ronaldson, P., and P. Davis, T. (2012). Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. *Curr. Pharm. Des.* 18, 3624–3644.

Takai, M., Terai, Y., Kawaguchi, H., Ashihara, K., Fujiwara, S., Tanaka, T., Tsunetoh, S., Tanaka, Y., Sasaki, H., Kanemura, M., et al. (2014). The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 7, 76.

Takayama, S., Ishii, S., Ikeda, T., Masamura, S., Doi, M., and Kitajima, M. (2005). The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin alpha(v)beta3 expression. *Anticancer Res.* 25, 79–83.

Tan, T.Z., Miow, Q.H., Huang, R.Y.J., Wong, M.K., Ye, J., Lau, J.A., Wu, M.C., Bin Abdul Hadi, L.H., Soong, R., Choolani, M., et al. (2013). Functional genomics identifies five distinct molecular subtypes with clinical relevance and pathways for growth control in epithelial ovarian cancer. *EMBO Mol. Med.* 5, 1051–1066.

Tan, T.Z., Miow, Q.H., Miki, Y., Noda, T., Mori, S., Huang, R.Y.-J.Y., and Thiery, J.P. (2014). Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol. Med.* 6, 1279–1293.

Tanaka, J., Watanabe, T., Nakamura, N., and Sobue, K. (1993). Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and tropomyosin) in normal and transformed cells. *J. Cell Sci.* 104 ( Pt 2), 595–606.

Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., and Zhang, Z. (2017). GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 45, W98–W102.

Tarin, D., Thompson, E.W., and Newgreen, D.F. (2005). The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* 65, 5996–6001.

Terry, S., Savagner, P., Ortiz-Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J.-P., and Chouaib, S. (2017). New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol. Oncol.* 11, 824–846.

Testa, U., Petrucci, E., Pasquini, L., Castelli, G., and Pelosi, E. (2018). Ovarian cancers: Genetic abnormalities, tumor heterogeneity and progression, clonal evolution and cancer stem cells. *Medicines* 5, 16.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.

Thigpen, T., Brady, M.F., Omura, G.A., Creasman, W.T., Mcguire, W.P., Hoskins, W.J., and

- Williams, S. (2010). Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma: the gynecologic oncology group experience. *Cancer* 71, 606–614.
- Tian, Y., Tian, Y., Zhang, W., Wei, F., Yang, J., Luo, X., Zhou, T., Hou, B., Qian, S., Deng, X., et al. (2015). Junctional adhesion molecule-A, an epithelial-mesenchymal transition inducer, correlates with metastasis and poor prognosis in human nasopharyngeal cancer. *Carcinogenesis* 36, 41–48.
- Torre, L.A., Trabert, B., DeSantis, C.E., Miller, K.D., Samimi, G., Runowicz, C.D., Gaudet, M.M., Jemal, A., and Siegel, R.L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 284–296.
- Tothill, R.W., Tinker, A. V., George, J., Brown, R., Fox, S.B., Lade, S., Johnson, D.S., Trivett, M.K., Etemadmoghadam, D., Locandro, B., et al. (2008). Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin. Cancer Res.* 14, 5198–5208.
- Trimboli, A.J., Fukino, K., De Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., et al. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 937–945.
- Tsuruchi, N., Kamura, T., Tsukamoto, N., Akazawa, K., Saito, T., Kaku, T., To, N., and Nakano, H. (1993). Relationship between paraaortic lymph node involvement and intraperitoneal spread in patients with ovarian cancer—a multivariate analysis. *Gynecol. Oncol.* 49, 51–55.
- Turner, C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* 2, 231–236.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 347, 1260419–1260419.
- Umekawa, H., and Hidaka, H. (1985). Phosphorylation of caldesmon by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 56–62.
- Urban, N., McIntosh, M.W., Andersen, M., and Karlan, B.Y. (2003). Ovarian cancer screening. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 17, 989–1005.
- Vacca, A. (2001).  $\alpha\beta 3$  integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp. Hematol.* 29, 993–1003.
- Vachon, P.H. (2011). Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation. *J. Signal Transduct.* 2011, 738137.
- La Vecchia, C. (2017). Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur. J. Cancer Prev.* 26, 55–62.
- Verhaak, R.G.W., Tamayo, P., Yang, J.-Y., Hubbard, D., Zhang, H., Creighton, C.J., Fereday, S., Lawrence, M., Carter, S.L., Mermel, C.H., et al. (2012). Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* 123, 517–525.
- Vincent, T., Neve, E.P.A., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009). A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- $\beta$  mediated epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 11, 943–950.
- Vogetseder, A., Thies, S., Ingold, B., Roth, P., Weller, M., Schraml, P., Goodman, S.L., and Moch, H. (2013).  $\alpha v$ -Integrin isoform expression in primary human tumors and brain metastases. *Int. J. Cancer* 133, 2362–2371.
- Waisberg, J., De Souza Viana, L., Affonso Junior, R.J., Silva, S.R.M., Denadai, M.V.A., Margeotto, F.B., De Souza, C.S., and Matos, D. (2014). Overexpression of the ITGAV gene is associated with progression and spread of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 34, 5599–5607.
- Walsh, T., Casadei, S., Lee, M.K., Pennil, C.C., Nord, A.S., Thornton, A.M., Roeb, W., Agnew, K.J., Stray, S.M., Wickramanayake, A., et al. (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18032–18037.
- Wang, C.L.A. (2008). Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 644, 250–272.
- Wang, H., Chen, H., Jiang, Z., Lin, Y., Wang, X., Xiang, J., and Peng, J. (2019). Integrin subunit alpha V promotes growth, migration, and invasion of gastric cancer cells. *Pathol. Res. Pract.* 215,

152531.

- Wang, W., Wyckoff, J.B., Frohlich, V.C., Oleynikov, Y., Hüttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E.P., Singer, R.H., White, J.G., et al. (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res.* *62*, 6278–6288.
- Webb, P.M., and Jordan, S.J. (2016). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *41*, 3–14.
- Weber, C., Fraemohs, L., and Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 467–477.
- Weber, C.E., Li, N.Y., Wai, P.Y., and Kuo, P.C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, TGF- $\beta$ , and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. *J. Burn Care Res.* *33*, 311–318.
- Weidle, U.H., Birzele, F., Kollmorgen, G., and Rueger, R. (2016). Mechanisms and targets involved in dissemination of ovarian cancer. *Cancer Genomics and Proteomics* *13*, 407–424.
- Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2011).  $\alpha V$  integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *1*, a006478.
- Westermann, A.M., Havik, E., Postma, F.R., Beijnen, J.H., Dalesio, O., Moolenaar, W.H., and Rodenhuis, S. (1998). Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity. *Ann. Oncol.* *9*, 437–442.
- Whiteman, E.L., Liu, C.J., Fearon, E.R., and Margolis, B. (2008). The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene* *27*, 3875–3879.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* *19*, 156–172.
- Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T.N., and Kumar, P. (2011). IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol. Cancer Res.* *9*, 1658–1667.
- Yamada, K.M., and Geiger, B. (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 76–85.
- Yamashiro, S., Chern, H., Yamakita, Y., and Matsumura, F. (2001). Mutant caldesmon lacking cdc2 phosphorylation sites delays M-phase entry and inhibits cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* *12*, 239–250.
- Yang, D., Sun, Y., Hu, L., Zheng, H., Ji, P., Pecot, C. V., Zhao, Y., Reynolds, S., Cheng, H., Rupaimoole, R., et al. (2013). Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer Cell* *23*, 186–199.
- Yang, D., He, Y., Wu, B., Deng, Y., Wang, N., Li, M., and Liu, Y. (2020a). Integrated bioinformatics analysis for the screening of hub genes and therapeutic drugs in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* *13*, 10.
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., et al. (2020b). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 341–352.
- Ye, X., and Weinberg, R.A. (2015). Epithelial – mesenchymal plasticity: A central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* *25*, 675–686.
- Ye, X., Brabletz, T., Kang, Y., Longmore, G.D., Nieto, M.A., Stanger, B.Z., Yang, J., and Weinberg, R.A. (2017). Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis. *Nature* *547*, E1–E6.
- Yeung, T.-L., Leung, C.S., Yip, K.-P., Au Yeung, C.L., Wong, S.T.C., and Mok, S.C. (2015). Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *309*, C444–56.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 15–33.
- Yin, J., Zeng, F., Wu, N., Kang, K., Yang, Z., and Yang, H. (2015). Interleukin-8 promotes human ovarian cancer cell migration by epithelial–mesenchymal transition induction in vitro. *Clin. Transl.*



Oncol. 17, 365–370.

Yoshida, S., Furukawa, N., Haruta, S., Tanase, Y., Kanayama, S., Noguchi, T., Sakata, M., Yamada, Y., Oi, H., and Kobayashi, H. (2009). Expression profiles of genes involved in poor prognosis of epithelial ovarian carcinoma: a review. *Int. J. Gynecol. Cancer* 19, 992–997.

Yoshio, T., Morita, T., Kimura, Y., Tsujii, M., Hayashi, N., and Sobue, K. (2007). Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation. *FEBS Lett.* 581, 3777–3782.

Zavadil, J., and Böttinger, E.P. (2005). TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764–5774.

Zebrowski, B.K., Yano, S., Liu, W., Shaheen, R.M., Hicklin, D.J., Putnam, J.B., and Ellis, L.M. (1999). Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin. Cancer Res.* 5, 3364–3368.

Zeisberg, M., and Neilson, E.G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119, 1429–1437.

Zemskov, E.A., Loukinova, E., Mikhailenko, I., Coleman, R.A., Strickland, D.K., and Belkin, A.M. (2009). Regulation of platelet-derived growth factor receptor function by integrin-associated cell surface transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 284, 16693–16703.

Zeppernick, F., and Meinhof-Heerlein, I. (2014). The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* 290, 839–842.

Zhang, M., Luo, W., Huang, B., Liu, Z., Sun, L., Zhang, Q., Qiu, X., Xu, K., and Wang, E. (2013). Overexpression of JAM-A in non-small cell lung cancer correlates with tumor progression. *PLoS One* 8, e79173.

Zhang, S., Dolgalev, I., Zhang, T., Ran, H., Levine, D.A., and Neel, B.G. (2019). Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma. *Nat Commun* 10:5367, 1–16.

Zhang, X.X., Pei, Z., Ji, C., Zhang, X.X., Xu, J., and Wang, J. (2017a). Novel insights into the role of the cytoskeleton in cancer. *Cytoskeleton - structure, dynamics, function and disease.*

Zhang, Y., Alexander, P.B., and Wang, X.F. (2017b). TGF- $\beta$  family signaling in the control of cell proliferation and survival. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, 84–89.

Zhao, C., Lu, F., Chen, H.H., Zhao, X., Sun, J., and Chen, H.H. (2014). Dysregulation of JAM-A plays an important role in human tumor progression. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 7242–7248.

Zhao, C., Wang, A., Lu, F., Chen, H., Fu, P., Zhao, X., and Chen, H. (2017). Overexpression of junctional adhesion molecule-A and EphB2 predicts poor survival in lung adenocarcinoma patients. *Tumor Biol.* 39, 101042831769100.

Zheng, P.-P., Van Der Weiden, M., and Kros, J.M. (2007). Hela 1-CaD is implicated in the migration of endothelial cells/endothelial progenitor cells in human neoplasms. *Cell Adh. Migr.* 1, 84–91.

Zhou, Y., Layton, O., and Hong, L. (2018). Identification of genes and pathways involved in ovarian epithelial cancer by bioinformatics analysis. *J. Cancer* 9, 3016–3022.

---

## 8. PRILOZI

---

### Biografija

Ivana Boljević rođena je 14. septembra 1987. godine u Beogradu gde je završila Osmu beogradsku gimnaziju. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisala je 2006. godine, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,27 i ocenom deset na diplomskom ispitu. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna onkologija upisala je 2013. godine. Iste godine zaposlila se kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za molekularnu genetiku na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Farmakodinamska i farmakogenomska ispitivanja novijih lekova u lečenju solidnih tumora”. Zvanje istraživač saradnik stiče 2015. godine. Učesnik je međunarodne COST akcije koja se bavi ispitivanjem karcinoma debelog creva, a od 2020. godine član je Promis projekta Fonda za Nauku Republike Srbije pod nazivom „TRACEPIGEN: Praćenje rezistencije na sistemsku terapiju u kanceru pluća i kolorektuma putem ciljane analize genetičkih i epigenetičkih varijanti u tečnim biopsijama metodom nove generacije sekvenciranja ”. Do sada je publikovala 9 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja kao i veći broj saopštenja na nacionalnim i međunarodnim skupovima. Dobitnica je nekoliko nagrada i stipendija od strane prestižnih kompanija i organizacija kao što su Novartis, EACR i ESO.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ивана Бољевић

Број индекса Б3041/2013

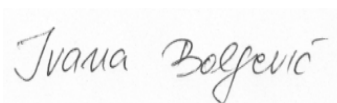
### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај експресије *JAM-A*, *ITGAV* и *CALD1* гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома  
јајника**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда



У Београду, 06.06.2021.

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Бољевић

Број индекса Б3041/2013

Студијски програм Биологија, Молекуларна онкологија

Наслов рада Утицај експресије JAM-A, ITGAV и CALD1 гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома јајника

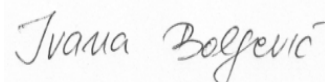
Ментори др Емина Малишић и др Маја Чакић Милошевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда



У Београду, 06.06.2021.

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Утицај експресије JAM-A, ITGAV и CALD1 гена на метастатски потенцијал ћелија хуманог карцинома јајника**

која је моје ауторско дело.

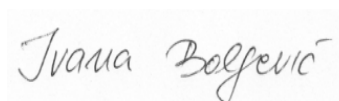
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис докторанда**



У Београду, 06.06.2021.

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.