Izražaj glikosfingolipida na matičnim stanicama trostruko negativnog raka dojke nakon tretmana novosintetiziranim spojem 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamidom

Marijan, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:968070

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

SANDRA MARIJAN

IZRAŽAJ GLIKOSFINGOLIPIDA NA MATIČNIM STANICAMA TROSTRUKO NEGATIVNOG RAKA DOJKE NAKON TRETMANA NOVOSINTETIZIRANIM SPOJEM 3-AMINO-N-(3-KLORO-2-METILFENIL)-5-OKSO-5,6,7,8-TETRAHIDROTIENO [2,3-*b*]KINOLIN-2-KARBOKSAMIDOM

DOKTORSKI RAD

Split, 2022.

Doktorska disertacija sadrži rezultate znanstvenih istraživanja provedenih u Laboratoriju za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

VODITELJICA RADA: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Zahvala

Imati prof. dr .sc. Vedranu Čikeš Čulić za mentoricu je privilegija. Imati je za prijateljicu je blagoslov. Hvala Ti!

Hvala prof. dr. sc. Aniti Markotić što me „zarazila" glikobiologijom i bila podrška na svakom koraku ovog puta, kao prijateljica i znanstvenica.

Od sveg srca hvala dragim kolegicama Marini, Nikolini, Angeli i Mireli na njihovoj nesebičnoj podršci.

Zahvaljujem članovima stručnog povjerenstva prof. dr. sc. Darku Modunu, izv. prof. dr. sc. Tomislavu Omrčenu i prof. dr. sc. Katarini Vilović na dragocjenim komentarima i prijedlozima.

Hvala voditeljima studija prof. dr. sc. Damiru Sapunaru i prof. dr. sc. Liviji Puljak te Juliji Pusić, mag. iur. iz Službe za poslijediplomske studije.

Veliko hvala prof. dr. sc. Stipanu Jankoviću na bezuvjetnoj podršci svih ovih godina.

Od srca se zahvaljujem ing. Tončici Jakšić, velikoj dami i radnici, osobi koja me naučila nositi se s izazovima našega posla na samim početcima mog profesionalnog puta.

Ne postoje riječi kojima bih mogla izraziti zahvalnost i sreću što sam izabrana biti kćerkom, sestrom, tetom, suprugom i prijateljicom baš njima… Mojim ovozemaljskim anđelima: mami, bratu, Leni, Goranu, Ivani i Tei. Hvala!

Mom uzoru, životnoj radosti, snazi i zaštiti, mome Tati…

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD ……...1

1.1. Rak dojke……...2

1.1.1. Trostruko negativni rak dojke 6

1.1.2. Matične stanice raka 8

1.2. Fosfolipaza kao ciljna molekula u istraživanju terapije raka ……..12

1.3. 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid ……16

1.4. Glikosfingolipidi ……18

1.4.1. Građa i funkcija glikosfingolipida 18

1.4.2. Uloga glikosfingolipida u karcinomima 25

2. CILJEVI I HIPOTEZE ……29

2.1. Cilj istraživanja ……...30

2.2. Hipoteze ……..30

3. MATERIJALI I METODE ……31

4.1. Stanične kulture trostruko negativnog raka dojke ……..32

4.2. Spoj (3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid ……32

4.3. Mjerenje citotoksične aktivnosti ……32

4.4. Protočna citometrija ……34

4.4.1. Apoptoza.....34

4.4.2. Određivanje izražaja glikosfingolipida na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke 35

4.5. Test stvaranja mamosfera - aktivnost CSC …… 37

4.6. Statistički postupci ……..38

5. REZULTATI ……..39

5.1. Citotoksično djelovanje Spoja ovisno o vremenu i koncentraciji ……..40

5.2. Mehanizam stanične smrti ……..42

5.3. Stvaranje mamosfera ……..43

5.4. Matične stanice raka ……...44

5.5. Izražaj glikosfingolipida na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke ……..……45

5.5.1. Izražaj terminalno sijaliniziranih gangliozida na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke 46

5.5.2. Izražaj gangliozida i neutralnih glikosfingolipida s terminalnim GalNAc ostatkom na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke 48

5.5.3. Izražaj neutralnog glikosfingolipida s terminalnim Gal ostatkom na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke …….……...50

5.5.4. Izražaj glikosfingolipida na netretiranim matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke stanične linije MDA-MB-231 52

6. RASPRAVA ……...53

7. ZAKLJUČCI ……...60

8. LITERATURA ……62

9. SAŽETAK ……..79

10. SUMMARY ……81

11. ŽIVOTOPIS ……83

POPIS OZNAKA I KRATICA

IV^{3}Neu5Ac-nLc$_4$Cer	gangliozid neolaktoserije sa sijalinskom kiselinom vezanom glikozidnom vezom α2–3 za četvrti glikozidni ostatak, NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Cer
IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer	gangliozid neolaktoserije sa sijalinskom kiselinom vezanom glikozidnom vezom α2–6 za četvrti glikozidni ostatak, NeuAcα2-6Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Cer
ALDH1A1	član A1 obitelji aldehid dehidrogenaze, od engl. *Aldehyde Dehydrogenase Family 1 member A1*
B3GALT4	β-1,3-galaktoziltransferaza 4
B3GNT5	β-1, 3-N-acetil-glukozaminil-transferaza 5
BCSC	matične stanice raka dojke, od engl. *Breast Cancer Stem Cells*
BL	podtip trostruko negativnog raka dojke nalik bazalnom, od engl. *Basal-Like*
BLIS	imunosuprimirani podtip nalik bazalnom, od engl. *Basal-Like Immune Suppressed*
BLIA	imunoaktivirani podtip nalik bazalnom, od engl. *Basal-Like Immune Activated*
BRCA1/2	tumor supresorski geni, od engl. *BReast CAncer gene 1/2*
CD	razlikovna skupina, od engl. *Cluster of Differentiation*
CI	interval pouzdanosti, od engl. *Confidence Interval*
CK5	citokeratin 5
CK17	citokeratin 17
CSC	matične stanica raka, od engl. C*ancer Stem Cells*
CTLA 4	antigen 4 povezan sa citotoksičnim T-limfocitima, od engl. *Cytotoxic T Lymphocyte–associated Antigen 4*
DAG	diacilglicerol
DMEM	medij za uzgoj staničnih kultura, od engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	dimetilni sulfoksid, od engl. *Dimethyl Sulfoxide*
eEF2K	kinaze za elongaciju eukariotskog čimbenika 2, od engl. *eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase*
EGF	epidermalni čimbenik rasta, od engl. *Epidermal Growth Factor*
EGFR	receptor epidermalnog čimbenika rasta, od engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*

EMA	Europska agencija za lijekove, od engl. *European Medicines Agency*
EMT	epitelno-mezenhimalna pretvorba, od engl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*
ER	estrogenski receptor
FBS	fetalni goveđi serum, od engl. *Fetal Bovine Serum*
FDA	Američka agencija za ranu i lijekove, od engl. *Food and Drug Administration*
FEC	fluoracil, epirubicin i ciklofosfamid
FGFR	receptor za fibroblastni čimbenik rasta, od engl. *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FITC	fluorescein izotiocijanat
FT	Fourier transform metoda
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GalNAc-GM1b	gangliozid, N-acetilgalaktozaminil GM1b, IV^3Neu5Ac-Gg_5Cer, GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-Cer
GALNT	N-acetilgalaktozaminil transferaza
GALNT3	N-acetilgalaktozaminil transferaza 3
GALNT14	N-acetetilgalaktozaminil transferaza 14
Gb_4Cer	globotetraozilceramid, GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer
Gb_5Cer	globopentaozilceramid, IV^3GalGb_4
GD2	gangliozid, Galβ3GalNAcβ3Galα4Ga lβ4GlcβCer
GD3	gangliozid, II^3(Neu5Ac)$_2$-LacCer, NeuAcα2-8NeuAcα2-3Galβ1-4Glcβ-Cer
GEM	membrane bogate glikolipidima, od engl. G*lycolipid-enriched Membrane*
GFR	superobitelj receptora čimbenika rasta, od engl. *Growth Factor Receptor*
Gg_3Cer	gangliotriaozilceramid, GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer
GM2	gangliozid, II^3Neu5Ac‑GalNAcβ1‑4Galβ1‑4Glcβ1‑1Cer, GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ-Cer
GM3	gangliozid, II^3Neu5Ac‑LacCer, NeuAcα2-3Galβ1-4Glcβ-Cer

GMI	geometrijska srednja vrijednost intenziteta fluorescencije, od engl. *Geometric Mean Intensity*
GPCR	receptor povezan s G proteinom, od engl. *G Protein Coupled Receptor*
GSL	glikosfingolipidi
HER2	receptor 2 ljudskog epidermalnog čimbenika rasta, od engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor* 2
HGFR	receptor za čimbenik rasta hepatocita, od engl. *Hepatocyte Growth Factor Receptor*
HMLE-Twist-ER	epitelne stanice dojke sa receptorom za Twist i estrogen, od engl. *Human Mammary Epithelial cell–Twist-Estrogen Receptor*
HPTLC	tekućinska tankoslojna kromatografija velike djelotvornosti, od engl. *High-performance liquid thin layer chromatography*
IC_{50}	koncentracija koja smanjuje preživljenje stanica za 50%, od engl. *the half maximal inhibitory concentration*
IGF	čimbenik rasta nalik inzulinu, od engl. *Insulin-like Growth Factor*
IM	imunomodulatorni podtip trostruko negativnog raka dojke
IP_3	inozitol 1,4,5-trifosfat, od engl. *inositol 1,4,5-triphosphate*
LAR	luminalni podtip trostruko negativnog raka dojke s izraženim androgenskim receptorom, od engl. *Luminal Androgen Receptor*
MES	mezenhimalni podtip trostruko negativnog raka dojke
MAPK	mitogenom aktivirane protein kinaze
MDR1	protein 1 otporan na lijekove, od engl. *Multidrug Resistance Protein 1*
MSL	podtip trostruko negativnog raka dojke nalik matično mezenhimalnom, od engl. *Mesenchymal Stem–Like*
mTOR	protein kinaza, od engl. *Mammalian target of rapamycin*
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid
ne-SCC	ne-matične stanice raka, engl. *Non-Stem Cancer Cells*
Neu5Ac	5-N-acetilneuraminska kiselina ili sijalinska kiselina
nLc_4Cer	neolaktotetraoza, Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer
PI3K/Akt	fosfatidlilinozitol 3-kinazni/protein kinaza B signalni put, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)*

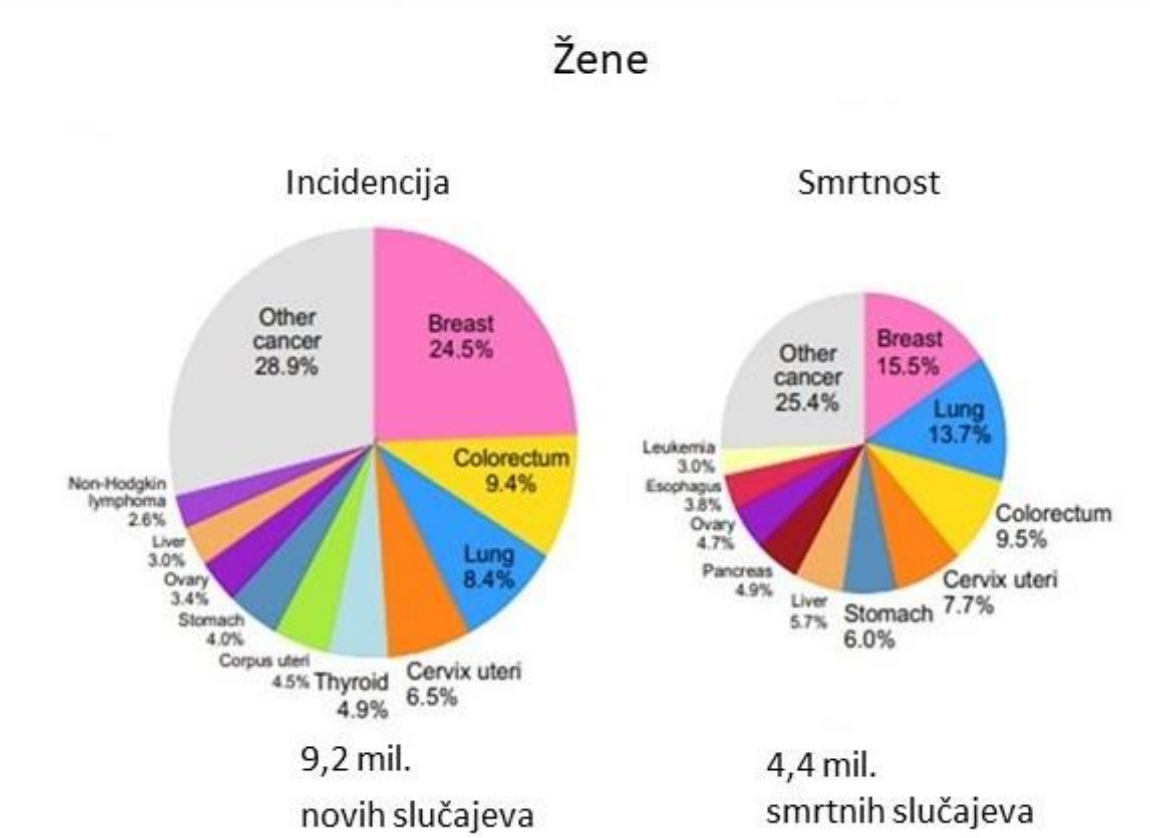
P2Y12R	receptor trombocita za ADP (adenozin 5'difosfat), od engl. *Platelet P2Y12 Receptor*
PARP inhibitori	inhibitori enzima poli (ADP-riboza) polimeraze
PBS	fosfatni pufer, od engl. *Phosphate-Buffered Saline*
PDGFR	receptor za čimbenik rasta koji potječe od trombocita, od engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*
PD-1	protein izražen na imunološkim stanicama, od engl. *Programmed cell death* 1
PD-L1	ligand za PD-1, protein izražen na stanicama raka, od engl. *Programmed cell death ligand* 1
PDK1	kinaza 1 ovisna o fosfoinozitid 3, od engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*
PE/Cy7	fikoeritin/cijanin7
PI3K/mTOR	fosfatidlilinozitol 3-kinaza/meta za rapamicin sisavaca signalni put, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/mammalian Target of Rapamycin (mTOR)*
PIM-1	serin/treonin kinaza, provirusno umetanje u kinaze mišjeg limfoma, od engl. *proviral insertion in murine lymphoma kinases*
PI-PLC	fosfoinozitid specifična fosfolipaza C, od engl. *Phosphoinositide specific-Phospholipase C*
pi-PLC-γ	fosfoinozitid specifična fosfolipaza γ, od engl. *Phosphoinositide specific-Phospholipase C-γ*
PIP2	fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat, od engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*
PKC	protein kinaza C, od engl. *Protein Kinase C*
PR	progesteronski receptor
RAF/RAS/ERK	signalna kaskada, od engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF)/Rat sarcoma (RAS)/extracellular-signal-regulated kinase (ERK)*
Ras/MAPK	signalni put Ras/protein kinaza aktivirana mitogenom, od engl. *Rat sarcoma viral oncogene(Ras)/mitogen-activated protein kinase (MAPK)*
ROS	reaktivni oblici kisika, od engl. *Reactive oxygen species*
RTK	receptorske tirozin kinaze

SERMs	selektivni modulatori receptor estrogena, od engl. *Selective estrogen receptor modulators*
ST6Gal	ST6 β-Galaktozid α-2,6-sijalil transferaza, od engl. *Sarcoma*
Src	nereceptorska tirozin kinaza
SSEA-3	embrionski antigen specifičan za stupanj razvoja, poznat kao Gb5, od engl. *Stage-specific embryonic antigen*
TACA	ugljikohidratni antigeni povezani sa rakom, od engl. *Tumour-associated carbohydrate antigens*
TDP1	tirozil DNA fosfodiesteraza 1, od. engl. *Tyrosyl–DNA Phosphodiesterase*
TNBC	trostruko negativni rak dojke, od engl. *Triple-Negative Breast Cancer*
TP53	tumor supresorski gen P53
UDP-GalNAc	uridin-difosfat_N-acetilglalaktozamin
VEGFR	receptor za čimbenik rasta vaskularnog endotela, od engl. *Vascular endothelial growth factor Receptor*
uPAR	receptor aktivatora plazminogena urokinaze, od engl. *urokinase plasminogen activator receptor*
VDAC2	anionski kanal ovisan o voltaži, od engl. *voltage-dependent anion channel* 2)
vHTS	probir na temelju računalnog modeliranja metodom vHTS, od engl. *virtual High Throughput Screen*

1. UVOD

1.1. Rak dojke

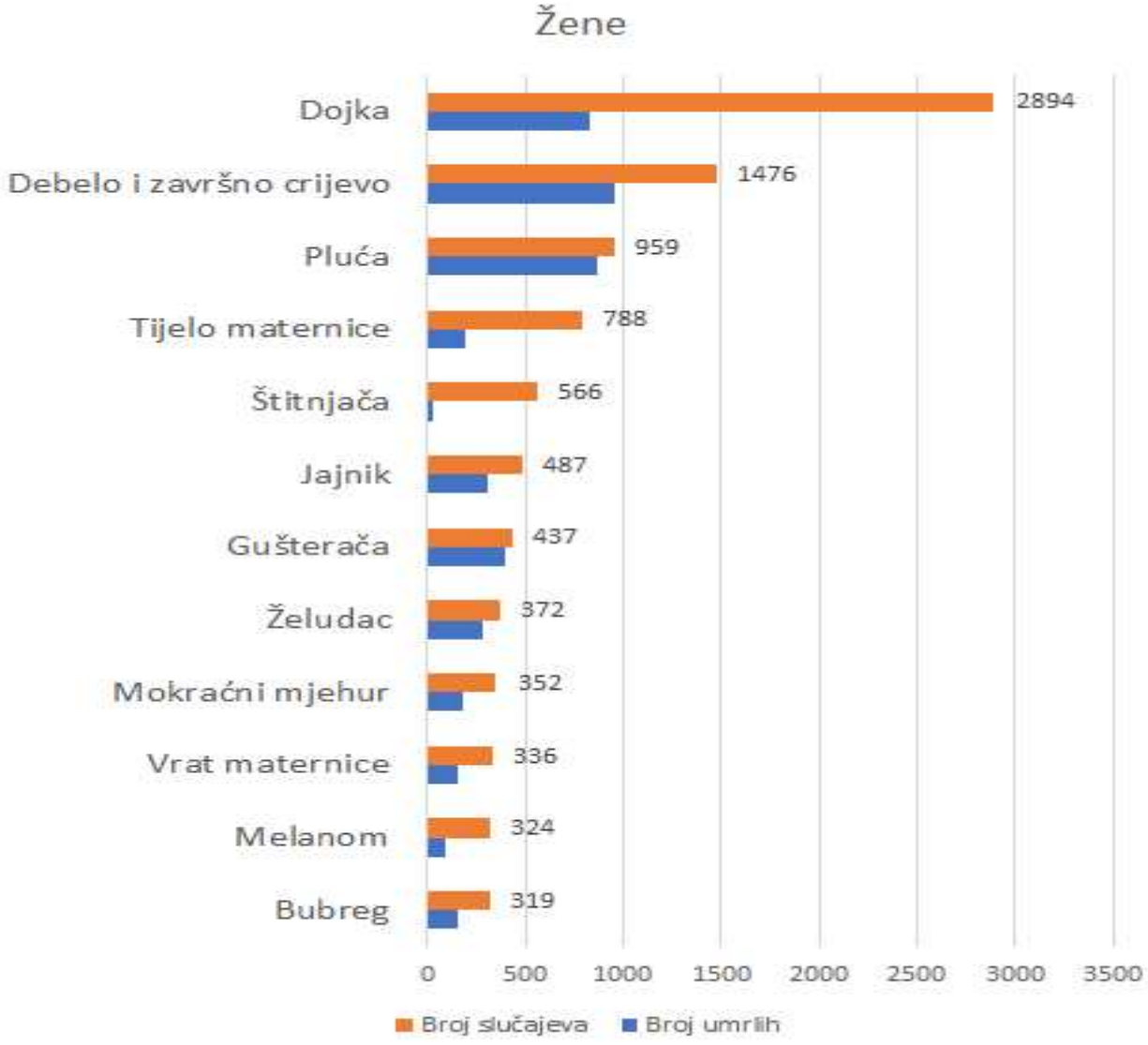
Prema podatcima Svjetske zdravstvene organizacije za 2020. godinu, rak je prvi ili drugi vodeći razlog mortaliteta do 70 godina u 112 od 183 zemalja. Među zloćudnim tumorima, karcinom dojke ima udio 11,7 % među novooboljelima oba spola, dok kod žena incidencija iznosi 24,5 %, a smrtnost 15,5 % (Slika 1.) (1).



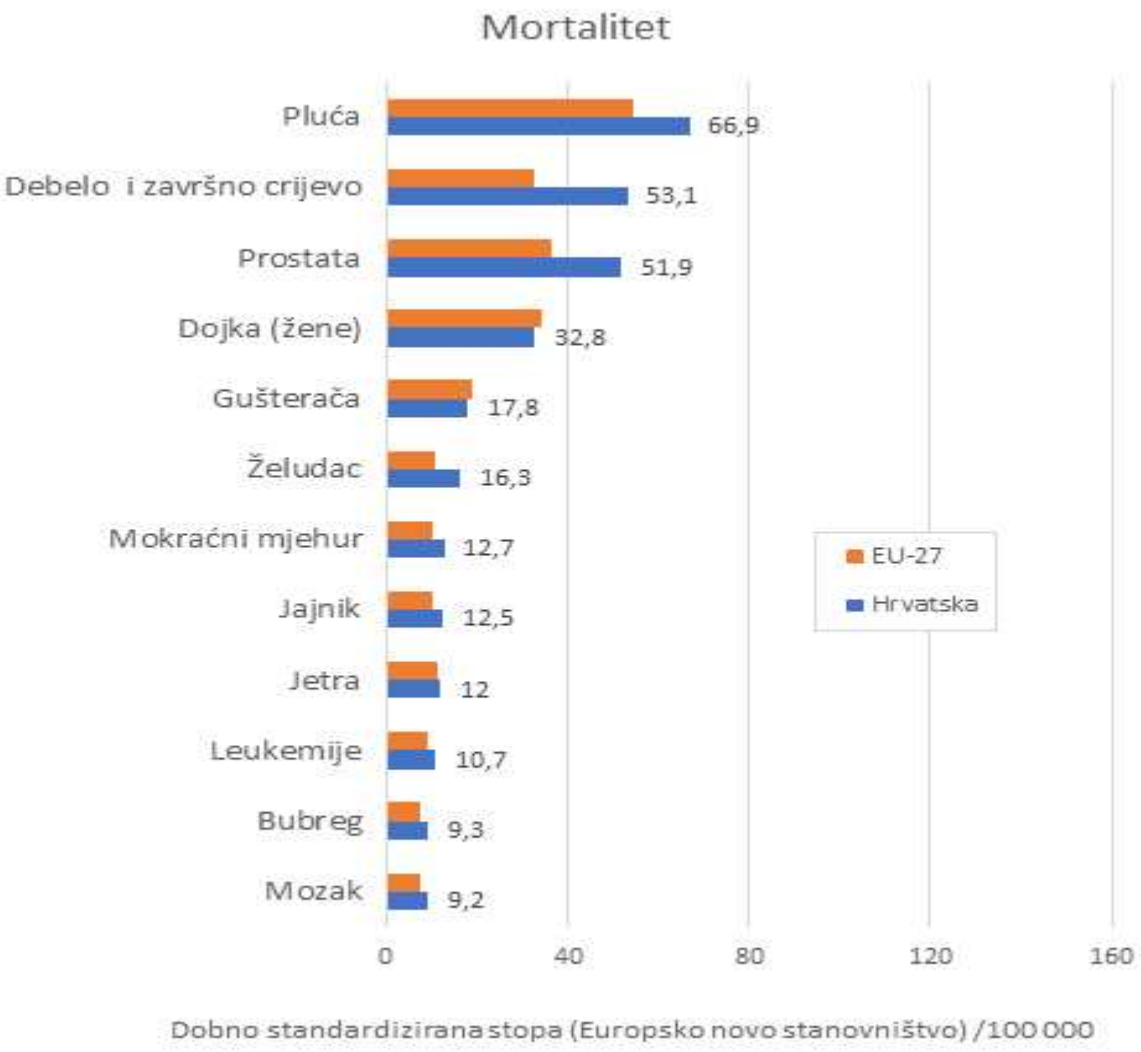
Slika 1. Distribucija incidencije deset najuobičajenijih karcinoma i ostalih karcinoma kod žena te distribucija mortaliteta kao posljedice karcinoma u 2020. godini.
Izvor GLOBOCAN 2020. (1)

Prema procjenama zajedničkog istraživačkog centra (engl. *Joint Research Centre, JRC*) Europske komisije i Europske mreže registara za rak (engl. *European Network of Cancer Registries*, ENCR) te Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) o opterećenju rakom u EU-27 zemljama za 2020. godinu, rak dojke je najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest. Više od 355 000 žena u zemljama članicama EU će

se prema procjenama u 2020. godini suočiti s dijagnozom raka dojke (13,3% od svih dijagnoza raka). Najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj 2020. godine je rak debelog crijeva (3 706 novih slučajeva), zatim rak pluća (3 235) i rak dojke (2 894). Vodeći zloćudni uzroci smrti su rak pluća (2 984 smrti), rak debelog crijeva (2 320) i rak dojke (832) (Slike 2. i 3.).



Slika 2. Najčešća sijela raka u Hrvatskoj, žene, 2020. godina (2)



Slika 3. Mortalitet od raka u Hrvatskoj i EU-27 u 2020. godini (2)

Ranije dijagnosticiranje, razvoj tehnologije i ciljana terapija značajno su poboljšali preživljenje pacijentica pa tako trenutno oko 98 % pacijentica s ranim stadijem raka dojke ima stopu preživljenja 10-15 godina i više. Iako je smrtni ishod u padu (pad od 40 % od 1989. do 2017.), petogodišnje preživljenje u slučaju lokalizirane bolesti je 99 %, u slučaju regionalne bolesti 86 %, dok kod pacijentica s udaljenim metastazama iznosi svega 27 %. Kada se kombiniraju svi stadiji bolesti, petogodišnje preživljenje za 2020. godinu iznosilo je 90 %, što znači da je značajan broj od 10 % pacijentica s rakom dojke koje i dalje podliježu kemo-refraktornoj metastatskoj i neoperabilnoj bolesti. Prognoza za pacijentice s lokalno uznapredovalom i metastatskom bolešću ostaje loša. Metastatski rak dojke pokazuje dinamičnu,

nepredvidivu i brzo razvijajuću genetsku raznolikost te biološku heterogenost te, unatoč mnogim naprecima u dijagnostici i terapiji posljednjih 30 godina, ostaje neizlječiv (3).

Na temelju izražaja receptora za estrogen (ER), progesteron (PR) i receptor 2 za epidermalni čimbenik rasta (HER2, od engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)*, rak dojke se klasificira u četiri molekularno različita tipa (4): 1. luminalni A tip (ER pozitivan, PR pozitivan, HER2 negativan), 2. luminalni B tip, koji ima dva podtipa, HER2 negativni (ER pozitivan, PR negativan ili nisko izražen, HER2 negativan) i HER2 pozitivni podtip (ER pozitivan, PR pozitivan, HER2 pozitivan), 3. HER2 pozitivan tip (ER negativan, PR negativan, HER2 pozitivan) i 4. nalik bazalnom ili trostruko negativni karcinom dojke (TNBC, od engl. T*riple-Negative Breast Cancer*; ER negativan, PR negativan, HER2 negativan) (5, 6), kao što je prikazano u Tablici 1. Luminalni A tip raka dojke se definira kao ER pozitivan i histološki je niskog gradusa, dok je luminalni B tip uglavnom ER pozitivan, ali izražaj hormona je puno manji i obično su visokog gradusa (7).

Tablica 1. Molekularna podjela raka dojke, prema Yin i sur. (6)

PODTIPOVI RAKA DOJKE	**Definicija**	**Terapija**
LUMINALNI TIP A	$ER^+PR^+HER2^-$Ki-67nizak (<14%)	Endokrina
LUMINALNI TIP B	a) Luminalni tip B (HER^-) ER^+HER2^- i bar jedno od: Ki-67 visok, PR negativan ili nizak (<20%)	Endokrina ± citotoksična
	b) Nalik luminalnom tipu B (HER^+) ER^+HER2 prekomjerno izražen ili umnožen; prisustvo ili Ki-67, ili PR	Endokrina ± citotoksična + protu-HER2
PREKOMJERAN IZRAŽAJ HER2	HER2 prekomjerno izražen ili umnožen; bez izražaja ER i PR	Citotoksična + protu-HER2
TROSTRUKO NEGATIVNI TIP	$ER^-PR^-HER2^-$	Citotoksična

1.1.1. Trostruko negativni rak dojke

Trostruko negativni rak dojke, TNBC, je agresivna i heterogena bolest, definirana nedostatkom receptora za estrogen, progesteron te receptora 2 za epidermalni čimbenik i čini 10 – 25 % karcinoma dojke. Zbog nedostatka ciljane molekularne terapije, ovaj tip raka je najagresivniji, s najlošijom prognozom (5, 8-10). Incidencija TNBC jednaka je u cijelom svijetu, a češće obolijevaju žene mlađe od 40 godina, žene afričkog i hispano podrijetla te nositeljice BRCA1/2 mutacije (4, 11). Češće se javlja i kod žena unutar Aškenazi populacije (8). BRCA1 gen prisutan je u 75 % žena s trostruko negativnim rakom dojke ili tipu nalik bazalnom (12). Osnovna obilježja TNBC i terapijske mogućnosti u liječenju prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Glavne karakteristike trostruko negativnog raka dojke (preuzeto i pojednostavljeno od Foulkes et al.) (12) te dopunjeno prema zadnjim smjernicama odobrenim od FDA i EMA

MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE	**Histološki tip**	Najčešće duktalni karcinom
	Histološki gradus	Uglavnom gradus 3
	Medularni ili atipični	Povremeno moguć
	Metaplastični elementi	Povremeno mogući
IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ	**Estrogenski receptor**	Negativan
	Progesteronski receptor	Negativan
	HER2	Negativan
	EGFR	Često pozitivan
	CK5 ili CK17	Često pozitivan
	Ciklin E	Često pozitivan
MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE	***TP53* mutacija**	Prisutna ponekad, često skraćena
	Stupanj aneuploidije	Obično visok
	Izražaj gena	Često tip nalik bazalnom, ponekad klaudin niski tip
PROGNOZA PREŽIVLJENJA	**5 godina**	Srednje
	10 godina	Rijetko
TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI	**Hormonska terapija**	Ne
	Trastuzumab	Ne
	Kemoterapija	Da, najčešće doksorubicin i taksan
	Drugi učinkoviti spojevi	PARP inhibitori, soli platine, sredstva protiv angiogeneze Anti-PD-L1 imunoterapija: atezolizumab u kombinaciji s nabpaklitakselom i pembrolizumab s karboplatinom, paklitakselom ili nab-paklitakselom

Patološka obilježja trostruko negativnog raka dojke prilikom postavljanja dijagnoze uključuju veličinu tumora veću od prosječne, veći gradus i proliferacijski indeks u odnosu na ne-TNBC. TNBC ima najgori ishod od svih podtipova, s petogodišnjim preživljenjem od 78,5 %. Jedna od tri oboljele od TNBC imat će povrat bolesti, a jedna od pet pacijentica će razviti metastatsku bolest u manje od pet godina od postavljanja dijagnoze (4). Jedan od razloga loših ishoda TNBC je nedostatak učinkovite terapije koja se uobičajeno koristi za liječenje hormonski ovisnih karcinoma dojke. Temelj terapije TNBC je kemoterapija antrakcilinima i taksanima, a uspješnom se pokazala terapija TNBC sa mutiranim BRCA genom solima platine. Kapecitabin se često koristi kao adjuvantna terapija (13). Endokrina terapija poput selektivnih modulatora estrogenskog receptora, SERMs (od engl. *Selective Estrogen Receptor Modulators*) i inhibitora aromataze ili terapija protu-HER2 monoklonalnim protutijelima poput trastuzumaba je neučinkovita u terapiji TNBC zbog neizraženih ili slabo izraženih receptora za estrogen, progesteron i receptor 2 epidermalnog čimbenika rasta (4).

Na temelju klasifikacije TNBC pomoću genskog izražaja, najviše se zna o podtipu TNBC nalik bazalnom, koji predstavlja 15 – 20 % svih karcinoma dojke. Ranije je ovaj tip bio klasificiran na temelju izražaja keratina 5 i 17, integrina β4 i laminina i otprilike 80 % se podudara sa imunohistokemijskom klasifikacijom TNBC. Rjeđa podvrsta raka dojke nazvana klaudin-niski podtip je također trostruko negativan. Ovaj podtip karakteriziran je nedostatkom izražaja biljega luminalne diferencijacije, jako izraženim biljezima epitelno-mezenhimalne pretvorbe (engl. E*pithelial-Mesenchymal Transition,* EMT), genima imunološkog odgovora i obilježjima nalik matičnim stanicama raka (14). Lehmann i suradnici su 2011. godine analizirali izražaj gena iz preko 500 uzoraka TNBC i identificirali su šest jedinstvenih podtipova: dva podtipa nalik bazalnom (engl. *Basal-like*, BL 1 i BL 2), imunomodulatorni (IM), mezenhimalni (MES), nalik matično mezenhimalnom (engl. *mesenchymal stem–like*, MSL) i luminalni tip s izraženim androgenskim receptorom (LAR, od engl. *luminal androgen receptor*). Istraživanja na staničnim linijama podtipova su pokazala da su BL 1 i BL 2 osjetljivi na cisplatin, MES i MSL na inhibitore PI3K/mTOR i Src, dok su stanične linije LAR podtipa osjetljive na antagonist androgenskog receptora (15). Kasnije, 2015. godine Burnstein i suradnici su, analizirajući oko 200 uzoraka TNBC, koristeći izražaj mRNA i profiliranje DNA, modificirali ovu podjelu na četiri podtipa TNBC: 1) LAR, 2) MES, 3) imunosuprimirani podtip nalik bazalnom, BLIS (engl. *Basal-Like Immune Suppressed*) i 4) imunoaktivirani podtip nalik bazalnom, BLIA (engl. *Basal-Like Immune Activated*), među kojima BLIS podtip ima najlošiju, a BLIA podtip najbolju prognozu (16). U praksi se TNBC i bazalni BC često smatraju sinonimima, ali na temelju dostupnih znanstvenih podataka, postoji značajno, ali ne i potpuno preklapanje (13).

Smatra se da napredovanje tumora omogućava njihova subpopulacija matičnih stanica raka, CSC (od engl. *Cancer Stem Cells*). CSC su pluripotentne stanice raka, a uključene su u procese stvaranja tumora i metastaziranja (17).

1.1.2. Matične stanice raka

Matične stanice raka su mala, proliferirajuća subpopulacija stanica raka koja ima sposobnost samoobnavljanja te iz njih ponovno može nastati primarni tumor (18, 19). Prvi put ih spominju Dick i sur. 1997. godine kod akutne mijeloične leukemije (20). CSC čine samo 0,05 - 1 % stanica unutar svih stanica tumora (21), a njihovo podrijetlo nije do kraja razjašnjeno. Neki znanstvenici smatraju da CSC potječu iz matičnih stanica tkiva s malignim promjenama, dok drugi istraživači smatraju da CSC potječu od diferenciranih stanica koje zloćudnom transformacijom imaju tendenciju iniciranja matičnosti (22). CSC su pronađene u različitim tumorima, uključujući rak dojke, jajnika, mokraćnog mjehura, želuca, crijeva, gušterače, prostate i pluća (23). Smatra se da ne-SCC stanice mogu steći svojstva matičnosti putem EMT, na način da epitelni fenotip zamijeni mezenhimalni fenotip. Mezenhimalni fenotip se povezuje s povećanim kapacitetom za migraciju, povećanom otpornošću na apoptozu, povećanom proizvodnjom enzima koji degradiraju vanstanični matriks te povećanom sklonošću invazije (17, 24).

Matične stanice raka dojke (engl. *Breast Cancer Stem* Cells, BCSC) pokazuju jedinstvene karakteristike, uključujući tumorigenost, samoobnovu, diferencijaciju, metastatski potencijal i, što je najvažnije, terapijsku rezistenciju na većinu protutumorskih terapija te se smatra da su upravo BCSC odgovorne za povratak tumora i metastaziranje (17, 25-28). Ove stanice pokazuju povećan kapacitet za stvaranje mamosfera, invazivnost i otpornost na kemo- i radioterapiju (22, 29). Smatra se da je otpornost na terapiju uzrokovana smanjenom otpornošću BCSC na reaktivne vrste kisika, povećanom ekspresijom proteina odgovornih za otpornost na lijekove i povećanim kapacitetom za obnavljanje DNA (18, 30-32). Na osnovne karakteristike BCSC, koje su pod kontrolom kompleksnih, strogo reguliranih molekularnih mehanizama, utječe i mikrookoliš. Međudjelovanje stanica tumora i mikrookoliša utječe na raznovrsnost tumora, tako da BCSC karakterizira različit izražaj staničnih biljega (33).

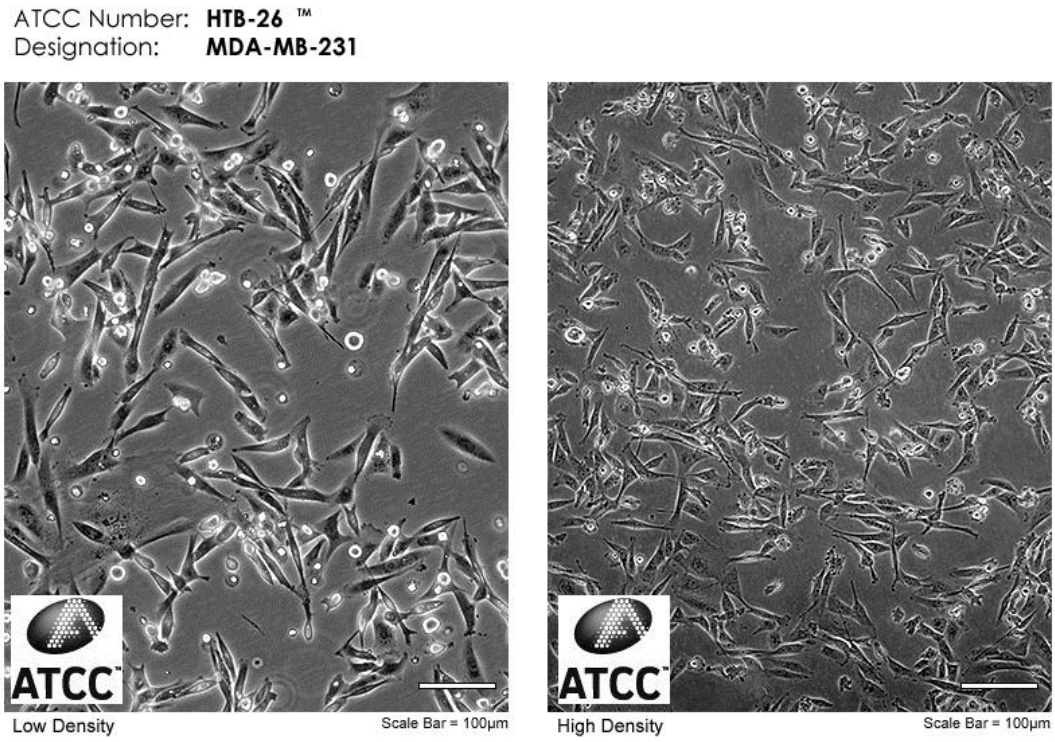
Kao glavni biljezi BCSC koriste se transmembranski glikoprotein CD44, za čiji je receptor glavni ligand hijaluronska kiselina (34); CD133 (Prominin 1), transmembranski glikoprotein koji se nalazi u plazma membrani i veže kolesterol (35); CD24, glavni ligand za P-

selektin (36) i aldehidna dehidrogenaza 1 (engl. *Aldehyde Dehydrogenase 1,* ALDH1) (37), enzim uključen u oksidaciju unutarstaničnih aldehida i proizvodnju unutarstanične retinoične kiseline (29, 38). Smatra se da CD44 protein potiče migraciju stanica raka ili smanjuje mehanizme imunološkog odgovora domaćina, a pronađen je u CSC većine solidnih tumora (23). CD133 može regulirati izražaj vaskularnog čimbenika rasta endotela, odnosno poticati vaskularizaciju i angiogenezu (35). Također se smatra da je CD133 važan regulator PI3K/Akt signalnog puta kod CSC (39). Signaliziranje putem retinoične kiseline povezano je sa staničnom signalizacijom tijekom razvoja organizma i ima ulogu u samoočuvanju matičnih stanica tijekom životnog vijeka organizma (29). CD24 posreduje u prenošenju signala putem protein tirozin kinaza (PTK) te može potaknuti pokretljivost stanica raka i kolonizaciju u plućima (40).

Zbog fenotipske raznolikosti raka dojke ne postoji jedinstveni biljeg CSC (21, 41, 42). BCSC stanice definirane $CD44^+/CD24^-$ fenotipom se povezuju s lošom prognozom raka dojke (43), dok se CSC s izraženim ALDH1 biljegom povezuju s agresivnošću i lošim ishodom (29). CSC s izraženim CD133 biljegom koreliraju s proliferacijom stanica raka te smanjenjem preživljenja pacijenata s rakom završnog dijela debelog crijeva (44), kao i sa stadijem tumora, njegovom veličinom, pojavom metastaza u limfnim čvorovima te osjetljivošću na neoadjuvantnu terapiju kod pacijentica s rakom dojke (42). *In vitro* studije također pokazuju da se BCSC $CD133^+$ stanice dovode u svezu sa lošom prognozom TNBC (21, 38). $CD44^+/CD24^-$ stanice imaju veći kapacitet za stvaranje mamosfera, što je *in vitro* metoda dokazivanja samoobnavljanja (45, 46).

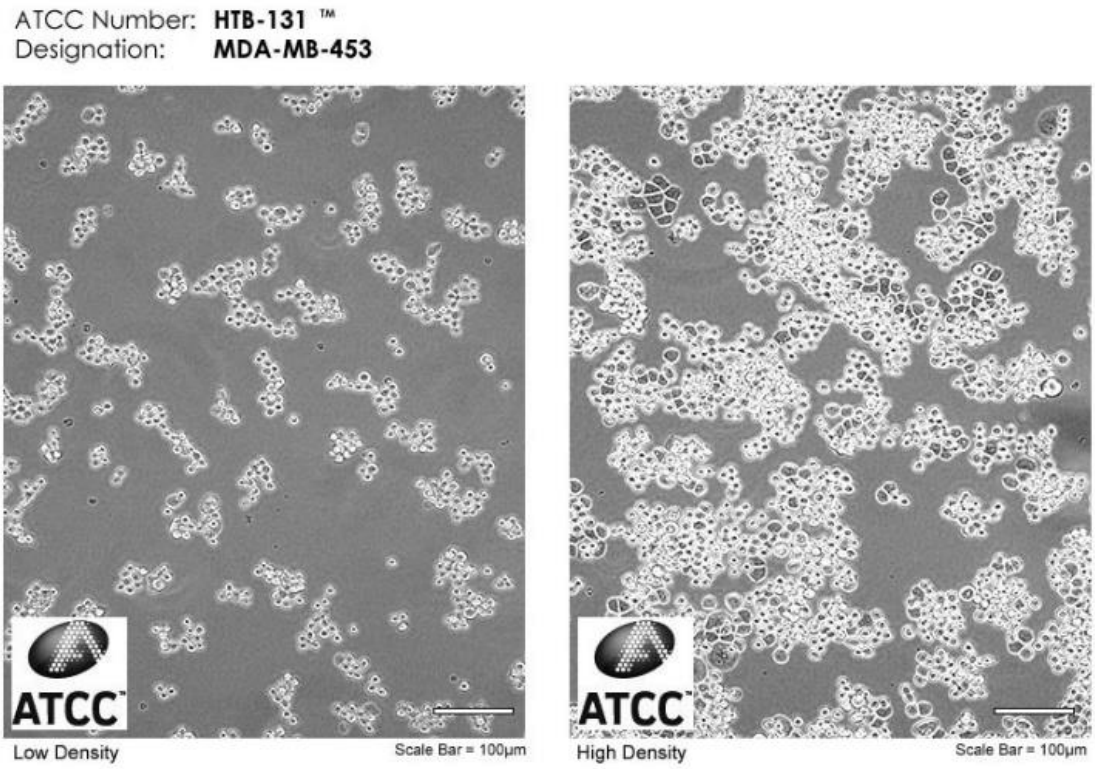
Nekoliko staničnih linija trostruko negativnog raka dojke je uspostavljeno u svrhu istraživanja, od kojih su se u ovom istraživanju koristile MDA-MB-231 i MDA-MB-453 stanične linije adenokarcinoma (47, 48). Obje stanične linije su slabo diferencirane i imaju karakteristike stanica sposobnih inicirati tumor (49).

Stanična linija MDA-MB-231 (Slika 4.) pripada podtipu s niskom razinom klaudina (klaudin-3, -4 i -7), za kojeg je specifična prisutnost biljega epitelno-mezenhimalne pretvorbe, nizak Ki-67 i E-kadherin, gubitak ili slab izražaj 18 biljega luminalne diferencijacije, kao i osobine slične BCSC, posebno $CD44^+/CD24^-$ fenotip (50). Ova stanična linija izolirana je u MD Anderson centru za rak (Texas, SAD) iz pleuralnog izljeva pedesetjednogodišnje bjelkinje s metastatskim adenokarcinomom dojke. Radi se o visoko agresivnoj, invazivnoj i slabo diferenciranoj trostruko negativnoj staničnoj liniji. Invazivnost se postiže proteolitičkim djelovanjem na izvanstanični matriks (51, 52).



Slika 4. MDA-MB-231 stanice u staničnoj kulturi. Lijevo-niska gustoća; desno-visoka gustoća Preuzeto s: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#generalinformation (52)

Stanična linija MDA-MB-453 (Slika 5.) pripada LAR podtipu trostruko negativnog raka dojke s prekomjerno izraženim HER2, kojeg karakterizira visoka razina Ki-67, izražen čimbenik rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*, FGF) (50) te izraženi receptori za androgen (53, 54), što ju čini dobrim modelom za istraživanje stanične proliferacije i metastaziranja raka dojke (55, 56). U usporedbi s ostalim karcinomima dojke, receptor za androgen značajno je slabije izražen kod TNBC (10 – 35 %) (10). Ovu staničnu liniju je izolirao R. Cailleau u MD Anderson centru za rak (Texas, SAD) iz pleuralnog izljeva četrdesetosmogodišnje bjelkinje s metastatskim rakom dojke (57).



Slika 5. MDA-MB-453 stanice u staničnoj kulturi. Lijevo-niska gustoća; desno-visoka gustoća Preuzeto s: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-131.aspx#characteristics (57)

U liječenju trostruko negativnog raka dojke koriste se različiti terapijski pristupi: kirurgija i zračenje, kemoterapija, ciljana terapija, imunoterapija, dok su mnogi potencijalni terapeutici u fazi istraživanja. Iako je terapija taksanima, posebice paklitakselom, standardna terapija kod trostruko negativnog karcinoma dojke, visoka učestalost recidiva i progresije kod liječenih pacijentica ukazuje da metastatski karcinom dojke može steći otpornost na ovaj lijek (28). Zbog nedostatka receptora za estrogen i progesteron, pacijentice s TNBC nemaju koristi od ciljane terapije te citotoksična kemoterapija (doksorubicin, docetaksel, 5-fluorouracil, soli platine i/ili ciklofosfamidi) ostaje glavna sustavna terapija, s nažalost slabim rezultatima. Kombinacija antraciklina, alkilatora i taksana s karboplatinom je uobičajena kombinacija kemoterapije za TNBC. Postoperativni, adjuvantni tretman TNBC paklitakselom u kombinaciji s fluoracilom, epirubicinom i ciklofosfamidom (FEC) smanjuje relaps tumora, a da bi se smanjila veličina tumora, koristi se također i neoadjuvantna terapija prije operacije (58). Aktivne kliničke studije ciljaju angiogenezu, polimerazu za homologni popravak, serin/treonin protein kinaze, PI3K/mTOR, receptore čimbenika rasta, hormonske receptore, Ras/MAPK te Notch/γ-sekretazu.

Također se istražuje i novija terapija protu-PD-1 (od engl. *anti-programmed cell death* 1), protu-PD-L1 (od engl. *anti-programmed cell death ligand* 1) te protu-CTLA 4 (od engl. *anti-cytotoxic T-lymphocyte protein* 4) monoklonskim protutijelima (58-60). Istraživanja protu-PD-L1 terapije u liječenju TNBC rezultirala su odobrenjem ciljane imunoterapije od strane Američke agencije za hranu i lijekove, FDA (engl. *Food and Drug Administration*) i Europske agencije za lijekove, EMA (engl. *European Medicines Agency*). Tako je u ožujku 2019. godine terapija atezolizumabom u kombinaciji s nab-paklitakselom za pacijentice s neoperabilnim lokalno uznapredovalim TNBC s izraženim PD-L1 te pembrolizumab s karboplatinom, paklitakselom ili nab-paklitakselom u terapiji ranog stadija TNBC s izraženim PD-L1 postala standard u liječenju ove bolesti (61-63).

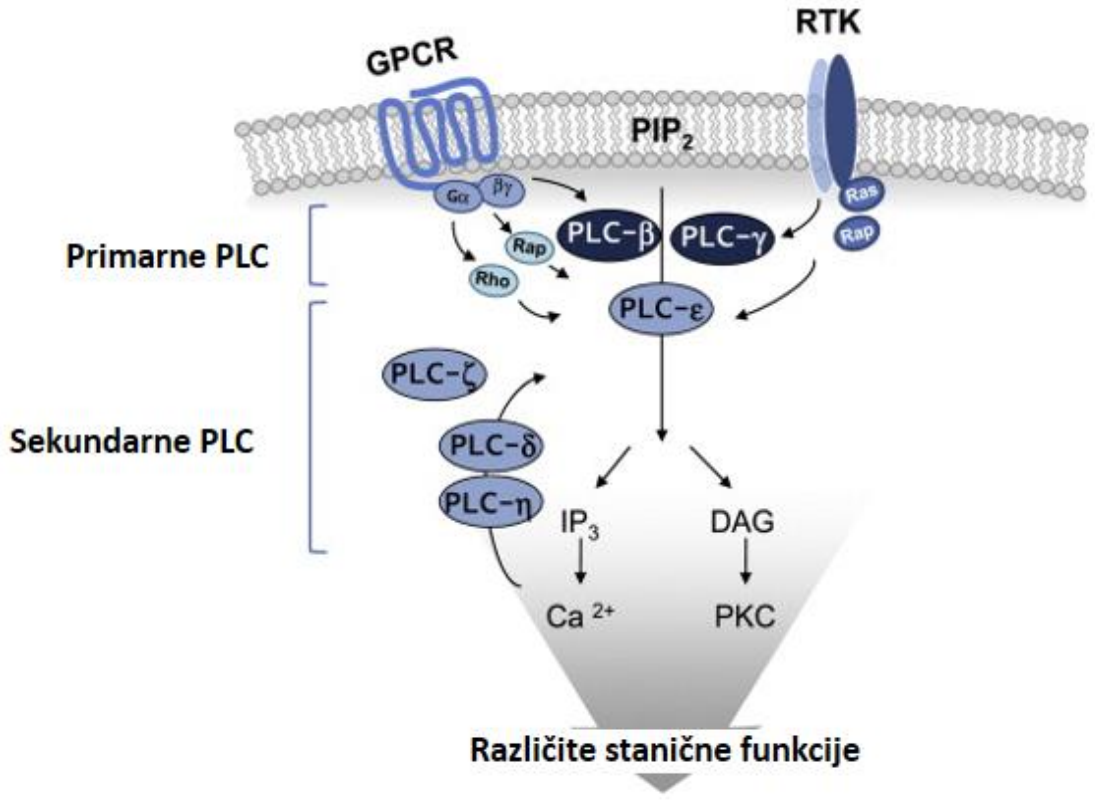
1.2. Fosfolipaza kao ciljna molekula u istraživanju terapije raka

Fosfolipidi, uključujući fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilglicerol i fosfatidilinozitol su glavne strukturne komponente stanične membrane. Fosfolipidi se pomoću fosfolipaza razgrađuju u bioaktivne lipidne posrednike, koji putem unutarstaničnog i međustaničnog signaliziranja reguliraju različite stanične fiziološke i patofiziološke funkcije, uključujući proliferaciju, preživljenje, migraciju, tumorigenost, metastaziranje i upalu (64). Fosfolipaze se na temelju reakcije koju kataliziraju dijele u tri glavne kategorije, A, C i D (65).

Fosfoinozitid specifična fosfolipaza C je membranski protein koji regulira mnoge stanične funkcije (pokretljivost stanica, transformaciju, diferencijaciju i rast) predstavljajući dobru ciljnu molekulu za terapiju tumora (66, 67). Supstrat PLC je fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (engl. *phosphatidylinositol 4,5-diphosphate*, PIP_2), fosfolipid koji se nalazi unutar plazma membrane. PIP_2 nastaje fosforilacijom dviju hidroksilnih skupina na inozitolnom dijelu fosfatidil inozitolnog fosfolipida, na poticaj hormona i signalnih molekula koje djeluju putem tirozin kinaznih receptora, uključujući i inzulin (68). Aktivirani enzim hidrolizira PIP_2 na diacilglicerol (DAG) i inozitol 1,4,5-trifosfat (engl. *inositol 1,4,5-triphosphate*, IP3). DAG aktivira serin/treonin kinaze ovisne o fosfolipidima i signalne puteve ovisne o RasGTP (69) te djelomično aktivira inače neaktivni citosolni enzim protein kinazu C (engl. *protein kinase* C, PKC), sidreći je za unutarnji jednosloj plazma membrane. IP3 potiče oslobađanje kalcijevih iona iz unutarstaničnih skladišta. Kalcijevi ioni zajedno s DAG-om, uzrokuju potpunu aktivaciju PKC koja provodi fosforilaciju unutarstaničnih proteina, uključujući i MAP kinaze (mitogenom

aktivirane protein kinaze), odgovorne za proliferaciju stanica (70). Ovaj proces predstavlja ključnu točku u staničnoj signalizaciji kod mnogih vrsta raka. PKC sudjeluju u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, migraciji i rastu, dok je oslobađanje kalcijevih iona ključno u pokretljivosti, dijeljenju i smrti stanica raka. Istovremeno, smanjenje koncentracije PIP_2 utječe na nekoliko osnovnih signalnih kaskada povezanih s rakom, osobito na staničnu migraciju, što je povezano sa utjecajem PIP_2 na proteine koji reguliraju aktin (71).

Unutar superobitelji PI-PLC postoji šest podobitelji: PLC-β, PLC-γ, PLC-δ, PLC-ε, PLC-ζ i PLC-η (72). Iako svi izoenzimi kataliziraju istu reakciju, svaki od njih ima jedinstvenu fiziološku funkciju te različitu raspodjelu po tkivima (73). Primarne fosfolipaze C, PLC-β i PLC-γ aktiviraju se djelovanjem receptora, za razliku od sekundarnih PLC (PLC-ε, PLC-δ PLC-ζ i PLC-η), kako je prikazano na slici 6. (74).



Slika 6. Djelovanje fosfolipaze C. Preuzeto, prevedeno i prilagođeno od Yang i sur. (74)

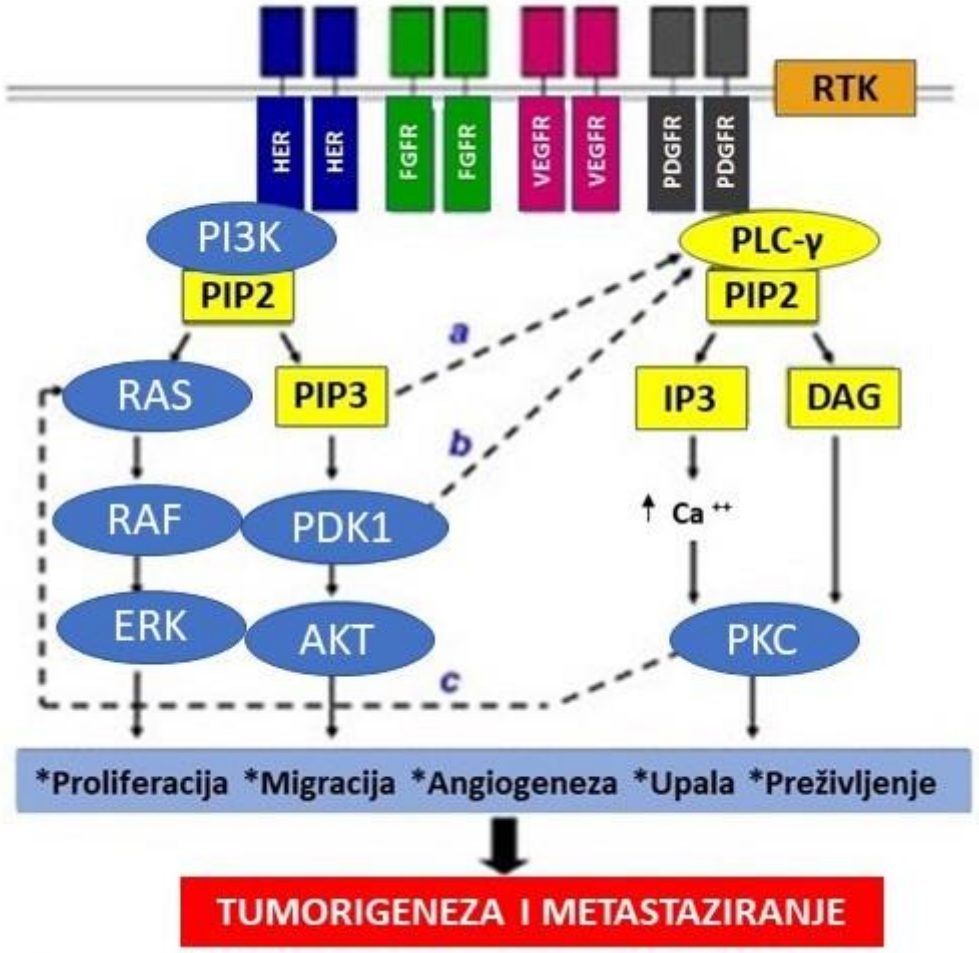
PLC-β se aktivira prijenosom signala preko membranskih proteina GPCR, koji 7 puta prolaze kroz membranu, dok se PLC-γ aktivira prijenosom signala preko receptora tirozin kinaze, RTK. PLC-ε se može aktivirati putem obaju receptora (72, 74). Struktura PLC-η slična je strukturi PLC-δ, a studije upućuju da je aktivirana porastom Ca^{2+}iona. Izražaj PLC-ζ ograničen je na muške spolne stanice te se aktivira niskim koncentracijama Ca^{2+} iona (73).

Aktivacija PLC-γ putem hormona, neurotransmitera, čimbenika rasta regulira brojne stanične i fiziološke funkcije nužne za nastanak tumora, uključujući stanično preživljenje, pokretljivost, invaziju tumorskih stanica i angiogenezu tumora, što je čini važnom metom za razvoj protutumorskih lijekova (75, 76). PLC-γ je uključena u procese reorganizacije citoskeleta nužne za polarizaciju stanice i signalizaciju stanične adhezije, što implicira širu ulogu PLC-γ u staničnoj pokretljivosti povezanoj s integrinom. Stoga se može reći da je PLC-γ uključena u dva ključna procesa u razvoju tumora: staničnu pokretljivost potaknutu čimbenikom rasta i staničnu adheziju. Stanična pokretljivost potaknuta čimbenikom rasta i citokinima događa se prvenstveno tijekom organogeneze, upale i cijeljenja rana (66).

PLC-γ se sastoji od dvije izoforme, PLC-γ1 i PLC-γ2. PLC-γ1 je prisutna u svim stanicama i aktiviraju je receptor za tirozin kinazu čimbenika rasta (RTK) i receptor T stanica. PLC-γ2 izoforma stimulirana je pomoću B stanica i Fc receptora i uglavnom se nalazi u hematopoetskim stanicama (77). Izoenzimi PLC-γ djeluju s fosforiliranim ostacima aktiviranih i neaktiviranih receptora tirozin kinaza. Većina tirozin kinaza uključena u aktivaciju PLC-γ su članovi superobitelji receptora čimbenika rasta (GFR, engl. *growth factor receptor*) koja uključuje receptor za čimbenik rasta koji potječe od trombocita (PDGFR, engl. *platelet-derived growth factor receptor*), receptor za čimbenik rasta fibroblasta (FGFR, engl. *Fibroblast growth factor receptor*), receptor za čimbenik rasta hepatocita (HGFR, engl. *Hepatocyte growth factor receptor*), receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR, engl. *Epidermal growth factor receptor*), receptor za čimbenik rasta nalik inzulinu (IGFR, engl. *Insulin-like growth factor receptor*) i receptor za čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGFR, engl. *Vascular endothelial growth factor receptor*) (71).

Nepravilna ekspresija i regulacija PLC-γ1 je povezana s nastankom mnogih tumora, uključujući tumore dojke, pluća, gušterače, želuca, prostate i jajnika (67). Kako PLC-γ komunicira s mnogim onkogenima i signalnim putevima, uključujući PI3K, AKT i RAF/RAS/ERK kaskadu (Slika 7.), sve više se naglašava kao nova meta za terapiju tumora (76). PLC-γ1 potiče staničnu migraciju, invazivnost i metastaziranje kod stanične linije MDA-MB-231, dok PI3K/Akt signalni put potiče preživljenje stanica raka dojke te rezistenciju na kemo- i radioterapiju (78). PI3K/AKT/mTOR je jedan od najvažnijih signalnih puteva kod raka. Njihova

signalna kaskada ima centralnu ulogu u staničnoj proliferaciji, metabolizmu, angiogenezi i genomskoj stabilnosti, smanjujući izražaj proapoptotskih čimbenika i povećavajući izražaj protu-apoptotskih čimbenika (5).



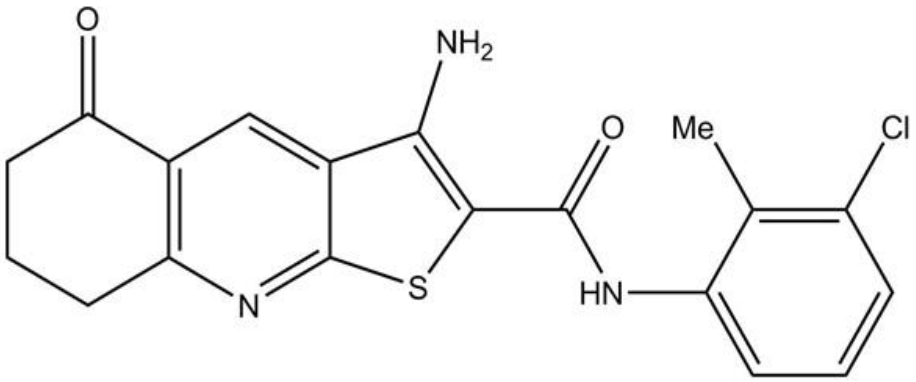
Slika 7. Aktivacija PLC-γ vezivanjem za tirozin kinaze i signalizacija putem PLC-γ (žuti kvadrati i ovali). Pune linije označavaju silazne efektore (plavi ovali) PI3K (lijevo) i PLC-γ (desno). Isprekidane linije od a do c pokazuju povezanost između signalnih puteva PI3K i PLC-γ. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Lattanzio i sur. (76)

Sve veći broj dokaza sugerira ključnu ulogu PLC-γ1 u staničnoj migraciji i invaziji (64, 79). Stoga poremećaj u signalizaciji PLC-γ1 može doprinijeti karcinogenezi. Glavni problem ciljanja PLC-γ1 je činjenica da se ovaj enzim smatra proteinom nepovoljnim za razvoj lijeka zbog svoje specifičnosti, što predstavlja veliku prepreku u razvoju malih molekula koje su inhibitori PLC-γ (76).

1.3. 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid

Novosintetizirani 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid (Spoj) spada u skupinu tieno[2,3-*b*]piridina. Tieno[2,3-*b*]piridini su obitelj spojeva koji su otkriveni virtualnim probirom, ciljajući fosfoinozitid specifičnu fosfolipazu C, pi-PLC (engl. *phosphoinositide specific-phospholipase C*) i za koje je utvrđeno da imaju protutumorsko djelovanje na brojne stanične linije tumora (80). Poznato je da derivati tieno[2,3-*b*]piridina mijenjaju aktivnost brojnih molekularnih meta, kao što su receptor povezan s G proteinom (engl. *G protein coupled receptor*, GPCR) (81), P2Y12 receptor trombocita (82), enzim za popravak DNA, tirozil DNA fosfodiesterazu 1 (engl. *tyrosyl–DNA phosphodiesterase,* TDP1) (83), tubulin na mjestu vezanja kolhicina (84), fosfolipazu C-δ1 (75), kinaze poput PIM-1 (engl. *proviral insertion in murine lymphoma kinases*) (85) i eEF2K, kinaze za elongaciju eukariotskog čimbenika 2 (engl. *eukaryotic elongation factor-2 kinase*) (86) te ciklooksigenaze (87). Učinak tieno[2,3-*b*]piridina testiran je na šezdeset tumorskih staničnih linija američkog instituta za tumore (engl. *National Cancer Institute*, NCI) te se pokazalo da ovi spojevi pokazuju učinak na inhibiciju staničnoga rasta kod staničnih linija melanoma, raka dojke, raka ne-malih stanica pluća i raka CNS-a (75). Od posebnog značaja je njihov utjecaj na inhibiciju rasta staničnih linija trostruko negativnog karcinoma dojke u nanomolarnim koncentracijama (88). Ovo je od osobitog interesa budući trostruko negativne stanice raka dojke nemaju izražene receptore za estrogen, progesteron i za receptor 2 za epidermalni čimbenik rasta te bi bilo poželjno pronaći lijek za ove terapijski otporne karcinome (75). Tienopiridini pokazuju različit mehanizam citotoksične aktivnosti, uključujući širok spektar utjecaja na stanični rast i razvoj. Tako značajno smanjuju stanični porast, uzrokuju zaobljavanje i stvaranje mjehurića plazma membrane, smanjenje transporta bakra, potiču staničnu smrt u G2/M fazi staničnog ciklusa te usporavaju staničnu migraciju (89). Koncentracije od 1 μM i više nisu pokazale toksičnost u istraživanjima na mišjem modelu (80). Niske vrijednosti IC_{50} (engl. *inhibitory concentration*, IC_{50}), zajedno s tolerancijom toksičnosti u životinjskom modelu pokazuju da su tienopiridini obećavajuća skupina novih antiproliferativnih spojeva (89). Molarna masa Spoja iznosi 385,867 g/mol, što znači da se nalazi u tzv. "slatkom području" (od engl. *sweet spot*) učinkovitosti potencijalnog razvijanja lijeka (90, 91).

Struktura 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamida prikazana je na slici 8.



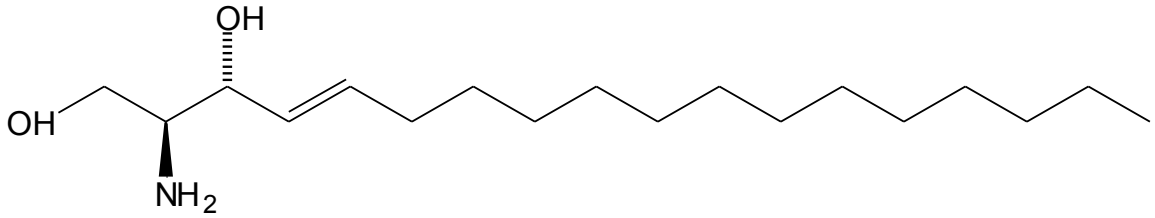
Slika 8. Struktura 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamida

Djelovanje Spoja sa PLC odvija se na način da su bočni lanci aminokiselina enzima, histidin (His356), glutamin (Glu341), arginin (Arg549) i lizin (Lys438) uključeni u vezanje vodika sa Spojem putem liganda 1, dok se fenilni dio Spoja veže na lipofilni džep enzima. Histidini reagiraju s kisikom koji se nalazi u centru amidnog dijela Spoja, dok glutamin reagira s amino grupom Spoja. Lizin i arginin enzima se vežu na karboksilni dio cikloheksanonskog prstena (75).

1.4. Glikosfingolipidi

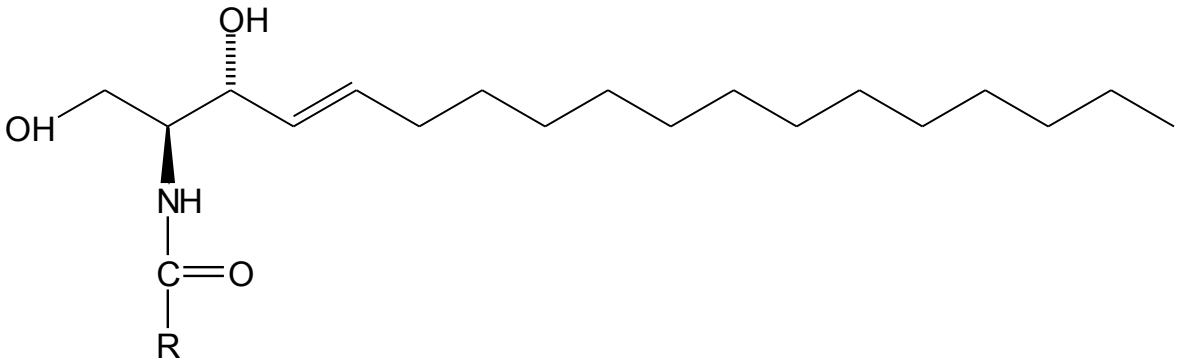
1.4.1. Građa i funkcija glikosfingolipida

Glikosfingolipidi (GSL) su glikolipidi koji izgrađuju plazma membrane stanica sisavaca no pronađeni su i u unutarstaničnim organelama (92). Tkiva sisavaca ne sadrže glikoglicerolipide, već isključivo glikosfingolipide. Glikosfingolipidi, za razliku od glikoglicerolipida, ne sadrže glicerol nego dugolančani, dvovalentni, nezasićeni amino-alkohol sfingozin (Slika 9.).



Slika 9. Sfingozin

Vezanjem masne kiseline za amino skupinu sfingozina nastaje ceramid (Slika 10.).



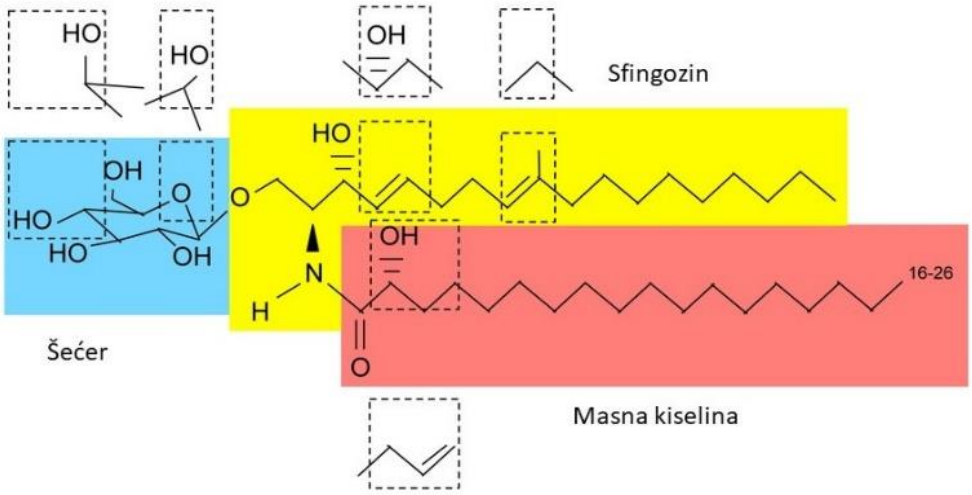
Slika 10. Ceramid

Prema vrsti glikozidnih ostataka koji su povezani s ceramidom, razlikuju se tri skupine glikosfingolipida: neutralni glikosfingolipidi, sulfatidi i gangliozidi.

Neutralni glikosfingolipidi sadrže samo neutralne glikozidne ostatke koji kod fiziološkog pH (7.4) ne mogu djelovati niti kiselo niti lužnato. Adicijom glukoze, odnosno galaktoze na OH^- skupinu ceramida nastaje najjednostavniji neutralni glikosfingolipid, glukozilceramid, odnosno galaktozilceramid. Daljnim dodavanjem oligosaharidnih i sulfatnih grupa nastaje veliki broj

kompleksnih glikosfingolipida (93). Esterifikacijom hidroksilne grupe na C-3 atomu galaktoze galaktozilceramida sa sulfatnom kiselinom nastaje najjednostavniji sulfatid (94).

GSL su važna komponenta stanične plazma membrane i sastoje se od hidrofobnih ceramida i hidrofilnih ugljikohidratnih ostataka (Slika 11.). Posjeduju vrlo heterogene i raznolike molekulske strukture u svojim ugljikohidratnim i ceramidnim dijelovima (95). Smješteni su uglavnom na vanjskom dijelu plazma membrane (96).



Slika 11. Osnovna građa glikosfingolipida.

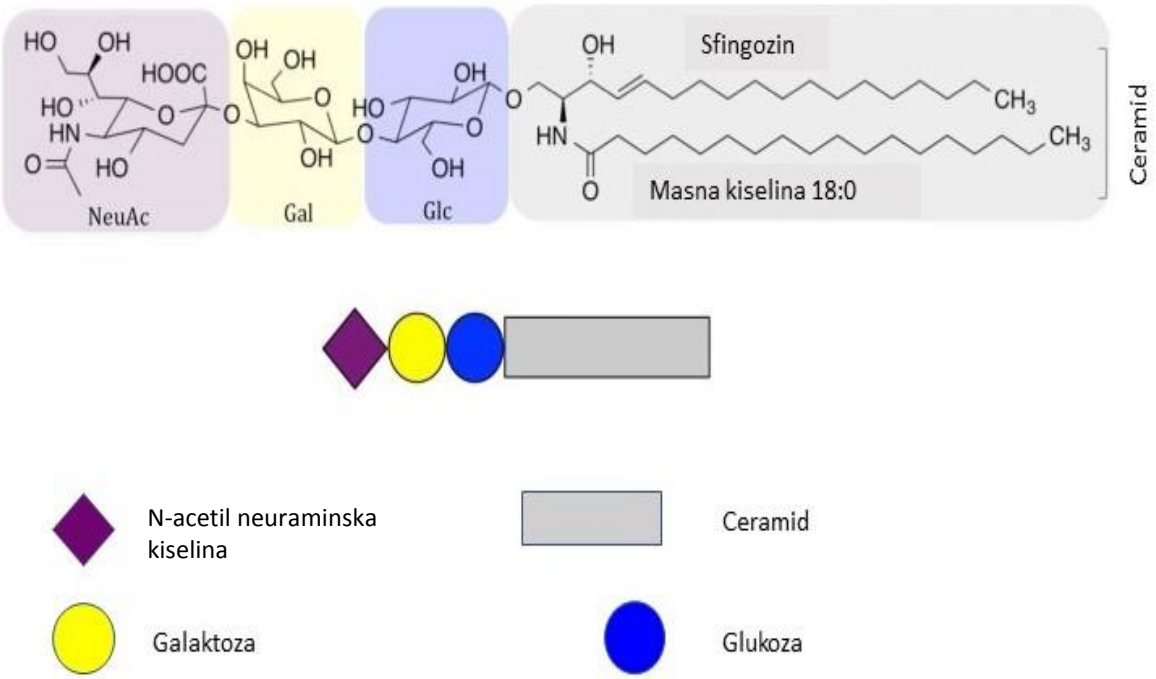
Klasificiraju se na temelju njihove strukture, odnosno na temelju prisutnosti temeljne strukture Galβ1-4Glcβ1-1Cer i/ili ganglio-N-tetraozil strukture (Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer), ili jedne ili dvije α2-3NeuAc strukture povezane bilo na unutarnju, bilo na teminalnu galaktozu ili na obje (97). Na temelju njihovih osnovnih ugljikohidratnih struktura, glikosfingolipidi se svrstavaju u sljedeće serije: ganglio-, izoganglio-, lakto-, neolakto, laktoganglio-, globo-, izoglobo-, muko-, gala-, neogala-, molu-, artro-, shisto- i spirometo-serije (95) (Tablica 3.).

Tablica 3. Korijen imena i strukture glikolipida (preporuka za imenovanje glikolipida), Preuzeto, pojednostavljeno i prevedeno Chester i sur. (92)

Korijen	Skraćenica	Struktura
Ganglio	Gg	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-Cer
Lakto	Lc	Galβ1-3GlcNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-Cer
Neolakto	nLc	Galβ1-4GlcNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-Cer
Globo	Gb	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-Cer
Izoglobo	iGb	GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glcβ1-Cer
Molu	Mu	GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4Glcβ1-Cer
Artro	At	GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-3Manβ1-4Glcβ1-Cer

Gangliozidi nastaju dodavanjem sijalinske kiseline na neutralne GSL te pokazuju najveću raznolikost u građi, a ujedno i najsloženiju građu (93). Klasificiraju se kao kiseli GSL zbog toga što sadrže jednu ili više sijalinskih kiselina, koja je pri fiziološkom pH disocirana (92). Sijalinska kiselina je najčešće N-acetilneuraminska kiselina (Neu5Ac), ali također može biti i N-glikolilneuraminska kiselina (Neu5Gc) (98). Gangliozide je otkrio i imenovao Ernst Klenk 1942. godine nakon što ih je izolirao iz tkiva mozga (99). Identificirao je sfingozin, masnu kiselinu i tvar koja je davala purpurnu boju s Bialovim reagensom te ju je nazvao neuraminskom kiselinom. Nakon više od dva desetljeća Blix je iz mucina izolirao tvar koju je nazvao sijalinskom kiselinom (100). Radilo se o istoj molekuli, međutim, oba naziva kiseline su zadržana.

Gangliozidi su najzastupljeniji u staničnim membranama živčanih stanica (5-10% ukupnih lipida), ali se u manjim količinama nalaze i na većini drugih stanica (101). Heterogenost gangliozida iz mozga prvi je prikazao Svennerholm 1956. godine (102). Tipični gangliozid prikazan je na slici 12., a naziva se GM3 prema prihvaćenoj nomenklaturi (103).

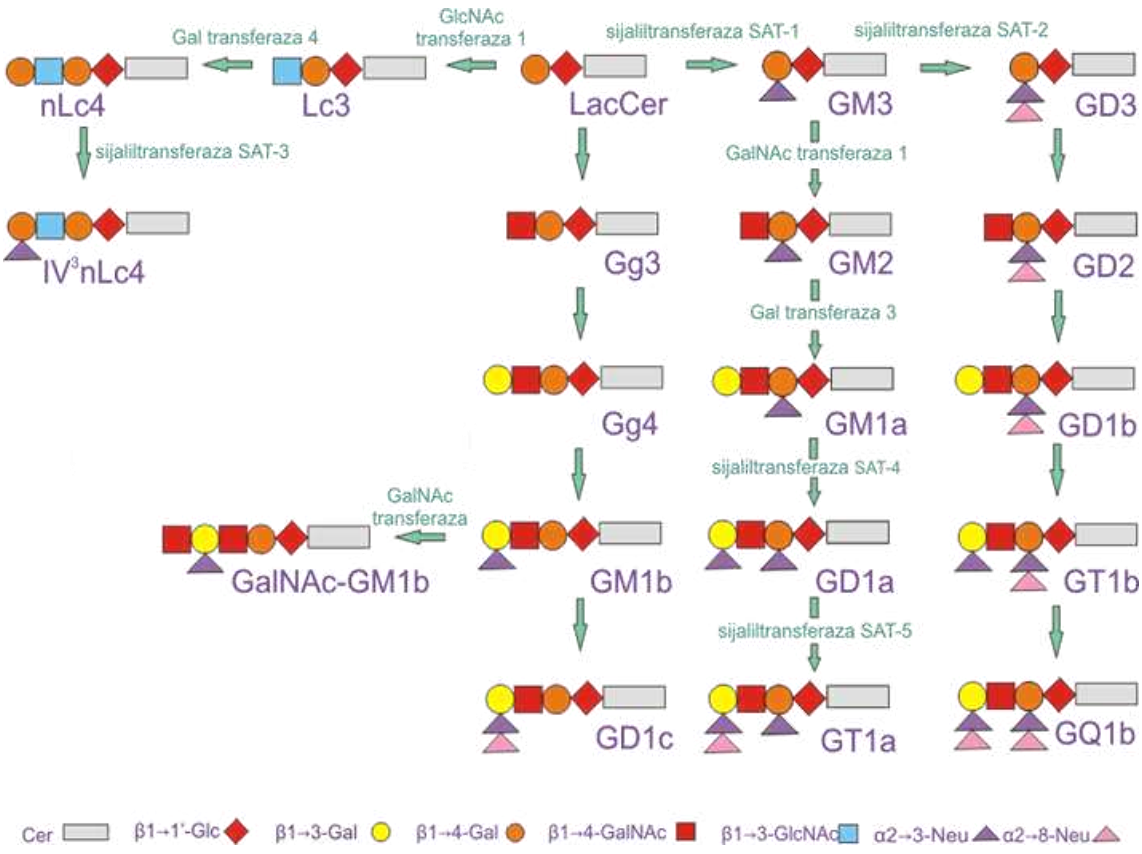


Slika 12. Gangliozid GM3

Preuzeto, prevedeno i dopunjeno Krengel i sur. (104)

U Svennerholmovoj nomenklaturi koriste se slijedeće oznake: G za gangliozid; M, D, T, Q i P za broj sijalinskih kiselina (M za mono, D za di, T za tri, Q za tetra i P za penta). Broj uz ime gangliozida označava broj neutralnih glikozidnih ostataka vezanih za ceramid, točnije n = 5 – broj vezanih šećera. Mala slova uz ime gangliozida označavaju broj sijalinskih kiselina na unutrašnjoj galaktozi: a - jedna sijalinska kiselina, b - dvije sijalinske kiseline, c - tri sijalinske kiseline (105).

Biosinteza osnovnih serija gangliozida uključuje aktivnost sijaliltransferaza i glikoziltransferaza, kao što je prikazano na slici 13.

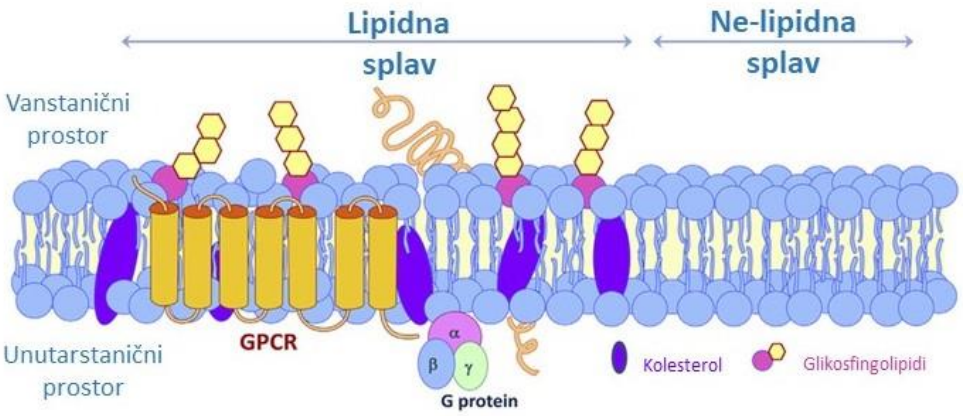


Slika 13. Osnovni putevi biosinteze ganglioserije gangliozida i jednog gangliozida neolaktoserije. Preuzeto iz doktorske dizertacije Čikeš Čulić (106).

Enzimi potrebni za sintezu GSL vezani su za membrane Golgijevog tjelešca, redoslijedom koji odgovara dodavanju različitih ugljikohidratnih komponenti (107). Većina gangliozida, s izuzetkom GM4 koji nastaje iz galaktozilceramida (GalCer), sintetizira se iz laktozilceramida (LacCer). Prvo se sintetizira jednostavni gangliozid GM3 dodavanjem sijalinske kiseline na LacCer pomoću CMP-sijalinska kiselina:LacCer α2–3 sijaliltransferaze (ST-I ili GM3 sintaza). GD3 i GT3 se sintetiziraju daljnjim uzastopnim dodavanjem sijalinske kiseline na GM3 i GD3 pomoću CMP-sijalinske kiseline: GM3 α2–8 sijaliltransferaze (ST-II ili GD3 sintaza) i CMP-sijalinske kiseline: GD3 α2–8 sijaliltransferaze (ST-III ili GT3 sintaza). GM3, GD3 i GT3 dalje služe kao preteče za sintezu kompleksnijih gangliozida koji pripadaju a, b- i c-seriji. Enzimi koji kataliziraju stvaranje kompleksnih gangliozida od ovih jednostavnih su UDP-GalNAc: LacCer/GM3/GD3/GT3 β1–4 N-acetilgalaktozaminiltransferaza (GalNAcT ili GA2/GM2/GD2/GT2 sintaza), UDP-Gal: GA2/GM2/GD2/GT2 β1–3 galaktoziltransferaza (GalT-II ili GA1/GM1/GD1b/GT1c sintaza), CMP-sijalinska kiselina: GA1/GM1/GD1b/GT1c

α2–3 sijaliltransferaza (ST-IV ili GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c sintaza), i CMP-sijalinska kiselina: GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c α2–8 sijaliltransferaza (ST-V ili GD1α/GT1aα/GQ1bα/GP1cα) (108). Degradacija GSL odvija se u lizosomima djelovanjem specifičnih glikohidrolaza (109).

Gangliozidi se u plazma membranama udružuju s drugim sfingolipidima, transmembranskim proteinima i kolesterolom u tzv. "splavi" putem kojih izvršavaju mnoge biološke funkcije (Slika 14.) (110). Tako čine antigene krvnih grupa, heterofilne antigene, receptore za bakterije i njihove toksine, razvojno regulirane antigene i antigene povezane s rakom, TACA (od engl. *Tumour-associated carbohydrate antigens*) (96). Međutim, postoji i teorija da se gangliozidi i drugi GSL udružuju putem vodikovih veza između hidroksilnih i acetamidnih grupa pojedinih glikozidnih ostataka te formiraju glikosinaptičke domene, koje se funkcionalno razlikuju od "splavi". Ove glikosinaptičke domene mogu imati specijalizirane funkcije u adheziji, rastu i kretanju stanica djelujući zajedno sa specifičnim proteinima (96, 111).



Slika 14. Shematski prikaz lipidne splavi.
Preuzeto i prevedeno Villar i sur. (112).

Gangliozidi imaju ključne uloge u embriogenezi, staničnom rastu i imunološkom sustavu. Uključeni su u tumorsku patogenezu pa se tako neki gangliozidi mogu naći u tumorskom, ali ne i u normalnom zdravom tkivu (113). Gangliozidi su udruženi s receptorima za interferon, inzulin, epidermalni čimbenik rasta i živčani čimbenik rasta tako da sudjeluju u regulaciji prijenosa pobudnih signala u stanicu. Utječu na funkciju integrina, kinaza iz Src obitelji, malih G-proteina te različitih drugih prijenosnika signala (114). Egzogeno dodani

gangliozidi inhibiraju rast stanica prevodeći ih u manje osjetljive na epidermalni čimbenik rasta, dok uklanjanje N-acetilne grupe sijalinske kiseline pojačava djelovanje ovog čimbenika i stimulira rast. Gangliozidi također vežu specifične viruse i bakterijske toksine, kao što su toksini botulinusa, tetanusa i kolere, te mogu posredovati u interakcijama između mikroorganizama i stanica domaćina za vrijeme infekcije (115). Tako je gangliozid GM1 specifični receptor na staničnoj površini za toksin kolere (116). Receptor za toksin *Clostridium perfrigens* je gangliozid GM2 (117), a GT1b i GQ1b su receptori za toksin botulinusa. Virusi influenze vežu se na gangliozidne receptore na plazma membrani domaćina pomoću hemaglutinina (118).

Gangliozidi su se pokazali kao glavne molekule plazma membrane uključene u adheziju, proliferaciju i procese prepoznavanja, kao i u mijenjanje signalnih puteva (119). GM1 regulira dotok kalcija neovisan o protein kinazi, tako što se veže na B podjedinicu toksina kolere te na takav način regulira stanični rast. Istraživanja pokazuju povezanost gangliozida s drugim membranskim proteinima koji mogu provoditi signal do citoplazme. Gangliozid GM3 inhibira dimerizaciju receptora te posljedično i aktivnost tirozin kinaze te na takav način modulira fosforilaciju tirozinskog receptora epidermalnog čimbenika rasta (120).

Neutralni gangliozid GalNAc-GM1b je izoliran prvi put 1981. godine iz mozga pacijenta oboljelog od Tay-Sachsove bolesti, a 1989. godine iz mišjih T-limfocita. Smatra se da ima važnu ulogu u imunološkom sustavu. Protutijela IgM na GalNAc-GM1b su izolirana iz uzoraka pacijenata sa sindromom Guillain-Barre (121). Pripada sintetičkom putu asijalo serije, koja započinje od LacCer i produljuje se N-acetilgalaktozaminom do Gg3. Gg3 se dalje produljuje do Gg4 dodavanjem galaktoze. Sijalizacijom Gg4 pomoću sijaliltransferaze IV nastaje gangliozid GM1b, koji je karakterističan za T-limfocite slezene i timusa i koji se dodavanjem N-acetilgalaktozamina na terminalnu galaktozu može produljiti do GalNAc–GM1b. Stvaranje GalNAc-GM1b je povezano s aktivacijom T-limfocita (122).

Terminalno α2-6-sijalinizirani gangliozidi neolaktoserije IV^6NeuAc-nLc_4 izraženi su na eritrocitima (123) i receptori su rViskumina, rekombinatnog biljnog lijeka podrijetlom iz imele koji se koristi kao adjuvantna terapija raka (124), dok terminalno α2-3-sijalinizirani gangliozidi, IV^3NeuAc-nLc_4 inhibiraju fosforilaciju inzulinskog receptora, što dovodi do zaustavljanja rasta stanica (125).

Izražaj pojedine serije GSL karakterističan je za pojedino tkivo. Tako su kod sisavaca GSL ganglio-serije, iako široko rasprostranjeni u organizmu, najviše prisutni u mozgu, dok su GSL neolakto-serije uobičajeni za hematopoetske stanice, uključujući leukocite. GSL lakto-serije su glavni glikolipidi sekretornih organa, dok eritrociti obiluju u GSL globo-serije. Ova raznolikost pokazuje nam važu ulogu GSL u organizmu (126). Ovi glikokonjugati na staničnoj membrani

uključeni su u brojne biološke procese, uključujući staničnu proliferaciju, adheziju i migraciju, prenošenje signala i imunološki odgovor (111, 127-129).

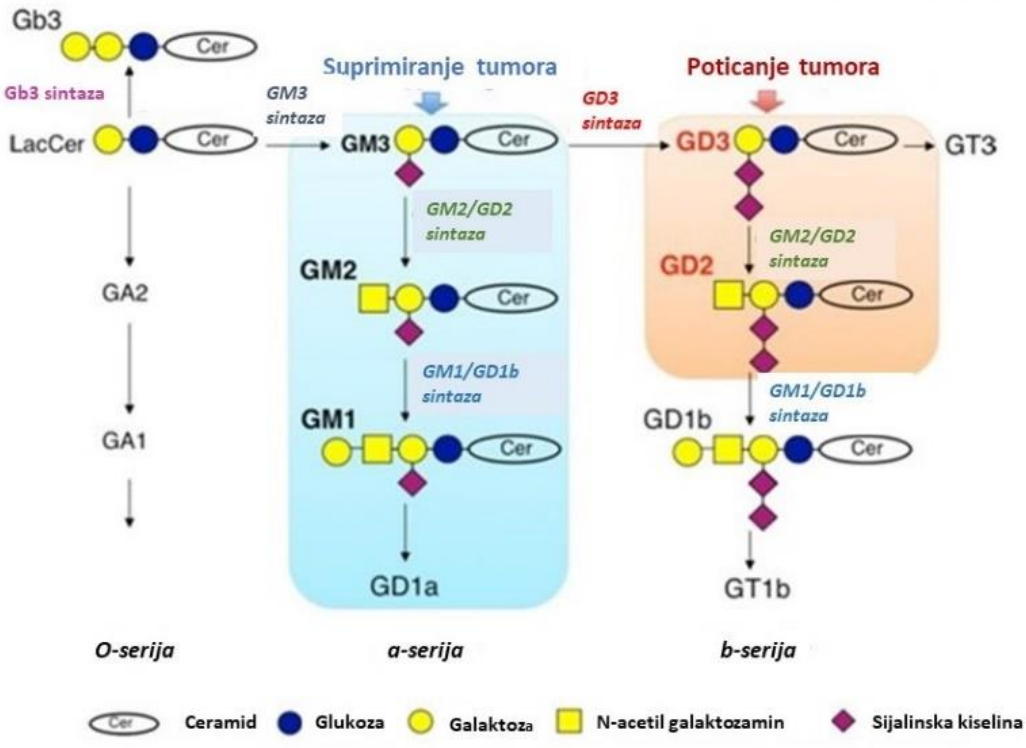
1.4.2. Uloga glikosfingolipida u karcinomima

Zbog raznolikosti GSL koji tvore stanične membrane te zbog komunikacije koja se odvija kroz ove lipidne barijere, njihova biologija i kemija već su neko vrijeme od interesa u istraživanjima raka. GSL i gangliozidi imaju temeljnu ulogu u razvoju stanice, staničnoj smrti, napredovanju tumora i interakciji patogena s domaćinom. Istraživanja pokazuju da metabolizam gangliozida u tumoru ima značajnu ulogu u njegovom stvaranju i napredovanju (108). Najkraći GSL povezan s rakom je GM3, koji ima jednu molekulu sijalinske kiseline povezanu s Lac-Cer strukturom i pojačano je izražen kod raka dojke i pluća, tumora mozga, melanoma, adenokarcinoma gušterače i hepatocelularnog karcinoma (130). GD2 i GD3 su duži GSL koji su karakterizirani dvjema molekulama sijalinske kiseline, a razlikuju se po tome što GD2 ima jednu GalNAc strukturu više. GD2 i GD3 su povećano izraženi u humanim tumorima neuro-ektodermalnog podrijetla, kao što su melanomi, gliomi i neuroblastomi, dok su slabo izraženi ili ih nema u normalnim tkivima (45). GD3 je u zdravih odraslih prisutan u niskim koncentracijama, dok povećane koncentracije koreliraju s adhezijom i invazijom stanica raka (131). Li i suradnici su dokazali povećani izražaj GD3 sintaze, sijaliltransferaze odgovorne za biosintezu GD3 i GD2, kod ER^- raka dojke u usporedbi sa ER^+ rakom dojke, što je rezultiralo pojačanom proliferacijom, invazijom i metstaziranjem (132). GD2 je gangliozid koji je povećano reguliran kod melanoma, raka pluća, sarkoma, neuroblastoma i trostruko negativnog raka dojke (133). Protu-GD2 terapija (dinutuximab) je klinički odobrena terapija u liječenju neuroblastoma i osteosarkoma (134). Stanične linije trostruko negativnog raka dojke MCF-7 i MDA-MB-231 sadrže četiri puta više gangliozda od normalnih stanica. Razine GM3 su čak 18 puta više u staničnoj liniji MDA-MB-231, što je od osobitog značaja budući se smatra da je GM3 uključen u regulaciju funkcije čimbenika rasta (120). Prekomjeran izražaj GSL globo-serije u svezi je sa rakom debelog crijeva (135). Globozid Gb3, poznat i kao CD77, prekomjerno je izražen u različitim karcinomima i povezan s povećanim izražajem proteina 1 otpornog na lijekove, MDR1 (od engl. *multidrug resistance protein 1*) (136). Glikosfingolipid Gb_3Cer ima ključnu ulogu u održavanju epitelnih svojstava stanica raka. Nedostatak Gb_3Cer izazvan delecijom gena laktozilceramid 4-alfa-galaktoziltransferaze (A4GALT), koji kodira sintezu Gb_3Cer, inducira EMT, povećava otpornost na kemoterapeutike i broj CSC ($CD44^+/CD24^-$) (137). Nadalje, Gb_3Cer je receptor za toksin

kolere koji može izazvati EMT nakon vezanja, što se događa samo u stanicama s funkcionalnim enzimom A4GALT (138). Razina Gb_3Cer u BCSC je značajno smanjena u odnosu na stanice raka dojke koje nisu matične (139). Globotetraozilceramid Gb4, također povećano izražen u različitim karcinomima, u staničnim linijama trostruko negativnog raka dojke MCF-7 i HCT-116 staničnim linijama kolorektalnog raka, potiče staničnu proliferaciju putem receptora epidermalnog čimbenika rasta signalizacijom MAP kinaze (136, 140). Globopentaozilceramid Gb_5Cer ili SSEA3 (od engl. *stage specific embryonic antigen 3*) je biljeg embrionalnih matičnih stanica i izražen je kod raka dojke i BCSC (141). Gubitak lakto-/neolaktoseije GSL zbog delecije β-1, 3-N-acetil-glukozaminil-transferaze 5 (B3GNT5) dovodi do smanjene α2-6 sijalizacije u stanicama raka jajnika (142). Povećana α2-6 sijalizacija povezana je s povećanim metastaziranjem i otpornošću na kemo- i radioterapiju kolorektalnog raka (143). Gangliozid GM3 djeluje na GEM, EGFR/tirozin kinaznu signalizaciju i signalizaciju povezanu s receptorom aktivatora plazminogena urokinaze (od engl. *urokinase plasminogen activator receptor*, uPAR), koji koordiniraju proteolizu vanstaničnog matriksa i aktiviraju brojne unutarstanične signalne puteve. GM3 se razmatra kao potencijalni prognostički biljeg kod pacijentica s rakom dojke (129). Gangliozid GM2 potiče razvoj raka putem mehanizama izbjegavanja imunološke reakcije, zbog čega se terapija monoklonskim protutijelom na ovaj gangliozid od 2015. godine koristi u terapiji visokorizičnih neuroblastoma (Dinutuximab) (144). GM2 direktno djeluje s integrinima, potičući migraciju stanica raka (145). Povišene razine gangliozida GD3 također nalazimo kod različitih vrsta raka. GD3 započinje apoptozu tako što potiče proizvodnju reaktivnih vrsta kisika kompleksa III mitohondrijskog respiratornog lanca. Akumulacija GD3 nije smrtonosna, ali potiče migraciju, proliferaciju, adheziju, metastaziranje i angiogenezu. GD2 gangliozid potiče proliferaciju i invazivnost putem obitelji Src kinaza (136).

Nedavna istraživanja pokazuju da gangliozidi mogu potaknuti angiogenezu povezanu s rakom, regulirati staničnu adheziju/pokretljivost i djelovati kao modulatori signalnog puta, što rezultira invazijom i metastaziranjem stanica raka (146). Na životinjskom modelu raka stanica dojke miša se pokazalo da „utišavanje“ GM3 sintaze može smanjiti staničnu pokretljivost, invaziju, rast i metastaziranje na pluća. Marquina i sur. su pokazali da je izražaj GM3 za 2,8 puta veći u tkivima raka dojke nego u normalnom tkivu (147). GM3 je uključen u funkciju integrinskog receptora i njegovu adheziju na vanstanični matriks, što je jedan od ključnih elemenata invazije tumorskih stanica (120, 148). Generalno govoreći, GSL s dvije ponavljajuće sijalinske kiseline, poput GD3 i GD2, povećavaju maligna svojstva različitih karcinoma, poput stanične proliferacije, invazije, adhezije i metastaziranja. Monosijalinizirani gangliozidi poput

GM1, GM3 i GM2 često smanjuju maligna svojstva različitih tumorskih stanica (149). Zbog toga je GD3 sintaza ključni enzim koji određuje stanični fenotip, kao što je pokazano na slici 15.



Slika 15. Sinteza glavnih kiselih GSL i uloga gangliozida u karcinomima. Preuzeto i prevedeno od Furukawa i sur. (146)

Izražaj pojedinih GSL kod raka dojke razlikuje se od izražaja GSL u normalnom tkivu. Tako su gangliozidi GD3, 9-O-acetil-GD3 i 9-O-acetyl-GT3 jedva detektibilni u normalnom tkivu, dok su prekomjerno izraženi u 50 % invazivnih duktalnih karcinoma. U filoidnim tumorima dojke, kapacitet za stvaranje mamosfera je 3,9 puta veći u $GD2^+$ stanicama, nego u $GD2^-$ stanicama te $GD2^+$ subpopulacija stanica pokazuje više karakteristika mezenhimalnih matičnih stanica (150). Gangliozidi reguliraju RTK signalizaciju u stanicama raka na način da ili inhibiraju ili aktiviraju dimerizaciju receptora i autofosforilaciju. Generalno gledano, monosijalogangliozidi (GM3 ili GM1) se smatraju negativnim regulatorima RTK signalizacije, dok disijalogangliozidi, uključujući i GD2, uglavnom aktiviraju prijenos signala putem RTK uključenog u staničnu proliferaciju, angiogenezu i metastaziranje tumora (119). Gangliozidi neolaktoserije kod kojih je sijalinska kiselina vezana na slijed od najmanje četiri neutralna

glikozidna ostatka Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer (nLc4Cer ili kraće nLc4) prisutan je u ascitesu pacijenata s hepatocelularnim karcinomom, rakom gušterače i želuca, dok kod zdravih osoba nije prisutan (151).

Stanična malignost tumora definirana je s nekoliko ključnih fenotipova: apoptozom, staničnom pokretljivošću, aktivnošću tirozin kinaze za receptor epidermalnog čimbenika rasta, angiogenezom, staničnom adhezijom. Svaki od fenotipova je reguliran različitim statusom glikoziliranosti (152). Glikozilacijom stanične membrane dolazi do njene modifikacije, što je uobičajena fenotipska promjena tijekom nastanka raka. Glikozilacija uglavnom pogađa vanjski dio ugljikohidratnog dijela glikoproteina i glikolipida, što dovodi do izražaja ugljikohidratnih antigena povezanih s rakom, TACA. Većina TACA su sijalinizirani, a povećana sijalizacija staničnih glikoproteina u svezi je s N- i O-povezanim oligosaharidima stanica raka. Povećan izražaj sijaliniziranh epitopa opisan je u brojnim epitelnim karcinomima, a promjene u glikozilaciji povezane su s gradusom karcinoma, invazijom, metastaziranjem i prognozom (153-156) . Fukozilacija proteina se smatra karakterističnom promjenom u nastanku tumora (157). Fukozilaciju glikoproteina kataliziraju specifične fukoziltransferaze (FUT) (158).

Glikokonjugati koji se mijenjaju na površini tumorskih stanica tijekom razvoja raka mogu poslužiti kao značajni biljezi raka te kao specifične mete u ranoj dijagnostici i terapiji raka. Tako je npr. CA19-9 (sLe) značajan biljeg raka debelog crijeva, želuca i gušterače, CA125 (MUC16, O-glikozilirani protein) je biljeg raka jajnika, a CA15-3 (aberantno glikozilirani MUC1) raka dojke (129).

Ciljanje populacije CSC predstavlja obećavajući pristup u terapiji trostruko negativnog raka dojke, kojim bi se onemogućio povratak bolesti i otpornost na terapiju. S obzirom da su PLC enzimi uključeni u dva ključna procesa u razvoju tumora: staničnu pokretljivost i staničnu adheziju, PLC predstavlja dobru ciljnu molekulu za potencijalnu terapiju tumora. Stoga bi inhibitor PLC iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina, koji ima dokazanu protutumorsku aktivnost, mogao doprinijeti i smanjenju udjela CSC unutar tumora, kao i promjeni izražaja različitih gangliozida, mijenjajući fenotip prema ne-SCC, što je po prvi put prikazano u ovoj dizertaciji.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je ispitati učinak novosintetiziranog protutumorskog spoja 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamida na stanični metabolizam, apoptozu i aktivnost stanica trostruko negativnog karcinoma dojke te izražaj glikosfingolipida na CSC i ne-SCC tumorskim stanicama.

Nakon primjene Spoja na staničnim linijama MDA-MB-231 i MDA-MB-453 odrediti:

1. Metaboličku aktivnost stanica raka
2. Apoptozu u stanicama raka
3. Stvaranje mamosfera
4. Izražaj terminalno sijaliniziranih gangliozida na CSC i ne-SCC (postotak stanica pozitivnih na GM3, GD3, IV^{3}Neu5Ac-nLc$_4$Cer i IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer te geometrijska srednja vrijednost intenziteta fluorescencije, engl. *Geometric Mean Fluorescence Intensity,* GMI)
5. Izražaj gangliozida i neutralnih glikosfingolipida s terminalnim GalNAc ostatkom na CSC i ne-SCC (postotak stanica pozitivnih na GM2, GalNAc-GM1b, Gg$_3$Cer i Gb$_4$Cer i GMI)
6. Izražaj neutralnog glikosfingolipida s terminalnim Gal ostatkom (nLc$_4$Cer) na CSC i ne-SCC (postotak stanica pozitivnih na nLc$_4$Cer i GMI)
7. Izražaj glikosfingolipida na netretiranim CSC i ne-SCC stanične linije MDA-MB-231

2.2. Hipoteze

Primijenjene koncentracije novosintetiziranog Spoja će:

1. inducirati apoptozu,
2. smanjiti postotak CSC,
3. smanjiti broj mamosfera,
4. promijeniti glikofenotip u smjeru ne-SCC.

3. MATERIJALI I METODE

4.1. Stanične kulture trostruko negativnog raka dojke

Stanične linije trostruko negativnog raka dojke MDA-MB-231 i MDA-MB-453 uzgajane su u inkubatoru na 37°C i 5% CO_2 u DMEM-u (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) s dodatkom 10 %-tnog goveđeg seruma (engl. *Fetal bovine serum,* FBS*,* EuroClone, Milano, Italija) i 1 % antibiotika (penicilin/streptomicin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).

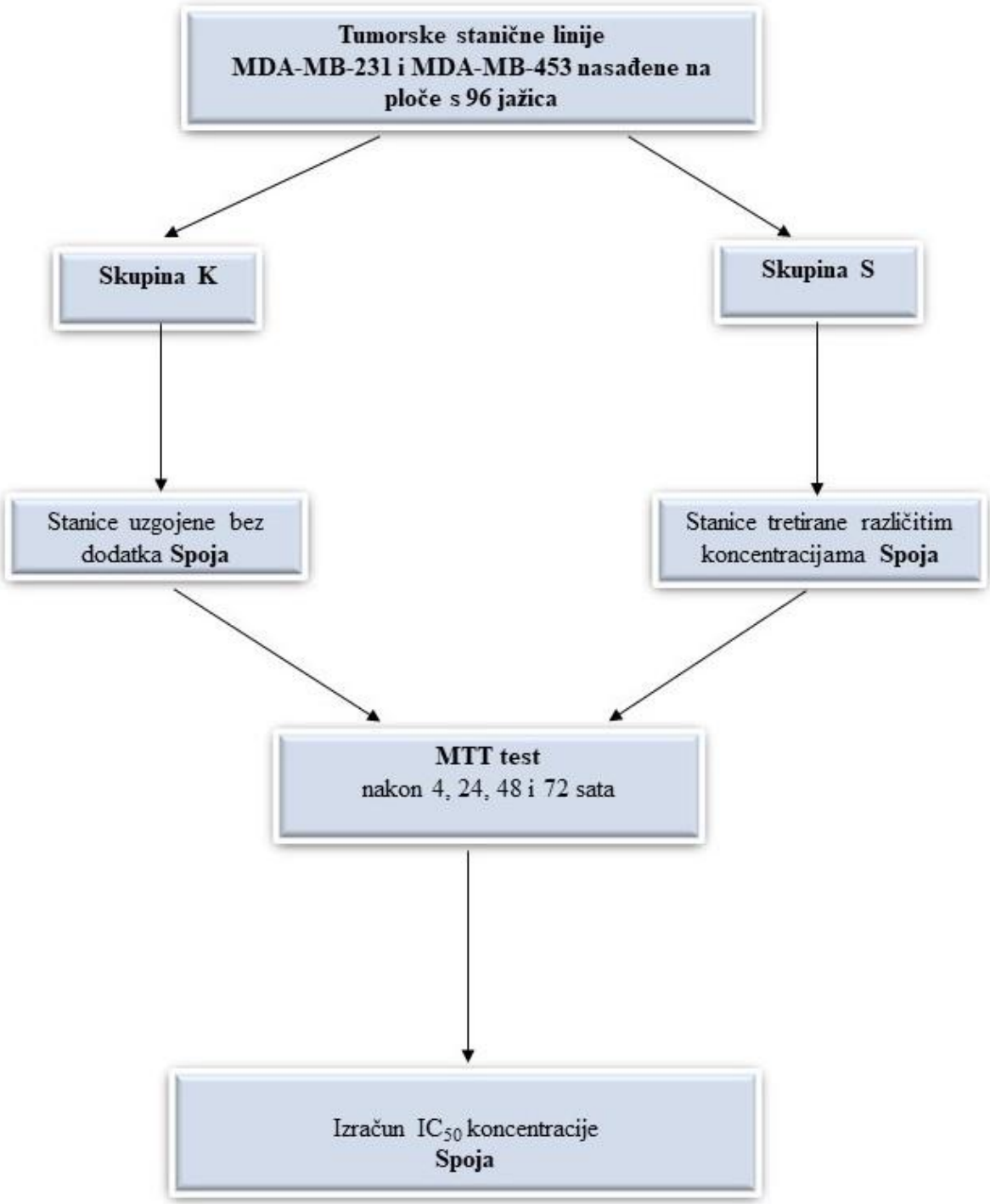
4.2. Spoj (3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid

Spoj je sintetiziran u laboratoriju dr. David Barker i dr. Lisa Ivy Pilkington, School of Chemical Sciences, The University of Auckland, Auckland, Novi Zeland. Prvo je otopljen u dimetil sulfoksidu, DMSO-u (od engl. *dimethyl sulfoxide*), a kasnije razrijeđen DMEM-om kako bi se dobile koncentracije 50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μM i 5 μM, čije se djelovanje određivalo. Konačni maksimalni udio DMSO-a je bio 0,01 % u najvećoj koncentraciji Spoja od 5 μM što je dokazano dovoljno niski udio koji nema utjecaja na proliferaciju stanica (159).

4.3. Mjerenje citotoksične aktivnosti

Za određivanje postotka metabolički aktivnih stanica raka dojke korišten je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid) test. Analiza detektira žive stanice, a generirani signal ovisi o stupnju aktivacije stanica, stoga je analiza pogodna za mjerenje citotoksičnosti, proliferacije i aktivacije stanica (160). Jednak broj stanica nasađen je u pentaplikatima na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica koje su ostavljene adherirati preko noći u inkubatoru. Sutradan su stanice tretirane medijem (kontrolne stanice) i otopinama različitih koncentracija Spoja u mediju te su ostavljene inkubirati se 4, 24, 48 i 72 sata. Nakon ovakvog tretmana, stanice su inkubirane sa 100 μL 0,5 mg/ml otopine MTT-a (Merck, Darmstadt, Njemačka) kroz 1 sat. Otopina je potom uklonjena te je dodan DMSO, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Biosan, Schaffhausen, Švicarska) (161).

Hodogram mjerenja citotoksične aktivnosti staničnih linija nakon različitih tretmana prikazan je na slici 16.



Slika 16. Hodogram mjerenja citotoksične aktivnosti staničnih linija nakon različitih tretmana.

4.4. Protočna citometrija

Nakon provedbe MTT testova, za analizu apoptoze i glikofenotipa CSC i ne-SCC primijenjena je koncentracija Spoja od 2 μM , a koja predstavlja IC_{50} vrijednost za 48 h za obje stanične linije, a izračunata je pomoću GraphPad Prism 7.0 programa (San Diego, CA, SAD). Prema Wang i sur. (162), primjenom što niže koncentracije željele su se postići značajne promjene u svim nadalje ispitivanim parametrima (apoptozi, postotcima CSC i ne-SCC unutar ukupnih populacija te postotcima subpopulacija CSC i ne-SCC pozitivnih na biljege GM3, GD3, IV^3Neu5Ac-nLc_4Cer, IV^6Neu5Ac-nLc4Cer, GM2, GalNAc-GM1b, Gg_3Cer, Gb_4Cer i nLc_4Cer), uz istovremeno preživljenje dovoljnog broja stanica za provođenje svih analiza.

4.4.1. Apoptoza

Jednak broj stanica nasađen je u triplikatima na mikrotitarske pločice sa 6 jažica i tretiran 2 μM koncentracijom otopine Spoja te je analizirana apoptoza. Nakon tretmana Spojem stanice su tripsinizirane, isprane otopinom fosfatnog pufera (PBS) i resuspendirane u 100 μl pufera za vezivanje koji sadrži 5 μl boje Aneksin-V- fluorescein izotiocijanat (FITC) i/ili 5 μl propidij jodida (Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Ova vrsta specifičnog bojanja stanične površine koristi Aneksin-V, protein ovisan o Ca^{2+} koji se veže za fosfolipid i služi kao biljeg rane apoptoze. Kombinacijom Aneksina i PI omogućena je diferencijacija rane i kasne apoptoze. Diferencijacija apoptotičnih, nekrotičnih i vijabilnih stanica temelji se na kombinaciji pozitivnih, odnosno negativnih rezultata kombinacije ovih dvaju spojeva te će rano apoptotične stanice imati kombinaciju Aneksin-V^+/PI^-, kasno apoptotične će biti Aneksin-V^+/PI^+, dok će vijabilne stanice biti Aneksin-V i PI negativne. Nakon 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u tamnom, stanice su analizirane protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Postotak apoptotičnih stanica i standardna devijacija analizirani su programom FlowLogic (Inivai Victoria, Australia).

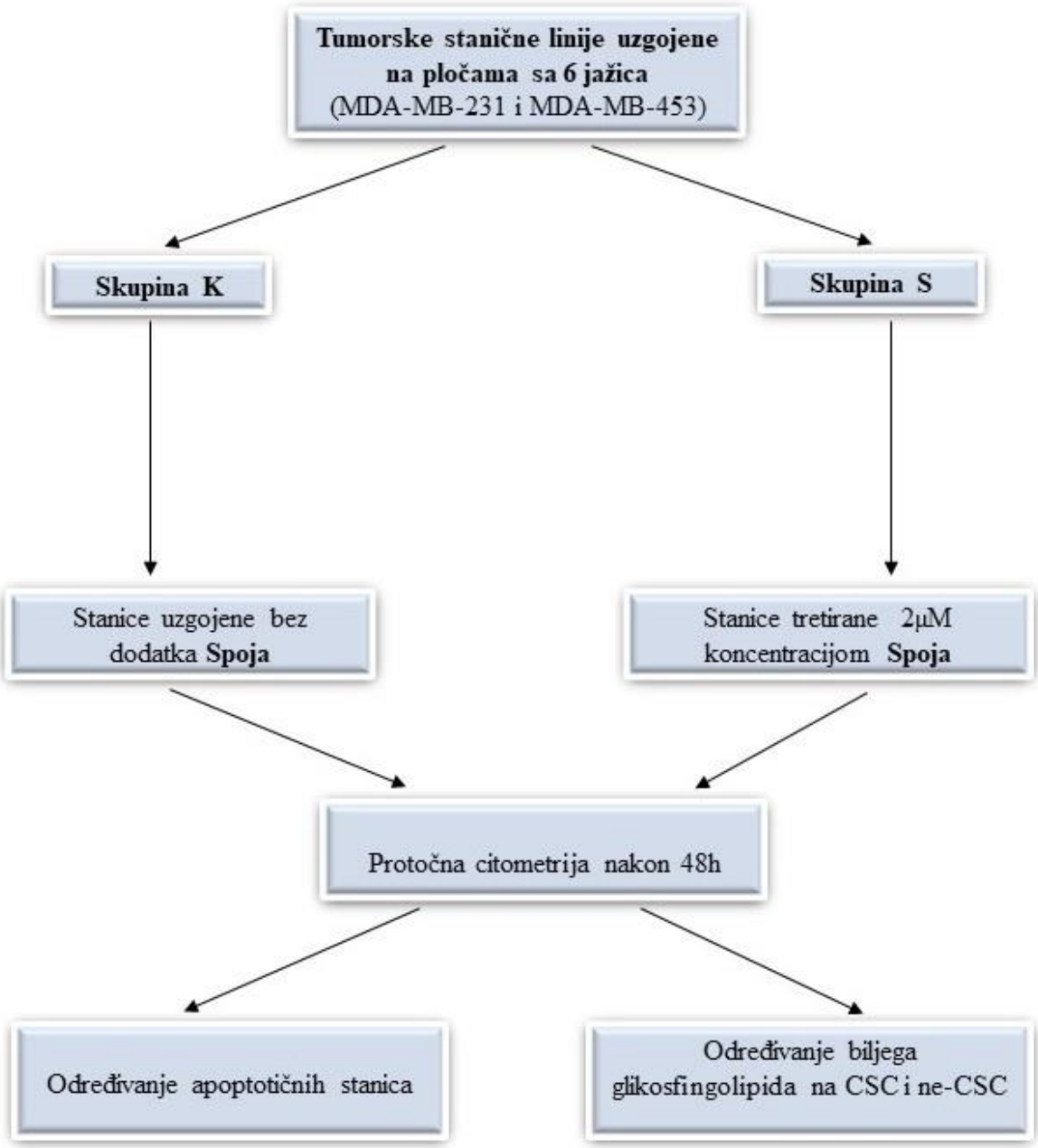
4.4.2. Određivanje izražaja glikosfingolipida na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke

Stanična linija MDA-MB-231 je tretirana 2μM koncentracijom Spoja tijekom 48 sati, nakon čega su stanice tripsinizirane i isprane PBS-om te potom obojana protu-CD44-fluorescein izotiocijanat (FITC, BD Biosciences, New York, SAD), protu-CD24-fikoeritrin (PE, eBioscience, Inc. San Diego, CA, SAD) i anti-GSL protutijelima. Primarno protutijelo na GM3 (mišji IgM) proizvedeno je u Cosmo Bio Co. (Tokyo, Japan), dok je primarno protutijelo na GD3 (mišji IgG3) proizvedeno u laboratoriju dr. J. Müthing (163). Sva ostala protutijela na glikosfingolipide (Gb_4Cer, nLc_4Cer, $IV^3Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$, $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$, GM2, Gg_3Cer i GalNAc-GM1b) su pileća poliklonalna protutijela proizvedena u laboratoriju dr. J. Müthinga (164). Vezivanje primarnih protu-GSL protutijela određivano je pomoću sekundarnih protutijela konjugiranih eFluor 660 fluorokromom (Abcam).

Stanična linija MDA-MB-453 tretirana je na isti način kao i stanična linija MDA-MB-231 te je osim protutijela korištenih za bojanje ove linije, stanična linija MDA-MB-453 bojana još i s protu-CD133-fikoeritin/cijanin7 fluorokromom (PE/Cy7, BioLegends, San Diego, SAD).

Fluorescencija obojanih uzoraka mjerena je protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Podatci su analizirani korištenjem FlowLogic programa (Inivai, Victoria, Australia). CSC su određene na staničnim linijama MDA-MB-231 ($CD44^+CD24^-$) i MDA-MB-453 ($CD133^+$) te je na njima, kao i na ne-SCC staničnih linija MDA-MB-231 ($CD44^-CD24^+$, $CD44^+CD24^+$, $CD44^-CD24^-$) i MDA-MB-453 ($CD133^-$) određen izražaj glikosfingolipida (postotak stanica pozitivnih na GM3, GD3, $IV^3Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$, $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$, GM2, GalNAc-GM1b, Gg_3Cer, Gb_4Cer i nLc_4Cer te geometrijska srednja vrijednost intenziteta fluorescencije, engl. *Geometric Mean Fluorescence Intensity,* GMI).

Hodogram istraživanja udjela apoptotskih stanica te izražaja glikosfingolipida na CSC i ne-SCC, koji bi mogli ukazati na mogući biokemijski mehanizam djelovanja Spoja, prikazan je na slici 17.

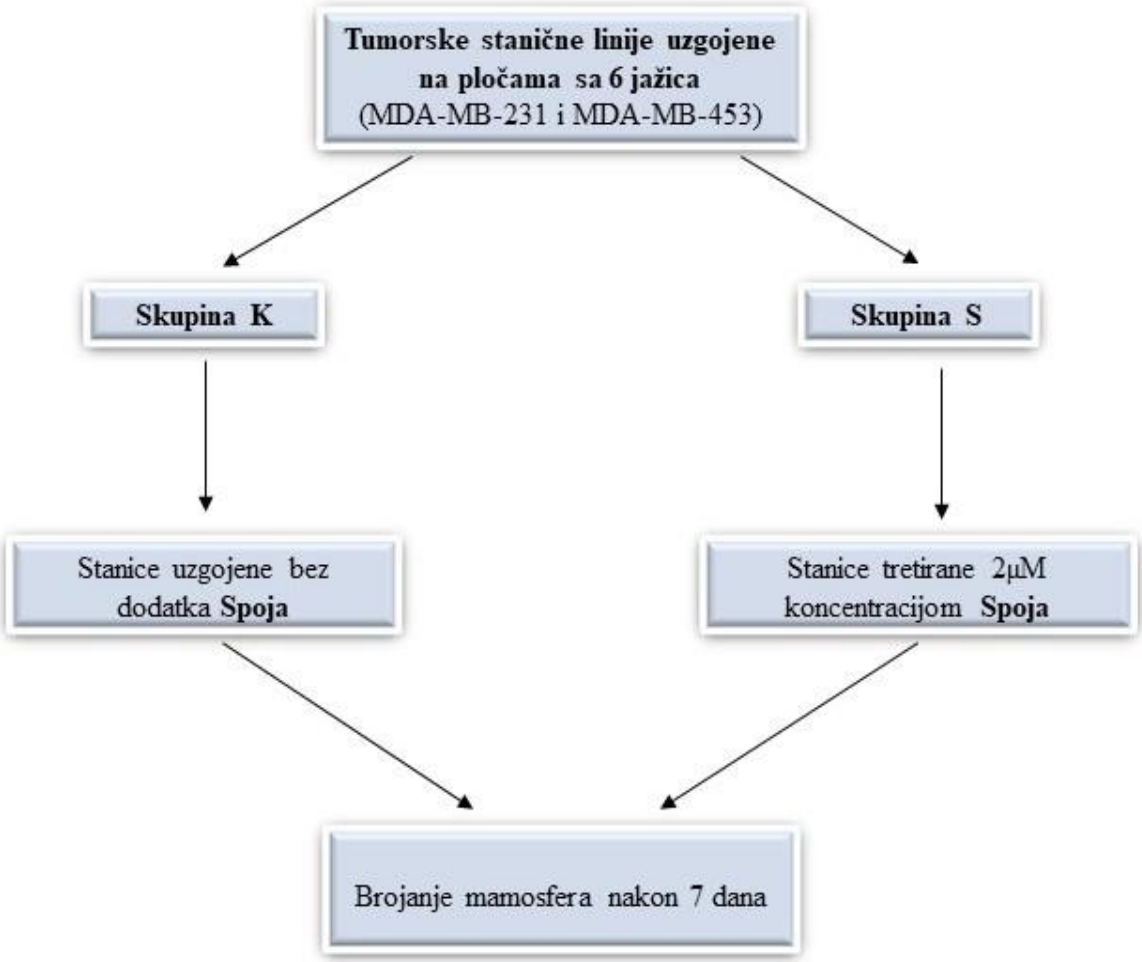


Slika 17. Hodogram istraživanja udjela apoptotskih stanica te izražaja glikosfingolipida na CSC i ne-SCC.

4.5. Test stvaranja mamosfera - aktivnost CSC

Jednak broj stanica obiju staničnih linija, MDA-MB-231 i MDA-MB-453 nasađen je u triplikatima na mikrotitarske pločice slabe prijemčljivosti sa 6 jažica (Corning® Costar® Ultra-Low Attachment Multiple Well Plate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i uzgojen u 2 ml obogaćenog medija za kultivaciju mamosfera, uz dodatak otopine antibiotika. Nakon 7 dana inkubacije izbrojan je broj mamosfera većih od 50 μm pomoću invertnog mikroskopa (Motic AE31E Inverted Microscope, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Mamosfere su fotografirane pomoću kamere (Industrial Digital Camera, Lacerta GmbH, Austrija).

Hodogram testa stvaranja mamosfera prikazan je na slici 18.



Slika 18. Hodogram testa stvaranja mamosfera

4.6. Statistički postupci

Apsorbancije tretiranih stanica dobivene MTT testom podijeljene su s apsorbancijama za netretirane stanice kako bi se dobio postotak metabolički aktivnih stanica. Podatci dobiveni protočnom citometrijom analizirani su u FlowLogic programu.

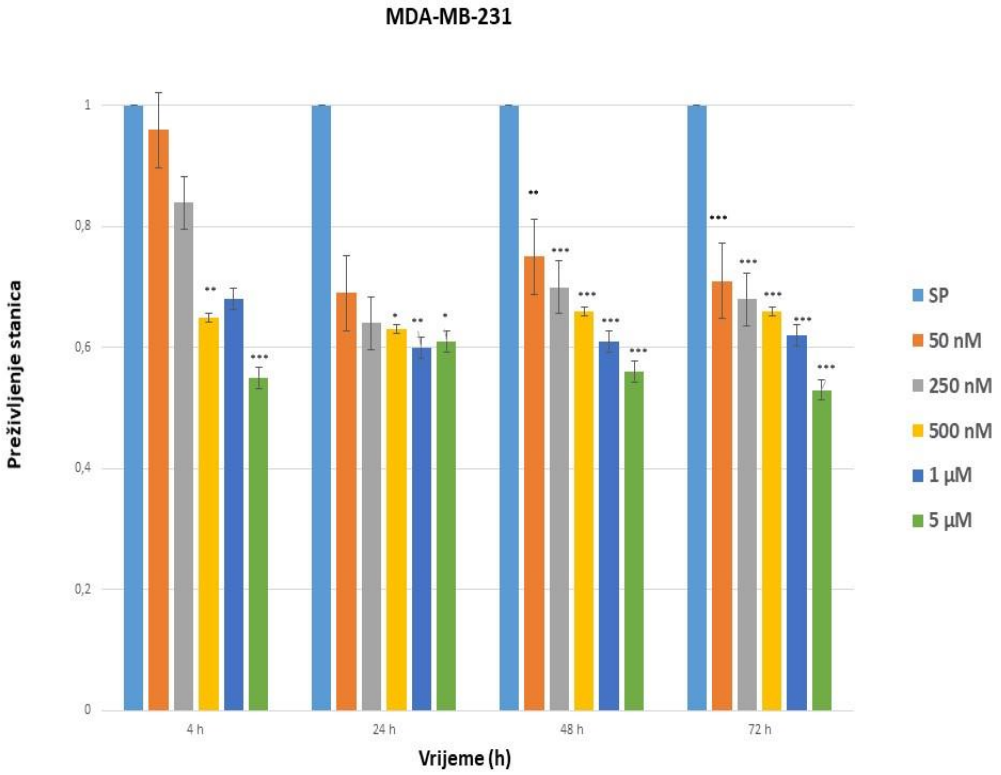
Svi podatci su obrađeni ANOVA testom te post-hoc Tukey testom ili Kruskal–Wallis testom u GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD). Statistička značajnost postavljena je na $P < 0.05$.

5. REZULTATI

5.1. Citotoksično djelovanje Spoja ovisno o vremenu i koncentraciji

Preživljenje stanica nakon 4, 24, 48 i 72 sata djelovanja različitih koncentracija Spoja (50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM i 5 µM) uspoređeno je korištenjem MTT testa (Slike 19. i 20.).

Kod tretmana stanične linije MDA-MB-231, Spoj pokazuje citotoksičnost pri koncentraciji od 500 nM nakon samo 4 sata (postotak preživljenih stanica je 65 %), dok je deset puta niža koncentracija (50 nM) citotoksična nakon 48 sati (postotak preživljenih stanica iznosi 69 %). Maksimalnu citotoksičnost Spoj pokazuje nakon 72 sata tretmana 5 µM otopinom, uz postotak preživljenih stanica 53 %. (Slika 19.).

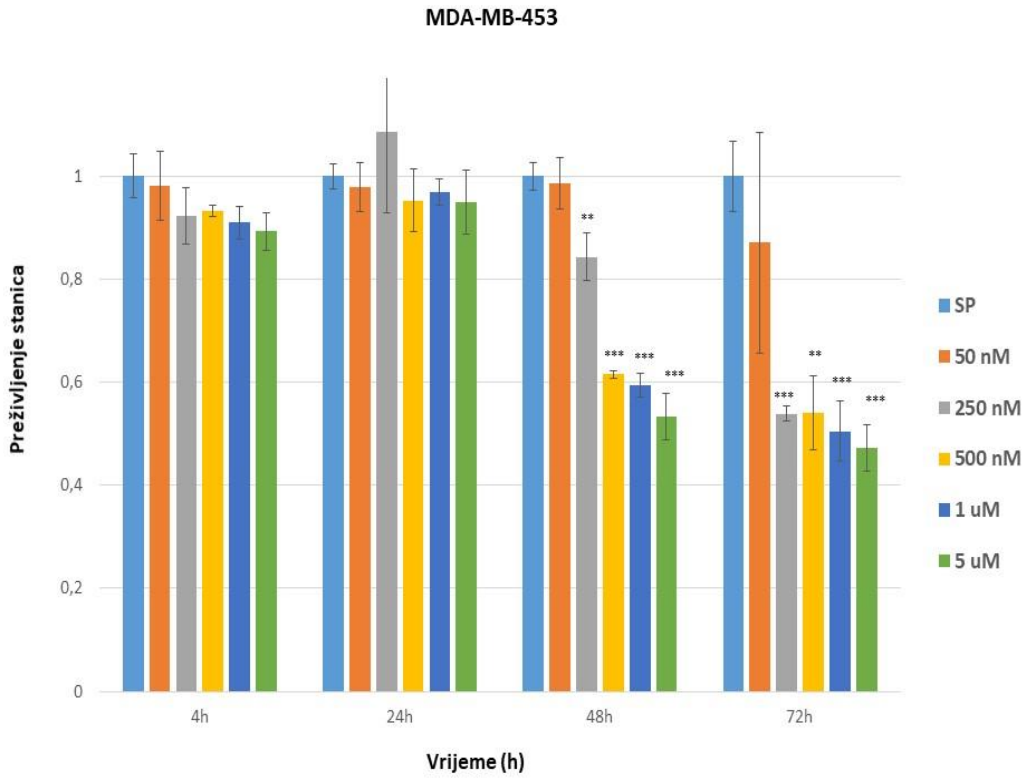


Slika 19. Rezultati preživljenja MDA-MB-231 stanica nakon MTT testa**.**

SP – kontrola. 100% preživljenje stanica =1.

* P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001.

Kod tretmana stanične linije MDA-MB-453, Spoj pokazuje citotoksičnost pri koncentraciji od 250 nM nakon 48 sati (84 %), dok je maksimalna citotoksičnost postignuta 72 sata nakon tretmana 5 µM otopinom Spoja, uz postotak od 47 % preživljenih stanica (Slika 20.).



Slika 20. Rezultati preživljenja MDA-MB-453 stanica nakon MTT testa**.**

SP – kontrola. 100% preživljenje stanica =1.

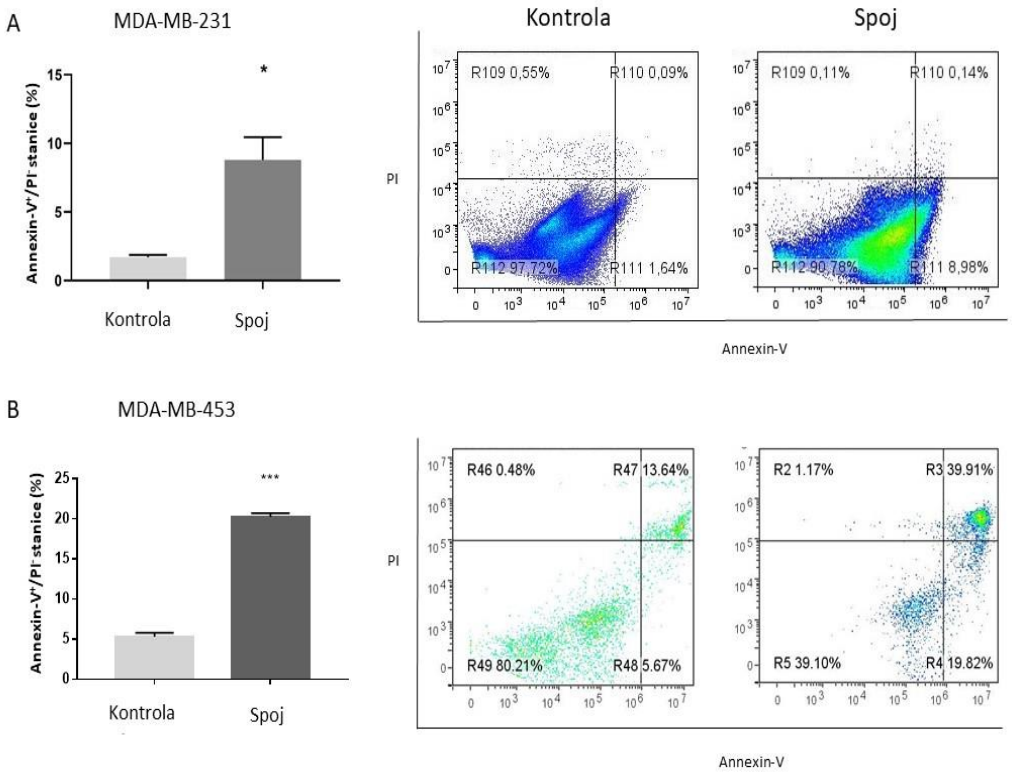
** P<0,01; ***P<0,001.

Na slikama 19. i 20. uočljiva je ovisnost usporavanja rasta obje stanične linije o koncentraciji Spoja i vremenu izloženosti istome. Kod stanične linije MDA-MB-231, 0,5 µM i 5 µM koncentracije Spoja pokazuju značajan utjecaj na smanjenje staničnog preživljenja u usporedbi s netretiranim stanicama nakon četverosatnog tretmana. Nakon 24 satnog tretmana 0,5 µM koncentracijom uočeno je značajno smanjenje preživljenja, dok nakon 48, odnosno 72 sata Spoj značajno djeluje na smanjenje broja stanica u svim koncentracijama (Slika 19.). Kod stanične linije MDA-MB-453, Spoj pokazuje slabiji utjecaj na smanjenje staničnog preživljenja

nakon četverosatnog, odnosno 24-satnog tretmana u usporedbi s netretiranim stanicama (Slika 20.). Međutim, nakon 72 sata, niže koncentracije Spoja su citotoksičnije za MDA-MB-453 stanice negoli za MDA-MB-231 stanice.

5.2. Mehanizam stanične smrti

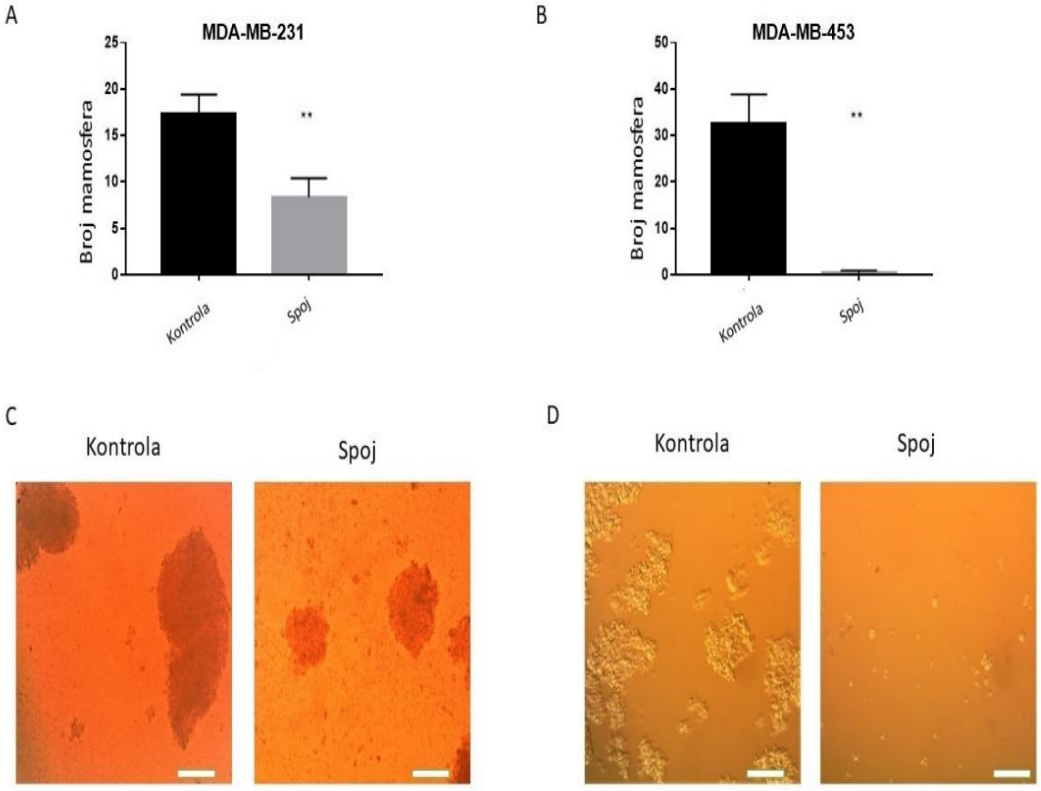
Da bi se utvrdilo je li stanična smrt posljedica apoptoze ili staničnog aresta, stanice su tretirane 48 sati 2 μM otopinom Spoja, nakon čega su obojane kombinacijom boje Annexin V i propidijevog jodida. Tretman Spojem uzrokovao je apoptozu stanica u obje stanične linije (Slika 21.). Tretirane stanice pokazuju značajan porast rano apoptotičnih stanica (Annexin-V^+/PI^- subpopulacija) u obje stanične linije u usporedbi sa netretiranim stanicama (Slike 21A i 21B).



Slika 21. Postotak i točkasti dijagrami apoptotskih stanica (Annexin-V^+/PI^-) staničnih linija MDA-MB-231 (A) i MDA-MB-453 (B) nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja.
* P<0,05; ***P<0,001.

5.3. Stvaranje mamosfera

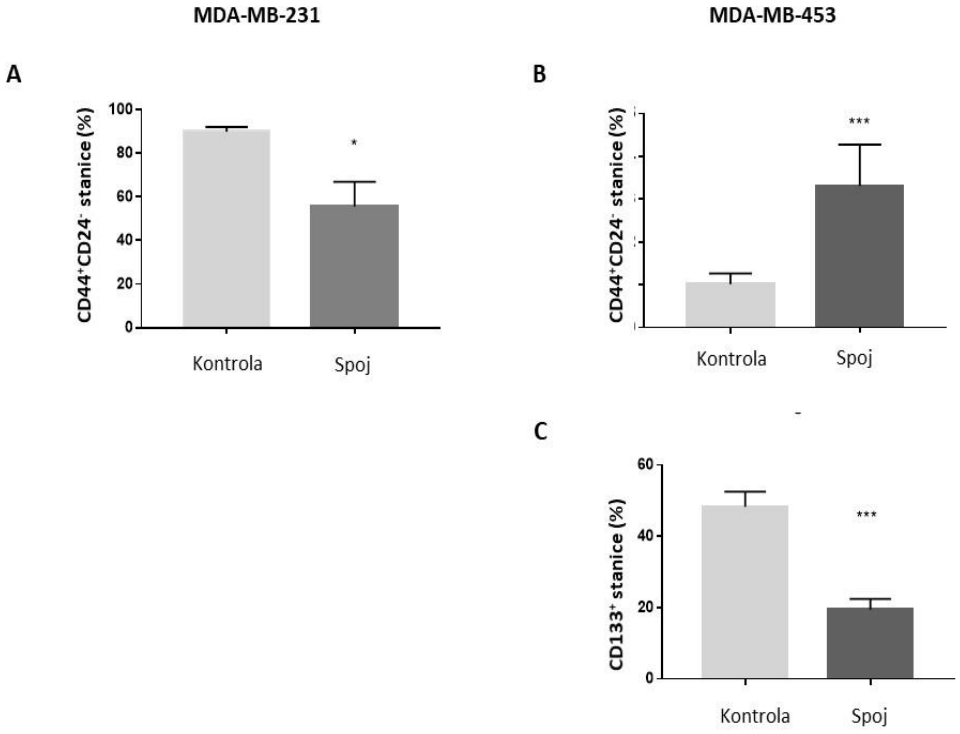
Da bi se utvrdilo jesu li CSC osjetljive na Spoj, određivao se broj mamosfera. Brojane su mamosfere veće od 50 μm. Nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja, broj mamosfera kod obje stanične linije značajno je snižen, i to sa 17,33 ± 2,83 u kontrolnoj skupini na 8,33 ± 2,83 u tretiranoj skupini kod stanične linije MDA-MB-231 (Slika 22A), dok je tretman 2 μM koncentracijom Spoja kod stanične linije MDA-MB-453 uzrokovao potpunu inhibiciju stvaranja mamosfera te je broj mamosfera snižen sa 32,5 ± 17,68 u kontrolnoj na nula u tretiranoj skupini (Slika 22C). Na slikama 22B i 22D prikazane su mamosfere u kulturi stanica pri povećanjima objektiva 40, odnosno 100 puta.



Slika 22. Broj mamosfera staničnih linija MDA-MB-231 (A) i MDA-MB-453 (C) bez i nakon sedmodnevnog tretmana 2 μM koncentracijom Spoja te komparativne fotografije mamosfera staničnih linija MDA- MB-231 (B) i MDA-MB-453 (D), snimljene različitim povećanjima objektiva.
**P<0,01.

5.4. Matične stanice raka

CSC stanične linije MDA-MB-231 pokazuju $CD44^+/CD24^-$ fenotip (165). Tretman 2 μM koncentracijom Spoja rezultirao je statistički značajnim smanjenjem $CD44^+/CD24^-$ subpopulacije s 89,9 % (netretirana kontrola) na 55,5 % (Slika 23A). Izražaj CD44 biljega je jako malen u staničnoj liniji MDA-MB-453 te se $CD44^+/CD24^-$ fenotip ne smatra biljegom CSC kod ove linije (23, 166). Ova subpopulacija pokazuje statistički značajan porast nakon tretmana Spojem (Slika 23B). Puno pouzdaniji biljeg CSC za staničnu liniju MDA-MB-453 je CD133 (167). Postotak $CD133^+$ stanica je značajno smanjen, s 58,3 % (netretirana kontrola) na 19,4 % nakon tretmana Spojem (Slika 23C).



Slika 23. Postotak $CD44^+/CD24^-$ CSC u staničnim linijama MDA-MB-231 (A) i MDA-MB-453 (B) te $CD133^+$ CSC u staničnoj liniji MDA-MB-453 (C) nakon 48-satnog tretmana 2 μM koncentracijom Spoja.
*P<0,05; ***P<0,001.

5.5. Izražaj glikosfingolipida na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke

S ciljem utvrđivanja ovisnosti mehanizma citotoksičnosti spoja o različitom sadržaju membranskih glikosfingolipida, određivan je izražaj glikosfingolipida na CSC (definiranim kao $CD44^+/CD24^-$ subpopulacija u staničnoj liniji MDA-MB-231 i $CD133^+$ u staničnoj liniji MDA-MB-453). Također je određivan sadržaj glikosfingolipida na ne-SCC ($CD44^+/CD24^+$, $CD44^-/CD24^-$ i $CD44^-/CD24^+$ u MDA-MB-231 i $CD133^-$ u staničnoj liniji MDA-MB-453).

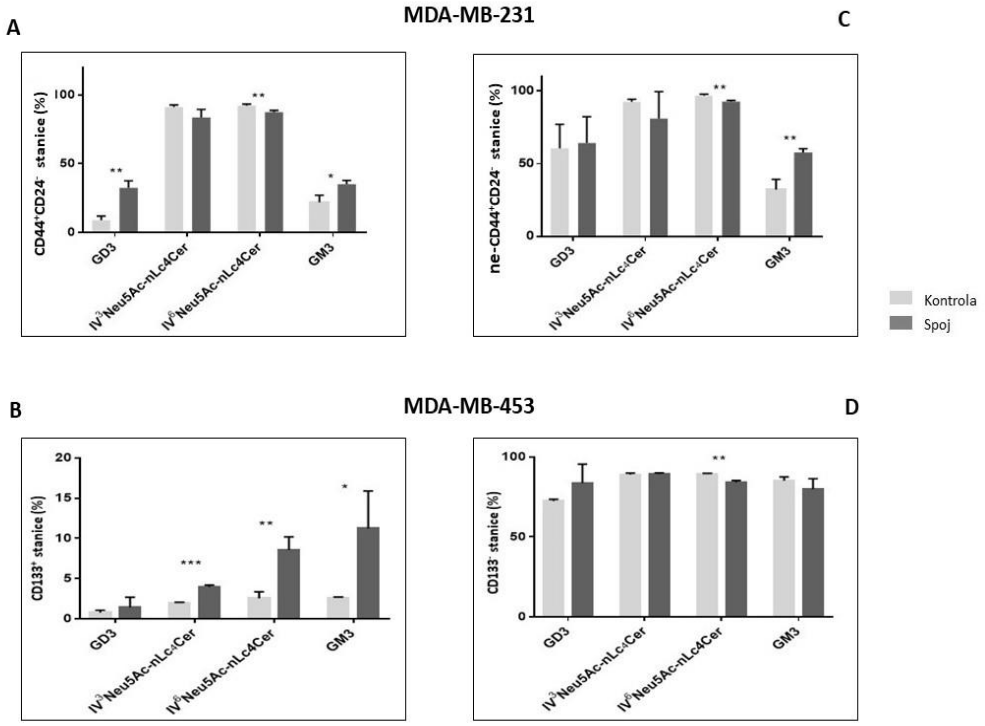
Izražaj pojedinog GSL po jednoj stanici prikazan je kao GMI (od engl. *Geometric mean intensity*). GMI je bolji pokazatelj izražaja GSL nego postotak stanica jer umanjuje potencijalnu subjektivnu pogrešku (168).

Terminalni šećerni ostatak gangliozida GM3, GD3, IV^3Neu5Ac-nLc_4Cer i IV^6Neu5Ac-nLc_4Cer je sijalinska kiselina ili N-acetil-neuraminska kiselina. Zadnji korak sinteze gangliozida GM2 i GalNAc-GM1b je prenošenje GalNAc ostatka. Zbog toga je izražaj GM2 i GalNAc-GM1b analiziran zajedno s neutralnim GSL Gg_3Cer (globotriaozilceramid, Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer) i Gb_4Cer (globotetraozilceramid, GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer) jer također sadrže terminalni GalNAc ostatak.

5.5.1. Izražaj terminalno sijaliniziranih gangliozida na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke

Postotak GM3 pozitivnih stanica povećan je na tretiranim CSC i ne-SCC stanične linije MDA-MB-231 u odnosu na netretirane stanice, dok je postotak IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer pozivnih stanica snižen u obje subpopulacije tretiranih u odnosu na netretirane stanice (Slika 24A i 24C). Nakon tretmana Spojem značajno je porastao postotak GD3 pozitivnih stanica na CSC (Slika 24A), dok na postotak IV^{3}Neu5Ac-nLc$_4$Cer stanica Spoj nema utjecaja (Slika 24A i 24C).

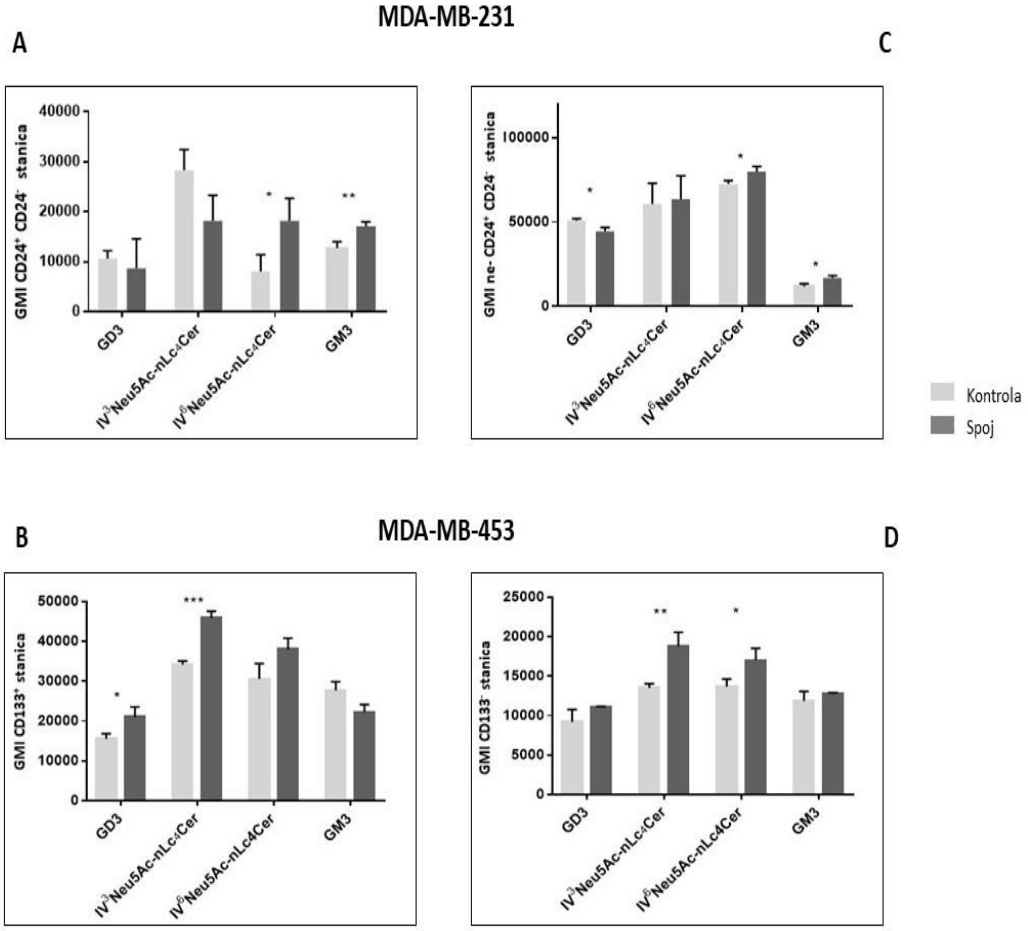
Kod stanične linije MDA-MB-453, postotak GM3, IV^{3}Neu5Ac-nLc$_4$Cer i IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer pozitivnih stanica značajno je povišen samo na CSC subpopulaciji tretiranih stanica (Slika 24B), dok je postotak IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer pozitivnih stanica snižen na ne-SCC tretiranim stanicama (Slika 24D). Tretman Spojem ne utječe na postotak GD3 pozitivnih stanica (Slika 24B i 24D).



Slika 24. Postotak terminalno sijaliniziranih GSL na CD44$^+$/CD24$^-$ CSC stanične linije MDA-MB-231 (A) i CD133$^+$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (B) i ne-CD44$^+$/CD24$^-$ CSC stanične linije MDA-MB 231 (C) i CD133$^-$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (D). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja, izražaj IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer u staničnoj liniji MDA-MB-231 povećan je na CSC i ne-SCC (Slika 25A i 25C), dok je izražaj GD3 na ne-matičnim stanicama raka značajno snižen (Slika 25C).

Kod stanične linije MDA-MB-453, izražaj IV^{3}Neu5Ac-nLc$_4$Cer je povećan na CSC i ne-SCC (Slika 25B i 25D), izražaj GD3 povećan je samo na CSC subpopulaciji (Slika 25B), a izražaj IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer na ne-SCC subpopulaciji (Slika 25D) nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja. Spoj nema utjecaja na izražaj GM3 na obje subpopulacije ove stanične linije.

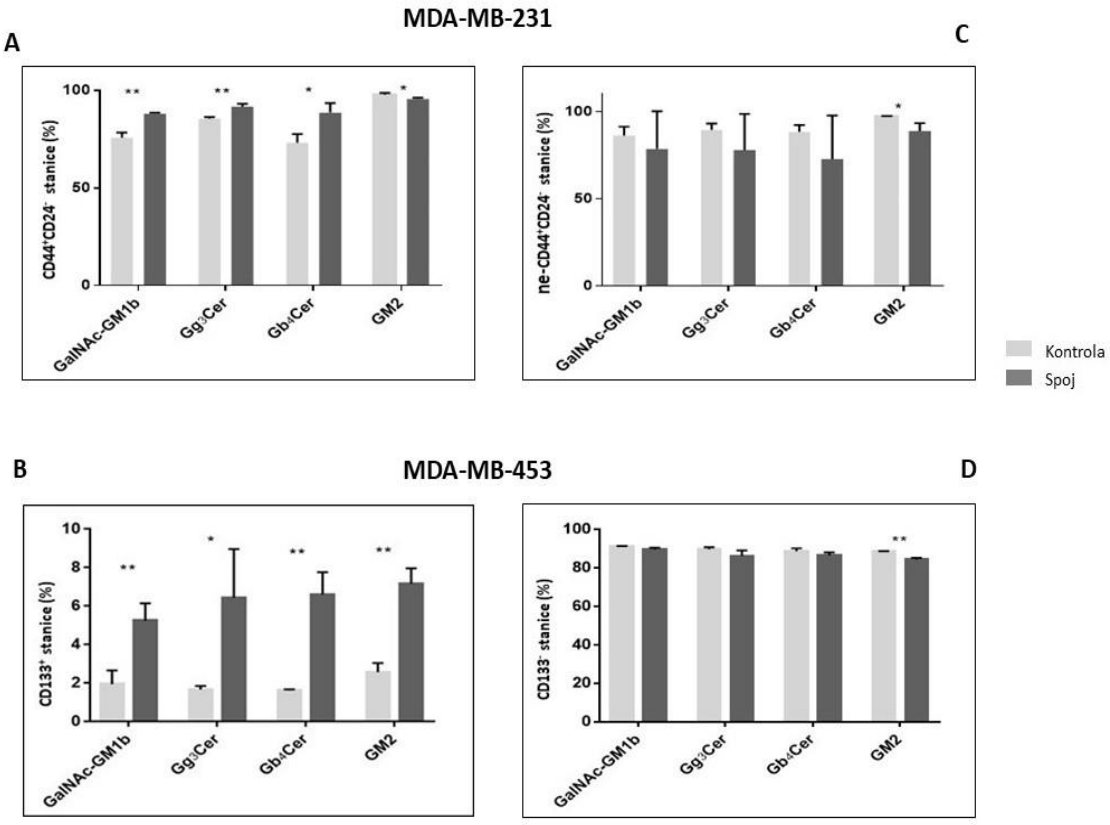


Slika 25. GMI terminalno sijaliniziranih GSL na CD44$^+$/CD24$^-$ CSC stanične linije MDA-MB-231 (A) i CD133$^+$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (B) i ne-CD44$^+$/CD24$^-$ CSC stanične linije MDA-MB 231 (C) i CD133$^-$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (D). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

5.5.2. Izražaj gangliozida i neutralnih glikosfingolipida s terminalnim GalNAc ostatkom na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke

Postotak GM2 pozitivnih stanica snižen je na CSC i ne-SCC stanicama stanične linije MDA-MB-231 (Slika 26A i 26 C), dok su postotci GalNAc-GM1b, Gg_3Cer i Gb_4Cer pozitivnih stanica povećani samo na CSC subpopulaciji (Slika 26A) nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja.

Kod stanične linije MDA-MB-453, postotak GM2, GalNAc-GM1b, Gg_3Cer, i Gb_4Cer pozitivnih stanica značajno je povećan na CSC subpopulaciji (Slika 26C), dok je postotak GM2 snižen na ne-SCC subpopulaciji (Slika 26D) nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja.

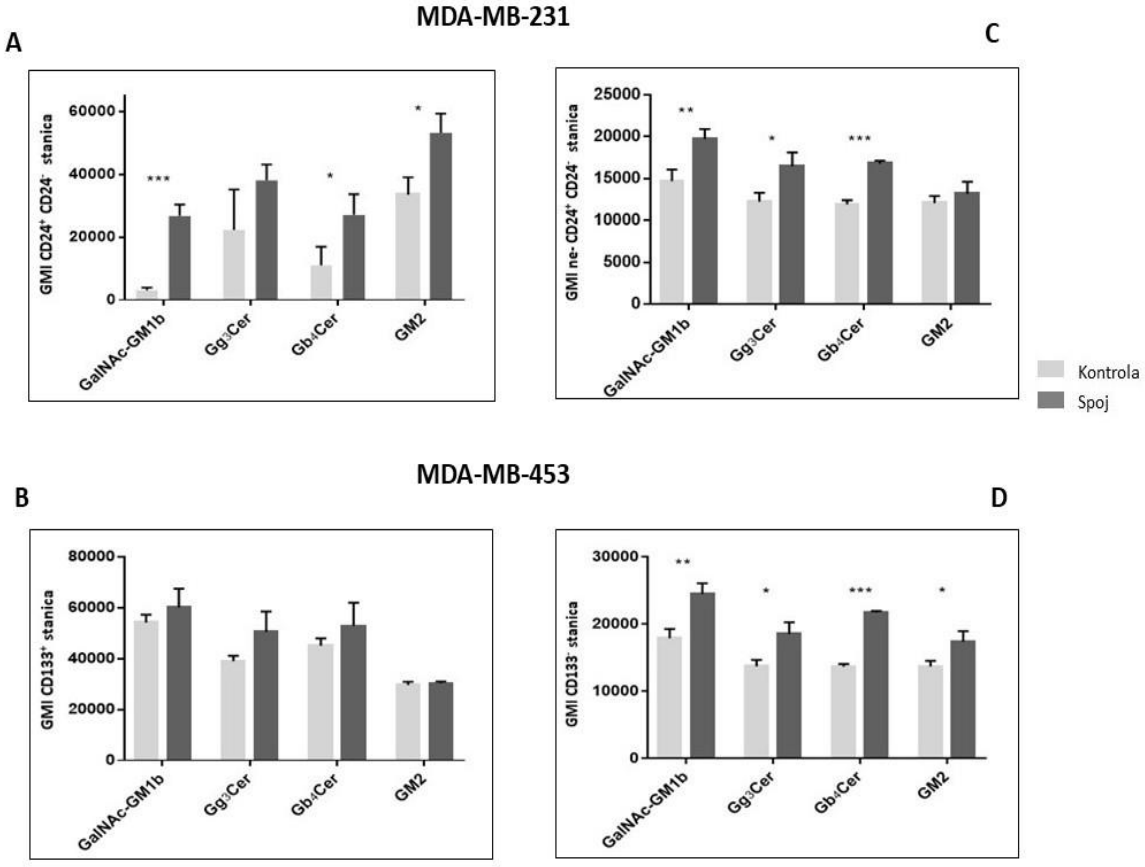


Slika 26. Postotak gangliozida i neutralnih GSL s terminalnim GalNAc ostatkom na $CD44^+CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB-231 (A) i $CD133^+$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (B) i ne-$CD44^+CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB 231 (C) i $CD133^-$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (D).

*P<0,05; **P<0,01.

Tretman 2 μM koncentracijom Spoja značajno povećava izražaj GalNAc-GM1b, Gb_4Cer i GM2 na CSC subpopulaciji stanične linije MDA-MB-231 (Slika 27A), dok se izražaj GM2 značajno ne mijenja na ne-SCC subpopulaciji (Slika 27C).

Kod stanične linije MDA-MB-453 tretman 2 μM koncentracijom Spoja značajno povećava izražaj GM2, GalNAc- GM1b, Gg_3Cer i Gb_4Cer na ne-SCC subpopulaciji (Slika 27D), ali ne utječe na izražaj ovih GSL na CSC subpopulaciji (Slika 27B).



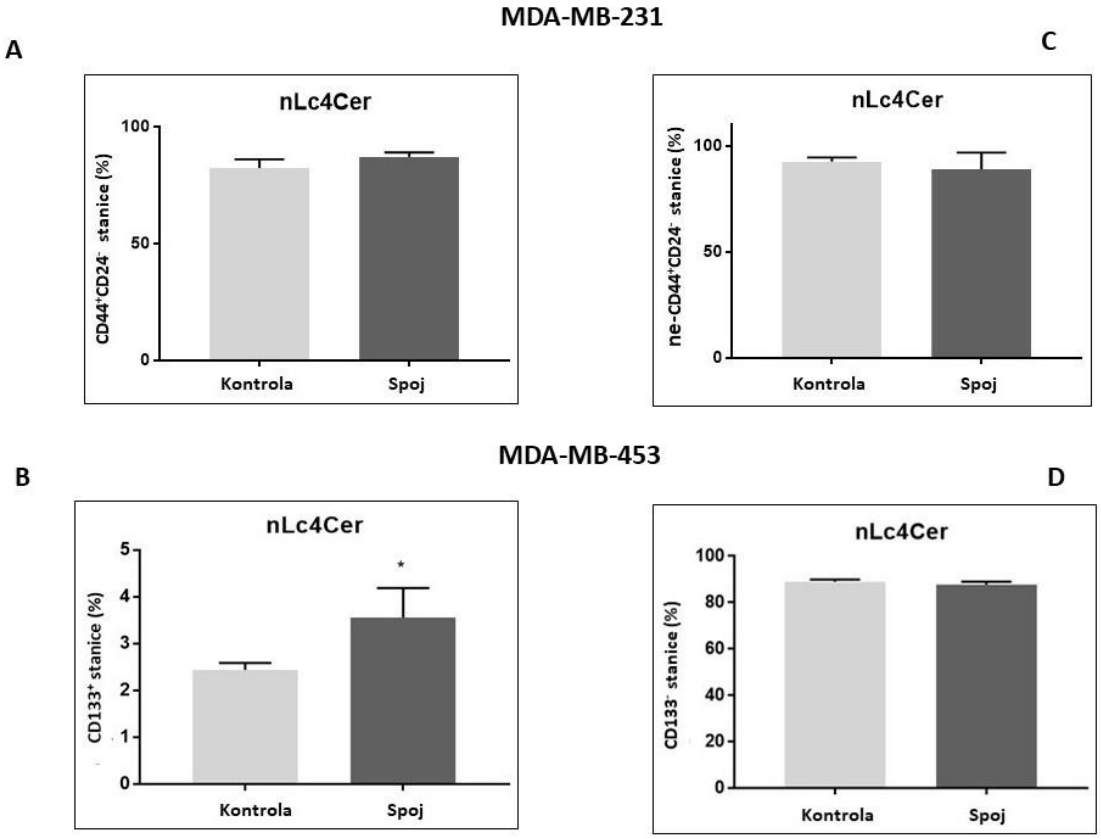
Slika 27. GMI gangliozida i neutralnih GSL s terminalnim GalNAc ostatkom na $CD44^+/CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB-231 (A) i $CD133^+$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (B) i ne-$CD44^+/CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB 231 (C) i $CD133^-$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (D).

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

5.5.3. Izražaj neutralnog glikosfingolipida s terminalnim Gal ostatkom na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke

Nema promjena u postotku nLc_4Cer pozitivnih stanica na CSC i ne-SCC stanicama stanične linije MDA-MB-231 nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja (Slika 28A i 28C).

Postotak nLc_4Cer pozitivnih stanica značajno je povećan na CSC subpopulaciji stanične linije MDA-MB-453 nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja (Slika 28B), dok na ne-SCC subpopulaciji nema promjena u postotku (Slika 28D).

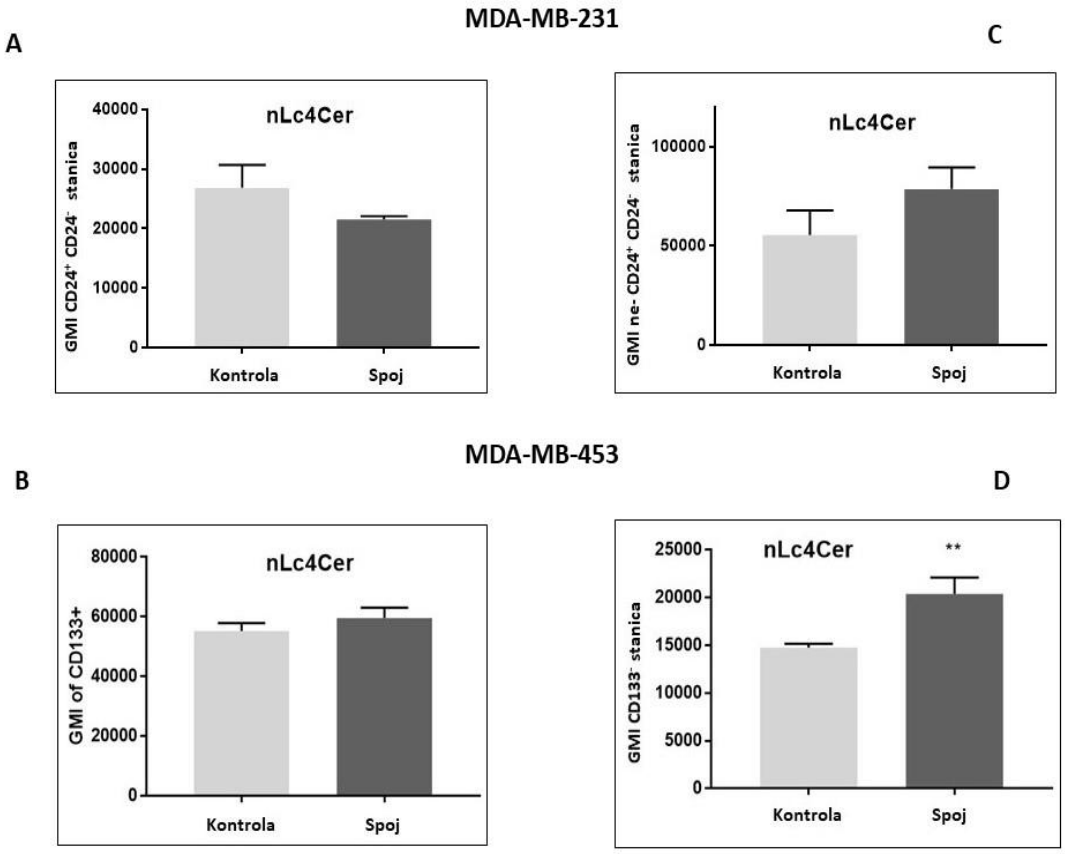


Slika 28. Postotak neutralnog GSL s terminalnim Gal ostatkom na $CD44^+/CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB-231 (A) i $CD133^+$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (B) i ne-$CD44^+/CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB 231 (C) i $CD133^-$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (D).

*P<0,05

Kod stanične linije MDA-MB-231, također ne dolazi do promjene u izražaju nLc_4Cer na obje subpopulacije nakon tretmana Spojem (Slika 29A i 29C).

Izražaj nLc_4Cer je povećan na ne-SCC stanicama stanične linije MDA-MB-453 nakon tretmana 2 μM koncentracijom Spoja (Slika 29D), dok isti tretman nema utjecaja na izražaj nLc_4Cer na CSC subpopulaciji ove stanične linije (Slika 29B).

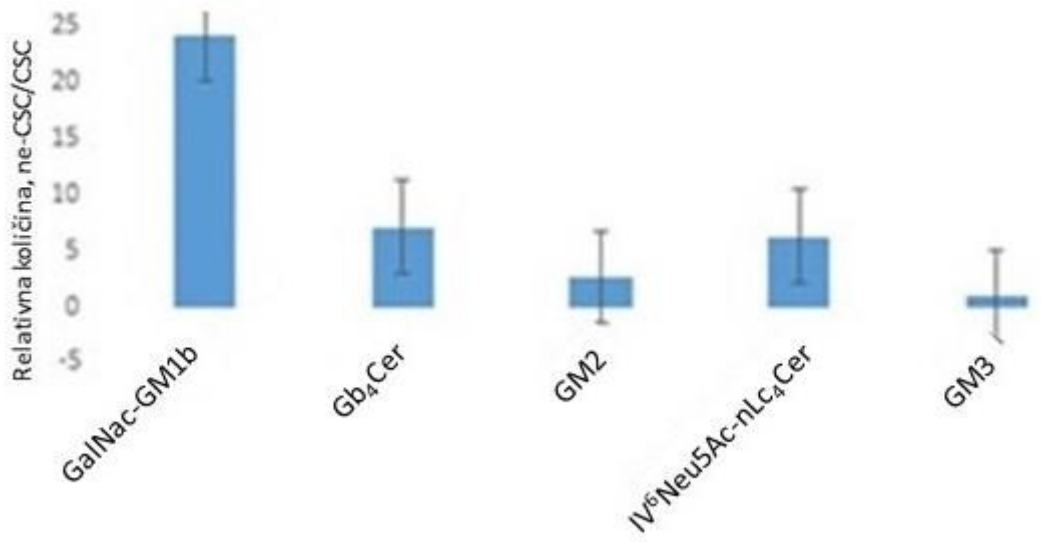


Slika 29. GMI neutralnog GSL s terminalnim Gal ostatkom na $CD44^+/CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB-231 (A) i $CD133^+$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (B) i ne-$CD44^+/CD24^-$ CSC stanične linije MDA-MB 231 (C) i $CD133^-$ CSC stanične linije MDA-MB-453 (D).

**P<0,01.

5.5.4. Izražaj glikosfingolipida na netretiranim matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke stanične linije MDA-MB-231

U staničnoj liniji MDA-MB-231, stanice koje nisu tretirane 2 μM koncentracijom Spoja pokazuju 23 puta veći izražaj GalNAc-GM1b na ne-SCC, nego na CSC, kao i povećanje Gb_4Cer i $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$. Sva tri glikosfingolipida GalNAc-GM1b, Gb_4Cer i $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$ sadrže GalNAc kao zadnji šećerni ostatak (Slika 30.). Gangliozidi GM2 i GM3 također su povišeni, iako ne tako značajno kao GalNAc-GM1b.



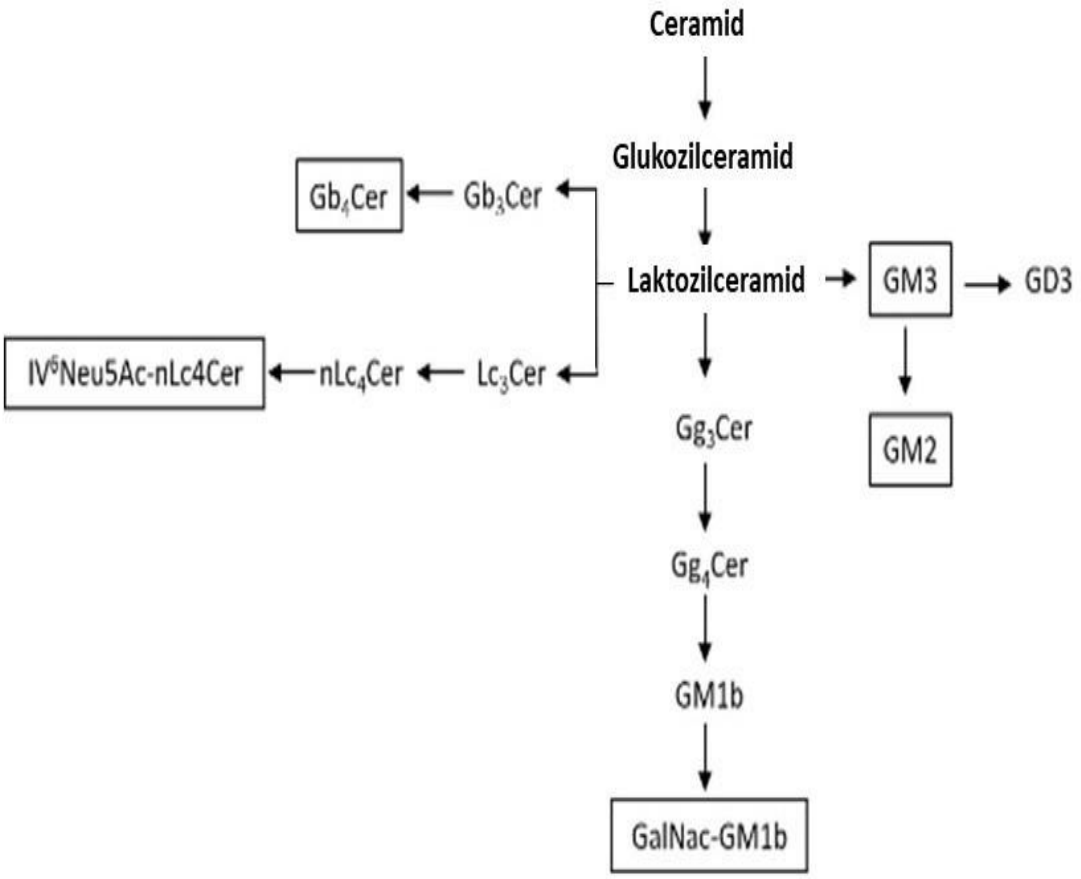
Slika 30. Promjene u izražaju GSL između netretiranih CSC i ne-SCC stanica raka.

6. RASPRAVA

Novosintetizirani spoj 3 – amino – N - (3 - kloro - 2 - metilfenil) - 5 –okso - 5, 6, 7, 8 - tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksmid (Spoj, Slika 8.) citotoksičan je za stanične linije MDA-MB-231 i MDA-MB-453. U usporedbi sa ranije objavljenim (169) 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamidom, Spoj pokazuje veću citotoksičnost. Prepolovljeno stanično preživljenje stanične linije MDA-MB-231 postignuto je nakon 48 sati s peterostruko nižom koncentracijom Spoja (5 μM u usporedbi sa 25 μM). Ni jedan ni drugi spoj nisu inhibitori topljivi u mastima, ali ciljaju specifične receptore (90). Molekulska masa Spoja (385,867 g/mol) je u tzv. "sweet spot" u razvoju lijeka (91).

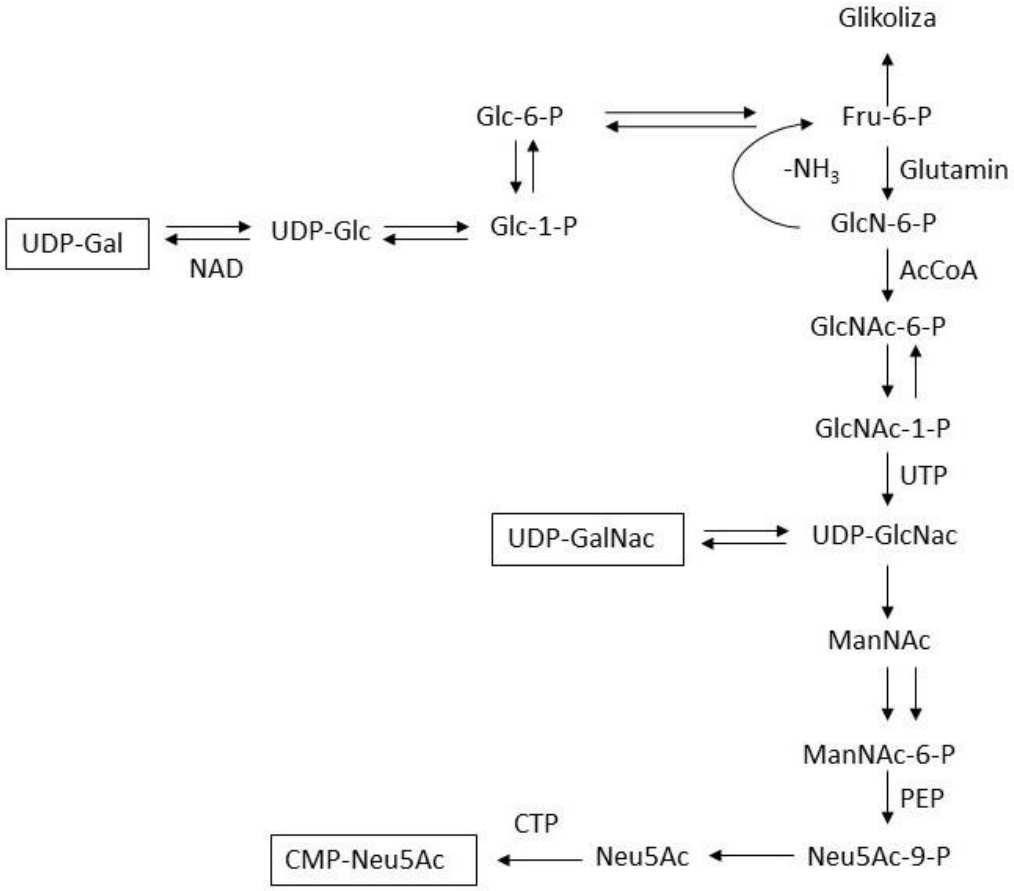
Određivanje načina na koji stanice umiru pokazao je da smrt stanice nakon tretmana Spojem nastupa uglavnom zbog apoptoze te je postotak CSC bio značajno manji nakon tretmana Spojem. Prvi je put prikazan izražaj GSL IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer i GalNAc-GM1b na CSC i ne-SCC stanicama. Nakon tretmana Spojem, zabilježen je značajan porast izražaja IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer u obje subpopulacije staničnih linija MDA-MB-231 i MDA-MB-453, dok je porast GM3 zabilježen na obje subpopulacije stanične linije MDA-MB-231. Porast GalNAc-GM1b, Gb$_4$Cer i GM2 uočen je na CSC obje stanične linije, dok ne-SCC stanične linije MDA-MB-231 pokazuju snižen izražaj GD3 nakon tretmana Spojem. Ne-SCC stanične linije MDA-MB-453 ne pokazuju nikakve promjene u izražaju GD3 nakon tretmana Spojem.

GSL koji su nakon tretmana Spojem povišeni i na CSC i ne-SCC raka stanične linije MDA- MB-231 su kiseli GSL: gangliozidi GM3 i IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer. Sijalinska ili N-acetil-neuraminska kiselina (Neu5Ac) dodaje se na kraju sinteze ova dva GSL (Slika 31).



Slika 31. Shematski prikaz sinteze GSL koji su povišeni (uokvireno) kod tretiranih CSC.

Zadnji korak u sintezi GSL koji su nakon tretmana Spojem povišeni na CSC, GalNAc-GM1b, Gb_4Cer i GM2, uključuje dodavanje GalNAc ostatka. GAlNAc ostatak se mora aktivirati vezivanjem na UDP-GalNAc, što se uglavnom postiže pretvorbom UDP-GlcNAc u UDP-GalNAc (Slika 32.). Fruktoza-6-fosfat je zajednički metabolit glikolize i sinteze UDP-GalNAc. Sijalinska kiselina, koja je potrebna za sintezu kiselih GSL-a i UDP-GalNAc dijele UDP-GlcNAc kao zajedničkog preteču (94). U staničnoj liniji MDA-MB-231, stanice koje nisu tretirane Spojem pokazuju 23 puta veći izražaj GalNAc-GM1b na ne-SCC, nego na CSC, kao i povećanje Gb_4Cer i $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$. Sva tri GSL, GalNAc-GM1b, Gb4Cer i $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$ sadrže GalNAc kao zadnji šećerni ostatak (Slika 31.).



Slika 32. Shematski prikaz sinteze aktiviranih šećernih ostataka potrebnih za zadnji korak (uokvireno) sinteze GSL koji su povišeni kod tretiranih CSC.

Gangliozidi GM2 i GM3 su također povišeni, iako ne toliko značajno kao GalNAc-GM1b. Ovi rezultati pokazuju da bi glikoliza u ne-SCC mogla biti sporija od glikolize u CSC, dajući više preteča za sintezu UDP-GalNAc i Neu5Ac. Stoga rezultati na CSC stanične linije MDA-MB-231 nakon tretmana Spojem, a to su povećani GM3, IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer, GalNAc-GM1b, Gb$_4$Cer i GM2, mogu ukazivati na usporavanje glikolize u CSC. U CSC glioma odvija se više glikolize nego u ne-SCC zbog mitohondrijskog proteina VDAC2 (engl. *voltage-dependent anion channel* 2), koji je ključan u diferencijaciji fenotipa CSC i ne-SCC glioma. Poremećaj VDAC2 potiče dediferencijaciju ne-SCC glioma i stjecanje karakteristika CSC, uključujući samoobnavljanje, izražavanje biljega matičnosti te povećanu tumorigenost (170). Ovaj protein je jako izražen u ne-SCC u odnosu na CSC glioma i djeluje u sprezi s mitohondrijskom trombocitnom fosfofruktokinazom (PFKP, engl. *phosphofructokinase,*

platelet), koja ima ključnu ulogu u regulaciji glikolize i održavanja matičnosti stanica glioma (170).

Tijekom nastanka tumora dolazi do promjene izražaja različitih GalNAc transferaza (171). Djelovanjem glikoziltransferaze nazvane GALNT u Golgijevom aparatu započinje glikozilacija E-kaderina s GalNAc (172). E-kaderin regulira polarizaciju vezivnog tkiva i smještaj veziva, na način da kombinira mehaničku transdukciju i signalizaciju putem receptora za EGF (173), dok GALNT3 (N-acetilgalaktozaminiltransferaza 3) sudjeluje u održavanju epitelnih svojstva matičnih stanica trofoblasta. Gubitak izražaja GALNT3 smanjuje O-GalNAc glikozilaciju i uzrokuje EMT (172). U mliječnoj žlijezdi dolazi do fibrocističnih promjena i stvaranja tumora zbog zamjene E-kaderina N-kaderinom (174). N-kaderin uzrokuje promjene receptora za FGF, što dovodi do epitelno-menzehimalne pretvorbe i svojstava sličnih matičnim/progenitornim stanicama (175). Možemo nagađati da je GALNT, koja je odgovorna za sintezu GalNAc-GM1b, osjetljiva na slične efektore kao GALNT3.

O izražaju GalNAc-GM1b na CSC nema literaturnih podataka. U ovom radu je pronađen niži izražaj GalNAc-GM1b na CSC u odnosu na ne-SCC stanične linije MDA-MB-231, što je u skladu s rezultatima Guan et al. (176). Tijekom induciranog EMT-a stanica dojke, značajno je snižen Gg_4 i njegova sintaza B3GALT4 (beta-1,3-galaktoziltransferaza 4) (176). Neutralni GSL Gg_4 neposredna je preteča GM1b, koji je dalje direktna preteča GalNAc-GM1b (prikazano na Slici 32). S druge strane, N-acetilgalaktozaminiltransferaza 14, GALNT14 pokazuje potpuno drugi učinak. GALNT14 katalizira O-glikozilaciju proteina 2, izvanstaničnog proteina nalik fibulinu koji sadrži EGF, što značajno povećava sposobnost invazije staničnih linija raka dojke MCF-7 i MBA-MD-231 (171, 177). GALNT14 je povezana s kemijskom osjetljivošću tumora dojke. Osterix, transkripcijski čimbenik koji sadrži cink, smanjuje kemijsku osjetljivost i pojačava protu- apoptozu tako što pojačano regulira GALNT14 (178). Osterix također ima važnu ulogu u invazivnosti raka dojke (179).

U ovom su istraživanju tretirane CSC stekle fenotip bliže netretiranim ne-SCC. Malignost se ne definira samo tumor-specifičnim molekulama ili njihovim genima, nego i prerazmještajem komponenti stanične membrane (111). GSL su važna komponenta stanične membrane, sposobna utjecati na krajnje ponašanje stanice. Gb_3Cer ima bitnu ulogu u održavanju svojstava epitelnih stanica raka. Trošenje Gb_3Cer uslijed delecije ključnog enzima laktozilceramid 4-alfa-galaktoziltransferaze (A4GALT) izaziva EMT, pojačavajući kemijsku otpornost i povećavajući broj $CD44^+/CD24^-$ stanica (137). Epitelno-mezenhimalni prijelaz izazvan toksinom kolere događa se samo u stanicama s funkcionalnom A4GALT. Toksin kolere je sposoban izazvati ovaj prijelaz nakon vezivanja na Gb_3Cer, koji je njegov receptor

(138). Liang i suradnici opisuju jako snižene vrijednosti Gb_3Cer na CSC u usporedbi s ne-SCC (139). Iako se ovdje nije određivao Gb_3Cer, može se reći da je enzim A4GALT očito aktivan budući je Gb_3Cer neposredni preteča Gb_4Cer (138), a u ovom istraživanju Gb_4Cer je povišen na CSC nakon tretmana Spojem. Nisu pronađene povišene vrijednosti GM2 i GD3, kako sugeriraju ranije studije (139). U ovom istraživanju korištene su CSC i ne-SCC staničnih linija MDA-MB-231 i MDA-MB-453, dok su Liang i suradnici koristili model izazivanja EMT-a na modelu besmrtnih epitelnih stanica dojke s receptorom za Twist estrogen (engl. *Human mammary epithelial cell–Twist-estrogen receptor, HMLE-Twist-ER*) (139). Oni su metodom Orbitrap-Fourier transform (FT) masene spektrometrije (MS) i imunobojanjem pomoću tekućinske tankoslojne kromatografije visokih performansi (engl. *high-performance liquid thin layer chromatography, HPTLC*) dokazali povećanje GM2 i GD3 u organskom otapalu. To znači da su u rezultate uključeni GSL iz plazma membrane i iz Golgijevog aparata. Rezultati njihove protočne citometrije nisu dokazali povećanje GM2 ni CSC. Pronašli su povećanje postotka GD3, ali su zbog strategije označavanja iz analize biljega CSC ($CD44^+/CD24^-$) isključili većinu GD3 pozitivnih stanica. Zbog toga konačni rezultati ovog istraživanja nisu usporedivi s rezultatima istraživanja Liang i suradnika..

Sijalizacija je proces uključen u stanične procese tijekom razvoja, reprogramiranja i tumorske progresije (180, 181). GM3 i IV^6Neu5Ac-nLc_4Cer, koji su sijalinizirani, nakon tretmana Spojem su povišeni kod obje stanične linije. Gangliozid GM3 uobičajeno je smješten na lipidnim splavima, specijaliziranim membranskim domenama (182). Lipidne splavi s povećanim GM3 remete funkciju inzulinskog receptora, što dovodi do inzulinske rezistencije i u konačnici do dijabetesa tipa 2 (183). Na sličan način promjene sadržaja GM3 u stanici mogu utjecati na djelovanje receptora za FGF, smještenog u blizini, koji je uključen u patogenezu tumora (184); niske razine GM3 aktiviraju, dok visoke razine inhibiraju transdukciju signala receptora za FGF (185). Zbog toga možemo pretpostaviti da povišenje GM3 na CSC nakon tretmana Spojem doprinosi inhibiciji signalizacije FGF, zbog čega dolazi do smanjene progresije tumora. Sijalizacija nLc_4Cer u IV^6Neu5Ac-nLc_4Cer kataliziran je djelovanjem enzima sijalil transferaze (ST6Gal). Povećanje infiltriranih limfocita u stanicama trostruko negativnog raka dojke je pod utjecajem visokog izražaja ST6Gal-II (186). Infiltracija limfocita kod trostruko negativnih stanica raka dojke korelira s boljim preživljenjem i boljim odgovorom na kemoterapiju (187).

U ovom su istraživanju samo povišen postotak GalNAc-$GM1b^+CD44^+/CD24^-$ (rezultati nisu prikazani) nakon tretmana Spojem kod stanične linije MDA-MB-231 u skladu s nalazima GSL na ovoj staničnoj liniji. Yang i suradnici su, koristeći kao biljege $CD44^+/CD24^-$,

aldehidnu dehidrogenazu A1 (ALDH1A1) i CD133, otkrili da od 88 pacijenata s trostruko negativnim rakom dojke njih 31 ima CSC. U osam slučajeva $CD44^{+}/CD24^{-}$ i ALDH1A1 su bili pozitivni, u deset slučajeva $CD44^{+}/CD24^{-}$ i CD133 su bili pozitivni, u 9 slučajeva ALDH1A1 i CD133, a sva tri biljega CSC su bili pozitivni samo u tri pacijenta (38). Korelacija među biljezima CSC bila je slaba, sugerirajući da većina tumorskih stanica ne izražava biljege istovremeno. Budući znamo da CSC koje izražavaju CD133 biljeg nisu značajno povezane s lošijim preživljavanjem bez progresije, možemo pretpostaviti da je CD133 manje pouzdan biljeg CSC od $CD44^{+}/CD24^{-}$ biljega (38). Izražaj GSL na staničnoj liniji MDA-MB-231 koji je pronađen u ovom istraživanju mogao bi imati veći utjecaj na primjenu u klinici. Kao što je ranije naglašeno, smanjena GalNAc glikozilacija uključena je u epitelno-mezenhimalnu pretvorbu, odnosno u mezenhimalno-epitelnu pretvorbu. Dramatično smanjenje GalNAc glikozilacije na CSC stanične linije MDA-MB-231, uočeno u ovom istraživanju, moglo bi ukazivati na mogući biokemijski put smanjenja CSC nakon tretmana Spojem.

7. ZAKLJUČCI

1. Novosintetizirani protutumorski spoj 3 - amino - N - (3 - kloro - 2 - metilfenil) - 5 - okso - 5,6,7,8 - tetrahidrotieno[2,3 - *b*]kinolin - 2 - karboksamid citotoksičan je za stanice raka dojke.
2. Stanična smrt uvjetovana je apoptozom.
3. Postotak CSC dojke značajno je snižen nakon tretmana Spojem.
4. Glikosfingolipidi IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer i GalNAc-GM1b, o kojima ranije nije izvještavano, identificirani su na CSC i ne-SCC staničnih linija MDA-MB-231 i MDA-MB-453.
5. Izražaj glikosfingolipida IV^{6}Neu5Ac-nLc$_4$Cer povećan je na CSC i ne-SCC staničnih linija MDA-MB-231 i MDA-MB-453 nakon tretmana Spojem.
6. Izražaj gangliozida GM3 nakon tretmana Spojem povećan je na CSC i ne-SCC stanične linije MDA-MB-231.
7. Izražaj GalNAc-GM1b, Gb$_4$Cer i GM2 povećan je na CSC obje stanične linije nakon tretmana Spojem.
8. Izražaj GD3 smanjen je na ne-SCC stanične linije MDA-MB-231 48 h nakon tretmana Spojem.

Zbog dokazanog utjecaja na smanjenje postotka CSC, smanjenje broja mamosfera te na promjene glikofenotipa na način da je izražaj glikosfingolipida nakon tretmana Spojem sličniji ne-SCC, novosintetizirani spoj 3 - amino - N - (3 - kloro - 2 - metilfenil) - 5 - okso - 5, 6, 7, 8 - tetrahidrotieno[2,3 - *b*]kinolin - 2 - karboksamid zaslužuje pažnju kao novi potencijalni lijek za terapiju trostruko negativnog raka dojke.

8. LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021. Epub 2021/02/05.

2. HZJZ. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2020.

3. Al-Mahmood S, Sapiezynski J, Garbuzenko OB, Minko T. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. Drug Deliv Transl Res. 2018;8(5):1483-507. Epub 2018/07/07.

4. Gupta GK, Collier AL, Lee D, Hoefer RA, Zheleva V, Siewertsz van Reesema LL, et al. Perspectives on Triple-Negative Breast Cancer: Current Treatment Strategies, Unmet Needs, and Potential Targets for Future Therapies. Cancers. 2020;12(9). Epub 2020/08/28.

5. Chang-Qing Y, Jie L, Shi-Qi Z, Kun Z, Zi-Qian G, Ran X, et al. Recent treatment progress of triple negative breast cancer. Prog Biophys Mol Biol. 2020;151:40-53. Epub 2019/11/26.

6. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. Breast cancer research : BCR. 2020;22(1):61. Epub 2020/06/11.

7. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. Arch Gynecol Obstet. 2016;293(2):247-69. Epub 2015/09/06.

8. Ahmad A. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance Challenges and Progress. Second Edition ed. Cohen I, Lajitha, A., Lambris, J.D., Paoletti, R., Rezaei, N., editor. Cham,Switzerland: © Springer Nature 2019.

9. Ensenyat-Mendez M, Llinas-Arias P, Orozco JIJ, Iniguez-Munoz S, Salomon MP, Sese B, et al. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. Frontiers in oncology. 2021;11:681476. Epub 2021/07/06.

10. Anestis A, Sarantis P, Theocharis S, Zoi I, Tryfonopoulos D, Korogiannos A, et al. Estrogen receptor beta increases sensitivity to enzalutamide in androgen receptor-positive triple-negative breast cancer. Journal of cancer research and clinical oncology. 2019;145(5):1221-33. Epub 2019/02/26.

11. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. Cancer. 2007;109(9):1721-8. Epub 2007/03/28.

12. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. N Engl J Med. 2010;363(20):1938-48. Epub 2010/11/12.

13. Tecic Vuger A, Separovic R, Vazdar L, Pavlovic M, Lepetic P, Sitic S, et al. Characteristics and prognosis of triple-negative breast cancer patients: a croatian single institution retrospective cohort study. Acta clinica Croatica. 2020;59(1):97-108. Epub 2020/07/30.

14. Anders CK, Abramson V, Tan T, Dent R. The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer: From Biology to Novel Therapeutics. American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. 2016;35:34-42. Epub 2016/06/02.

15. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. The Journal of clinical investigation. 2011;121(7):2750-67. Epub 2011/06/03.

16. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2015;21(7):1688-98. Epub 2014/09/12.

17. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. Medicine. 2016;95(1 Suppl 1):S20-S5. Epub 2016/09/10.

18. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001;414(6859):105-11. Epub 2001/11/02.

19. Bluemel L, von Wahlde MK, Tio J, Kiesel L, Bernemann C. Reverse engineering of triple-negative breast cancer cells for targeted treatment. Maturitas. 2018;108:24-30. Epub 2018/01/02.

20. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. Cell Stem Cell. 2012;10(6):717-28. Epub 2012/06/19.

21. Bao B, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Sarkar FH. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. Curr Protoc Pharmacol. 2013;Chapter 14:Unit 14 25. Epub 2013/06/08.

22. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Gotte M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. Cytometry A. 2012;81(4):284-93. Epub 2012/02/09.

23. Hong IS, Lee HY, Nam JS. Cancer stem cells: the 'Achilles heel' of chemo-resistant tumors. Recent patents on anti-cancer drug discovery. 2015;10(1):2-22. Epub 2014/12/06.

24. Cumin C, Huang YL, Everest-Dass A, Jacob F. Deciphering the Importance of Glycosphingolipids on Cellular and Molecular Mechanisms Associated with Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. Biomolecules. 2021;11(1). Epub 2021/01/10.

25. Tseng CN, Hong YR, Chang HW, Yu TJ, Hung TW, Hou MF, et al. Brefeldin A reduces anchorage-independent survival, cancer stem cell potential and migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. Molecules. 2014;19(11):17464-77. Epub 2014/10/31.

26. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. Nat Med. 2017;23(10):1124-34. Epub 2017/10/07.

27. Zheng Q, Cui X, Zhang D, Yang Y, Yan X, Liu M, et al. miR-200b inhibits proliferation and metastasis of breast cancer by targeting fucosyltransferase IV and alpha1,3-fucosylated glycans. Oncogenesis. 2017;6(7):e358. Epub 2017/07/12.

28. Jiang M, Zhuang H, Xia R, Gan L, Wu Y, Ma J, et al. KIF11 is required for proliferation and self-renewal of docetaxel resistant triple negative breast cancer cells. Oncotarget. 2017;8(54):92106-18. Epub 2017/12/02.

29. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. J Cell Mol Med. 2009;13(8B):2236-52. Epub 2008/08/07.

30. Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. Br J Cancer. 2010;103(4):439-45. Epub 2010/07/29.

31. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. Nature reviews Cancer. 2008;8(7):545-54. Epub 2008/05/31.

32. Ramos A, Sadeghi S, Tabatabaeian H. Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them. International journal of molecular sciences. 2021;22(17). Epub 2021/09/11.

33. Zeng X, Liu C, Yao J, Wan H, Wan G, Li Y, et al. Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications. Pharmacological research. 2021;163:105320. Epub 2020/12/04.

34. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. Frontiers in cell and developmental biology. 2017;5:18. Epub 2017/03/23.

35. Barzegar Behrooz A, Syahir A, Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. J Drug Target. 2019;27(3):257-69. Epub 2018/06/19.

36. Palomeras S, Ruiz-Martinez S, Puig T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance. Molecules. 2018;23(9). Epub 2018/09/12.
37. O'Conor CJ, Chen T, Gonzalez I, Cao D, Peng Y. Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker. Biomark Med. 2018;12(7):813-20. Epub 2018/06/16.
38. Yang F, Cao L, Sun Z, Jin J, Fang H, Zhang W, et al. Evaluation of Breast Cancer Stem Cells and Intratumor Stemness Heterogeneity in Triple-negative Breast Cancer as Prognostic Factors. Int J Biol Sci. 2016;12(12):1568-77. Epub 2016/12/21.
39. Glumac PM, LeBeau AM. The role of CD133 in cancer: a concise review. Clin Transl Med. 2018;7(1):18. Epub 2018/07/10.
40. Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. CD24: from A to Z. Cell Mol Immunol. 2010;7(2):100-3. Epub 2010/02/16.
41. Khan T, Cabral H. Abnormal Glycosylation of Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. Frontiers in oncology. 2021;11:649338. Epub 2021/04/24.
42. Brugnoli F, Grassilli S, Lanuti P, Marchisio M, Al-Qassab Y, Vezzali F, et al. Up-modulation of PLC-beta2 reduces the number and malignancy of triple-negative breast tumor cells with a CD133(+)/EpCAM(+) phenotype: a promising target for preventing progression of TNBC. BMC cancer. 2017;17(1):617. Epub 2017/09/06.
43. Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. The Journal of clinical investigation. 2011;121(7):2723-35. Epub 2011/06/03.
44. Dzobo K, Senthebane DA, Rowe A, Thomford NE, Mwapagha LM, Al-Awwad N, et al. Cancer Stem Cell Hypothesis for Therapeutic Innovation in Clinical Oncology? Taking the Root Out, Not Chopping the Leaf. Omics : a journal of integrative biology. 2016;20(12):681-91. Epub 2016/12/09.
45. Battula VL, Shi Y, Evans KW, Wang RY, Spaeth EL, Jacamo RO, et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. The Journal of clinical investigation. 2012;122(6):2066-78. Epub 2012/05/16.
46. Stivarou T, Stellas D, Vartzi G, Thomaidou D, Patsavoudi E. Targeting highly expressed extracellular HSP90 in breast cancer stem cells inhibits tumor growth in vitro and in vivo. Cancer Biol Ther. 2016;17(8):799-812. Epub 2016/06/05.
47. Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In vitro. 1978;14(11):911-5. Epub 1978/11/01.

48. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. Breast cancer research and treatment. 2004;83(3):249-89. Epub 2004/02/06.
49. Kim SY, Hong SH, Basse PH, Wu C, Bartlett DL, Kwon YT, et al. Cancer Stem Cells Protect Non-Stem Cells From Anoikis: Bystander Effects. Journal of cellular biochemistry. 2016;117(10):2289-301. Epub 2016/02/27.
50. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast cancer research : BCR. 2011;13(4):215. Epub 2011/09/03.
51. Cultures ECoAC. Cell line profile MDA-MB-2312017; 2017;231(92020424)::[1-3 pp.]. Available from: https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf.
52. ATCC. MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26™). 2021 [cited 2021. 25.3.2021.]; Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRM-HTB-26.aspx#documentation.
53. Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY. Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. Oncology letters. 2011;2(6):1131-7. Epub 2011/11/29.
54. Moore NL, Buchanan G, Harris JM, Selth LA, Bianco-Miotto T, Hanson AR, et al. An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. Endocrine-related cancer. 2012;19(4):599-613. Epub 2012/06/22.
55. Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, Sutherland RL. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. Eur J Cancer. 1994;30A(4):484-90. Epub 1994/01/01.
56. Rae JM, Ramus SJ, Waltham M, Armes JE, Campbell IG, Clarke R, et al. Common origins of MDA-MB-435 cells from various sources with those shown to have melanoma properties. Clinical & experimental metastasis. 2004;21(6):543-52. Epub 2005/02/01.
57. ATCC. MDA-MB-453 HTB-131™. 2021 [17.11.2021.]; Available from: https://www.atcc.org/products/htb-131#characteristics.
58. Hossain F, Majumder S, David J, Miele L. Precision Medicine and Triple-Negative Breast Cancer: Current Landscape and Future Directions. Cancers. 2021;13(15). Epub 2021/08/08.
59. Emens LA. Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. Cancer J. 2021;27(1):59-66. Epub 2021/01/22.

60. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. Nature reviews Clinical oncology. 2016;13(11):674-90. Epub 2016/10/19.

61. Latif F, Bint Abdul Jabbar H, Malik H, Sadaf H, Sarfraz A, Sarfraz Z, et al. Atezolizumab and pembrolizumab in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. Expert review of anticancer therapy. 2022;22(2):229-35. Epub 2021/12/25.

62. Feng D, Guan Y, Liu M, He S, Zhao W, Yin B, et al. Excellent Response to Atezolizumab After Clinically Defined Hyperprogression Upon Previous Treatment With Pembrolizumab in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Case Report and Review of the Literature. Frontiers in immunology. 2021;12:608292. Epub 2021/06/18.

63. Kwapisz D. Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2021;70(3):607-17. Epub 2020/10/06.

64. Bill CA, Vines CM. Phospholipase C. Adv Exp Med Biol. 2020;1131:215-42. Epub 2019/10/28.

65. Park JB, Lee CS, Jang JH, Ghim J, Kim YJ, You S, et al. Phospholipase signalling networks in cancer. Nature reviews Cancer. 2012;12(11):782-92. Epub 2012/10/19.

66. Reynisson J, Court W, O'Neill C, Day J, Patterson L, McDonald E, et al. The identification of novel PLC-gamma inhibitors using virtual high throughput screening. Bioorg Med Chem. 2009;17(8):3169-76. Epub 2009/03/24.

67. Mandal S, Bandyopadhyay S, Tyagi K, Roy A. Recent advances in understanding the molecular role of phosphoinositide-specific phospholipase C gamma 1 as an emerging onco-driver and novel therapeutic target in human carcinogenesis. Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer. 2021;1876(2):188619. Epub 2021/08/29.

68. Murray RK GD, Mayes PA, Rodwell VW. Harper’s Illustrated Biochemistry. 28th ed: McGraw-Hill Medical; 2018.

69. Braiman A, Barda-Saad M, Sommers CL, Samelson LE. Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. The EMBO journal. 2006;25(4):774-84. Epub 2006/02/10.

70. Lieberman M. Marks’ essentials of medical biochemistry : a clinical approach: Lippincott Williams & Wilkins; 2015.

71. Owusu Obeng E, Rusciano I, Marvi MV, Fazio A, Ratti S, Follo MY, et al. Phosphoinositide-Dependent Signaling in Cancer: A Focus on Phospholipase C Isozymes. International journal of molecular sciences. 2020;21(7). Epub 2020/04/12.

72. Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. BMB reports. 2008;41(6):415-34. Epub 2008/07/03.

73. Nakamura Y, Fukami K. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. Journal of biochemistry. 2017;161(4):315-21. Epub 2017/01/29.

74. Yang YR, Follo MY, Cocco L, Suh PG. The physiological roles of primary phospholipase C. Advances in biological regulation. 2013;53(3):232-41. Epub 2013/09/18.

75. Leung EH, J. M.; Barker, D.; Reynisson, J. The effect of a thieno[2,3-b]pyridine PLC-γ inhibitor on the proliferation, morphology, migration and cell cycle of breast cancer cells. Med Chem Commun. 2014.;5(99):8.

76. Lattanzio R, Piantelli M, Falasca M. Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. Advances in biological regulation. 2013;53(3):309-18. Epub 2013/08/09.

77. Koss H, Bunney TD, Esposito D, Martins M, Katan M, Driscoll PC. Dynamic Allostery in PLCgamma1 and Its Modulation by a Cancer Mutation Revealed by MD Simulation and NMR. Biophysical journal. 2018;115(1):31-45. Epub 2018/07/05.

78. Browaeys-Poly E, Perdereau D, Lescuyer A, Burnol AF, Cailliau K. Akt interaction with PLC(gamma) regulates the G(2)/M transition triggered by FGF receptors from MDA-MB-231 breast cancer cells. Anticancer research. 2009;29(12):4965-9. Epub 2010/01/02.

79. Cai S, Sun PH, Resaul J, Shi L, Jiang A, Satherley LK, et al. Expression of phospholipase C isozymes in human breast cancer and their clinical significance. Oncol Rep. 2017;37(3):1707-15. Epub 2017/01/24.

80. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D'Mello S A, Denny WA, Baguley BC, et al. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. Cancer Cell Int. 2016;16:18. Epub 2016/03/12.

81. Zafar A, Sari S, Leung E, Pilkington LI, van Rensburg M, Barker D, et al. GPCR Modulation of Thieno[2,3-b]pyridine Anti-Proliferative Agents. Molecules. 2017;22(12). Epub 2017/12/21.

82. Binsaleh NK, Wigley CA, Whitehead KA, van Rensburg M, Reynisson J, Pilkington LI, et al. Thieno[2,3-b]pyridine derivatives are potent anti-platelet drugs, inhibiting platelet activation, aggregation and showing synergy with aspirin. Eur J Med Chem. 2018;143:1997-2004. Epub 2017/11/14.

83. Arabshahi HJea. A synthesis, in silico, in vitro and in vivo study of thieno[2,3-b]pyridine anticancer analogues MedChemComm. 2015;6(11):30.

84. Eurtivong C, Semenov V, Semenova M, Konyushkin L, Atamanenko O, Reynisson J, et al. 3-Amino-thieno[2,3-b]pyridines as microtubule-destabilising agents: Molecular modelling and biological evaluation in the sea urchin embryo and human cancer cells. Bioorg Med Chem. 2017;25(2):658-64. Epub 2016/12/14.

85. Naguib BH, El-Nassan HB. Synthesis of new thieno[2,3-b]pyridine derivatives as pim-1 inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem. 2016;31(6):1718-25. Epub 2016/08/20.

86. Lockman JW, Reeder MD, Suzuki K, Ostanin K, Hoff R, Bhoite L, et al. Inhibition of eEF2-K by thieno[2,3-b]pyridine analogues. Bioorg Med Chem Lett. 2010;20(7):2283-6. Epub 2010/03/02.

87. Sanad SMHM, A. E. M. . Novel nicotinonitriles and thieno[2,3-b]pyridines as potent biofilm and COX-2 inhibitors: Synthesis, in vitro and in silico studies. ChemistrySelect 2020.;5:8494-503.

88. Haverkate NA, van Rensburg M, Kumara S, Reynisson J, Leung E, Pilkington LI, et al. Improving the solubility of anti-proliferative thieno[2,3-b]quinoline-2-carboxamides. Bioorg Med Chem. 2021;37:116092. Epub 2021/03/17.

89. Leung E, Pilkington LI, van Rensburg M, Jeon CY, Song M, Arabshahi HJ, et al. Synthesis and cytotoxicity of thieno[2,3-b]quinoline-2-carboxamide and cycloalkyl[b]thieno[3,2-e]pyridine-2-carboxamide derivatives. Bioorg Med Chem. 2016;24(5):1142-54. Epub 2016/02/09.

90. Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, Decrescenzo GA, Devraj RV, et al. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. Bioorg Med Chem Lett. 2008;18(17):4872-5. Epub 2008/08/12.

91. Hann MM, Keseru GM. Finding the sweet spot: the role of nature and nurture in medicinal chemistry. Nat Rev Drug Discov. 2012;11(5):355-65. Epub 2012/05/01.

92. Gillard BK, Thurmon LT, Marcus DM. Variable subcellular localization of glycosphingolipids. Glycobiology. 1993;3(1):57-67. Epub 1993/02/01.

93. Wennekes T, van den Berg RJ, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JM. Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(47):8848-69. Epub 2009/10/29.

94. Varki A, Schnaar, R. L., Schauer, R. Essentials of Glycobiology In: Varki A, Cummings, R. D., Esko, J. D. et al., editor. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. p. 179–95.

95. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. J Oleo Sci. 2011;60(10):537-44. Epub 2011/09/23.

96. Duvar S, Peter-Katalinic J, Hanisch FG, Muthing J. Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated bovine aortic endothelial cells. Glycobiology. 1997;7(8):1099-109. Epub 1998/02/10.

97. Hakomori SI. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. Biochimica et biophysica acta. 2008;1780(3):325-46. Epub 2007/11/03.

98. Schauer R, Kamerling JP. Exploration of the Sialic Acid World. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. 2018;75:1-213. Epub 2018/12/05.

99. Klenk E. On the discovery and chemistry of neuraminic acid and gangliosides. Chemistry and physics of lipids. 1970;5(1):193-7. Epub 1970/10/01.

100. Blix G. The linkage between hexosamine and amino acids in ovine submaxillary mucin. Annals of the New York Academy of Sciences. 1963;106:164-7. Epub 1963/03/30.

101. Ilangumaran S, Briol A, Hoessli DC. Distinct interactions among GPI-anchored, transmembrane and membrane associated intracellular proteins, and sphingolipids in lymphocyte and endothelial cell plasma membranes. Biochimica et biophysica acta. 1997;1328(2):227-36. Epub 1997/10/07.

102. Svennerholm L. Composition of gangliosides from human brain. Nature. 1956;177(4507):524-5.

103. Svennerholm L. Classification of lipidoses. Rivista di patologia nervosa e mentale. 1970;91(5):277-8. Epub 1970/10/01.

104. Krengel U, Bousquet PA. Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. Frontiers in immunology. 2014;5:325. Epub 2014/08/08.

105. Chester MA. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. European journal of biochemistry. 1998;257(2):293-8. Epub 1998/11/24.

106. Čulić VČ. Imunokemijska analiza gangliozida u jetri djelomično hepatektomiranih štakora tretiranih hiperbaričnim kisikom. 2009.

107. Levery SB. Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics. Methods in enzymology. 2005;405:300-69. Epub 2006/01/18.

108. Groux-Degroote S, Rodriguez-Walker M, Dewald JH, Daniotti JL, Delannoy P. Gangliosides in Cancer Cell Signaling. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018;156:197-227. Epub 2018/05/12.

109. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. Glycosphingolipids: synthesis and functions. FEBS J. 2013;280(24):6338-53. Epub 2013/10/30.

110. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiology. 2007;17(1):18.

111. Regina Todeschini A, Hakomori SI. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. Biochimica et biophysica acta. 2008;1780(3):421-33. Epub 2007/11/10.

112. Villar VA, Cuevas S, Zheng X, Jose PA. Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts. Methods in cell biology. 2016;132:3-23. Epub 2016/03/02.

113. Segui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. Biochimica et biophysica acta. 2006;1758(12):2104-20. Epub 2006/08/24.

114. Yates AJ, Rampersaud A. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998;845:57-71. Epub 1998/07/21.

115. Sandhoff R, Schulze H, Sandhoff K. Ganglioside Metabolism in Health and Disease. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018;156:1-62. Epub 2018/05/12.

116. Kabbani AM, Raghunathan K, Lencer WI, Kenworthy AK, Kelly CV. Structured clustering of the glycosphingolipid GM1 is required for membrane curvature induced by cholera toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2020;117(26):14978-86. Epub 2020/06/20.

117. Manich M, Knapp O, Gibert M, Maier E, Jolivet-Reynaud C, Geny B, et al. Clostridium perfringens delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming toxins, but shows functional differences. PloS one. 2008;3(11):e3764. Epub 2008/11/20.

118. Hidari KI, Shimada S, Suzuki Y, Suzuki T. Binding kinetics of influenza viruses to sialic acid-containing carbohydrates. Glycoconjugate journal. 2007;24(9):583-90. Epub 2007/07/13.

119. Groux-Degroote S, Guerardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. Chembiochem. 2017;18(13):1146-54. Epub 2017/03/16.

120. Nohara K, Wang F, Spiegel S. Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. Breast cancer research and treatment. 1998;48(2):149-57. Epub 1998/05/22.

121. Konishi M, Imamura A, Fujikawa K, Ando H, Ishida H, Kiso M. Extending the glucosyl ceramide cassette approach: application in the total synthesis of ganglioside GalNAc-GM1b. Molecules. 2013;18(12):15153-81. Epub 2013/12/18.

122. Marusic A, Markotic A, Kovacic N, Muthing J. Expression of glycosphingolipids in lymph nodes of mice lacking TNF receptor 1: biochemical and flow cytometry analysis. Carbohydrate research. 2004;339(1):77-86. Epub 2003/12/09.

123. Nakakuma H, Kawaguchi T, Horikawa K, Hidaka M, Yonemura Y, Kawakita M, et al. Altered expression of gangliosides in erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. The Journal of clinical investigation. 1990;85(5):1456-61. Epub 1990/05/01.

124. Muthing J, Burg M, Mockel B, Langer M, Metelmann-Strupat W, Werner A, et al. Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally alpha2-6-sialylated neolacto-series gangliosides. Glycobiology. 2002;12(8):485-97. Epub 2002/07/30.

125. Nojiri H, Stroud M, Hakomori S. A specific type of ganglioside as a modulator of insulin-dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL-60 cells. The Journal of biological chemistry. 1991;266(7):4531-7. Epub 1991/03/05.

126. Schnaar RL, Lopez PHH. Preface and Ganglioside Nomenclature. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018;156:xvii-xxi. Epub 2018/05/12.

127. Morales A, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease. Glycoconjugate journal. 2004;20(9):579-88. Epub 2004/09/30.

128. Giussani P, Tringali C, Riboni L, Viani P, Venerando B. Sphingolipids: key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance. International journal of molecular sciences. 2014;15(3):4356-92. Epub 2014/03/15.

129. Li Q, Sun M, Yu M, Fu Q, Jiang H, Yu G, et al. Gangliosides profiling in serum of breast cancer patient: GM3 as a potential diagnostic biomarker. Glycoconjugate journal. 2019;36(5):419-28. Epub 2019/07/13.

130. Labrada M, Dorvignit D, Hevia G, Rodriguez-Zhurbenko N, Hernandez AM, Vazquez AM, et al. GM3(Neu5Gc) ganglioside: an evolution fixed neoantigen for cancer immunotherapy. Seminars in oncology. 2018;45(1-2):41-51. Epub 2018/10/16.

131. Liu J, Zheng X, Pang X, Li L, Wang J, Yang C, et al. Ganglioside GD3 synthase (GD3S), a novel cancer drug target. Acta Pharm Sin B. 2018;8(5):713-20. Epub 2018/09/25.

132. Li W, Zheng X, Ren L, Fu W, Liu J, Xv J, et al. Epigenetic hypomethylation and upregulation of GD3s in triple negative breast cancer. Ann Transl Med. 2019;7(23):723. Epub 2020/02/12.

133. Dewald JH, Cavdarli S, Steenackers A, Delannoy CP, Mortuaire M, Spriet C, et al. TNF differentially regulates ganglioside biosynthesis and expression in breast cancer cell lines. PloS one. 2018;13(4):e0196369. Epub 2018/04/27.

134. Buffone A, Weaver VM. Don't sugarcoat it: How glycocalyx composition influences cancer progression. The Journal of cell biology. 2020;219(1). Epub 2019/12/25.
135. Bien T, Perl M, Machmuller AC, Nitsche U, Conrad A, Johannes L, et al. MALDI-2 Mass Spectrometry and Immunohistochemistry Imaging of Gb3Cer, Gb4Cer, and Further Glycosphingolipids in Human Colorectal Cancer Tissue. Anal Chem. 2020;92(10):7096-105. Epub 2020/04/22.
136. Schomel N, Geisslinger G, Wegner MS. Influence of glycosphingolipids on cancer cell energy metabolism. Progress in lipid research. 2020;79:101050. Epub 2020/06/28.
137. Jacob F, Alam S, Konantz M, Liang CY, Kohler RS, Everest-Dass AV, et al. Transition of Mesenchymal and Epithelial Cancer Cells Depends on alpha1-4 Galactosyltransferase-Mediated Glycosphingolipids. Cancer research. 2018;78(11):2952-65. Epub 2018/03/25.
138. Legros N, Pohlentz G, Steil D, Muthing J. Shiga toxin-glycosphingolipid interaction: Status quo of research with focus on primary human brain and kidney endothelial cells. Int J Med Microbiol. 2018;308(8):1073-84. Epub 2018/09/19.
139. Liang YJ, Ding Y, Levery SB, Lobaton M, Handa K, Hakomori SI. Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(13):4968-73. Epub 2013/03/13.
140. Jennemann R, Grone HJ. Cell-specific in vivo functions of glycosphingolipids: lessons from genetic deletions of enzymes involved in glycosphingolipid synthesis. Progress in lipid research. 2013;52(2):231-48. Epub 2013/03/12.
141. Cheung SK, Chuang PK, Huang HW, Hwang-Verslues WW, Cho CH, Yang WB, et al. Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) and beta3GalT5 are cancer specific and significant markers for breast cancer stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016;113(4):960-5. Epub 2015/12/19.
142. Alam S, Anugraham M, Huang YL, Kohler RS, Hettich T, Winkelbach K, et al. Altered (neo-) lacto series glycolipid biosynthesis impairs alpha2-6 sialylation on N-glycoproteins in ovarian cancer cells. Scientific reports. 2017;7:45367. Epub 2017/03/31.
143. Park JJ, Lee M. Increasing the alpha 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. Gut and liver. 2013;7(6):629-41. Epub 2013/12/07.
144. Yu J, Hung JT, Wang SH, Cheng JY, Yu AL. Targeting glycosphingolipids for cancer immunotherapy. FEBS letters. 2020;594(22):3602-18. Epub 2020/08/30.

145. Kundu M, Mahata B, Banerjee A, Chakraborty S, Debnath S, Ray SS, et al. Ganglioside GM2 mediates migration of tumor cells by interacting with integrin and modulating the downstream signaling pathway. Biochimica et biophysica acta. 2016;1863(7 Pt A):1472-89. Epub 2016/04/14.

146. Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Bhuiyan RH, Zhang P, Tajima O, et al. New era of research on cancer-associated glycosphingolipids. Cancer Sci. 2019;110(5):1544-51. Epub 2019/03/22.

147. Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, Valiente O, et al. Gangliosides expressed in human breast cancer. Cancer research. 1996;56(22):5165-71. Epub 1996/11/15.

148. Prokazova NV, Samovilova NN, Gracheva EV, Golovanova NK. Ganglioside GM3 and its biological functions. Biochemistry Biokhimiia. 2009;74(3):235-49. Epub 2009/04/15.

149. Furukawa K, Hamamura K, Aixinjueluo W. Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006;1086:185-98. Epub 2006/12/23.

150. Zhuo D, Li X, Guan F. Biological Roles of Aberrantly Expressed Glycosphingolipids and Related Enzymes in Human Cancer Development and Progression. Front Physiol. 2018;9:466. Epub 2018/05/19.

151. Taki T, Ishikawa H, Imai K, Yachi A, Matsumoto M. Immunological analysis of glycolipids on cell surfaces of cultured human tumor cell lines: expression of lactoneotetraosylceramide on tumor cell surfaces. Journal of biochemistry. 1985;98(4):887-95. Epub 1985/10/01.

152. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(16):10231-3. Epub 2002/08/01.

153. Rao X, Duan X, Mao W, Li X, Li Z, Li Q, et al. O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth. Nature communications. 2015;6:8468. Epub 2015/09/25.

154. Jiang K, Li W, Zhang Q, Yan G, Guo K, Zhang S, et al. GP73 N-glycosylation at Asn144 reduces hepatocellular carcinoma cell motility and invasiveness. Oncotarget. 2016;7(17):23530-41. Epub 2016/03/20.

155. Chen JT, Chen CH, Ku KL, Hsiao M, Chiang CP, Hsu TL, et al. Glycoprotein B7-H3 overexpression and aberrant glycosylation in oral cancer and immune response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015;112(42):13057-62. Epub 2015/10/07.

156. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Krzewinski-Recchi MA, Harduin-Lepers A, Groux-Degroote S, et al. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. Carbohydrate research. 2010;345(10):1377-83. Epub 2010/03/17.

157. Kumar S, Das S, Rachagani S, Kaur S, Joshi S, Johansson SL, et al. NCOA3-mediated upregulation of mucin expression via transcriptional and post-translational changes during the development of pancreatic cancer. Oncogene. 2015;34(37):4879-89. Epub 2014/12/23.

158. Merino P, Tejero T, Delso I, Hurtado-Guerrero R, Gomez-SanJuan A, Sadaba D. Recent progress on fucosyltransferase inhibitors. Mini reviews in medicinal chemistry. 2012;12(14):1455-64. Epub 2012/07/26.

159. Larsson P, Engqvist H, Biermann J, Werner Ronnerman E, Forssell-Aronsson E, Kovacs A, et al. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. Scientific reports. 2020;10(1):5798. Epub 2020/04/04.

160. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63. Epub 1983/12/16.

161. Ross AE, Emadi A, Marchionni L, Hurley PJ, Simons BW, Schaeffer EM, et al. Dimeric naphthoquinones, a novel class of compounds with prostate cancer cytotoxicity. BJU Int. 2011;108(3):447-54. Epub 2010/12/24.

162. Wang X, Wang SS, Huang H, Cai L, Zhao L, Peng RJ, et al. Effect of Capecitabine Maintenance Therapy Using Lower Dosage and Higher Frequency vs Observation on Disease-Free Survival Among Patients With Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer Who Had Received Standard Treatment: The SYSUCC-001 Randomized Clinical Trial. Jama. 2021;325(1):50-8. Epub 2020/12/11.

163. Meisen I, Peter-Katalinic J, Muthing J. Direct analysis of silica gel extracts from immunostained glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem. 2004;76(8):2248-55. Epub 2004/04/15.

164. Markotic A, Culic VC, Kurir TT, Meisen I, Buntemeyer H, Boraska V, et al. Oxygenation alters ganglioside expression in rat liver following partial hepatectomy. Biochemical and biophysical research communications. 2005;330(1):131-41. Epub 2005/03/23.

165. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. Breast cancer research : BCR. 2011;13(1):202. Epub 2011/03/12.

166. Sastry KS, Chouchane AI, Wang E, Kulik G, Marincola FM, Chouchane L. Cytoprotective effect of neuropeptides on cancer stem cells: vasoactive intestinal peptide-induced antiapoptotic signaling. Cell death & disease. 2017;8(6):e2844. Epub 2017/06/02.
167. Jiao X, Rizvanov AA, Cristofanilli M, Miftakhova RR, Pestell RG. Breast Cancer Stem Cell Isolation. Methods Mol Biol. 2016;1406:121-35. Epub 2016/01/29.
168. Wu YJ, Wang H, Liang JH, Miao Y, Liu L, Qiu HR, et al. Using the geometric mean fluorescence intensity index method to measure ZAP-70 expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. OncoTargets and therapy. 2016;9:797-805. Epub 2016/03/05.
169. Mastelic A, Cikes Culic V, Rezic Muzinic N, Vuica-Ross M, Barker D, Leung EY, et al. Glycophenotype of breast and prostate cancer stem cells treated with thieno[2,3-b]pyridine anticancer compound. Drug Des Devel Ther. 2017;11:759-69. Epub 2017/03/30.
170. Zhou K, Yao YL, He ZC, Chen C, Zhang XN, Yang KD, et al. VDAC2 interacts with PFKP to regulate glucose metabolism and phenotypic reprogramming of glioma stem cells. Cell death & disease. 2018;9(10):988. Epub 2018/09/27.
171. Lin WR, Yeh CT. GALNT14: An Emerging Marker Capable of Predicting Therapeutic Outcomes in Multiple Cancers. International journal of molecular sciences. 2020;21(4). Epub 2020/02/27.
172. Rubsam M, Mertz AF, Kubo A, Marg S, Jungst C, Goranci-Buzhala G, et al. E-cadherin integrates mechanotransduction and EGFR signaling to control junctional tissue polarization and tight junction positioning. Nature communications. 2017;8(1):1250. Epub 2017/11/03.
173. Raghu D, Mobley RJ, Shendy NAM, Perry CH, Abell AN. GALNT3 Maintains the Epithelial State in Trophoblast Stem Cells. Cell Rep. 2019;26(13):3684-97 e7. Epub 2019/03/28.
174. Kotb AM, Hierholzer A, Kemler R. Replacement of E-cadherin by N-cadherin in the mammary gland leads to fibrocystic changes and tumor formation. Breast cancer research : BCR. 2011;13(5):R104. Epub 2011/10/28.
175. Qian X, Anzovino A, Kim S, Suyama K, Yao J, Hulit J, et al. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. Oncogene. 2014;33(26):3411-21. Epub 2013/08/27.
176. Guan F, Handa K, Hakomori SI. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;106(18):7461-6. Epub 2009/04/22.
177. Zuo T, Shan J, Liu Y, Xie R, Yu X, Wu C. EFEMP2 Mediates GALNT14-Dependent Breast Cancer Cell Invasion. Transl Oncol. 2018;11(2):346-52. Epub 2018/02/13.

178. Wu J, Chen X, Bao Q, Duan R, Jin Y, Shui Y, et al. Osterix Decreases the Chemosensitivity of Breast Cancer Cells by Upregulating GALNT14. Cell Physiol Biochem. 2017;44(3):998-1010. Epub 2017/12/12.
179. Yao B, Wang J, Qu S, Liu Y, Jin Y, Lu J, et al. Upregulated osterix promotes invasion and bone metastasis and predicts for a poor prognosis in breast cancer. Cell death & disease. 2019;10(1):28. Epub 2019/01/12.
180. Badr HA, AlSadek DM, Mathew MP, Li CZ, Djansugurova LB, Yarema KJ, et al. Nutrient-deprived cancer cells preferentially use sialic acid to maintain cell surface glycosylation. Biomaterials. 2015;70:23-36. Epub 2015/08/22.
181. Li F, Ding J. Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. Protein & cell. 2019;10(8):550-65. Epub 2018/11/28.
182. Margheri F, Papucci L, Schiavone N, D'Agostino R, Trigari S, Serrati S, et al. Differential uPAR recruitment in caveolar-lipid rafts by GM1 and GM3 gangliosides regulates endothelial progenitor cells angiogenesis. J Cell Mol Med. 2015;19(1):113-23. Epub 2014/10/15.
183. Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, et al. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. The Journal of biological chemistry. 2002;277(5):3085-92. Epub 2001/11/15.
184. Hakomori SI, Handa K. GM3 and cancer. Glycoconjugate journal. 2015;32(1-2):1-8. Epub 2015/01/24.
185. Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. Cell growth regulation through GM3-enriched microdomain (glycosynapse) in human lung embryonal fibroblast WI38 and its oncogenic transformant VA13. The Journal of biological chemistry. 2004;279(33):34655-64. Epub 2004/05/15.
186. Garbar C, Mascaux C, Merrouche Y, Bensussan A. Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancer cell sialylation impacts tumor microenvironment T-lymphocyte subset recruitment: a possible mechanism of tumor escape. Cancer Manag Res. 2018;10:1051-9. Epub 2018/05/17.
187. Miyan M, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I, de Boniface J. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. J Transl Med. 2016;14(1):227. Epub 2016/07/31.

9. SAŽETAK

Ciljevi doktorske disertacije bili su istražiti izražaj glikosfingolipida na matičnim i ne-matičnim stanicama raka dojke nakon tretmana novosintetiziranim spojem, 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksa midom (Spoj).

Djelovanje Spoja analizirano je kroz parametre rasta i preživljenja (MTT test), apoptoze, aktivnosti (stvaranje mamosfera) i postotka CSC ($CD44^+/CD24^-$ i $CD133^+$) te glikofenotipa ($IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$, GalNAc-GM1b, $IV^3Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$, GM3(NeuAc5), Gb_4Cer, GM2, GD3, Gg_3Cer i nLc_4Cer) na CSC i ne-SCC ($CD44^-/CD24^+$, $CD44^+/CD24^+$, $CD44^-/CD24^-$ i $CD133^-$) stanicama tumorskih linija trostruko negativnog raka dojke (MDA-MB-231 i MDA-MB-453). Učinak pet različitih koncentracija Spoja tijekom četiri vremenska intervala analiziran je MTT testom. Svi parametri, osim kod MTT testa, određivani su nakon 48-satnog tretmana 2 μM koncentracijom Spoja. Citotoksični učinak, zapažen kod obiju staničnih linija, bio je posredovan apoptozom. Postotak CSC i broj nastalih mamosfera bio je značajno snižen. CSC i ne-SCC razlikuju se u izražaju glikosfingolipida. Glikosfingolipidi $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$ i GalNAc-GM1b koji nisu istraživani ranije, pronađeni su na CSC i ne-SCC. $IV^6Neu5Ac\text{-}nLc_4Cer$ je bio pojačano izražen na objema subpopulacijama nakon tretmana Spojem, dok je GM3(Neu5Ac) bio pojačano izražen na objema subpopulacijama stanične linije MDA-MB-231. GalNAc-GM1b, Gb_4Cer i GM2 pojačano su bili izraženi na CSC obje stanične linije, dok je GD3 bio snižen na CSC stanične linije MDA-MB-231.

Zbog učinka Spoja na smanjenje postotka CSC i na smanjenje stvaranja mamosfera, kao i njegovog utjecaja na izražaj glikosfingolipida, u smislu pomjeranja glikofenotipa prema ne-SCC, te uzimajući u obzir činjenicu da je trostruko negativni rak dojke karakteriziran povećanim postotkom CSC te posljedično s povećanim rizikom metastaziranja, povećanim otpornošću na terapiju, povećanom vjerojatnošću povratka bolesti te povećanjem smrtnosti, možemo zaključiti da ovaj derivat tieno [2,3-*b*] piridina zaslužuje pažnju kao potencijalno novi lijek u liječenju ovog tipa raka dojke.

10. SUMMARY

The aims of doctoral dissertation „Glycosphingolipid expression at breast cancer stem cells after newly synthesized compound 3 - amino - N - (3 - chloro - 2 - methylphenyl) - 5 - oxo -5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide treatment" were to investigate the expression of glycosphingolipids on breast cancer stem cells and non-stem cancer cells after treatment with the newly synthesized compound.

Compound activity was analyzed through growth and survival parameters (MTT test), apoptosis, activity (mammosphere formation) and stem cell percentage ($CD44^+/CD24^-$ and $CD133^+$) and glycophenotype (IV^6Neu5Ac- nLc4Cer, GalNAc - GM1b, IV^3Neu5Ac-nLc4Cer, GM3, Gb4Cer, GM2, GD3, Gg3Cer and nLc4Cer) on CSC and non-SCC ($CD44^{-/}CD24^+$, $CD44^+/CD24^+$, $CD44^-/CD24^-$ and $CD133^-$) cells of triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MDA-MB-453). The effect of five different compound concentrations at four-time intervals was analyzed by the MTT assay. All parameters, except the MTT assay, were determined after 48 hours of treatment with a 2 μM concentration of the Compound. The cytotoxic effect, observed in both cell lines, was mediated by apoptosis. The percentage of CSC and the number of mammospheres formed is significantly reduced. CSC and non-SCC differ in glycosphingolipid expression. Glycosphingolipids IV^6Neu5Ac-nLc_4Cer and GalNAc-GM1b, which have not been previously studied, have been found in both CSC and non-SCC. IV^6Neu5Ac-nLc_4Cer expression was increased in both subpopulations after Compound treatment, while GM3(Neu5Ac) expression was increased in both subpopulations in MDA-MB-231 cell line. GalNAc-GM1b, Gb_4Cer and GM2 were overexpressed on CSC of both cell lines, while GD3 expression was decreased at the CSC in MDA-MB-231 cell line.

Due to the effect of the Compound on reducing the percentage of CSC and the formation of mammospheres, the shift of CSC to non-SCC glycophenotype, and taking into account the fact that triple-negative breast cancer is characterized by increased CSC and, consequently, with an increased risk of metastasis, chemoresistance, relapse and mortality, we can conclude that this thieno [2,3-*b*] pyridine derivative deserves attention as a potentially new drug in the treatment of this type of breast cancer.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Sandra Marijan

Djevojačko prezime: Dujić-Bilušić

Državljanstvo: hrvatsko

IZOBRAZBA

2012. Poslijediplomski studij „Translacijska istraživanja u biomedicini", Sveučilište u Splitu Medicinski fakultet

2011. Magistra forenzične kemije i molekularne biologije, Sveučilište u Splitu Centar za forenzične znanosti

1997. Prvostupnica inženjerka medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet

MATERINSKI JEZIK

Hrvatski

OSTALI JEZICI

Engleski, njemački, talijanski

RADNO ISKUSTVO

2019. – danas	Sveučilište u Splitu Odjel zdravstvenih studija, predavač
2017. – danas	Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju, stručni suradnik na studiju Medicina na engleskom jeziku
2012. – 2019.	Sveučilište u Splitu Odjel zdravstvenih studija, stručni suradnik
1998. – danas	Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju, voditelj laboratorija II. vrste zvanja
1998. - 2008.	Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Katedra za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, voditelj laboratorija II. vrste zvanja
1993. - 1994.	Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko dalmatinske županije, pripravnik

NASTAVNE AKTIVNOSTI

2016. – danas Medical chemistry and biochemistry (studij Medicina na engleskom jeziku, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu)

2013. – 2021. Biokemija 2 (Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu)

2013. – 2021. Glikobiologija hematopoeze (Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu)

2012. – 2021. Biokemija (svi studijski smjerovi Odjela Zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu)

2012. – 2021. Opća i analitička kemija (Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu)

OSTALE AKTIVNOSTI

2019. Organizacija i provedba aktivnosti u okviru Europske noći istraživača, travanj 2019., Split, Hrvatska

2018. Organizacija i provedba aktivnosti u okviru Europske noći istraživača, travanj 2018., Split, Hrvatska

2017. 2. BABS simpozij, *„GM3 and CD15s highly expressing breast cancer stem cells are sensitive to novel thieno[2,3-b]pyridine anticancer compound treatment*“, rujan 2017., Split, Hrvatska. **Usmena prezentacija**.

2017. Organizacija i provedba aktivnosti na otvaranju Festivala znanosti, travanj 2017., Split, Hrvatska

2017. Organizacija i provedba aktivnosti u okviru Festivala znanosti, radionica „Kemija u vremenu“, travanj 2017., Split, Hrvatska

2016. Organizacija i provedba aktivnosti u okviru Festivala znanosti, radionica „Umjetnost kemije“, travanj 2016., Split, Hrvatska

2016. Završen intenzivni tečaj iz protočne citometrije „*From First Principles to Polychromatic Applications*“, listopad 2016., Zagreb, Hrvatska

2016. 8. Hrvatski Cochrane simpozij, Razumijevanje znanstvenih dokaza, svibanj 2016., Split, Hrvatska. Sudionica.

2016. TRIBE tečaj, Znanost o laboratorijskim životinjama, travanj 2016., Split, Hrvatska. Sudionica.

2016. TRIBE tečaj, *Fascination for Statistic*, travanj 2016., Split, Hrvatska. Sudionica.

2015. Organizacija i provedba aktivnosti u okviru Festivala znanosti, radionica „Splitwarts - mala škola čarobiranja“, travanj 2015., Split, Hrvatska

2015. 7. Hrvatski Cochrane simpozij, Izrada i provedba kliničkih smjernica, svibanj 2015., Split, Hrvatska. Sudionica.

2014. FEBS EMBO 2014 kongres, „*Can CD15s (sialyl Lewis x) be used as a potential marker for neonatal sepsis? Control study. Split, Croatia*.“, kolovoz - rujan 2014., Pariz, Francuska. **Poster prezentacija**.

2013. ISABS kongres forenzike, antropologije i medicinske genetike, lipanj 2013., Split, Hrvatska. Članica lokalnog organizacijskog odbora.

2013. 5. Hrvatski Cochrane simpozij, Osvrt na prošlost, pogled u budućnost, travanj 2013., Split, Hrvatska. Sudionica.

2013. Radionica Instrumentalia & Waters Analytical Solutions: „*Complete approach to UPLC & UPLC-MS/MS Analysis*“, veljača 2013., Split, Hrvatska. Sudionica.

2012. IUBMB FEBS kongres “*From Single Molecules to Systems Biology*”, „*Diversity of autosomal SE33 marker in the reference samples of the Dalmatian population*“, rujan 2012., Sevilla, Španjolska. **Poster prezentacija**.

2011. ISABS kongres forenzike, antropologije i medicinske genetike, “*Allele frequencies of the New European Standard Set (ESS) loci plus SE33 locus in Dalmatian Human Population*“, lipanj 2011., Bol, Hrvatska. **Poster prezentacija**.

2010. HDBMB kongres s međunarodnim sudjelovanjem, „*Hyperbaric environment downregulates renal CD77 expression in rat*“, rujan 2010., Opatija, Hrvatska. **Poster prezentacija.**

2010. FEBS radionica: „*Education in Biochemistry and Molecular Biology*“, rujan 2010., Opatija, Hrvatska. Sudionica.

STIPENDIJE

2012. Stipendija grada Solina za studente poslijediplomskih studija

2012. Stipendija Europskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (FEBS) za studente poslijediplomskih studija

ČLANSTVA

2010. – danas Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), članica.

2012. – danas Hrvatsko društvo forenzičara (HDF), članica Upravnog odbora.

ISTRAŽIVAČKI PROJEKTI

2016. – 2017. Suradnica na HAMAG-BICRO projektu „RNazaH2A kao nova meta u dijagnostici i liječenju tumora mokraćnog mjehura“ (voditeljica projekta izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić)

2009. – 2013. Suradnica na MZOŠ HR projektu „Patobiokemija glikosfingolipidnih antigena” (216-21601330066, voditeljica projekta: prof. dr. sc. Anita Markotić)

PUBLIKACIJE

Koautorica triju znanstvenih članka, 5 kongresnih priopćenja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima te sveučilišnog praktikuma za medicinsku kemiju i biokemiju na engleskom jeziku.

1. Marijan S, Markotić A, Mastelić A, Režić-Mužinić N, Pilkington LI, Reynisson J, Čulić VČ., „Glycosphingolipid expression at breast cancer stem cells after novel thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer compound treatment“, *Scientific Reports*, (2020) 10:11876, doi: 10.1038/s41598-021-87310-y., PMID: 33837243 **(IF: 4.379)**
2. Marijan S, Mastelić A, Markotić A, Režić-Mužinić N, Vučenović N, Barker D, Pilkington LI, Reynisson J, Čulić VČ, “Thieno[2,3-b]Pyridine Derivative Targets Epithelial, Mesenchymal and Hybrid CD15s+ Breast Cancer Cells”, *Medicines* 2021, 8(7), 32. doi: 10.3390/medicines8070032., PMID: 34206154
3. Marija Simundic Munitic, Sandra Marijan, Darko Kero, Ivona Bago, “Antibacterial efficacy of bioceramic root canal sealers against planktonic Enterococcus faecalis after different contact and setting time: An in vitro study”, *Saudi Endodontic Journal* 2022, Volume 12, Issue 1 [p. 56-60], DOI: 10.4103/sej.sej_12_21 (IF: 1,944)