

Uloga Arf6 GTPaze u patogenezi različitih vrsta tumora

Antunović, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:939992>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Prijediplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Valentina Antunović

ULOGA ARF6 GTPAZE U PATOGENEZI RAZLIČITIH VRSTA MALIGNIH
TUMORA

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Prijediplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Valentina Antunović

ULOGA ARF6 GTPAZE U PATOGENEZI RAZLIČITIH VRSTA MALIGNIH
TUMORA

Završni rad

Rijeka, 2024.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Gordana Blagojević Zagorac

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Undergraduate university study

„Biotechnology and drug research“

Valentina Antunović

ROLE OF ARF6 GTPASES IN THE PATHOGENESIS OF DIFFERENT TYPES OF
MALIGNANT TUMORS

Final paper

Rijeka, 2024.

Mentor: Full professor Gordana Blagojević Zagorac, M.D.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Gordana Blagojević Zagorac

Završni rad obranjen je dana

pred povjerenstvom :

1.

2.

3.

Rad ima 35 stranica, 8 slika, 1 tablicu i 44 literaturna navoda.

ZAHVALA

Želim se iskreno zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Gordani Blagojević Zagorac na nesebičnom vremenu, trudu i strpljenju koje mi je pružila tokom pisanja ovog rada.

Najveće zahvale idu mojoj obitelji, posebno roditeljima bez kojih bih sve ovo bio samo san.

Također, hvala svim prijateljima, kolegama i djelatnicima Fakulteta biotehnologije i razvoja lijekova.

SAŽETAK

Arf6 GTPaze, točnije mali Arf GTP vezujući proteini, sastavni su proteini stanica u ljudi. Pripadaju superobitelji Ras, a mogu se podijeliti u tri razreda, a Arf6 GTPaza pripada razredu III. Za neometano djelovanje Arf6 GTPaze neophodna je stalna izmjena između aktivnog (GTP-vezanog) i inaktivnog (GDP-vezanog) oblika. Proteini koji aktiviraju Arf6 GTPazu nazivaju se čimbenici izmjene gvanin nukleotida (GEF proteini), dok se proteini koji ju inhibiraju nazivaju i čimbenicima aktivacije GTPazne aktivnosti Arf proteina (GAP proteini). Arf6 GTPaza sudjeluje u mnogobrojnim procesima, kako i u zdravim, netumorskim stanicama, tako i u tumorskim, malignim stanicama, odnosno kancerogenim novotvorinama. U zdravim, neupalnim i netumorskim stanicama, sudjeluje u procesima endocitoze (klatrin posredovane i klatrin neovisne), lipidne modifikacije, autofagije, signalizacije pomoću receptora nalik Tollu i polimerizaciji aktina. U malignim tumorskim stanicama nerijetko sudjeluje u proliferaciji tumorskih stanica, invaziji malignih tumora u zdrava tkiva te metastaziranju. Stoga ne čudi da neki od lijekova koji se koriste u liječenju malignih tumora, poput SecinH3, Brefeldin A i NAV 2729, kao ciljnu molekulu ciljaju Arf6 GTPazu, odnosno njezine GEF i GAP proteine. Mnogobrojni lijekovi također indirektno mogu utjecati na aktivnost i rad Arf6 GTPaze, no njihovi točni mehanizmi još uvijek se istražuju.

Ključne riječi: Arf6 GTPaza, GAP proteini, GEF proteini, maligni tumori

SUMMARY

Arf6 GTPase, more specifically, small Arf GTP binding proteins are essential proteins in human cells. They belong to the Ras superfamily and can be divided in three classes, out of which, Arf6 GTPase is member of class III. Proteins that activate Arf6 GTPase are called guanine nucleotide exchange factor, shortly GEF proteins while the proteins that inhibit Arf6 GTPase are called GTPase activating protein, shortly GAP proteins. Arf6 GTPase is a part of many processes in both nontumor and malignant tumor cells. In healthy, noninflammatory and nontumor cells they take part in processes of endocytosis (clathrin mediated and clathrin independent), lipid modification, autophagy, Toll like receptor signaling and actin polymerization. In malignant tumor cells they are often taking part in proliferation of tumor cells, invasion of tumor cells and metastasis.

Therefore, it is not surprising that some of the drugs used in the treatment of malignant tumors, such as SecinH3, Brefeldin A and NAV 2729, target Arf6 GTPase, i.e. their GEF and GAP proteins. A number of drugs can also indirectly affect the activity and function of Arf6 GTPase, but their exact mechanisms are still under research.

Key words: Arf5 GTPse, GAP proteins, GEF proteins, malignant tumors

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ras superobitelj i Arf GTPaze	2
1.2. Mehanizmi djelovanja Arf6 GTPaze.....	3
2. SVRHA RADA.....	5
3. Arf6 GTPaza – Aktivacijska stanja, specifični GAP i GEF proteini	6
3.1. Aktivacijska stanja Arf GTPaza	6
3.2. Specifični Arf6 GEFovi i GAPovi	8
4. Uloga Arf6 GTPaze u normalnim, netumorskim i neupalnim stanicama .	9
4.1. Lipidna modifikacija	10
4.2. Klatrin posredovana endocitoza, klatrin neovisna endocitoza, endosomalno recikliranje.....	10
4.3. Polimerizacija aktina	12
4.4. Autofagija	12
4.5. Signalizacija putem TLR i prezentacija antigena	12
5. Tumori	14
5.1. Maligni tumori	14
5.2. Tumorski antigeni	15
5.3. Tumorsko izbjegavanje imunskog sustava, metastaziranje	16
6. Arf6 GTPaza u patogenezi malignih tumora	19
6.1. Odvajanje od primarnih stanica malignog tumora uz pomoć Arf6 GTPaze	19
6.2. Kretanje stanica malignog tumora uz pomoć Arf6 GTPaze	20
6.3. Uloga Arf6 GTPaze u formiranju invadopodija i degradiranju izvanstaničnog matriksa	20
6.4. Uloga Arf6 GTPaze u stvaranju mikrovezikula	21

6.5. Uloga Arf6 GTPaze u recikliranju integrina beta 1 i angiogenezi ..	22
6.6. Uloga Arf6 GTPaznog GAPa u formiranju mikrosatelita u malignim tumorima	23
7. Liječenje	25
7.1. SecinH3.....	25
7.2. Brefeldin A.....	26
7.3. NAV 2729	27
8. Zaključak	28
Literatura.....	Error! Bookmark not defined.
Životopis.....	36

1. UVOD

Razumijevanje mehanizma rada i procesa u koje je uključena Arf6 GTPaza u ovome radu proučavano je najviše kroz stanične, imunološke i fiziološke (patofiziološke) razine. Razmatrane su funkcije i uloge Arf6 GTPaze kako u zdravim, tako i u malignim tumorskim stanicama. Ovakvi podatci od iznimne su važnosti, između ostalog, zbog daljnjih istraživanja načina liječenja, ali i suzbijanja širenja i rasta malignih tumora. Također, otvaraju mogućnost razvoja novih lijekova, koji za svoje mete imaju samu Arf6 GTPazu, ali i njene GEF i GAP proteine.

U današnjoj eri napredne biomedicinske istraživačke tehnologije, kritički pregled i analiza postojeće literature postaju neophodni za pravilno razumijevanje uloge Arf6 GTPaze u malignim tumorima. Integracija podataka iz različitih istraživačkih studija omogućava nam da identificiramo ključne mehanizme i signalne puteve, čime se otvara put za nove hipoteze i daljnja istraživanja. Prvi korak u kritičkom pregledu literature je razumijevanje osnovnih bioloških funkcija Arf6 GTPaze. Arf6 GTPaza je protein koji neprestano cirkulira između aktivnog, GTP i neaktivnog, odnosno GDP stanja, regulirajući time različite stanične procese [1]. Promjena u regulaciji aktivacije ovog proteina može dovesti do poremećaja različitih procesa u stanicama, a što posljedično može rezultirati razvojem različitih patoloških stanja, uključujući nastanak malignih tumora [1, 2]. Osim toga, kritički pregled literature može nam ukazati na specifičnosti različitih malignih tumora, u kojima Arf6 GTPaza ima značajniji učinak i samim time može biti potencijalna meta antitumorskse terapije.

1.1.Ras superobitelj i Arf GTPaze

Ras superobitelj proteina podijeljena je u 5 podobitelji: Ras, Raf, Arf, Ran i Rab. Općenito Ras proteini su najpoznatiji po svojoj ulozi u regulaciji staničnog rasta i diferencijacije. Mutacije u genima koji kodiraju Ras proteine često su povezane s različitim oblicima malignih tumora, čineći ih tako vrlo preciznim i važnim metama za istraživanja u području onkologije. Ras proteini djeluju kao molekularni prekidači koji prenose signale proizvedene ili primljene izvan stanice do jezgre stanice, aktivirajući niz signalnih puteva koji kontroliraju proliferaciju i preživljavanje stanica [1, 2].

Naziv Arf proteina dolazi od njihove funkcije, te je njihov puni naziv ADP faktori ribolizacije (engl. ADP-ribosylation factors, ADP) i oni pripadaju malim GTP vezujućim proteinima, odnosno malim GTPazama. U istu obitelj proteina (obitelj Arf) ubrajaju se i Arf slični proteini (engl. Arf-like proteins, ARL) te Sar proteini [1, 2]. Osnovni mehanizam djelovanja Arf GTPaza može se prikazati kroz njihova dva aktivacijska stanja: Arf-GTP i Arf-GDP. Naime, Arf proteini funkcioniraju kao molekularne sklopke i stalno kruže između dva osnovna stanja, aktivnog i inaktivnog. Kada Arf proteini imaju na sebe vezan GTP nalaze se u aktivnom obliku, dok su u inaktivnom obliku kada na sebe imaju vezan GDP. Arf proteini kada su u svojem inaktivnom stanju pretežito se nalaze raspršeni u citosolu, dok se nakon aktivacije, odnosno vezivanja GTPa vezuju za membrane. Arf proteini se s obzirom na podudarnost u građi dijele u tri razreda. Razredu I pripadaju proteini Arf1, Arf2 i Arf3, s tim da je važno napomenuti da ljudima nedostaje Arf2. Proteini Arf4 i Arf5 sačinjavaju razred II, dok razred III sadrži samo jedan Arf protein, Arf6 [1, 2].

1.2. Mehanizmi djelovanja Arf6 GTPaze

Arf6 GTPaza je poput ostalih Arf proteina vrlo mali protein kojeg čini svega 175 aminokiselina (molekulska masa iznosi 20.1 kDa) i jedini je pripadnik razreda III Arf proteina. Arf6 je unutarstanični protein koji je izražen u gotovo svim stanicama ljudskog organizma i sudjeluje u mnogobrojnim staničnim procesima koji su nužni za stanično preživljavanje, migraciju, diferencijaciju i diobu. Neki od najvažnijih procesa zdravih stanica u kojima Arf6 GTPaza igra važnu ulogu, a koji će kasnije biti detaljnije opisani, su endocitoza (klatrin posredovana i klatrin neovisna), stanična adhezija, lipidna modifikacija, autofagija i polimerizacija aktina. Neki od najvažnijih procesa u patogenezi malignih tumora u kojima je Arf6 GTPaza ima ključnu ulogu su: formiranje invadopodija, prekid staničnog kontakta, stvaranje mikrovezikula, kao i mikrosatelitno induciranih malignih tumora [1, 3]. Jedna od najvažnijih uloga Arf6 GTPaze u malignim tumorskim stanicama je promicanje migracije stanica malignih tumora, invazija u zdrava tkiva te metastaziranje. Arf6 GTPaza posreduje promjene u staničnoj membrani, kao i formiranje invadopodija, odnosno specijaliziranih staničnih struktura koje omogućavaju tumorskim stanicama da degradiraju kontinuitet izvanstaničnog matriksa i invadiraju zdrava tkiva. Ova funkcija je ključna za metastaziranje, proces kojim se tumorske stanice šire iz primarnog tumora u udaljene organe [3]. Arf6 GTPaza također regulira proces endocitoze i izražaja, odnosno recikliranje adhezijskih molekula, točnije E kadherina. Internalizacijom i recikliranjem E kadherina, protein Arf6 GTPaza utječe na staničnu adheziju i kontakt dvije ili više stanica. Samim time može dodatno doprinijeti odvajanju primarnih stanica tumora i njihovoj migraciji [3, 4, 5].

S obzirom da se Arf6 GTPaza nalazi i u zdravim, neupalnim i netumorskim stanicama, njezinom potpunom inhibicijom potencijalno bi se narušilo i funkcioniranje zdravih stanica. Stoga, osim već u početku samog uvoda spomenutih novih mogućih meta lijekova kao što su Arf6 GTPaza i njezini

GEF i GAP proteini, nove moguće mete u liječenju malignih tumora potencijalno su i molekule koje su kofaktori mehanizama i puteva signalizacije u kojima sudjeluje Arf6 GTPaza. Dakle, poznavanjem mehanizama u kojima sudjeluje i sama Arf6 GTPaza (zajedno sa GEF i GAP proteinima) otvaraju se mogućnosti za nova istraživanja i nove mete lijekova, kao što su kofaktori u formiranju invadopija, mikrovezikula i recikliranju kadherina. Pregledima literature i novim istraživanjima mehanizama rada Arf6 GTPaze, pruža se niz novih informacija i dokaza koji će služiti u svrhe pronalaska novih lijekova i terapija kada su u pitanju maligni tumori povezani s disfunkcijom Arf6 GTPaze.

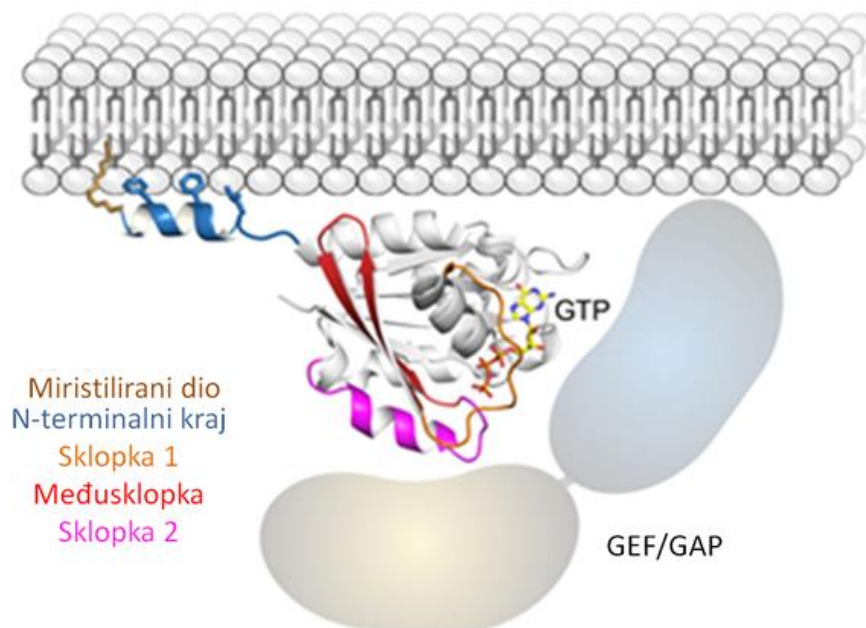
2. SVRHA RADA

Kritička analiza literature ovog rada potkrijepljena je mnogim znanstvenim radovima, kako istraživačkim, tako i preglednim znanstvenim radovima. Ovakav pregled i analiza literature je bitna jer nam pruža detaljniji i bolji uvid u mnogobrojne mehanizme koji su od iznimne važnosti u dijagnostici, liječenju i općenito razumijevanja ljudskog organizma na imunološkoj, fiziološkoj, patofiziološkoj, biokemijskoj i mnogim drugim razinama. Kako je tema ovog rada jedan od velikog broja proteina ljudske stanice, Arf6 GTPaza, od iznimne je važnosti razumjeti njegovu građu, položaj, mehanizam aktivacije i inhibicije te mehanizme djelovanja, kako u zdravim, neupalnim i netumorskim stanicama, tako i u kronično upalnim, odnosno tumorskim stanicama; specifičnije, malignim tumorskim stanicama. Ukoliko se dobro poznaje sve navedeno, potiče se kritičko razmišljanje u vidu interakcije ovog proteina s ostalim proteinima, staničnim organelima i općenito dijelovima stanice, ali također i interakcije ovog proteina s lijekovima. S obzirom da su maligni tumori vrlo specifični te mogu vrlo brzo i lako izbjeći nadzor imunosnog sustava, proliferirati i metastazirati, stavljen je naglasak na mehanizme proliferacije, invazije i metastaziranja tumorskih stanica potpomognute Arf6 GTPazom. Danas je baš taj protein jedan od ključnih meta istraživanja, kako bi se širenje, rast i razvoja tumora spriječili. Osim navedenog proteina, jedne od vrlo važnih meta istraživanja su i proteini koji ga aktiviraju i inaktiviraju, a to su Arf GEF proteini i Arf GAP proteini.

3. ARF6 GTPAZA – AKTIVACIJSKA STANJA, SPECIFIČNI GAP I GEF PROTEINI

3.1. Aktivacijska stanja Arf GTPaza

Arf obitelj proteina građena je alosterički, a što omogućuje postojanje više veznih i aktivnih mjesta proteina, odnosno „udaljenu“ komunikaciju proteina. Vezno mjesto za GDP/GTP molekule sastoji se od dvije sklopke (engl. *switch 1 i switch 2*) i jedne međusklopke (engl. *interswitch*) koja ih povezuje i ključna je za izmjenu GDP i GTP molekula. Aktivaciju Arf GTPaza posreduju čimbenici izmjene gvanin nukleotida (engl. *guanine nucleotide exchange factor, GEF*) koji sadrže N – terminalnu domenu, odnosno Sec7 domenu koja je glavni katalizator izmjene GDP molekule s GTP molekulom. Osim navedene domene, GEFovi sadrže još i DCB domenu (engl. *cyclophilin binding*), kao i homologne domene (engl. *homology domains, HUS*) te C-terminalnu domenu [1,2]. Do sada je poznato ukupno 15 različitih GEF proteina koji se mogu podijeliti u 6 različitih grupa: BIG, GBF, PSD (EFA), BRAG, citohezini i FOX [2]. Neki od GEFova koji su dio trans-Golgijeve mreže (engl. *Trans-Golgi network, TGN*) su BIG1 i BIG2, dok je GBF1 primjer GEF proteina u cis-Golgijevoj mreži. Za razliku od njih, Arf GEF proteini iz BRAG, PSD i citohesinske skupine uglavnom svoj funkciju vrše unutar endosomalnog sustava stanice te na staničnoj membrani. Inaktivaciju Arf GTPaza posreduju čimbenici aktivacije GTPazne aktivnosti Arf proteina (engl. *GTPase activating protein, GAP*). GAP proteini sadrže GAP domene koje u sebi imaju argininski prsten koji se umeće u vezno mjesto za nukleotid u Arf proteinima. Argininski prsten pojačava endogenu GTPaznu aktivnost Arf proteina [2]. Do sada je poznato više od dvadeset različitih Arf GAP proteina koji često imaju redundantnu funkciju, a dijele se u 8 različitih skupina i to: ADAP, ACAP, ARAP, AGAP, ArfGAP, SMAP, GIT i ASAP [1, 2].



Slika 1. Strukturni dijelovi Arf proteina koji se vežu za membranu i sudjeluju u interakciji s čimbenicima aktivacije. Arf GTPaze imaju 3 glavna dijela odgovorna za aktivaciju/inaktivaciju samog proteina. Narančasto označena sklopka 1 i ružičasto označena sklopka 2 su dva glavna faktora koja određuju kako će izgledati vezno mjesto nukleotida. Međusklopka (crveno označeno) služi kao alosterični regulator. Preuzeto i modificirano prema [2].

Do sada su opisana dva načina putem kojih može doći do aktivacije Arf GTPaze. Prva mogućnost je da se najprije Arf GTPaze u inaktivnom obliku vrlo slabo vežu za staničnu membranu kako bi se prekinula autoinhibicija N-terminalnog dijela proteina, pomoću međusklopke. Kako bi se vezale za membranu, Arf GTPaze su prvo miristilirane, odnosno N-terminalni kraj je modificiran tako da je na njegovu alfa-amino skupinu kovalentno vezan dio miristinske kiseline od 14 ugljikovih atoma. Potom dolazi do mobilizacije Arf GEF proteina na isto mjesto na membrani. Sec7 domena Arf GEFa dovodi invarijanti glutamat (još nazivan i glutamatskim prstenom) u kompeticiju s fosfatom GDP molekule, nakon čega će molekula GDPa disociirati i tako ostaviti prazno mjesto za vezanje GTPa. Drugi mogući

način aktivacije Arf GTPaza je, da najprije dođe do vezivanja GEF proteina za membranu, a tek potom do mobilizacije Arf GTPaze i njezine aktivacije [2]. Opisani načini aktivacije pokazani su za sve Arf GTPaze, iako je od svih najbolje istražena Arf6 GTPaza koja je u fokusu ovoga rada.

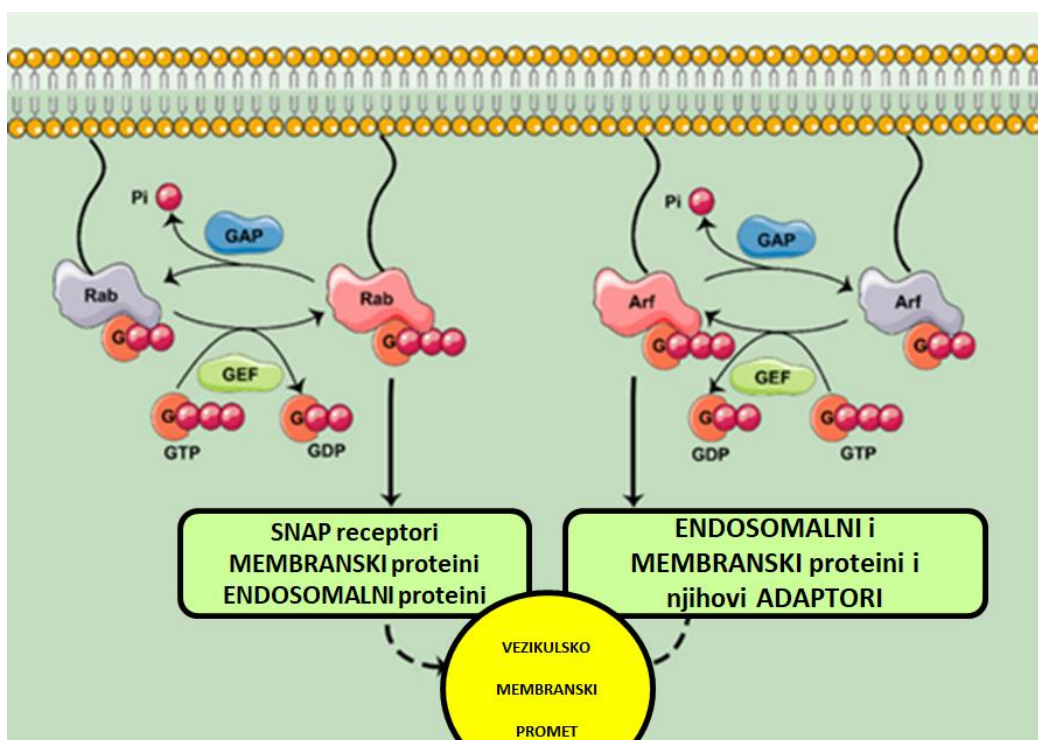
3.2. Specifični Arf6 GEFovi i GAPovi

Kao što je već ranije navedeno, do sada je poznato ukupno 15 različitih Arf GEF proteina i za mnoge od njih je pokazano da mogu posredovati i aktivaciju Arf6 proteina [4]. Neki od Arf GEFova specifičnih za Arf6 GTPazu su EFA6 (engl. *exchange factor for Arf6*), BRAG2 (engl. *Brefeldin A-resistant Arf GEF*, kasnije nazvan IQSecs ili GEP100) i citohezini koji posreduju aktivaciju Arf6 GTPaze uglavnom na površini stanica. Citohezini u sebi sadrže Sec7 domenu koja aktivira Arf6 GTPazu i tako stimulira aktivaciju Rac signalnog puta, odnosno aktinsku polimerizaciju. Iako je do sada pokazano da čak i FBX8 (F box protein), BIG1 i BIG2 Arf GEF proteini mogu posredovati aktivaciju Arf6 GTPaze, oni se ne smatraju specifičnim GEF proteinima Arf6 GTPaze [2, 4].

Neki od Arf GAPova specifičnih za Arf6 GTPazu su: ASAP1 i ASAP2 (ArfGAP sa SH3 domenom, ankyrin ponavljajućom i PH domenom), ARAP2 (Arf GAP s Rho GAP domenom, ANK ponavljajućom domenom i PH domenom) i AGAP2 (ArfGAP s GTPaznom domenom, Ankyrin ponavljanjem i PH domenom) Arf GAP proteini. Navedene molekule, osim GAP domene, sadrže ključnu PH domenu (engl. *pleckstrin homology domain*) kojom se vežu za membrane [1, 5].

4. ULOGA ARF6 GTPAZE U NORMALNIM, NETUMORSKIM I NEUPALNIM STANICAMA

Kao što je već ranije navedeno, Arf6 GTPaza sudjeluje u brojnim staničnim procesima, vršeći funkciju prenositelja signala. Neki od najvažnijih procesa u kojima Arf6 GTPaza ima važnu ulogu, a koji će biti opisani u ovom poglavlju su: lipidna modifikacija, klatrin posredovana i klatrin neovisna endocitoza, polimerizacija aktina, autofagija, signalizacija putem receptora sličnih Tollu (engl. *Toll like receptors*), kao i prezentiranje antigena u sklopu molekula tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) [5]. Također, Arf6 GTPaza, kao i Rab proteini, sudjeluju u transportu vezikula i biokemijskih signala od mjesta nastanka i pakiranja vezikula, pa sve do mjesta sekrecije na membrani [3].



Slika 2. Prikaz mehanizma rada aktiviranih Rab i Arf proteina. Proteini su aktivirani od strane GEF proteina te sudjeluju u mnogobrojnim procesima, od kojih je vrlo značajan vezikulsko membranski promet (engl. *membrane vesicle trafficking*), proces u kojem su Arf proteini u interakciji sa endosomalnim i membranskim proteinima, kao i njihovim adaptorima te

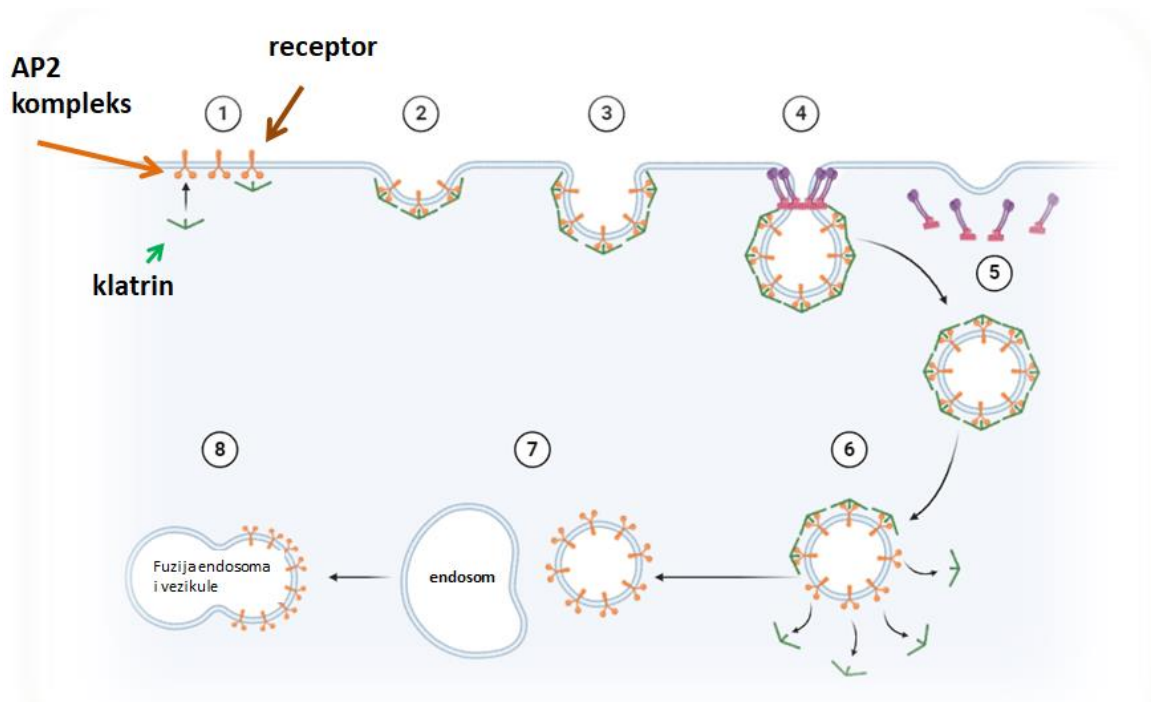
prenose biokemijske signale o mjestu pakiranja, putu i mjestu sekrecije vezikula. Ovakav proces zaustavlja se kada Arf proteini prijeđu u svoje GDP vezno stanje. Preuzeto i modificirano prema [3].

4.1. Lipidna modifikacija

Arf6 GTPaza zauzima ključnu ulogu u aktivaciji enzima i stvaranju molekula važnih za lipidnu modifikaciju. Arf6 GTPaza aktivira enzime koji su zaduženi za modificiranje lipida, kao što su fosfatidilinozitol-4-fosfat 5-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase*, PIP5K) i fosfolipaza D (engl. *phospholipase D*, PLD), a što rezultira stvaranjem fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (engl. *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*, PIP2) i fosfatidne kiseline (engl. *phosphatidic acid*, PA), važnih komponenti membranskih staničnih odjeljaka. Mijenjajući lipidni sastav membrana, Arf6 GTPaza utječe na brojne stanične procese, uključujući endocitozu, staničnu migraciju i polimerizaciju aktina [6].

4.2. Klatrin posredovana endocitoza, klatrin neovisna endocitoza, endosomalno recikliranje

U klatrin posredovanoj endocitozi (engl. *clathrin mediated endocytosis*, CME), koja je od iznimne važnosti za unos proteina i njihovih liganada u stanice eukariota, sudjeluje i Arf6 GTPaza. Arf6 GTPaza aktivirana je od strane proteina dynamin 2 te se veže na polipeptid AP 2 (engl. *assembly polypeptide 2*), adaptorski protein koji se nalazi na endocitiranim vezikulama. Isto tako, Arf6 GTPaza pridonosi stvaranju PIP2 koji je nužan za normalno odvijanje CME, odnosno daljnji put signalizacije, a ujedno je i prekursor drugih molekula važnih za CME (npr. PIP3). Nakon hidroliziranja PIP2 molekule, Arf6 GTPaza vraća se u svoje inaktivno stanje [5, 8].



Slika 3. Klatrin posredovana endocitoza. Na slici vidimo kako je unutarnja strana membrane, gdje će biti formirana vezikula, obložena klatrinom. Klatrin se veže na AP2 kompleks, točnije kompleks proteina na koji je vezana i Arf6 GTPaza. Pozadina slike preuzeta sa znanstveno ilustrativnog softwera Biorender te modificirana prema [8].

U klatrin neovisnoj endocitozi Arf6 molekula ima važnu ulogu u sortiranju endocitiranih molekula u reciklirajući endosomalni put [4]. Recikliranje endocitiranih proteina natrag do stanične površine može se odviti na 2 načina pa tako razlikujemo brzo (engl. *fast*) i sporo (engl. *slow*) recikliranje. U tzv. brzom recikliranju, endocitirani proteini se izravno recikliraju na staničnu membranu iz sortirajućih endosoma, dok se kod sporog recikliranja, endocitirana molekula najprije transportira iz sortirajućih endosoma u reciklirajući endosomalni odjeljak, a tek potom reciklira nazad na staničnu površinu. Arf6 GTPaza sudjeluje u oba procesa. Jedan od opisanih mehanizama putem kojeg Arf6 utječe na recikliranje endocitiranih molekula je taj da Arf6 dolazi u interakciju sa Sec10

molekulom i tako tvori funkcionalni egzocitozni kompleks nužan za uspješno recikliranje endocitiranih proteina [5, 7].

4.3. Polimerizacija aktina

Polimerizacija aktina važna je za nesmetanu migraciju stanica, kao i za održavanje normalne stanične strukture. Nakon agregacije Arf6 GTPaze kao i PIP3 molekula, regrutira se i čimbenik „otvaranja“ Arf nukleotidnog mjesta (engl. *ARF nucleotide binding site opener*, ARNO) koji funkcionira kao Arf GEF za Arf6 i Arf1 GTPaze, a pripada skupini citohezina (citohezin2). Aktivirani Arf6 i Arf1 pokreću kaskadni niz koji uključuje brojne molekule i signale, vodeći na kraju do polimerizacije aktina. Arf6 GTPaza također je uključena u polimerizaciju aktina putem interakcije s Rho GTPazom i njenim signalnim molekulama [5, 8].

4.4. Autofagija

Autofagija je proces putem kojeg stanica uklanja nefunkcionalne, odnosno nepotrebne dijelove stanice. Već ranije opisana interakcija Arf6 GTPaze i PIP5K dovodi do stvaranja velikog broja PIP2 molekula koje su važne u formiranju fagopora, odnosno endocitoze stanične membrane. Također, Arf6 GTPaza stupa u interakciju s proteinima koji formiraju fagopore i autofagosome, primjerice Atg12 i Atg16L1 proteinima, te na taj način sudjeluje u regulaciji autofagije [5, 9].

4.5. Signalizacija putem TLR i prezentacija antigena

Arf6 GTPaza jednu od svojih ključnih uloga ima i u signalnim putevima aktivacije receptora kao što je TLR4 i to na način da potiče proizvodnju PIP2 molekula uključuje putem aktivacije PIP5K kinaze koja je zadužena za lipidnu modifikaciju, PIP5K [5].

Osim toga, Arf6 GTPaza uključena je u proces endosomalnog recikliranja MHC I i MCH II molekula koje na sebe vežu antigene koje zatim prezentiraju stanicama imunskog sustava. Upravo ovaj mehanizam virusi i drugi patogeni mogu iskoristiti u svoju korist, što će biti detaljnije opisano u sljedećim tematskim poglavljima [5, 10].

5. TUMORI

Tumori, još nazivani neoplazme ili novotvorine, predstavljaju abnormalno rastući (novi) skup stanica u tijelu. Mogu biti dobroćudne (benigne novotvorine) ili kancerogene (maligne novotvorine). Manifestacije benignih tumora su polagan rast, ne prodiranje u okolna tkiva te dobro diferencirane stanice (slične „normalnim“ stanicama tijela), dok se maligni tumori očituju brzim rastom i invazijom u okolna tkiva te su stanice ovih tumora slabo diferencirane [11]. U ovom i sljedećim tematskim poglavljima, naglasak će biti na malignim tumorima.

5.1. Maligni tumori

Kao što je već navedeno, jedna od osnovnih razlika između benignih i malignih tumora je ta da se maligni tumori vrlo lako i brzo šire kroz ostatak tijela, odnosno metastaziraju. Maligni tumori mogu se širiti krvlju ili limfom, a sklonost metastaziranju, kao i predominantna mjesta u koja tumor metastazira između ostalog ovise i o vrsti malignog tumora. Neke od najčešćih vrsta malignih tumora su: karcinomi, sarkomi, mijelomi, leukemije i limfomi. Karcinomi su novotvorine koje zahvaćaju epitelne stanice kao što su epitelne stanice kože, dojke, prostate, mjehura, pluća i sl. Sarkomi su maligne novotvorine koje zahvaćaju kosti, tetive, hrskavice i masno tkivo te su jedni od najčešćih tumora u mlađoj dobi. Mijelomi su maligne novotvorine koje nastaju u stanicama koštane srži, odnosno nastaju u plazma stanicama imunskog sustava. Leukemije, maligne novotvorine koštane srži, nastaju prekomjernim stvaranjem nezrelih imunskih stanica. Limfomi, maligne novotvorine limfnog sustava, najčešće se pojavljuju u limfnim čvorovima na području vrata, pazuha ili prepona [11, 12].

Uzroci nastanka malignih tumora su multifaktorijalni, odnosno mogu biti uzrokovani genetskim faktorima, ali i okolišnim. Također, vrlo bitan čimbenik može biti i prehrana te način života (npr. pušenje). Genetski uzroci se najčešće očituju kroz mutacije u (proto)onkogenima, tumor

supresorskim genima i genima zaduženima za održavanje stabilnosti DNA. Najčešće mutirani onkogeni su *myc* i *ras*, dok su kod tumor supresorskih gena to *p53* i *RB* geni. Geni stabilnosti DNA koji su najčešće mutirani u tumorskim stanicama su : protein za popravak nepodudarnosti DNA *Mlh1* (engl. *MutL Homolog 1*, *MLH1*) i *Msh2* (engl. *MutS Homolog 2*, *MSH2*). Mutacije su najčešće točkaste mutacije, mutacije u pomaku okviru čitanja (engl. *frameshift mutations*) te varijacije u broju kopija gena (engl. *copy number variation*, *CNV*) [12].

5.2. Tumorski antigeni

Tumorski antigeni se dijele u dvije velike skupine, a to su : tumor specifični antigeni (engl. *tumor specific antigens*, *TSA*) i tumorski asocirajući antigeni (engl. *tumor associated antigens*, *TAA*). U oba slučaja, radi se o unutarstaničnim molekulama koje su izražene na površini stanice zajedno s *MHC* molekulama. Najznačajniji tumor specifični antigeni su mutirani onkogeni i tumor supresori, virusni antigeni (npr. *proteini E6 i E7 kod tumora uzrokovanih virusom HPV-a*) te suputničke mutacije u genima koji nisu nužno zaduženi za razvoj tumora (engl. *passenger mutations*) [11,13].

Osim navedene dvije glave skupine, u tumorske antigene još se ubrajaju i onkofetalni antigeni te prekomjerno izraženi nemutirani antigeni. Onkofetalni antigeni su antigeni normalno izraženi samo u embrionalnom razvoju, kao što je α -fetoprotein, glikoprotein izražen tokom razvoja jetre fetusa. Navedeni glikoprotein se često koristi kao marker za tumor jetre. Nadalje, primjer nemutiranog i prekomjerno izraženog antigena je receptor tirozin-protein kinaze *erbB2* (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, *HER2*) odnosno protein koji se nalazi u membranama normalnih i zdravih stanica, ali je u tumorskim stanicama prekomjerno izražen. Jedan od tumora gdje je najčešće prekomjerno izražen je maligni tumor dojke [13].

5.3. Tumorsko izbjegavanje imunskog sustava, metastaziranje

Tri glavne funkcije imunskog sustava u obrani od tumora su: zaštita od virusa, samim time i virusom uzrokovanih tumora, eliminacija patogena, odnosno supresija (kronične) upale i eliminacija tumorskih stanica (stanična citotoksičnost aktivirana tumorskim antigenima). Iako imunski sustav ima ulogu zaštite, tumor nerijetko nalazi načine kako ga izbjeći, odnosno kako nastaviti rast i širenje. Neki od glavnih mehanizama pomoću kojih tumori nadilaze imunski sustav su sljedeći : smanjenje imunogeničnosti, izbjegavanje apoptoze, promocija angiogeneze, invazija u okolna tkiva i metastaziranje te prekomjerna ekspresija imunosupresivnih citokina i stanica [14,15].

Smanjenje imunogeničnosti se odnosi na gubitak MHC molekula, sa stanične površine odnosno nemogućnost prezentiranja antigena. Molekula HLA-1 je jedna od najčešćih MHC molekula uključena u ovaj proces. Promjene u ekspresiji HLA-I molekula mogu biti uzrokovane mutacijama i/ili promjenom regulacije. Utvrđeno je da je HLA-B44 alel jedan od najčešće zahvaćenih alela kada je u pitanju smanjena ekspresija HLA-1 molekula. Općenito, gubitak MHC molekula znači i nemogućnost prezentiranja antigena stanicama imunskog sustava, odnosno uklanjanje mogućnosti da imunski sustav napadne i uništi tumorske stanice. Takav način izbjegavanja imunskog sustava najviše će potisnuti odgovor citotoksičnih T stanica, s obzirom da su najčešće zahvaćene MHC I molekule [15, 16, 17].

Još jedan od načina izbjegavanja imunskog sustava je i izbjegavanje apoptoze. Molekula FasL, izražena na površini stanica, označava „smrtonosni“ signal (engl. *death signal*), odnosno obilježava stanicu koja treba biti podvrgnuta procesu apoptoze. Tumorske stanice nerijetko koriste fosfoinozimid 3-kinazu (engl. *phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) i protein kinaza B (još nazivana i Akt) u svoju korist i aktiviraju signale za preživljavanje stanice te samim time tumorska stanica može izbjeći proces apoptoze. Osim navedenih molekula koje aktiviraju signale za

preživljavanje, tumorske stanice često koriste i mehanizam inhibicije kaspaze 8. Kaspaza 8 je protein koji se aktivira pomoću Fas/FasL signalnog puta te pokreće niz drugih kaspaza čiji je krajnji rezultat apoptoza. Protein sličan FADDu (engl. *FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitor protein*, cFLIP) ima ulogu inhibiranja kaspaze 8 te samim time dovodi do izbjegavanje apoptoze i preživljavanja tumorskih stanica [15, 18].

Angiogeneza predstavlja razvitak krvnih žila koji započinje stvaranjem krvnih otočića koji se zatim povezuju i nastaju prve mreže kapilara. Maligni tumori također koriste proces angiogeneze kako bi lakše došli do potrebnog kisika i hranjivih tvari te kako bi se samim time lakše širili po tijelu. Jedan od glavnih čimbenika promocije angiogeneze je signalni protein, faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i njegovi pripadajući receptori. VEGF potiče rast novih krvnih žila iz postojećih vaskularnih struktura. Interakcija između VEGF signalnih molekula i VEGF receptora pokreće niz signalnih puteva unutar endotelnih stanica. Prekomjerna ekspresija VEGF molekula može upućivati na potencijalni razvoj tumorskih stanica u tijelu [19, 20].

Tumorske stanice također proizvode veću količinu određenih citokina koji djeluju suprimirajući imunosni odgovor. Mogu inhibirati efektorsku funkciju stanica imunosnog odgovora, ali također i inhibirati sazrijevanje stanica imunosnog sustava. Jedan takav primjer je i VEGF koji osim važne uloge u angiogenezi, također ima važnu ulogu u suprimiranju sazrijevanja dendritičkih stanica. Mehanizam pomoću kojeg se to odvija je supresija NF- κ B u matičnim hematopoetskim stanicama. Tumorske stanice nerijetko prekomjerno izražavaju IL-10, TGF- β i TNF. IL-10 smanjuje stvaranje IL-2 (interleukina nužnog za stvaranje i sazrijevanje T stanica) i inhibira prezentiranje antigena. TGF- β također smanjuje razinu IL-2, dok TNF u prekomjernom izražaju nanosi štetu stanici doprinoseći razvoju bolesti, odnosno kronične upale, stanične smrti te autoimunih poremećaja [15, 21].

Imunosupresivne stanice, kao što su CD4+CD25+, odnosno regulatorne T stanice, nerijetko su brojnije u tumorima gdje suprimiraju imunološki odgovor. Regulatorne T stanice koje izlučuju TGF- β u većim količinama, također su u povećanom broju uočene u epitelnim tumorima [15, 22].

Metastaze, odnosno metastatske stanice nastaju kada se primarne stanice tumora prošire u ostatak tijela, odnosno u druga tkiva. Tumorske stanice se „odvoje“ od svoje primarne nakupine te putuju krvlju ili limfom do tkiva gdje će se „priljepiti“ na zdrave stanice i metastazirati. Metastaziranje osim o vrsti i primarnom sjelju tumora, može ovisiti o okolišnim faktorima, o genetskim čimbenicima, ali i individualnom pacijentu (organizmu) u kojem se tumor razvija [11, 15].

6. ARF6 GTPAZA U PATOGENEZI MALIGNIH TUMORA

Tumori, kako bi proliferirali i širili se kroz organizam, zahtijevaju određene mehanizme koje će poduprijeti Arf GTPazni proteini, točnije Arf6 GTPaza i njezini GEFovi i GAPovi. Prekomjerni izražaj Arf6 GTPaze, kao i čimbenika aktivacije GEFova i GAPova, uočena je u mnogim tumorima, osobito u raku dojke, prostate, pluća, želudca i kolorektuma. Arf6 GTPaza sudjeluju u degradiranju staničnog kontakta, kao i izvanstaničnog matriksa, migraciji, invaziji i proliferaciji tumorskih stanica [23, 24].

6.1. Odvajanje od primarnih stanica malignog tumora uz pomoć Arf6 GTPaze

Da bi započela invazija tumorskih stanica u zdrava tkiva, odnosno metastaziranje, stanice tumora moraju se prvo odvojiti od primarne nakupine tumorskih stanica. Prekida se adhezija kadherinom E sa primarnim stanicama. Kadherin E ili kadherin 1 je glikoprotein ovisan o kalciju, čija je glavna funkcija održavanja fizičkog kontakta stanica. U ovom procesu sudjeluju Arf6 GTPaza, vezana za GTP i za GDP molekulu. Arf6 GTPaza, u svom GTP vezanom obliku promovira internalizaciju kadherina E i dinamina te samim time i prekid adhezije stanice preko E-kadherina. No, zanimljivo je istaći da je na mjestima veznih spojeva dolazi i do nakupljanja Arf GAP proteina koji također utječu na njegovu endocitozu, a što ukazuje na važnost stalnog kruženja Arf proteina između njegovog aktivnog i inaktivnog oblika kako bi nesmetano mogao obavljati svoju funkciju [25].

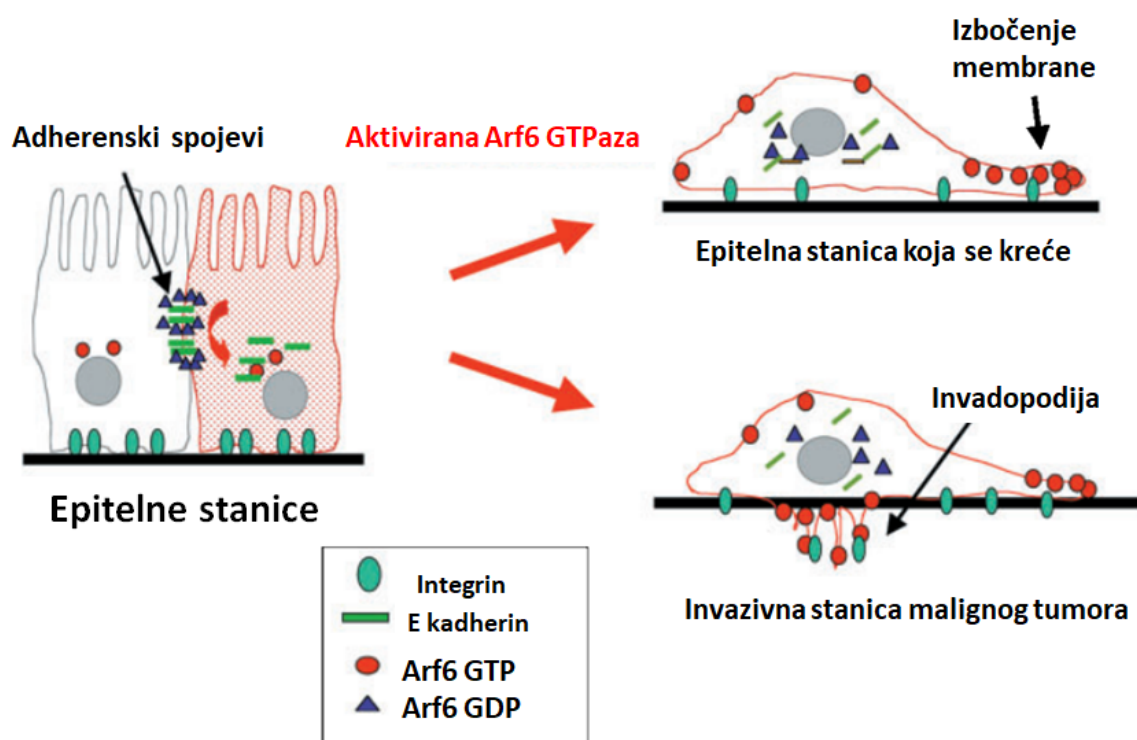
Zbog navedenih mehanizama, metastatske stanice tumora nerijetko gube normalnu ekspresiju i lokalizaciju E kadherina, ali također i često izražavaju N kadherin. U mnogim istraživanjima pokazano je da iako je stanica E kadherin pozitivna stanica, ispoljavanje N kadherina, može dovesti do nastanka invazivne stanice. Ovakva pojava najčešće je uočena u stanicama raka dojke [25, 26, 27].

6.2. Kretanje stanica malignog tumora uz pomoć Arf6 GTPaze

Za kretanje stanice, osobito je bitno remodeliranje aktina, točnije interakcija Arf6 i Rac1 GTPaza. Arf 1 i Arf6 GTPaze potiču promjene u citoskeletu stanice kako bi se ona lakše kretala, a to čine pokrećući put još jednog od GTP proteina, Ras srodnog C3 supstrata botulinumnog toksina 1 (engl. *Ras related C3 botulinum toxic substrate 1*, Rac1). Rac1 protein pokreće put stvaranja lamelipodija, membranskih struktura koje će pomoći stanici da se kreće prema naprijed. Osim navedenih proteina, ključnu ulogu u pokretanju Rac1 puta i formiranju lamelipodija, ima i protein citohezin 2 (GEF protein Arf6 GTPaze) kojeg pokreće receptor osjetljiv na kalcij (engl. *calcium sensitive receptor*, CaSR) [25, 28].

6.3. Uloga Arf6 GTPaze u formiranju invadopodija i degradiranju izvanstaničnog matriksa

Nakon odvajanja od primarne nakupine tumorskih stanica, odvojene stanice moraju degradirati izvanstanični matriks kako bi došle do zdravih stanica, odnosno tkiva. Stvaranje invadopodija je jedan od načina na koji to čine. Invadopodije su izbočine stanične membrane koje su bogate aktinom. Za njihovo formiranje je nužna Arf6 GTPaza. Arf6 GTPaza će svojom aktivnošću doprinijeti nakupljanju molekula na staničnoj membrani, a koje su potrebne za formiranje invadopodija. Neke od potrebnih molekula su: aktin vezujući proteini, adhezijske molekule i membranske proteaze. Jedan takav primjer su aktin vezujući protein kontraktin i adhezijski protein paxilin, koje će kod raka dojke Arf6 GTPaza usmjeriti prema staničnoj membrani gdje se formiraju invadopodije [25, 28, 29].



Slika 4. Kretanje i invazija tumorskih stanica. Stanice su često u međusobnom kontaktu pričvršćene adherentnim spojevima. U slučaju malignih tumora, kada dođe do prestanka ispoljavanja E kadherina na staničnoj površini, kao i ispoljavanja recikliranih integrina, stanice malignog tumora se lakše kreću te degradiraju izvanstanični matriks i samim time, invadiraju nova i zdrava tkiva. Arf6 GTPaza ima ključnu ulogu u ovim procesima, kao što je opisano u ovom tematskom poglavlju. Preuzeto i modificirano prema [27].

6.4. Uloga Arf6 GTPaze u stvaranju mikrovezikula

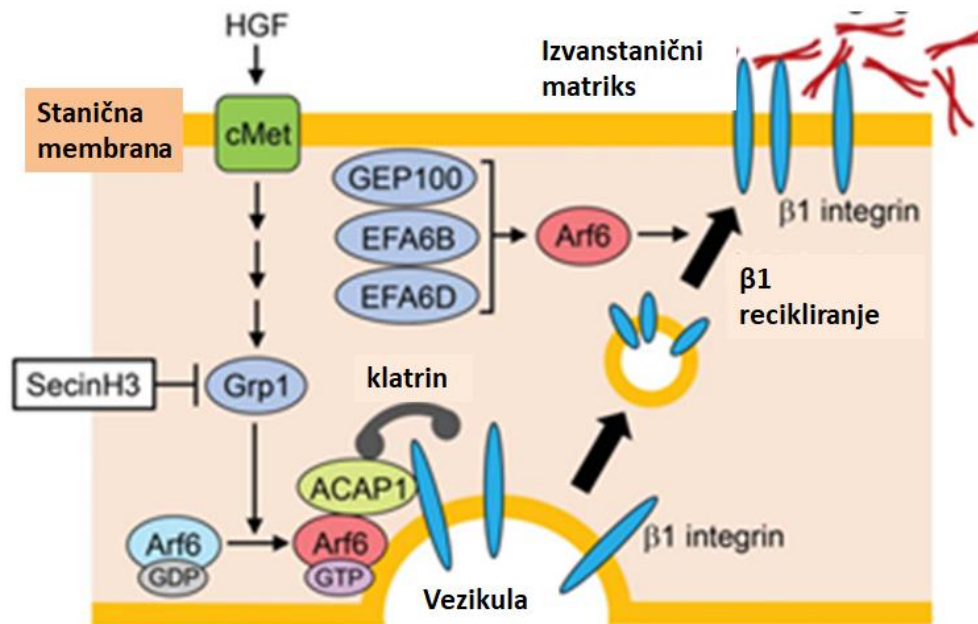
Osim invadopija koje proteolitički razgrađuju vanstanični matriks te lamelipodija koje pomažu stanici u kretanju, tumorske stanice također proizvode i mikrovezikule koje su također zaslužne za invaziju novih i zdravih tkiva te stanica. Mikrovezikule razaraju daljnje vanstanične matrikse te tako pomažu odvijanju invazije na većoj udaljenosti. Nastaju fuzijom i pupanjem stanične membrane te sadrže proteolitičke enzime kao

npr. matrične metaloproteinaze (engl. *matrixmetallo proteinase*, MMP). Arf6 GTPaza aktivira fosfolipazu D čime dolazi do nakupljanja vanstanične signalom regulirane kinaze (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) te posljedično i fosforilacije miozin kinaze i njezinog lakog lanca (engl. *myosin light chain kinase*, MLCK). Odnosno, dolazi do aktin/miozinske kontrakcije stanice pomoću koje se oslobađaju mikrovezikule s proteolitičkim enzimima. Ovaj mehanizam je uočen u mnogim tumorima, ali najveći značaj ima u melanomskom tumoru LOX (engl. *lysyl oxidase*), tumoru dojke i prostate [25, 30].

6.5. Uloga Arf6 GTPaze u recikliranju integrina beta 1 i angiogenezi

Molekula beta 1 integrina također je vrlo važna za angiogenezu. Sudjeluje u vezanju vaskularno endotelnih stanica za izvanstanični matriks, odnosno migraciji vaskularno endotelnih stanica, a samim time i angiogenezi. Arf6 GTPaza koja nakon aktivacije određenim GEF molekulama (npr. Grp1, EFA6B, i EFA6D) pokreće mehanizam recikliranja integrina beta 1, pomaže u migraciji stanica tumora i vaskularno endotelnih stanica [30]. Beta 1 integrin, kao i mnoštvo drugih integrina, pomaže stanici u adheziji, no ako je recikliran, adhezija slabi i pojačana je migracija stanice. Na taj način, beta 1 integrin pomaže stanicama koje tvore novi vaskularni endotel u migraciji, odnosno angiogenezi [25, 27, 31].

Arf6 GTPaza u svom GTP veznom obliku, nužna je za inicijaciju angiogeneze od strane faktora rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF). Dokazano je [33] da delecija proteina Arf6 iz stanica vaskularnog endotela inhibira angiogenezu induciranu HGFom, dok se angiogeneze inducirane faktorom rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i osnovnim faktorom rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) odvijaju neometano [31, 32, 33].



Slika 5. Recikliranje beta 1 integrina i promocija angigogeneze. Stimulacijom od strane HGF molekule, aktivirana Arf6 GTPaza regulira recikliranje beta 1 integrina, koji će zatim izražen i recikliran na staničnoj membrani omogućiti lakše kretanje stanica novog vaskularnog endotela. Preuzeto i modificirano prema [34].

6.6. Uloga Arf6 GTPaznog GAPa u formiranju mikrosatelita u malignim tumorima

Mikrosateliti su ponovljene sekvence DNK, najčešće sastavljene od ponavljajućih baznih parova GT/CA. Mikrosatelitna nestabilnost predstavlja predispozicije za mutacije u genomu. Jedan od najčešćih uzroka je nepravilan popravak neusklađenosti DNK (engl. *mismatch repair*, MMR). Nepravilnim popravkom, nastaju novi segmenti DNK, mikrosateliti. Jedna od najčešćih mutacija koja nastaje zbog mikrosatelitne nestabilnosti je mutacija pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift mutation*). Mikrosatelitna nestabilnost uočena je u kolorektalnom karcinomu, karcinomu želuca i limfomima [35].

U takvim tumorima, naročito kolorektalnom karcinomu, uočene su mutacije u Arf6 GAP molekuli, odnosno proteinu povezanom sa stromalnom membranom, SMAP1 (enlg. *Small Arf GAP 1*) [28]. SMAP1, djelujući na Arf6 GTPazu, sudjeluje u endocitozi, točnije CMEu, E kadherina te polimerizaciji aktina. Također, mutacijama, SMAP1 često gubi potpunu funkciju, odnosno gubi funkciju hidrolize GTP molekule koja je vezana na Arf6 GTPazni protein. Samim time, doprinosi razvoju i metastaziranju mikrosatelitno induciranih tumora [35, 36].

Tablica 1. Prikaz funkcionalne regulacije (+) i disfunkcionalne, negativne regulacije (-) nekoliko GAP molekula u primjerima malignih tumora. Izrađeno prema [28].

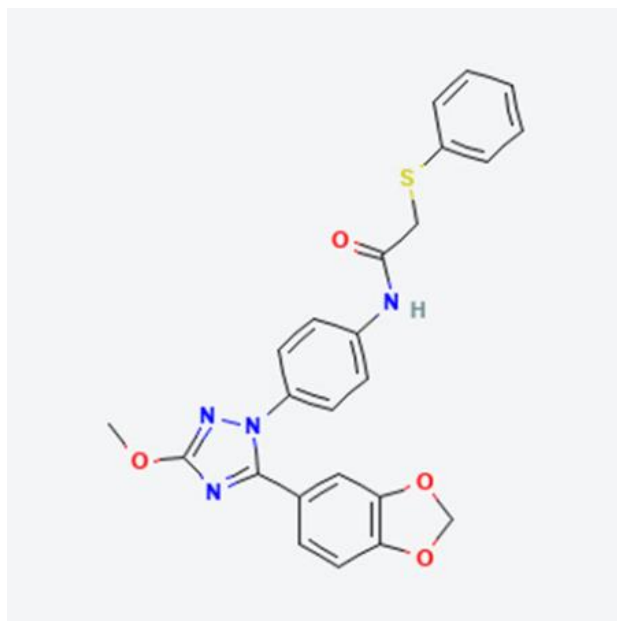
Vrsta malignog tumora	SMAP1	ASAP3	AGAP2	ASAP1
Pluća		+		
Debelo crijevo	-			
Dojke			+	+
Jetre			+	

7. LIJEČENJE

Kako Arf6 GTPaza sudjeluje u mnogim procesima koji potiču proliferiraju i invaziju tumora, u fokusu mnogih istraživanja su lijekovi i terapijski pristupi koji ciljaju upravo Arf6 GTPazu ili njene regulatorne proteine. Određeni lijekovi na Arf6 GTPazu djeluju direktno, odnosno vežući se za sam protein, dok drugi djeluju indirektno, odnosno djeluju na Arf6 GTPazu preko njezinih aktivirajućih i inaktivirajućih čimbenika, GEF i GAP proteina [37].

7.1. SecinH3

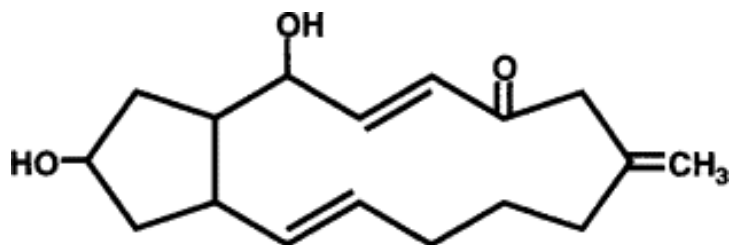
Lijek SecinH3, odnosno N-(4(5-(1,3benzodioks-5-il)-3-metoksi-1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-(feniltio)acetamid, je po svom kemijskom sastavu triazol. Triazoli su heterociklički spojevi koji imaju peteročlane prstene koji sadrže 2 atoma ugljika i 3 atoma dušika. Njihova primarna uloga je da djeluju kao selektivni antagonisti nekoliko GEF proteina, odnosno, inhibiraju učinak proteina Arf6 GTPaze do kojeg bi došlo njezinom aktivacijom od strane GEF proteina, kao što je endocitoza. Neki od tih Arf GEF proteina, a na koje djeluje SecinH3 su: citohezin1, citohezin2 i citohezin3. Maligni tumori u kojima je ovaj lijek pokazao značajan eksperimentalni učinak su maligni tumor debelog crijeva i maligni tumor dojke [38].



Slika 6. Struktura lijeka SecinH3. Preuzeto s [38].

7.2. Brefeldin A

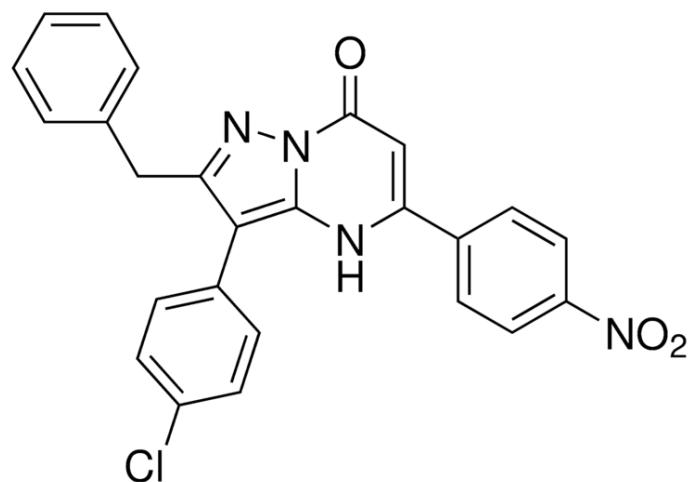
Brefeldin A je antivirusni lijek dobiven iz *Penicillium brefeldianum*, odnosno specifične vrste gljive. Glavna meta ovog lijeka je jedan od GEFova, odnosno Golgi-specifičan brefeldin A-rezistentni faktor izmjene guanin nukleotida 1 (engl. *Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1*, GBF1). Navedeni GEF je specifičan za Arf1 GTPazu, ali s obzirom da Arf6 GTPaza i Arf1 GTPaza sudjeluju u nekoliko istih procesa, njegovom inhibicijom neizravno se djeluje i na Arf6 GTPazu. Lijek se najčešće koristi u liječenju leukemije i malignog tumora prostate [39, 40].



Slika 7. Struktura lijeka Brefeldin A. Preuzeto s [41].

7.3. NAV 2729

Lijek NAV 2729 je dvojni inhibitor aktivacije, inhibira aktivaciju Arf1 i Arf6 GTPaze. Navedeni lijek blokira određene GEF proteine Arf6 GTPaze, kao što su ARNO, BRAG2/GEP100. Koristi se u liječenju melanomu oka (engl. *uveal melanoma*) te time onemogućuje rast tumorske stanice. Također, iako i dalje u fazi istraživanja, ovaj lijek značajne učinke pokazuje u smanjenju proliferacije i invazije tumorskih stanica malignog tumora dojke, debelog crijeva i glioma, vrste tumora na mozgu [42, 43].



Slika 8. Stuktura lijeka NAV 2729. Preuzeto s [43].

8. ZAKLJUČAK

Arf6 GTPaza pripada Arf podobitelji skupine proteina Ras. U stanici se može nalaziti u dva stanja, GTP i GDP veznom stanju. Smatra se da GTP vezno stanje predstavlja aktivirani oblik Arf6 GTPaze, dok GDP vezno stanje predstavlja inaktivirani oblik Arf6 GTPaze. Kako bi se Arf6 GTPaza našla u GTP veznom obliku, stupa u interakciju s GEF proteinima koji će GDP molekulu zamijeniti GTP molekulom. Kako bi se Arf6 GTPaza inaktivirala, stupa u interakciju s GAP proteinima zajedno s GAP argininskim prstenom [1, 2, 4]. Općenito, Arf6 GTPaza sudjeluje u mnogih staničnim procesima zdrave stanice, kao što su: lipidna modifikacija, klatrin posredovana endocitoza, klatrin neovisna endocitoza, endosomalno recikliranje, polimerizacija aktina, autofagija, signalizacija putem TLRa te prezentacija antigena [6, 7, 8, 10]. Nužna je normalnu funkciju, preživljavanje i rast zdravih stanica, ali disfunkcijom i/ili mutacijama u genu koji kodiraju Arf6 GTPazu može doći do njene poremećene aktivnosti, odnosno do raznih patoloških stanja, kao što su maligni tumori, odnosno proliferacija i metastaziranje stanica malignih tumora [25]. Načini na koje Arf6 GTPaza sudjeluje u promociji rasta i kretanja malignih stanica tumora su: narušavanje normalnog izražaja i lokalizacije E kadherina, kao i izražaja nekih drugih kadherina, poput N kadherina, promjene u citoskeletu, formiranje invadopodija, formiranje i otpuštanje mikrovezikula, recikliranje integrina, točnije beta 1 integrina te poticanje angiogeneze. Svi navedeni procesi olakšavaju lakše odvajanje primarnih tumorskih stanica, njihovu migraciju, invadiranje u zdrava tkiva te lakše i brže metastaziranje [26, 27, 28, 29, 30].

Do sada je pronađeno nekoliko lijekova koji mogu utjecati na aktivnost Arf6 GTPaze, odnosno na GEF i GAP proteine, a to su: SecinH3, Brefeldin A i NAV 2729 [38, 39, 42]. Postoje još brojna istraživanja kojima se pokušavaju utvrditi točni mehanizmi još nekoliko lijekova koji će na direktan ili indirektan način utjecati na aktivnost i rad Arf6 GTPaze, a primjer toga su tetraciklini. Uočeno je da su tetraciklini nekompetitivni

inhibitori Arf6 GTPaze, odnosno vezujući se na sam protein, utječu na njegovu konformaciju i time smanjuju aktivnost samo proteina, odnosno GTPaze. Točan mehanizam ove interakcije još uvijek je u procesu istraživanja [44].

Zaključno, možemo reći da s obzirom na brojnost staničnih procesa u koje je uključena u zdravim, ali i u patološki promijenjenim stanicama, Arf6 GTPaza, kao i njezini regulatorni proteini predstavljaju veliki potencijal razvoja novih pristupa liječenja malignih tumora, ali i drugih bolesti.

LITERATURA

- [1] Nawrotek A, Zeghouf M, Cherfils J. Allosteric regulation of Arf GTPases and their GEFs at the membrane interface. *Small GTPases*. 2016 Aug 10;7(4):283–96.
- [2] Sztul E, Chen PW, Casanova JE, Cherfils J, Dacks JB, Lambright DG, et al. ARF GTPases and their GEFs and GAPs: concepts and challenges. Bement W, editor. *Molecular Biology of the Cell*. 2019 May 15;30(11):1249–71.
- [3] Arrazola Sastre A, Luque Montoro M, Lacerda HM, Llaveró F, Zugaza JL. Small GTPases of the Rab and Arf Families: Key Regulators of Intracellular Trafficking in Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Apr 23;22(9):4425.
- [4] ARF6 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. www.proteinatlas.org. [cited 2024 Jun 16]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165527-ARF6>
- [5] Van Acker T, Tavernier J, Peelman F. The Small GTPase Arf6: An Overview of Its Mechanisms of Action and of Its Role in Host–Pathogen Interactions and Innate Immunity. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019 May 5;20(9):2209.
- [6] Hongu T, Kanaho Y. Activation machinery of the small GTPase Arf6. *Advances in Biological Regulation*. 2014 Jan;54:59–66.
- [7] Donaldson JG. Multiple Roles for Arf6: Sorting, Structuring, and Signaling at the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Oct 1;278(43):41573–6.
- [8] Das S, Malaby AW, Agata Nawrotek, Zhang W, Mahel Zeghouf, Maslen SL, et al. Structural Organization and Dynamics of Homodimeric Cytohesin Family Arf GTPase Exchange Factors in Solution and on Membranes. 2019 Dec 1;27(12):1782-1797.e7.

- [9] Moreau K, Ravikumar B, Puri C, Rubinsztein DC. Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *Journal of Cell Biology*. 2012 Feb 20;196(4):483–96.
- [10] Sugita M, Grant EP, van Donselaar E, Hsu VW, Rogers RA, Peters PJ, et al. Separate Pathways for Antigen Presentation by CD1 Molecules. *Immunity*. 1999 Dec;11(6):743–52.
- [11] Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai, Baker DL, Baker A. *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. 2016.
- [12] Cleveland Clinic. Malignant Neoplasm: What It Is, Types & Factors [Internet]. Cleveland Clinic. 2022.
- [13] Tumor Antigens - Hematology and Oncology [Internet]. MSD Manual Professional Edition.
- [14] Jakóbiśiak M, Lasek W, Gołęb J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Letters* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2022 Mar 2];90(2):103-22
- [15] Ahmad M, Rees RobertC, Ali SelmanA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2004 Jun 10;53(10).
- [16] Cabrera T, López-Nevot M, Gaforio J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer immunology, immunotherapy/Cancer immunology and immunotherapy*. 2003 Jan 1;52(1):1–9.
- [17] Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Molecular Medicine Today*. 1999 Apr;5(4):178–86.

- [18] Chen YL, Chen SH, Wang JY, Yang BC. Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2024 Jun 16];171(3):1183–91.
- [19] Vimalraj S. A concise review of VEGF, PDGF, FGF, Notch, angiopoietin, and HGF signalling in tumor angiogenesis with a focus on alternative approaches and future directions. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. 2022 Nov 30 [cited 2022 Oct 26];221:1428–38.
- [20] angiogeneza - Medicinski leksikon [Internet]. medicinski.lzmk.hr.
- [21] Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a Mediator of Tumor-Associated Immunodeficiency. *Immunologic Research*. 2001;23(2-3):263–72.
- [22] Pardoll D. T cells and tumours. *Nature*. 2001 Jun 28;411(6841):1010–2.
- [23] Li R, Peng C, Zhang X, Wu Y, Pan S, Xiao Y. Roles of Arf6 in cancer cell invasion, metastasis and proliferation. *Life Sciences*. 2017 Aug;182:80–4.
- [24] Casalou C, Faustino A, Barral DC. Arf proteins in cancer cell migration. *Small GTPases* [Internet]. 2016 Sep 2 [cited 2021 Mar 21];7(4):270–82.
- [25] Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y. Pathological functions of the small GTPase Arf6 in cancer progression: Tumor angiogenesis and metastasis. *Small GTPases*. 2016 Feb 24;7(2):47-53.
- [26] Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-Cadherin Expression. *The Journal of Cell Biology*. 1999 Nov 1;147(3):631–44.

- [27] Sabe H. Requirement for Arf6 in Cell Adhesion, Migration, and Cancer Cell Invasion. *Journal of Biochemistry*. 2003 Oct 1;134(4):485–9.
- [28] Casalou C, Faustino A, Barral DC. Arf proteins in cancer cell migration. *Small GTPases* [Internet]. 2016 Sep 2;7(4):270–82.
- [29] Kondo A, Hashimoto S, Yano H, Nagayama K, Mazaki Y, Sabe H. A New Paxillin-binding Protein, PAG3/Papa/KIAA0400, Bearing an ADP-Ribosylation Factor GTPase-activating Protein Activity, Is Involved in Paxillin Recruitment to Focal Adhesions and Cell Migration. Hynes R, editor. *Molecular Biology of the Cell*. 2000 Apr;11(4):1315–27.
- [30] Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*. 2009 Dec;19(22):1875–85.
- [31] Tsunaki Hongu, Funakoshi Y, Fukuhara S, Suzuki T, Susumu Sakimoto, Nobuyuki Takakura, et al. Arf6 regulates tumour angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial β 1 integrin recycling. *Nature communications*. 2015 Aug 4;6(1).
- [32] Tsunaki Hongu, Funakoshi Y, Fukuhara S, Suzuki T, Susumu Sakimoto, Nobuyuki Takakura, et al. Arf6 regulates tumour angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial β 1 integrin recycling. *Nature communications*. 2015 Aug 4;6(1).
- [33] Ikeda S, Masuko Ushio-Fukai, Zuo L, Tojo T, Sergey Dikalov, Patrushev NA, et al. Novel Role of ARF6 in Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Signaling and Angiogenesis. *Circulation Research*. 2005 Mar 4;96(4):467–75.
- [34] Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y. Pathological functions of the small GTPase Arf6 in cancer progression: Tumor angiogenesis and metastasis. *Small GTPases*. 2016 Feb 24;7(2):47–53.

- [35] Fatiha Sangar, Schreurs As, Umaña-Diaz C, Clapéron A, Christèle Desbois-Mouthon, Calmel C, et al. Involvement of small ArfGAP1 (SMAP1), a novel Arf6-specific GTPase-activating protein, in microsatellite instability oncogenesis. *Oncogene*. 2013 Jun 10;33(21):2758–67.
- [36] Zaanan A, Meunier K, Sangar F, Fléjou JF, Praz F. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cellular Oncology*. 2011 Apr 12;34(3):155–76.
- [37] Dani N, Jorge Moura Barbosa A, Del Rio A, Di Girolamo M. ADP-Ribosylated Proteins as Old and New Drug Targets for Anticancer Therapy: The Example of ARF6. *Current Pharmaceutical Design [Internet]*. 2013 Feb 1;19(4):624–33.
- [38] PubChem. SecinH3 [Internet]. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. [cited 2024 Jun 16].
- [39] Brefeldin A [Internet]. InvivoGen. 2019.
- [40] Rana KL, Kour D, Kaur T, Devi R, Negi C, Yadav AN, et al. Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications. *Microbial Endophytes*. 2020;273–305.
- [41] Akira Takatsuki. Golgi-acting drugs: inducers and inhibitors of Golgi dispersal as probes to analyze Golgi membrane dynamics. *Progress in biotechnology*. 2002 Jan 1;35–44.
- [42] Rosenberg EM, Jian X, Olivier Soubias, Yoon HY, Yadav MP, Hammoudeh S, et al. The small molecule inhibitor NAV-2729 has a complex target profile including multiple ADP-ribosylation factor regulatory proteins. *Journal of biological chemistry/The Journal of biological chemistry*. 2023 Mar 1;299(3):102992–2.
- [43] Merck. NMR Chemical Shifts of Impurities Charts. Merck [Internet]. 2024;1(1).

[44] Macia E, Vazquez-Rojas M, Robiolo A, Fayad R, Abélanet S, Mus-Veteau I, et al. Chlortetracycline, a Novel Arf Inhibitor That Decreases the Arf6-Dependent Invasive Properties of Breast Cancer Cells. *Molecules* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2021 Feb 12 [cited 2023 Aug 15];26(4):969.

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime : Valentina Antunović

Adresa : M.A.Reljkovića 12, Ivankovo 32281, Hrvatska

Telefon : +385 99 753 3925

E-pošta: valentinaantunovic@gmail.com,
valentina.antunovic@student.uniri.hr

Državljanstvo : hrvatsko

Datum rođenja : 30.11.2002.

Radno i praktično iskustvo

Period: listopad – prosinac 2022.

Mjesto: Rijeka

Ustanova zaposlenja: Commodatio d.o.o

Naziv radnog mjesta: promotor

Funkcija: promocija novih farmaceutskih proizvoda

Period: rujan 2023.

Mjesto: Vinkovci

Ustanova obavljanja stručne prakse : Laboratorij za pretrage molekularne biologije, Opća županijska bolnica Vinkovci

Naziv radnog mjesta: praktikant

Funkcija: sudjelovanje u obradi uzoraka, praćenje RT-PCR postupka, obrada podataka

Obrazovanje

Period: 2021. – danas

Mjesto: Rijeka

Ustanova: Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Sveučilište u Rijeci

Period: 2017.-2021.

Mjesto: Vinkovci

Ustanova: Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci

Period: 2009.-2017.

Mjesto: Ivankovo

Ustanova: OŠ „August Cesarec“ Ivankovo

Osobne vještine i kompeticije

Materinji jezik: hrvatski

Strani jezik: engleski (vrlo dobro) i njemački jezik (osnovno)

Poznavanje i mogućnost rada u Office 365 paketu

Vozačka dozvola: B kategorija

Volontiranje: Udruga studenata na fakultetu (USBRI)

Dodatno: Vrlo sam komunikativna, pristupačna osoba i kreativna osoba. Sposobna za rad u grupi, ali također i samostalan rad. Spremna na izazove i brzo prilagodnu na nova i nepoznata okruženja.