

# Karakterizacija adhesoma u stanicama trostrukog negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon stabilnog utišavanja gena za integrin alfav

---

Vitković, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:784433>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Zrinka Vitković

**KARAKTERIZACIJA ADHESOMA U  
STANICAMA TROSTRUKO NEGATIVNOG  
KARCINOMA DOJKE MDA-MB-231 NAKON  
STABILNOG UTIŠAVANJA GENA ZA  
INTEGRIN  $\alpha v$**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2018.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Mladena Paradžika. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Marko Močibob.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta HRZZ-a pod nazivom „Molekularni mehanizmi povećanja osjetljivosti na protutumorske lijekove stanica karcinoma dojke i melanoma čovjeka utišavanjem integrina“ (IP-11-2013-2465).



## **Zahvale**

*Veliko hvala svima iz Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, a posebice dr. sc. Andreji Ambriović Ristov i dr. sc. Mladenu Paradžiku - naučili ste me puno toga i uvijek će pamtitи vrijeme koje sam provela radeći s vama.*

*Veliko hvala i doc. dr. sc. Marku Močibobu na susretljivosti i pomoći pri pisanju rada.*

*Mojim roditeljima, Željki i Andđelku, najveće hvala na svoj potpori za cijelo vrijeme studiranja, a posebice za vrijeme nastanka ovog rada.*

*Mojoj sestri i cimerici Petri ogromno hvala na strpljenju, slušanju mojih monologa, filmskim večerima, sestrospojevima™ i nevjerljivoj sposobnosti da donese čips svaki put kada sam zapela.*

*Mojoj dragoj prijateljici Ini ogromno hvala na kavama, smijehu, bezuvjetnoj potpori i pomoći i nizu drugih stvari koje bi vjerojatno bilo apsolutno neprimjereni spomenuti ovdje.*

*To my ziom and future flatmate Agata - a big dzikeuje for putting up with my virtual meltdowns and being a great ziom for the past (gulp) seven years.*

## Sadržaj

<b>SAŽETAK .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Trostruko negativni karcinom dojke.....	1
1.2. Integrini i fokalne adhezije.....	1
1.3. Cilj rada.....	2
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
2.1. Tumori.....	3
2.1.1. Tumori dojke.....	4
2.1.2. Trostruko negativni karcinomi dojke .....	5
2.1.3. Terapija trostruko negativnog karcinoma dojke .....	5
2.1.4. Stanična linija MDA-MB-231 kao model u istraživanju trostruko negativnog karcinoma dojke..	9
2.2. Integrini.....	10
2.2.1. Građa integrina .....	10
2.2.2. Integrini av i njihova uloga u razvoju tumora .....	11
2.2.3. Fokalne adhezije.....	13
<b>§ 3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>15</b>
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Osnovne kemikalije.....	15
3.1.2. Stanična linija.....	17
3.1.3. Protutijela.....	18
3.1.4. Priprema otopina .....	19
3.1.5. Uređaji i ostali materijali.....	20
3.2. Metode .....	20
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi .....	20
3.2.2. Rasađivanje stanica.....	21
3.2.3. Smrzavanje stanica.....	21
3.2.4. Odmrzavanje stanica .....	21
3.2.5. Provjera identiteta plazmida restriktivskom analizom.....	22
3.2.7. Određivanje preživljjenja stanica MTT testom .....	23
3.2.8. Određivanje ekspresije proteina na površini stanica pomoću protočne citometrije.....	24
3.2.9. Izdvajanje fokalnih adhezija.....	24

3.2.10. SDS-PAGE i western blot.....	26
3.2.11. Spektrometrija masa.....	28
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
4.1. Izdvajanje klonova stanica MDA-MB-231 stabilno transficiranih plazmidima pSUPER.puro i pSUPER.puro αv.....	29
4.2. Stabilno utišavanje podjedinice integrina αv dovodi do smanjene osjetljivosti stanica na protutumorkse lijekove paklitaksel i cisplatinu .....	35
4.3. Promjena sastava adhesoma u stanicama MDA-MB-231 nakon stabilnog utišavanja podjedinice integrina αv .....	40
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>51</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>52</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>54</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
8.1. Spektrometrija masa.....	xv
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXXIV</b>





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### KARAKTERIZACIJA ADHESOMA U STANICAMA TROSTRUKO NEGATIVNOG KARCINOMA DOJKE MDA-MB-231 NAKON STABILNOG UTIŠAVANJA GENA ZA INTEGRIN $\alpha v$

Zrinka Vitković

Adhesom integrina je skup proteina koje čine kompleksi adhezije integrina neke stanice. Ovi kompleksi se nazivaju i fokalne adhezije, a nastaju kada se integrini, transmembranski receptori sastavljeni od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice, vežu na izvanstanični matriks, što dovodi do nakupljanja proteina vezanjem na njihovu citoplazmatsku domenu. Cilj je ovog rada bio metodom spektrometrije masa istražiti adhesom stanica trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 i usporediti ga s adhesomom stanica klona 231sh $\alpha v$  u kojima je, pomoću shRNA specifične za podjedinicu integrina  $\alpha v$ , postignuto stabilno utišavanje te podjedinice. Nakon izolacije proteina fokalnih adhezija, spektrometrijom masa identificirano je 426 proteina, a bioinformatičkom analizom utvrđeno je da je njih 107 povezano s fokalnim adhezijama, a 95 s izvanstaničnim matriksom. Smanjena količina nekih od identificiranih proteina potvrđena je metodom western blot. U ovome radu definiran je adhesom stanica MDA-MB-231 ovisan o integrinu  $\alpha v$  i doprinjet će otkrivanju mehanizma promjene osjetljivosti ovih stanica na protutumorske lijekove, cisplatinu i paklitakselu, kao i promjene u sposobnosti migracije i invazije ovih stanica nakon utišavanja integrina  $\alpha v$ .

(58 stranica, 14 slika, 10 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: fokalne adhezije, adhesom, integrin  $\alpha v$ , stanice trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231

Mentor: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica

Neposredni voditelj: dr. sc. Mladen Paradžik, viši asistent

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob, PMF, Zagreb.
2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki, PMF, Zagreb
3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, PMF Zagreb

Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić, PMF, Zagreb

Datum diplomskog ispita: 29. 10. 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### ADHESOME CHARACTERISATION IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CARCINOMA CELL LINE MDA-MB-231 UPON STABLE SILENCING OF INTEGRIN SUBUNIT $\alpha v$

Zrinka Vitković

The integrin adhesome is a collection of proteins composed of integrin adhesion complexes in a given cell. These complexes are also known as focal adhesions which are formed when integrins, transmembrane receptors comprising an  $\alpha$  and  $\beta$  subunit, bind the extracellular matrix and lead to accumulation of multimolecular complex of proteins through binding to the cytoplasmic domains of integrins. The aim of this project was to explore by mass spectrometry, the adhesome of triple negative breast cancer cells MDA-MB-231 and compare it to the adhesome of 231sh $\alpha v$  cells in which the  $\alpha v$  integrin subunit has been silenced by the use of  $\alpha v$  specific shRNA. After focal adhesion isolation, 426 proteins were identified using mass spectrometry, 107 of which were found to be related to focal adhesions, while 95 of them were found to be related to the extracellular matrix. Western blots were used to validate the expression of some of the identified proteins. This project has identified the adhesome of MDA-MB-231 cells and will contribute to research of the mechanism by which the sensitivity of these cells to cisplatin and paclitaxel is modulated, as well as their ability to modulate migration and invasion upon  $\alpha v$  integrin knockdown.

(58 pages, 14 figures, 10 tables, 85 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: focal adhesions, adhesome, integrin  $\alpha v$ , triple negative breast cancer cells MDA-MB-231

Mentor: Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Scientist

Assistant mentor: Mladen Paradžik, PhD

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
  2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
  3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
- Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: 29 October 2018



## § 1. UVOD

### 1.1. Trostruko negativni karcinom dojke

Tumori su nakupine stanica koje se nekontrolirano dijele i ne obavljaju svoju normalnu ulogu u tkivu. Tumori dojke mogu nastati iz svih tkiva dojke.<sup>[1]</sup> Iza karcinoma pluća, karcinom dojke najčešći je uzrok smrti žena.<sup>[2]</sup> Karcinomi dojke su izuzetno heterogena skupina tumora. Istraživanjima je identificirano pet intrinzičnih podtipova karcinoma dojke: luminalni tip A, luminalni tip B, HER2-pozitivni, bazalni i normalni.<sup>[3,4]</sup> Trostruko negativni karcinom dojke (engl. *triple negative breast cancer*, TNBC) predstavlja heterogenu skupinu karcinoma dojke, no većina TNBC spada u skupinu bazalnih karcinoma – procjenjuje se da je oko 80% svih trostruko negativnih karcinoma dojke upravo ovog podtipa.<sup>[3]</sup> Od svih dijagnosticiranih karcinoma dojke, u 15-20% slučajeva radi se o trostruko negativnom karcinomu dojke.<sup>[5]</sup> Trostruko negativni karcinom dojke naziva se tako jer stanice ovog karcinoma ne eksprimiraju receptor za estrogen, progesteron ni receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2), što otežava liječenje bolesnika s ovim tumorom i to zbog nemogućnosti primjene ciljane terapije kao što je ona koja cilja hormonske receptore i ona koja cilja HER2. Ipak, u TNBC je primijećena povećana osjetljivost na lijekove koji sadrže platinu.<sup>[6]</sup>

Iako TNBC dobro odgovara na standardne protutumorske lijekove (soli platine, taksani, antraciklini), nakon završetka kemoterapije je kod osoba oboljelih od TNBC veći rizik od povratka bolesti u prvih pet godina nego kod pacijenata oboljelih od drugih tipova karcinoma dojke.<sup>[7]</sup> Budući da je izbor lijekova kojima se TNBC može liječiti ograničen, a rizik od povratka bolesti u ovih pacijenata veći, potrebno je razumjeti mehanizam nastanka i širenja ovog karcinoma kako bi se poboljšala terapija i stopa preživljjenja oboljelih osoba.

Danas se u istraživanju trostruko negativnih karcinoma dojke koristi 27 staničnih linija, a među njima jedna od najpoznatijih i najčešće korištenih je stanična linija MDA-MB-231.<sup>[8]</sup>

### 1.2. Integrini i fokalne adhezije

Integrini su heterodimerni transmembranski receptori koji se sastoje od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. Integrini se vežu za ligande izvanstaničnog matriksa čime se potiče niz unutarstaničnih signala

koji reguliraju niz staničnih funkcija, uključujući migraciju, preživljenje, proliferaciju i diferencijaciju.<sup>[9]</sup> Za zarastanje tkiva uslijed nastanka rane, angiogenezu, migraciju i proliferaciju tumora osobito su važni integrini  $\alpha v$ .<sup>[10,11]</sup> Podjedinica integrina  $\alpha v$  može vezati pet različitih  $\beta$  podjedinica:  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  i  $\beta 8$ .

Vezanjem integrina na ligande izvanstaničnog matriksa dolazi do nakupljanja proteina s unutrašnje strane stanične membrane te stvaranja dinamičkog makromolekulskog kompleksa koji se naziva fokalna adhezija ili kompleks adhezije integrina. Ti kompleksi imaju više uloga u stanici; oni čine strukturne veze između aktinskog citoskeleta i izvanstaničnog matriksa i služe kao mjesta prijenosa signala od proteina izvanstaničnog matriksa do unutarstaničnih signalnih puteva.

Proteini fokalnih adhezija dijele se u nekoliko skupina: adaptorni proteini (npr. talin, paksilin), proteini koji reguliraju aktin (npr.  $\alpha$ -aktinin), šaperoni (npr. Hsp70), GTP-aze (npr. Rac1, RhoA), fosfataze (npr. protein tirozin-fosfataza nereceptorskog tipa), kinaze (npr. kinaza fokalne adhezije (engl. *Focal Adhesion Kinase*, FAK), kanali (npr. *solute carrier* obitelj kanala) te adhezijski receptori.<sup>[12]</sup>

Broj proteina u kompleksu ovisi o tipu integrina i izvanstaničnog matriksa koji sudjeluju u stvaranju fokalne adhezije.<sup>[13]</sup>

### 1.3. Cilj rada

Cilj ovoga rada je utvrditi sastav adhesoma stanica trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 i usporediti ga sa adhesomom klena stanica dobivenog stabilnim utišavanjem gena za podjedinicu integrina  $\alpha v$ . Ovi rezultati trebali bi pomoći u razumijevanju mehanizma nedavno objavljene povećane osjetljivosti stanica MDA-MB-231 na protutumorske lijekove, cisplatinu i paklitaksel, nakon prolaznog utišavanja integrina  $\alpha v$ .<sup>[14]</sup>

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Tumori

Tumori su nakupine stanica koje se nekontrolirano dijele. Kada neka stanica, odnosno skupina stanica, prestane odgovarati na signale iz svojega okoliša i one više ne obavljaju svoju ulogu, smatra se da je nastao tumor.

Svi tumori dijele šest stečenih obilježja (engl. *hallmarks of cancer*): nekontrolirana proliferacija, izbjegavanje supresora rasta, izbjegavanje apoptoze, neograničeni replikacijski potencijal, mogućnost promicanja angiogeneze i sposobnost invazije i metastaziranja. Za navedena obilježja obično se smatra da proizlaze iz nestabilnosti genoma. To pak potiče genetsku raznolikost, a iz toga proizlazi brže stjecanje ostalih obilježja tumora, ali i upala koja također potiče razvoj tumora.

Osim navedenih šest obilježja tumora, novijim istraživanjima utvrđena su i dva dodatna obilježja tumora: sposobnost izbjegavanja uništenja od strane imunološkog sustava te reprogramiranje metabolizma. No, kompleksnost tumora ne proizlazi samo iz svega dosada spomenutog, već i iz činjenice da tumori sadrže i normalne stanice koje doprinose stjecanju tumorskih obilježja tako što pomažu stvoriti tumorski mikrookoliš.<sup>[15]</sup>

Proces nastajanja tumora započinje nakupljanjem mutacija unutar stanica. Dvije su skupine gena čije su mutacije bitne za tumorigenezu: onkogeni i tumor-supresorski geni. Onkogeni su mutirani geni čiji proteinski produkti imaju ulogu u inicijaciji tumora. Tumor-supresorski geni su geni čiji proteinski produkti pridonose regulaciji staničnog ciklusa, neki od njih su, primjerice, kontrolne točke staničnog ciklusa. Kod mutacija tumor-supresorskih gena dolazi do gubitka njihove funkcije, čime se sprječava regulacija staničnog ciklusa, a time i omogućava nekontrolirana proliferacija staničnog ciklusa.<sup>[16]</sup>

Ovisno o tome pokazuje li tumor sposobnost metastaziranja, tumori se dijele na dobroćudne i zloćudne. Dobroćudni tumori ne metastaziraju i ostaju na mjestu na kojem su nastali, dok, suprotno tome, zloćudni metastaziraju. Procesom metastaziranja nastaju sekundarni tumori drugdje u tijelu. Prema vrsti tkiva od kojega su nastali, tumori se dijele u četiri skupine: karcinomi (nastali od stanica epitela), sarkomi (nastali od mezenhimskih

stanica), limfomi (pretežno smješteni u limfnim čvorovima) i leukemije (koje se uglavnom nalaze u koštanoj srži i krvi).

### 2.1.1. Tumori dojke

Pet je elemenata koji čine tkivo dojke. Ono se sastoji od lobula, duktusa, vezivnog tkiva, limfnih čvorova i krvnih žila. Karcinomi dojke dijele se histološki na karcinome *in situ* i invazivne karcinome, ovisno o tome ostaje li karcinom na mjestu na kojem je nastao ili se širi dalje u tijelu.<sup>[17]</sup> *In situ* karcinom se ponekad smatra i „pred-invazivnim“ jer nastaje i raste u postojećim lobulima i duktusima dojke. Ako dođe do širenja *in situ* karcinoma izvan normalnih lobula i duktusa dojke u vezivno tkivo dojke, karcinom se smatra invazivnim. Invazivni karcinomi se mogu proširiti dalje po tijelu, primjerice u limfne čvorove ili druge organe, u obliku metastaza.<sup>[17]</sup>

Među tumorima dojke najčešći je invazivni duktalni karcinom. Procjenjuje se da oko 80% karcinoma dojke pripada ovom tipu. Drugi najčešći karcinom dojke je invazivni lobularni karcinom i smatra se da ovom tipu pripada 10-15% slučajeva karcinoma dojke.<sup>[17]</sup>

Prema tome eksprimiraju li određene receptore: receptor estrogena (ER), receptor progesterona (PR) i receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta (HER2) tumori dojke i eventualne metastaze se mogu dodatno svrstati u jedan od pet molekularnih podtipova karcinoma dojke. Ti podtipovi su luminalni A, luminalni B, HER2-pozitivni, normalni i bazalni. Svaki podtip karcinoma dojke odlikuje se karakterističnim obrascem ekspresije određenih gena i promjenama DNA. Identificiranje molekulskih karakteristika karcinoma dojke uz njegove patohistološke karakteristike omogućava bolji pristup liječenju oboljelih osoba jer se tako može lakše odabrati prikladna terapija.<sup>[4]</sup>

Općenito, karcinomi koji eksprimiraju receptor estrogena imaju dobru prognozu jer se mogu liječiti lijekovima koji blokiraju učinke estrogena (npr. tamoksifen), budući da navedeni karcinomi ovise o estrogenu za rast. Karcinomi pozitivni na HER2 smatraju se agresivnijima od ostalih tipova, no uvođenjem monoklonskih protutijela poput trastuzumaba i pertuzumaba u terapiju ovih pacijenata, njihova prognoza značajno je poboljšana. Karcinomi koji ne eksprimiraju nijedan od navedenih receptora (ER, PR, HER2) nazivaju se trostruko negativnima.<sup>[18]</sup>

### 2.1.2. Trostruko negativni karcinomi dojke

Kao što je već spomenuto, trostruko negativni karcinomi dojke karakterizirani su odsustvom receptora za estrogen, progesteron i HER2. Liječenje TNBC je zahtjevnije budući da osobe oboljele od TNBC ne odgovaraju na hormonsku terapiju (npr. tamoksifen), kao ni na terapije koje ciljaju HER2. Radi se o veoma agresivnom tipu karcinoma i prognoze kod ovih oboljelih često su loše, čemu pridonosi i ograničenost broja učinkovitih lijekova. TNBC čini 15-20% svih dijagnoza karcinoma dojke i najčešće pogađa žene mlađe od 40 godina, pogotovo afroameričkog i latinoameričkog podrijetla.<sup>[5]</sup>

TNBC je heterogena bolest na svim razinama - kliničkoj, histološkoj i molekularnoj. Bitne molekularne karakteristike TNBC uključuju inaktivaciju signalnog puta BRCA (engl. *breast cancer*) i učestale mutacije poznatog tumor-supresorskog proteina p53. Među karcinomima dojke, smatra se da je kod TNBC najveći rizik od metastaziranja.<sup>[6]</sup>

### 2.1.3. Terapija trostruko negativnog karcinoma dojke

Trostruko negativni karcinomi dojke pokazuju osjetljivost na lijekove koji se uobičajeno koriste u terapiji već desetljećima - soli platine (karboplatina i cisplatina), taksane (npr. paklitaksel, docetaksel) i antracicline (npr. dokosorubicin, epirubicin). Unatoč tome što TNBC dobro odgovaraju na protutumorske lijekove, rizik od povratka karcinoma u prvih tri do pet godina nakon oboljenja je za oboljele od TNBC veći nego za osobe oboljele od hormonalno pozitivnog karcinoma dojke.<sup>[7]</sup> Ovo pokazuje koliko je bitno pronaći terapiju koja će spriječiti ili umanjiti stopu metastaziranja karcinoma te povećati stopu preživljjenja.

Kao i kod drugih tumora dojke tako se i u terapiji TNBC uz kirurško odstranjivanje tumora koristi i terapija protutumorskim lijekovima. Terapija protutumorskim lijekovima je ključan korak u svim fazama bolesti; ona se daje oboljelima prije operativnog zahvata kako bi se smanjio tumor, čime se smanjuje i opseg operativnog zahvata. Poslije operativnog zahvata je također bitno da oboljeli primi terapiju protutumorskim lijekovima budući da se operativnim zahvatom ne mogu uvijek odstraniti sve stanice tumora. Protutumorski lijekovi imaju ulogu i u terapiji metastaza. Paradoksalno je da pacijenti sa TNBC imaju bolji odgovor na protutumorske lijekove od pacijenata s drugim tipovima karcinoma dojke, unatoč tome što se TNBC smatra karcinomom dojke koji je agresivan, invazivan i s lošijim očekivanim ishodima.

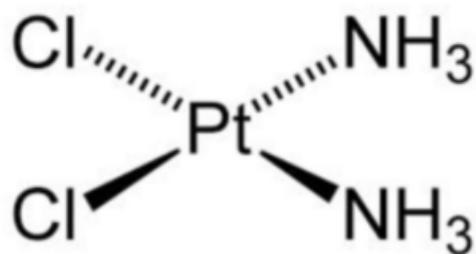
Iako dobar odgovor TNBC na kemoterapiju ohrabruje, zanimljivo je da kada oboljeli ne primaju kemoterapiju, veći je rizik od povratka TNBC nego drugih tipova karcinoma dojke. [19]

Soli platine često se koriste budući da je dokazana njihova uspješnost u terapiji niza različitih tumora, uključujući sarkome, tumore mekog tkiva, limfome i karcinome. Cisplatina (slika 1) uzrokuje staničnu smrt na nekoliko načina. Smatra se da većina citotoksičnosti cisplatine proizlazi iz toga što se cisplatin veže na nukleofilna mesta na gvanozinu i adenozinu zbog čega dolazi do unakrsnog povezivanja lanaca DNA. Nastali adukti aktiviraju apoptotske puteve u stanicama koje ne mogu učinkovito popraviti nastale lezije.<sup>[20]</sup>

Nadalje, za citotoksičnost cisplatine uvelike je zaslužan i oksidativni stres koji cisplatinu inducira. U normalnim fiziološkim uvjetima stanice koriste mehanizme koje ih štite od reaktivnih kisikovih vrsta i tako izbjegavaju oštećenje DNA, proteina i lipida uzrokovano prevelikom koncentracijom reaktivnih kisikovih vrsta u stanci. Cisplatin remeti redoks homeostazu stanice ciljanjem na molekule s tiolnom skupinom koje su zadužene za održavanje ove homeostaze. Tiolna skupina može dati radikale koji reakcijom s molekularnim kisikom stvaraju reaktivne kisikove vrste. Ovaj mehanizam uvelike cilja mitohondrije budući da u uvjetima oksidativnog stresa nastalog zbog djelovanja cisplatine dolazi do inhibicije unosa kalcijevih iona i gubitka mitohondrijskog membranskog potencijala. Oksidativni stres inducira apoptozu aktivacijom i vanjskih i unutarnjih puteva. U prvom slučaju, reaktivne kisikove vrste aktiviraju protein Fas i dolazi do njegove interakcije s Fas-vezanim proteinom s domenom smrti (engl. *Fas-associated protein with death domain*) i kaspazom 8, koja pripada obitelji inicijatorskih kaspaza. U intrinzičnom putu, reaktivne kisikove vrste olakšavaju otpuštanje citokroma c tako da aktiviraju proteine koji stabiliziraju pore mitohondrijske membrane i inhibiraju proteine koji ih destabiliziraju.<sup>[20]</sup> Vrlo visoke koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta mogu, osim apoptoze, inducirati i nekrozu<sup>[21]</sup>, a pokazano je i da reaktivne kisikove vrste mogu inducirati smrt stanice preko autofagije.<sup>[22][23]</sup>

U slučaju da je koncentracija kloridnih iona u stanci niska nastaju hidrolizirani oblici cisplatine koji su do tisuću puta reaktivniji. Hidrolizirani oblici cisplatine inhibiraju stanično disanje tako da ne dolazi do oksidativne fosforilacije zbog čega dolazi do trenutnog izlaska kalcijevih iona iz mitohondrija i povećanja njihove koncentracije u citoplazmi. Smatra se da zbog ovoga dolazi do velikog remećenja normalne homeostaze kalcija u stanci i, posljedično, različitih staničnih funkcija.<sup>[20]</sup>

Osim navedenih, smatra se da cisplatina djeluje preko još nekoliko mehanizama, među kojima su aktivacija p53 i zaustavljanje staničnog ciklusa, utišavanje protoonkogena i anti-apoptoskih proteina te aktivacija MAPK/ERK signalnog puta.<sup>[20]</sup>



**Slika 1. Struktura cisplatine.** Preuzeto iz literturnog navoda<sup>[20]</sup>.

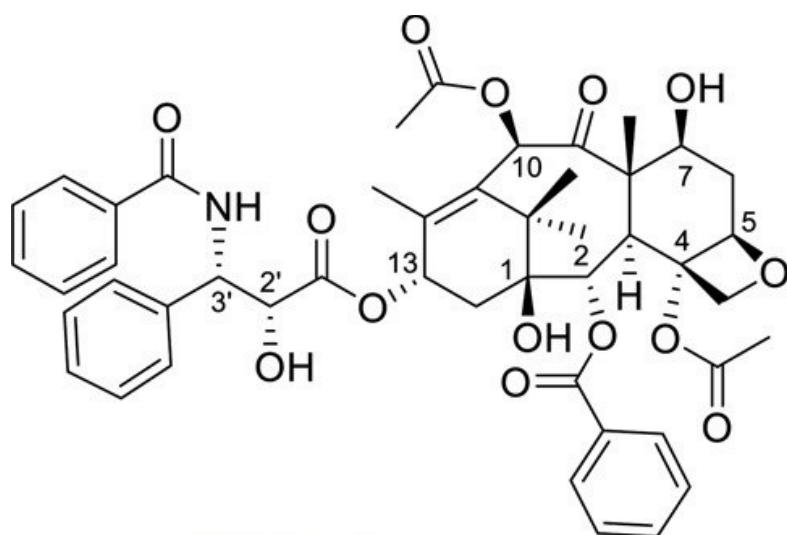
Osobe oboljele od TNBC osjetljiviji su na lijekove koji sadrže platinu. Budući da su to agensi koji oštećuju DNA, bitno je razumijevanje mehanizma popravka DNA, i upravo je to dovelo do poboljšanja terapije TNBC primjerice solima platine i inhibitorima PARP (engl. *Poly(ADP-ribose) polymerase*, PARP). Tumor-supresorski geni *BRCA1* i *BRCA2* bitni su za popravak dvostrukih lomova DNA procesom homologne rekombinacije, stoga mutacije u ovim genima dovode do veće genomske nestabilnosti zbog nepravilnog popravka DNA. Nasljedni karcinomi iz ovog razloga češći su kod pacijenata s mutacijama *BRCA1* i *BRCA2* genima, a kod čak 75% pacijenata oboljelih od karcinoma dojke zbog nasljedne mutacije *BRCA1* karcinom je trostruko negativnog tipa.<sup>[6]</sup>

Taksani su među najčešće korištenim protutumorskim lijekovima zbog svoje učinkovitosti. Paklitaksel je u uporabi još od 1994. kada je odobren u SAD-u od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*), u terapiji metastatskog karcinoma dojke kod onih pacijenata kod kojih je bolest uznapredovala unatoč korištenju terapije na bazi antraciklina te kod bolesnika koji su bili u recidivu nakon operativnog zahvata kojim se uklonilo tumorsko tkivo.<sup>[24]</sup> Struktura paklitaksela prikazana je na slici 2.

Paklitaksel se često koristi u terapiji niza tumora, najčešće jajnika, dojke i pluća, no u uporabi je i u terapiji tumora glave i vrata, endometrija, maternice, prostate, sarkoma, limfoma i leukemija.<sup>[25]</sup> Protutumorsko djelovanje taksana proizlazi iz vezanja na mikrotubule i poticanjem stabilizacije mikrotubula inhibicijom njihove depolimerizacije. Ovo uzrokuje nepravilno razdvajanje kromosoma i zaustavljanje mitoze. Novija istraživanja pokazuju da,

osim stabilizacije mikrotubula, paklitaksel djeluje i tako da inducira stvaranje mitotskih vretena s nekoliko polova, pri čemu dolazi do loše segregacije kromosoma i smrti stanice.<sup>[25]</sup>

Veliki broj istraživanja pokazuje da je paklitaksel vrlo učinkovit u terapiji uznapredovalih karcinoma dojke, i to u kombinaciji s drugim lijekovima, najčešće doksorubicinom. Trostruko negativni karcinomi dojke pokazuju povećanu osjetljivost na terapiju paklitakselom i doksorubicinom od normalnih i luminalnih podtipova karcinoma dojke.<sup>[26]</sup> U kombinaciji s ciklofosfamidom i doksorubicinom paklitaksel povećava ukupnu stopu preživljjenja osoba oboljelih od karcinoma dojke.<sup>[27]</sup>



**Slika 2. Struktura paklitaksela.** Preuzeto iz literarnog navoda<sup>[28]</sup>.

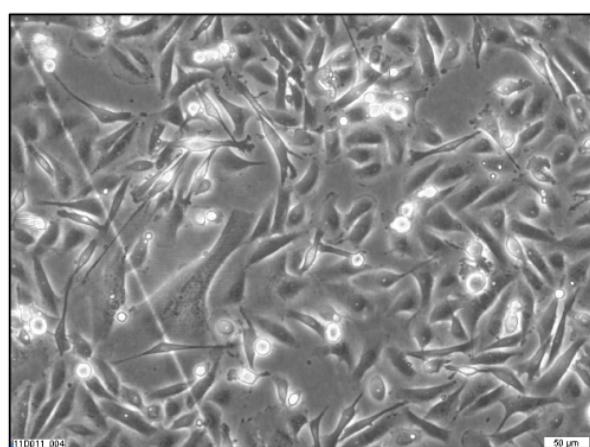
S obzirom na heterogenost TNBC, najbolji rezultati liječenja postigli bi se uporabom personalizirane terapije kojima bi se ciljale specifične molekularne promjene. Ovime bi se znatno poboljšala terapija velikog dijela bolesnika, budući da oko 60-70% oboljelih od TNBC ne odgovaraju na protutumorske lijekove u potpunosti. Procjenjuje se da oko 90% trostruko negativnih karcinoma dojke koji zaostaju nakon liječenja kemoterapijom pokazuju promjene u signalnim putevima koji su meta spojeva koji su u fazi kliničkih ispitivanja, primjerice inhibitora PARP, PI3K i histonskih deacetilaza (engl. *histone deacetylase*, HDAC).<sup>[19]</sup>

#### 2.1.4. Stanična linija MDA-MB-231 kao model u istraživanju trostrukog negativnog karcinoma dojke

Stanična linija MDA-MB-231 je linija epitelnih stanica trostrukog negativnog karcinoma dojke čovjeka. Stanična linija dobivena je iz pleuralne tekućine 51-godišnje žene oboljele od metastatskog adenokarcinoma. Ova stanična linija odlikuje se velikom invazivnošću, agresivnošću te slabom diferenciranošću i jedna je od najčešće korištenih staničnih linija u istraživanjima. Kao i kod ostalih staničnih linija koje se odlikuju velikom invazivnošću, invazivnost MDA-MB-231 stanica proizlazi iz proteolitičke degradacije izvanstaničnog matriksa.<sup>[29,30]</sup>

Zbog toga što se radi o stanicama koje ne eksprimiraju receptore za estrogen i progesteron kao ni HER2, ova je stanična linija prvotno bila prepoznata kao stanična linija bazalnog karcinoma dojke. No, sada je poznato da je ovo stanična linija koja ima sniženu ekspresiju klaudina-3 i kladuinina-4, proteina koji sudjeluju u stvaranju čvrstih veza među stanicama (engl. *tight junctions*), nisku ekspresiju markera proliferacije Ki-67 te pokazuje obogaćenje markera epitelno-mezenhimalnog prijelaza i ekspresiju karakteristika povezanih s matičnim stanicama karcinoma dojke. Zbog navedenih karakteristika stanična linija MDA-MB-231 svrstava se u podtip karcinoma s niskom ekspresijom klaudina.<sup>[29]</sup>

Analiza ekspresije gena pokazuje da ova stanična linija ima heterozigotnu mutaciju u genima *BRAF* (proto-onkogen) i *KRAS* (kodira protein K-Ras koji sudjeluje u signalnom putu RAS/MAPK) i homozigotnu mutaciju u tumor-supresorskim genima *p14ARF*, *p16* i *p53*.<sup>[30]</sup> U 3D kulturi stanice pokazuju morfologiju sličnu endotelu i ima invazivan fenotip, zbog čega ima zvjezdane projekcije koje često povezuju kolonije stanica. Izgled MDA-MB-231 stanica u kulturi vidljiv je na slici 3.



**Slika 3. Stanice MDA-MB-231 u kulturi.** Preuzeto iz literaturnog navoda<sup>[29]</sup>.

## 2.2. Integrini

### 2.2.1. Građa integrina

Integrini su heterodimerni transmembranski glikoproteinski receptori koji se vežu za ligande izvanstaničnog matriksa ili adhezijske receptore na susjednim stanicama. Vezanjem liganda na integrine potiče se niz unutarstaničnih signala koji reguliraju adheziju, migraciju, preživljjenje, proliferaciju i diferencijaciju.<sup>[31]</sup> Integrini se sastoje od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. Dosada je poznato 18  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica koje mogu činiti 24 različita heterodimera.<sup>[9]</sup> Podjedinice,  $\alpha$  i  $\beta$ , sastoje se od izvanstanične domene (kojom vežu ligande u izvanstaničnom okolišu), transmembranske te citoplazmatske domene koja je obično vrlo mala (20-50 aminokiselina). Veličina podjedinica varira, a prosječna  $\alpha$  podjedinica ima oko 1 000, dok  $\beta$  podjedinica ima oko 750 aminokiselina.<sup>[32]</sup> Svi članovi porodice integrina imaju oblik koji se često opisuje kao dvije „glave“ koje stoje na dvjema „nogama“.

Zanimljivo je da, za razliku od drugih receptora na površini stanice, integrini imaju mali afinitet vezanja liganda. No, upravo ovo svojstvo integrina omogućuje stanicama brzo odvajanje i pričvršćivanje za podlogu, što pak znači da je stanicama omogućena lakša pokretljivost i invazija nego što bi to bilo da je afinitet vezanja liganda integrina veći. Ovisno o tome koje  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice čine heterodimer, mijenja se specifičnost vezanja jednog ili više liganada. Mnogo tipova stanica ovisi o integrinima i njihovim interakcijama s izvanstaničnim matriksom da bi preživjele.<sup>[10]</sup> Integrini koji se nalaze na površini stanice određuju do koje će se mjeru stanica vezati na, odnosno migrirati na određenoj površini.<sup>[11]</sup>

Prema tome na koju se komponentu izvanstaničnog matriksa ili ligand vežu, integrini se dijele u četiri skupine, kao što je prikazano u tablici 1.

**Tablica 1. Podjela integrina.**

Skupina	Integrini
Receptori laminina	$\alpha 3\beta 1, \alpha 7\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 6\beta 4$
Leukocitni specifični integrini	$\alpha 4\beta 1, \alpha 4\beta 7, \alpha E\beta 7$ , cijela potporodica $\beta 2$ integrina
Receptori kolagena	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 2, \alpha 10\beta 1, \alpha 11\beta 1$
Receptori RGD	$\alpha v\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5, \alpha v\beta 6, \alpha v\beta 8, \alpha 5\beta 1, \alpha 8\beta 1, \alpha IIb\beta 3$

Glavna skupina integrina koja posreduje u interakciji stanica i izvanstaničnog matriksa su integrini iz porodice  $\beta 1$  i stoga su integrini iz ove porodice eksprimirani na velikom broju

različitih tipova stanica. Iz ove porodice integrina, integrini  $\alpha 1\beta 1$  i  $\alpha 2\beta 1$  glavni su receptori za kolagen,  $\alpha 4\beta 1$  i  $\alpha 5\beta 1$  za fibronektin, a  $\alpha 3\beta 1$  i  $\alpha 6\beta 1$  za laminin.<sup>[33]</sup>

Integrini su dvosmjerne signalne molekule – moguć je prijenos signala iz izvanstaničnog matriksa u stanicu (engl. *outside-in signalling*), ali i iz stanice u izvanstanični okoliš putem promjene konformacije integrina uzrokovana signalima iz citoplazme (engl. *inside-out signalling*). U prvom slučaju, signali iz izvanstaničnog okoliša se preko integrina prenose u stanicu, što modulira niz procesa u stanci, npr. adheziju, migraciju ili invaziju. Do modulacije procesa u stanci dolazi nakon vezanja liganda na integrin zbog promjena u interakcijama proteina koji su vezani na citoplazmatske domene integrina. U drugom slučaju, do promjene konformacije integrina dolazi zbog unutarstaničnih signala koji utječu na proteinske interakcije na citoplazmatskim domenama integrina. Promjenom konformacije integrina mijenja se i njegov afinitet prema određenom ligandu ili ligandima. Primjerice, unutarstanični signali mogu biti aktivacijski pa će izvanstanične podjedinice integrina prijeći iz zatvorene (neaktivne) konformacije u otvorenu (aktivnu) i integrin će vezati ligand. Ovakav *inside-out* prijenos signala stoga omogućuje i prijenos signala iz izvanstaničnog okoliša u stanicu budući da stabilizira aktivnu konformaciju integrina. U ovom procesu glavni proteini su talini i kindlini.<sup>[34]</sup>

### 2.2.2. Integrini $\alpha v$ i njihova uloga u razvoju tumora

Podjedinica integrina  $\alpha v$  može vezati pet različitih  $\beta$  podjedinica ( $\beta 1, \beta 3, \beta 5, \beta 6, \beta 8$ ). Neki od ovih heterodimera vežu se samo na jedan ligand (integrin  $\alpha v \beta 5$  veže se isključivo na vitronektin), dok se drugi vežu na nekoliko liganada (integrin  $\alpha v \beta 3$  veže se na vitronektin, fibronektin, von Wildebrandov faktor, tenascin, osteopontin, fibrilin, fibrinogen i trombospondin). Integrini  $\alpha v$  osobito su važni za zarastanje rana, angiogenezu te proliferaciju i migraciju tumora.<sup>[10]</sup>

Kao što je već spomenuto u prethodnom odjeljku, integrini  $\alpha v$  spadaju u skupinu receptora sa slijedom arginin-glicin-aspartat (RGD). Interakcija integrina s peptidima koji sadrže slijed RGD može se oponašati u laboratoriju izlaganjem stanica sintetičkim cikličkim peptidima sa slijedom RGD, pri čemu dolazi do vezanja ovih peptida na integrine i remećenja signalnih puteva posredovanih integrinima.<sup>[35]</sup> Mogućnost upotrebe cikličkih peptida sa slijedom RGD u terapiji tumora se intenzivno istražuje jer se remećenjem signalnih puteva posredovanih integrinima mogu poremetiti i procesi adhezije stanica, njihove proliferacije i

migracije.<sup>[35]</sup> Primjer cikličkog peptida sa slijedom RGD je cilengitid koji je, unatoč nekim negativnim rezultatima, još u fazi kliničkih istraživanja. Različiti ishodi dobiveni u studijama mogli bi biti rezultat farmakokinetike cilengitida – primjerice, u nekim istraživanjima cilengitid je korišten kao lijek koji bi trebao spriječiti angiogenezu pa je moguće da je vrlo mala količina lijeka došla do tumora.<sup>[36]</sup>

Smatra se da stanice tumora mogu, mijenjanjem ekspresijskog profila integrina u stanicu, manipulirati svojim mikrookolišem i utjecati na angiogenezu, čime tumorske stanice osiguravaju pristup hranjivim tvarima, kisiku i sl. Osim što omogućuju integrinima pristup krvnim žilama, integrini mogu stanicama tumora olakšati invaziju okolnih tkiva – u normalnim stanicama prepoznavanje integrina i liganada izvanstaničnog matriksa sprječava pretjerano i nekontrolirano širenje stanica. No, u tumorskim stanicama, bilo zbog signala izvan stanice (*outside-in signalling*) ili signala koji dolaze iz same stanice (*inside-out signalling*), ovaj proces se može iskoristiti za migraciju stanica i invaziju okolnih tkiva. Povećana ekspresija integrina povezuje se s rastom i invazivnošću tumora, iako integrini sami po sebi nisu onkogeni i eksprimirani su i na normalnim stanicama, no razina njihove ekspresije je niža.<sup>[10]</sup>

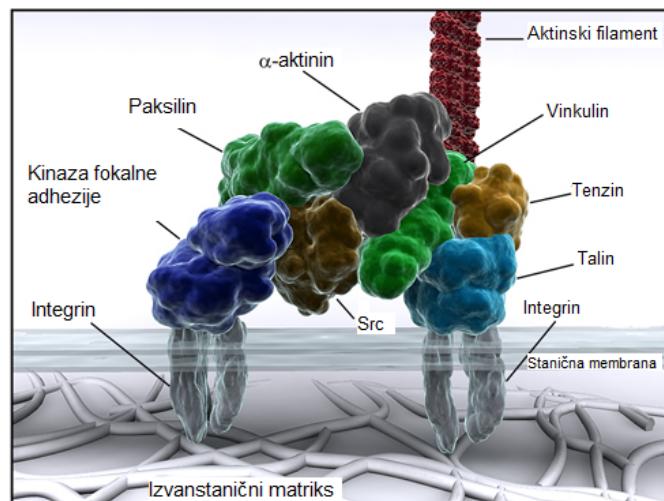
Integrini  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  najčešće su proučavani članovi potporodice integrina  $\alpha v$  budući da je njihova povećana ekspresija često povezana s napredovanjem i agresivnošću tumora. Integrin  $\alpha v\beta 3$  povećano je eksprimiran u mnogim karcinomima, kao što su karcinom dojke, gušterače i prostate. Često je povećana razina integrina  $\alpha v\beta 3$  prisutna u metastazama, što upućuje na njegovu važnost za migraciju i invazivnost tumora. Povećana ekspresija integrina  $\alpha v\beta 5$  česta je karakteristika karcinoma jezika te glioblastoma.<sup>[11]</sup> Članovi porodice integrina  $\alpha v$ , a posebice  $\alpha v\beta 5$ , povezani su s epitelno-mezenhimalnom promjenom posredovanom transformirajućim faktorom rasta  $\beta$  (engl. *Transforming Growth Factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ )<sup>[37]</sup>, utječu na osjetljivost na protatumorske lijekove i angiogenezu.<sup>[38]</sup>

Integrin  $\alpha v\beta 6$  eksprimiraju samo stanice epitela i obično se detektira jedino na stanicama koje prolaze kroz proces remodeliranja tkiva. Visoka ekspresija integrina  $\alpha v\beta 6$  povezuje se s lošijom prognozom za oboljele od karcinoma dojke, pogotovo ako je istovremeno povećana ekspresija receptora ljudskog epidermalnog faktora rasta (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2).<sup>[39]</sup> Osim kod pacijenata oboljelih od karcinoma dojke, povećana ekspresija integrina  $\alpha v\beta 6$  korelira s manjom stopom preživljavanja pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva, vrata maternice i karcinoma pluća ne-malih stanica. Smatra se da je

ovo slučaj jer integrin  $\alpha\beta 6$  povećava invazivnost stanica karcinoma te sposobnost migracije i preživljjenja stanica tumora. [1,39]

### 2.2.3. Fokalne adhezije

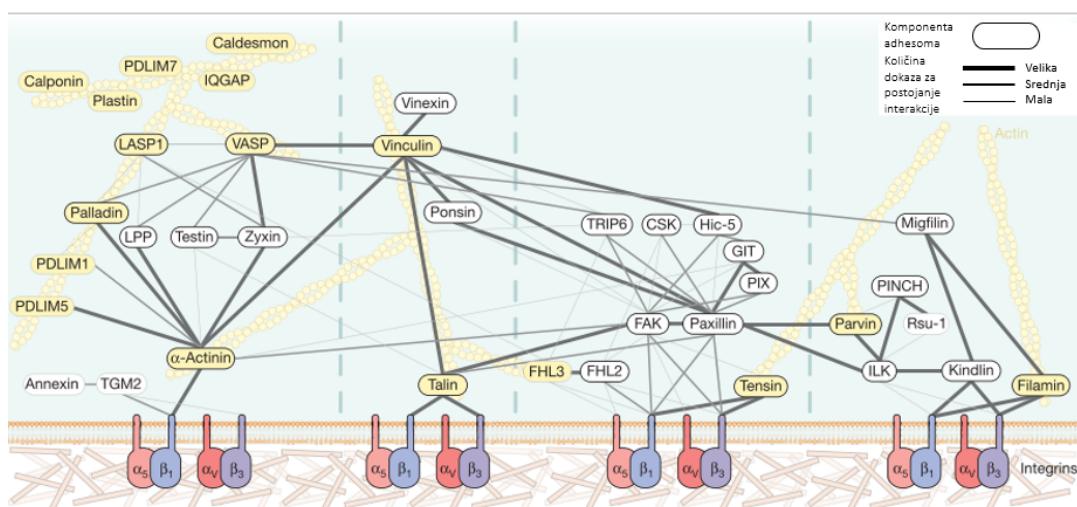
Vezanjem integrina na proteine izvanstaničnog matriksa dolazi do nakupljanja proteina s unutrašnje strane stanične membrane te stvaranja dinamičkog makromolekularnog kompleksa koji se naziva fokalna adhezija ili kompleks adhezije integrina. Ovi kompleksi imaju dvojaku ulogu: oni čine strukturne veze između izvanstaničnog matriksa i aktinskog citoskeleta i služe kao mjesta prijenosa signala od izvanstaničnog matriksa do unutarstaničnih signalnih puteva. Integrini sami nemaju kinaznu aktivnost, no stvaranjem fokalnih adhezija nakon vezanja liganda integrini regrutiraju i aktiviraju kinaze, kao što su kinaza fokalne adhezije (engl. *Focal Adhesion Kinase*, FAK), kinaza povezana s integrinima (engl. *Integrin-Linked Kinase*, ILK) i Src kinaze. [40,41] Na slici 4 prikazana je fokalna adhezija.



**Slika 4. Fokalna adhezija.** Preuzeto iz literaturnog navoda [42] i prilagođeno.

Proteini fokalnih adhezija mogu se podijeliti u četiri skupine: prvu skupinu čine adaptorni proteini (npr. talin i paksilin), drugu signalni proteini (npr. FAK, Src), nereceptorske tirozin kinaze (npr. Src) čine treću skupinu, a proteini koji sudjeluju u regulaciji aktina (npr.  $\alpha$ -aktinin) četvrtu skupinu. Broj proteina koji se nalazi u kompleksu ne može se točno odrediti budući da on ovisi o tipu integrina i tipu izvanstaničnog matriksa koji sudjeluje u stvaranju fokalnih adhezija. Dosad je analizom adhesoma (zajednički naziv za sve proteine adhezije) u različitim staničnim modelima pronađeno više od 2 000 proteina, no samo ih 60 čini konsenzusni

adhesom.<sup>[12,13]</sup> Konsenzusni adhesom dobiven je analizom baze podataka nastale okupljanjem podataka iz više proteomičkih istraživanja temeljenih na spektrometriji masa. Bioinformatičkom analizom ovih podataka identificirano je 2 412 proteina koji se nalaze u adhesomu. Identificirano je 60 proteina koji se pojavljuju u pet od analiziranih sedam setova podataka i za njih se smatra da čine okosnicu mehanizma koju stanica koristi za prijanjanje na izvanstanični matriks, odnosno podlogu. Za dio ovih proteina otprije je poznato da čine adhesom, no ostali proteini dotada nisu bili smatrani dijelom adhesoma (npr. Rsu-1). Prepoznate su četiri ključne skupine proteina oko kojih se okupljaju ostali proteini adhesoma: ILK-PINCH-kindlin, FAK-paksilin, talin-vinkulin i  $\alpha$ -aktinin-ziksin-VASP.<sup>[12]</sup> Sva proteomička istraživanja koja su korištena za izradu konsenzusnog adhesoma prikazanog na slici 5 promatrala su komplekse adhezije integrina nastale nakon vezanja integrina na fibronektin.



**Slika 5. Konsenzusni adhesom.** Preuzeto iz literaturnog navoda<sup>[12]</sup> i prilagođeno.

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Osnovne kemikalije

Popis osnovnih kemikalija korištenih pri izradi rada dan je u tablici 2.

**Tablica 2. Osnovne kemikalije.**

Kemikalija	Proizvođač
Aceton	Sigma Aldrich, Njemačka
Albumin seruma goveda (eng. <i>Bovine serum albumin, BSA</i> )	Roth, Njemačka
Akrilamid	Serva, Njemačka
Amido crno	Kemika, Hrvatska
Amonijev persulfat (APS) <i>BgII</i> (kataloški broj R0144S)	Serva, Njemačka New England Biolabs, SAD
Cisplatina	Sigma Aldrich, Njemačka
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Kemika, Hrvatska
Dimetil-3,3'-ditiobispropionimidat (DTBP)	Thermo Fisher Scientific, SAD
1, 4-ditiotreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Njemačka
Dulbeccova modifikacija Eagleove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )	Sigma Aldrich, Njemačka Lonza, Švicarska
<i>EcoRI</i> (kataloški broj 10703737001)	Roche, Švicarska
Hepes	Sigma Aldrich, Njemačka
<i>HindIII</i> (kataloški broj R014S)	New England Biolabs, SAD
Lipofektamin	Invitrogen, SAD

Mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Modifikacija Eagleovog minimalnog esencijalnog medija (Opti-MEM) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT))	Life Technologies, SAD
Natrijev deoksikolat	Chemicon International, SAD
Natrijev dodecilsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Njemačka
<i>N, N, N, N-tetrametiletilendiamin</i> (TEMED)	Sigma Aldrich, Njemačka
NEB 3. 1 pufer	New England Biolabs, SAD
Paklitaksel	Sigma Aldrich, Njemačka
Penicilin	Sigma Aldrich, Njemačka
Plazmid pEGFP	Addgene, SAD
Plazmid pSUPER.puro	OligoEngine, SAD
Plazmid pSUPER.puro $\alpha$ v	Dobiven u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu
Protutijelo za površinsko obilježavanje integrina $\alpha$ v	Calbiochem, SAD
Puromicin	Sigma Aldrich, Njemačka
RIPA pufer (engl. <i>Radioimmunoprecipitation buffer</i> )	Thermo Fisher Scientific, SAD
Serum fetusa goveda (engl. <i>Fetal calf serum, FCS</i> )	Invitrogen, SAD
Standard za određivanje dužine odsječaka DNA 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, SAD

Standard za određivanje molekulske mase PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, SAD
Standard za određivanje molekulske mase Precision Plus Protein Dual Color Standards	BioRad, SAD
Streptomycin	Sigma Aldrich, Njemačka
SuRE/Cut buffer B	Roche, Švicarska
SuRE/Cut buffer H	Roche, Švicarska
Trypsin	Invitrogen, SAD
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Njemačka
Triton X-100	Sigma Aldrich, Njemačka
Tween-20	Sigma Aldrich, Njemačka
Mili-Q voda	Milipore Corporation, SAD
Western Blot Chemiluminescence Reagent ECL-Plus	Perkin Elmer Life Science, SAD

### 3.1.2. Stanična linija

U ovom radu korištena je stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 (ATCC HTB-26). Stanična linija raste pričvršćena za podlogu.

### 3.1.3. Protutijela

Protutijela korištena za western blot popisana su u tablici 3.

**Tablica 3. Protutijela za western blot.**

Primarno protutijelo	Iz organizma	Proizvođač	Kataloški broj
α-aktinin	Miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-33649
ERK	Zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-94
Filamin 1	Miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-17749
ILK1	Zec	Cell Signalling Technology, SAD	cs-3862s
LDH	Miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-133123
Liprin β1	Miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-514575
pFAK (Y397)	Zec	Abcam, UK	ab81298
Plektin	Miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-33649
pPAX (Y113)	Zec	Abcam, UK	ab32084
Vinkulin	Zec	Abcam, UK	ab129002
Sekundarna protutijela	Iz organizma	Proizvođač	Kataloški broj
Protutijela usmjerena na zečji IgG (H+L) Alexa Fluor 555	Magarac	Abcam, UK	ab150074
Protutijela usmjerena na mišji IgG s peroksidazom iz hrena (HRP)	Ovca	GE Healthcare, UK	NA931

### 3.1.4. Priprema otopina

Sastav korištenih otopina prikazan je u tablici 4.

**Tablica 4. Korištene otopine.**

Otopina	Sastav
Dulbeccova modifikacija Eagleove tekuće hranjive podloge (DMEM-FCS-Pen/Strep)	DMEM s 10% seruma fetusa goveda (FCS) i 0,5% penicilinom/streptomicinom 50 mmol dm <sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 7,6) 150 mmol dm <sup>-3</sup> NaCl 5 mmol dm <sup>-3</sup> EDTA (pH 8) 5 g dm <sup>-3</sup> SDS 1% Triton X-100 1% natrijev deoksilat 10% ocetna kiselina 45% metanol
Modificirani RIPA pufer (5x)	
Otopina za odbojavanje membrane nakon bojanja amido crnim	
Otopina za prikupljanje fokalnih adhezija (engl. <i>Adhesion recovery solution</i> )	125 mmol dm <sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 6,8) 10 g dm <sup>-3</sup> SDS
Otopina za umrežavanje proteina	150 mmol dm <sup>-3</sup> ditiotreitol 6 mmol dm <sup>-3</sup> DTBP u DMEM-HEPES-u
Pufer za puferiranje DMEM-a	1 mol dm <sup>-3</sup> HEPES (pH 7,4)
Pufer za prijenos	10% Tris-glicinski pufer 20% metanol
Pufer za prikupljanje staničnog lizata	pufer RIPA s 0,1% inhibitora proteaza i 0,1% EDTA ( $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ )
PBS (1x, bez kalcija i magnezija)	0,14 mol dm <sup>-3</sup> NaCl 2,7 mmol dm <sup>-3</sup> KCl 10 mmol dm <sup>-3</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mmol dm <sup>-3</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TBST (1x)	20 mmol dm <sup>-3</sup> Tris 150 mmol dm <sup>-3</sup> NaCl 0,1% Tween-20
SB (engl. <i>Sample buffer</i> ) za SDS-PAGE	2% SDS 62,5 mmol dm <sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 6,8) 0,01% bromfenol plavo 25% glicerol 710 mmol dm <sup>-3</sup> β-merkaptoetanola

### 3.1.5. Uredaji i ostali materijali

Uređaji i drugi materijali korišteni pri izradi ovog rada dani su u tablici 5.

**Tablica 5. Korišteni uređaji i ostali materijali.**

Uredaj/materijal	Proizvođač
Automatski brojač stanica Beckman Coulter Z2	Beckman Coulter Life Sciences, SAD
Automatska pipeta	Integra Biosciences, SAD
Boćice za uzgoj stanica	Corning, SAD
Gradijentni gel za elektroforezu, 4-15%	BioRad, SAD
Inkubator za uzgoj stanica	Heraeus, Njemačka
Kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
Magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija
Mikropipete	Rainin, SAD
Nastavci za mikropipete	Rainin, SAD
Nitrocelulozna membrana	GE Healthcare, UK
Petrijeve zdjelice (promjera 10 cm i 6 cm)	Corning, SAD
Plastične i staklene pipete	Superior, Njemačka
Pločice za uzgoj stanica (6 i 96 bunarića)	Corning, SAD
Scaffold, program za analizu podataka MS	Proteome Software, SAD
Spektrofotometar za mikrotitarske pločice	StatFax 2100 Awareness Technology Inc., SAD
Sustav za elektroforezu MINI-Protean	BioRad, SAD
Svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
Termoblok Thermomixer Compact	Eppendorf, Njemačka
Tresilica	Tehnica, Slovenija
Uredaj za razbijanje stanica pomoću ultrazvuka	Cole Palmer, SAD
Vodena kupelj	Tehnica, Slovenija

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanice MDA-MB-231 uzgajane su *in vitro* u bočicama za uzgoj stanica površine  $25\text{ cm}^2$  (T25), odnosno  $75\text{ cm}^2$  (T75) u inkubatoru za uzgoj stanica pri  $37^\circ\text{C}$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Za uzgoj stanica

korištena je tekuća hranjiva podloga DMEM-FCS-Pen/Strep. Pri odabiru klonova za uzgoj je korištena ista tekuća hranjiva podloga s dodatkom puromicina.

### 3.2.2. *Rasađivanje stanica*

Budući da stanice rastu pričvršćene za podlogu, potrebno ih je rasaditi dva puta tjedno kako ne bi prekrile podlogu i iscrpile hranjive tvari. Prije rasađivanja potrebno je zagrijati pri  $37^{\circ}\text{C}$  DMEM-FCS-Pen/Strep koji se koriste za uzgoj i tripsin koji se koristi za odvajanje stanica od podloge. Stanicama se ukloni hranjiva podloga pipetom te se zatim stanice kratko isperu tripsinom (0,5 – 1,0 mL) pri čemu korišteni volumen tripsina ovisi o tome koja je bočica korištena za uzgoj stanica. Nakon ispiranja, stanicama se dodaje novi volumen tripsina (1,0 – 2,0 mL), a odvajanje stanica od podloge prati se pod svjetlosnim mikroskopom. Kada se stanice odvoje, u bočicu se dodaje 5 – 10 mL svježe hranjive podloge DMEM-FCS-Pen/Strep kako bi se zaustavilo daljnje djelovanje tripsina. Stanice se tada resuspendiraju višestrukim povlačenjem i ispuštanjem suspenzije stanica iz pipete. Ovako dobivena suspenzija stanica koristi se za nasadivanje stanica za daljnje eksperimente.

### 3.2.3. *Smrzavanje stanica*

Kako bi preživljenje stanica bilo što bolje po odmrzavanju, stanice se zamrzavaju kada su u eksponencijalnoj fazi rasta. Suspenzija stanica, dobivena kako je opisano u prethodnom odjeljku, prebaci se u plastičnu epruvetu od 15 mL i centrifugira 5 minuta pri  $10\,000 \times g$ . Nakon centrifugiranja, supernatant se odlije, a talog stanica resuspendira se u 1 mL hranjive podloge DMEM-FCS-Pen/Strep koja sadrži 10% krioprezervansa DMSO-a. Dobivena suspenzija stanica prebaci se u ampulu za zamrzavanje, a ampula se stavi na držač u poklopcu spremnika za tekući dušik ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) te se idući dan pohrani u tekući dušik ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2.4. *Odmrzavanje stanica*

Ampule sa smrznutim stanicama prethodno su pohranjene u spremniku s tekućim dušikom. Prilikom odmrzavanja, ampulu je potrebno zagrijati pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon odmrzavanja, stanice je potrebno prebaciti u T25 bočicu u koju je prethodno dodano 5 mL tekuće hranjive podloge zagrijane pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Bočica se potom stavi u inkubator, a idući dan stanicama se promijeni

hranjiva podloga kako bi se uklonio sav krioprezervans. Rast stanica se prati te se dalje rasađuju po potrebi.

#### *3.2.5. Provjera identiteta plazmida restrikcijskom analizom*

Provjera identiteta pSUPER.puro αv za transfekciju napravljena je cijepanjem s restrikcijskim enzimima i razdvajanjem dobivenih odsječaka DNA pomoću elektroforeze u agaroznom gelu. Dobiveni rezultati uspoređivani su sa rezultatima cijepanja ishodišnog plazmida, pSUPER.puro.

Da bi se plazmidi razgradili željenim enzimima, pripremljene su smjese koje su sadržavale odgovarajući pufer, restrikcijski enzim i plazmid. Budući da restrikcijski enzimi korišteni za dvostruku razgradnju zahtijevaju uporabu različitih pufera, nakon prve razgradnje je plazmidna DNA precipitirana, osušena i otopljena u puferu pogodnom za cijepanje drugim restrikcijskim enzimom. Taloženje je izvršeno dodatkom natrijevog klorida ( $c = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i dvostrukog volumena apsolutnog etanola, centrifugiranjem i sušenjem taloga DNA na zraku.

Nakon inkubacije s restrikcijskim enzimima,  $10 \mu\text{L}$  svake smjese pomiješano je s  $2 \mu\text{L}$  boje za nanošenje uzoraka i naneseno na agarozni gel (1,5% agaroze u TAE puferu; prije izljevanja u agarozni gel doda se etidijev bromid). Za određivanje dužina odsječaka DNA u jednu jažicu nanesen je standard za određivanje dužine odsječaka DNA u koncentraciji koja je preporučena uputama proizvođača. Elektroforeza je provođena 60 minuta pri 60 V.

Odsječci DNA se vizualiziraju korištenjem kamere UVITEC. Dodani etidijev bromid interkalira u DNA i fluorescira kada se osvijetli UV svjetлом, stoga se uređaj namjesti na detekciju fluorescencije.

#### *3.2.6. Transfekcija i odabir stabilno transficiranih klonova*

Za transfekciju su nasadene stanice u Petrijeve zdjelice promjera 3,5 cm tako da bude  $3 \times 10^5$  stanica po zdjelici. Za nasadivanje korištena je hranjiva podloga bez antibiotika, DMEM-FCS (1,5 mL po zdjelici) i stanice su rasle dva dana.

Za postupak transfekcije prema uputama proizvođača, pripremljene su smjese odgovarajućeg plazmida, lipofektamina i hranjive podloge Opti-MEM. Transfekcijske smjese inkubirane su 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Iz Petrijevih zdjelica sa stanicama uklonjena je

hranjiva podloga i dodano  $600 \mu\text{L}$  hranjive podloge DMEM bez FCS-a i antibiotika te odgovarajuća transfekcijska smjesa. Stanice su s transfekcijskom smjesom inkubirane 5 sati u inkubatoru. Nakon 5 sati, uklonjena je hranjiva podloga i dodano je  $1,5 \text{ mL}$  svježe hranjive podloge DMEM-FCS. Stanice su rasle 48 sati, a zatim su odvojene od podloge tripsinom i rasađene u omjeru 1:10 u nove Petrijeve zdjelice promjera 10 cm. Za rasađivanje stanica korištena je hranjiva podloga DMEM-FCS-Pen/Strep. Nakon četiri dana rasta stanicama je promijenjena hranjiva podloga u kojoj se nalazi i selektivni antibiotik puromicin (DMEM-FCS-Pen/Strep +  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  puromicina).

Nakon što su kolonije stanica otpornih na puromicin postale vidljive, prebačene su na pločice s 96 bunarića tako da u jednom bunariću bude jedna kolonija i to nježnim struganjem plastičnim nastavkom za mikropipetu. Stanice su dalje rasle u tekućoj hranjivoj podlozi s puromicinom ( $200 \mu\text{L}$  podloge po bunariću). Rast stanica praćen je pomoću svjetlosnog mikroskopa i stanice su prebačene na pločice s 48 bunarića, zatim na pločice s 24 bunarića, pločice sa 6 bunarića i na kraju u Petrijeve zdjelice do trenutka kada je dobiven dovoljan broj stanica za analizu metodom protočne citometrije, kako je opisano u odjeljku 3. 2. 7.

### 3.2.7. Određivanje preživljenja stanica MTT testom

MTT test temelji se na metaboličkoj aktivnosti vijabilnih stanica i stoga se koristi za određivanje preživljenja stanica nakon izlaganja protutumorskim lijekovima. Mitohondrijske reduktaze vijabilnih stanica reduciraju tetrazolijevu sol MTT u ljubičaste kristale formazana. Preživljenje stanica mjeri se pomoću spektrofotometra tako da se mjeri apsorbancija formazana čiji se kristali otapaju dodavanjem DMSO-a i potresanjem mikrotitarske pločice. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je preživljenju stanica.

Za MTT test stanice su nasadene na pločicu s 96 bunarića tako da je u svaki bunarić pipetirano  $180 \mu\text{L}$  suspenzije stanica koja sadrži 12 000 stanica. 24 sata nakon nasadivanja, stanicama je dodano po  $20 \mu\text{L}$  otopine protutumorskog lijeka i pločica je ostavljena u inkubatoru 72 sata. Za svaku koncentraciju lijeka rađeni su triplikati svakog uzorka, a jedan bunarić ostavljen je za slijepu probu.

Nakon 72 sata inkubacije, hranjiva podloga je uklonjena naglim okretanjem pločice, a zaostala tekućina uklonjena je prislanjanjem pločice na staničevinu. U svaki bunarić je dodano po  $40 \mu\text{L}$  radne otopine MTT-a i pločica je ostavljena 3 sata u inkubatoru. Nakon 3 sata nastali kristalići formazana otopljeni su dodatkom  $170 \mu\text{L}$  DMSO-a po bunariću. Da bi se kristali

formazana u potpunosti otopili, pločica je stavljena na tresilicu. Kada su se svi kristali otopili, mjerena je apsorbancija na 600 nm pomoću čitača za mikrotitarske pločice.

Preživljenje stanica se računa prema jednadžbi (1):

$$\text{Preživljenje (\%)} = \frac{\text{apsorbancija stanica izloženih citostatiku} - \text{apsorbancija negativne kontrole}}{\text{apsorbancija stanica neizloženih citostatiku} - \text{apsorbancija negativne kontrole}} \times 100 . \quad (1)$$

### *3.2.8. Određivanje ekspresije proteina na površini stanica pomoću protočne citometrije*

Za određivanje ekspresije proteina na površini stanica pomoću protočne citometrije nasadeno je  $5 \times 10^5$  stanica u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm u hranjivoj podlozi DMEM-FCS-Pen/Strep. Nakon dva dana rasta, stanice su odvojene od podloge tripsinom, prikupljene u plastičnu epruvetu i centrifugirane ( $10\,000 \times g$ , 5 minuta), pri sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen, a talog ispran s 10 mL PBS-a. Stanice su resuspendirane i prebačene u mikroepruvete tako da u svakoj mikroepruveti bude  $1 - 5 \times 10^5$  stanica po uzorku u 1 mL PBS-a. Mikroepruvete su centrifugirane 5 minuta  $10\,000 \times g$  pri sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo uklonjen vakuum sisaljkom tako da u mikroepruveti ostane oko  $50 \mu\text{L}$  supernatanta. Na talog stanica dodano je primarno protutijelo specifično za protein eksprimiran na površini stanice razrijeđeno u PBS-u. Uzorci su dobro promiješani potresanjem i inkubirani u mraku 60 minuta pri  $4^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, dodano je 1 mL PBS-a da bi se stanice isprale i uzorci su centrifugirani 5 minuta na  $10\,000 \times g$  pri sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo uklonjen vakuum sisaljkom i stanice ponovno isprane PBS-om i centrifugirane. Nakon uklanjanja supernatanta, stanicama je dodano sekundarno protutijelo i uzorci su inkubirani u mraku 30 minuta pri  $4^\circ\text{C}$ . Stanice su zatim isprane dodatkom 1 mL PBS-a i centrifugirane kako je već ranije opisano. Supernatant je pažljivo uklonjen vakuum sisaljkom, a stanice ponovno isprane PBS-om i centrifugirane. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice su resuspendirane u  $250 \mu\text{L}$  propidijevog jodida ( $\gamma(\text{PI}) = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Propidijev jodid koristi se u svrhu razlikovanja mrtvih od živilih stanica budući da propidijev jodid ulazi i boja jedino mrtve stanice. Uzorci su zatim analizirani na protočnom citometru.

### *3.2.9. Izdvajanje fokalnih adhezija*

Petrijeve zdjelice isprane su dva puta tekućom hranjivom podlogom DMEM-HEPES, zagrijanom pri  $37^\circ\text{C}$ , kako bi se maknule stanice koje nisu pričvršćene za podlogu. U svaku

Petrijevu zdjelicu dodano je 5 mL otopine za umrežavanje proteina i stanice su stavljenе u inkubator na 5 minuta. Nakon 5 minuta prekinuto je umrežavanje proteina dodatkom 150 µL Tris-HCl-a ( $c$  (HCl) = 1 mol dm<sup>-3</sup>, pH 8). Stanice su inkubirane s ovom otopinom 2 minute pri sobnoj temperaturi. Tris-HCl prekida umrežavanje proteina jer amino skupina Tris-a kompetira amino skupinama proteina za vezanje DTBP-a.

Otopina je uklonjena iz Petrijevih zdjelica i stanice su na ledu isprane s po 5 mL PBS-a pri 4°C. U svaku Petrijevu zdjelicu dodano je po 5 mL modificiranog RIPA pufera i inkubirane su 2 minute pri sobnoj temperaturi da bi došlo do lize stanice. Postupak lize praćen je pomoću svjetlosnog mikroskopa te su nakon 2 minute izlaganja modificiranom RIPA puferu ostaci stanica trebali bi još biti vidljivi, što ukazuje na učinkovito umrežavanje u prethodnom koraku. Petrijeve zdjelice su zatim isprane pod mlazom vodovodne vode (brzina protoka 150 mL po sekundi) s tim da se svaka zdjelica ispire ujednačeno u trajanju od oko 10 sekundi. Pri ovom postupku organeli i citoplazma se ispiru dok proteini fokalnih adhezija zaostaju na podlozi. Učinkovitost ispiranja provjerena je pomoću svjetlosnog mikroskopa (organeli više ne smiju biti vidljivi).

Petrijeve zdjelice su isprane s po 5 mL PBS-a, PBS je uklonjen i zaostala tekućina uklonjena je cijedenjem Petrijevih zdjelica pri 4°C (oko 1 minutu). Treba ukloniti što je više moguće tekućine kako bi se izbjeglo razrjeđenje otopine za prikupljanje fokalnih adhezija. 200 µL ARS-a dodano je u Petrijevu zdjelicu i proteini su skupljeni struganjem u toj otopini. Nakon minute struganja ARS je skupljen i prebačen u iduću Petrijevu zdjelicu. Kada su skupljeni proteini iz svih zdjelica, ARS s proteinima prebačen je u označenu mikropruvetu i stavljen na led. Proteini su skupljeni iz istih zdjelica još jednom, struganjem u svježih 200 µL ARS-a. Kada su ponovno skupljeni proteini iz istih zdjelica, otopina je dodana u istu mikropruvetu. Iz te mikropruvete je pola volumena sakupljenih proteina odvojeno u čistu, obilježenu mikropruvetu i u svaku mikropruvetu je dodan četiri puta veći volumen acetona (rashlađenog na -20°C) nego što je prikupljeni volumen ARS-a s proteinima.

Mikropruvete su inkubirane pri -80°C preko noći, a uzorci za SDS-PAGE i western blot pripremljeni su kako je opisano u odjeljku 3. 2. 10., dok su uzorci za spektrometriju masa pripremljeni kako je opisano u odjeljku 8.1.

### 3.2.10. SDS-PAGE i western blot

Diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (engl. *Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) je metoda pomoću koje se proteini mogu razdvojiti isključivo na temelju razlike u molekulskoj masi. Natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecylsulphate*, SDS) denaturira proteine i nastaju linearne, negativno nabijeni polipeptidni lanci. Pufer za nanošenje uzoraka na gel sadrži i β-merkaptotetanol koji reducira disulfidne mostove u proteinima čime se pospješuje denaturacija. Nastali negativno nabijeni polipeptidni lanci u električnom polju gibaju se prema anodi različitim brzinama, što je posljedica njihovih različitih masa.

U diskontinuiranoj elektroforezi koriste se dva gela, gel za sabijanje i gel za razdvajanje. U gelu za sabijanje dolazi do koncentriranja proteina u usku prugu kako bi svi proteini ušli u gel za razdvajanje u isto vrijeme. U gelu za sabijanje proteini iz uzoraka nalaze se između kloridnih iona koji putuju brzo i iona glicina koji putuju sporo. Pri prelasku u gel za razdvajanje, zbog naglog povećanja pH, pokretljivost iona glicina izjednačava se s pokretljivošću kloridnih iona čime se postiže dodatno sabijanje proteina na granici gelova. Nakon ulaska u gel za razdvajanje, kloridni ioni i ioni glicina, zbog svoje velike pokretljivosti i male veličine, vrlo brzo prolaze kroz gel ostavljajući proteine iz uzoraka da se razdvoje na temelju svoje molekulske mase.

Uzorci fokalnih adhezija za SDS-PAGE prikupljeni su kako je opisano u prethodnom odjeljku. Da bi se uzorci pripremili za nanošenje na gel, centrifugirani su 20 minuta pri  $16\,000 \times g$  u centrifugiji rashlađenoj na  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant je uklonjen, a talog ispran istim volumenom acetona koji je korišten za precipitaciju i centrifugiranje ponovljeno. Supernatant je uklonjen, a talog proteina ostavljen je da se osuši u digestoru pri sobnoj temperaturi (oko 20 minuta). Osušeni talog proteina otopljen je u  $90\,\mu\text{L}$  2x pufera za nanošenje uzoraka i zagrijan na  $70^{\circ}\text{C}$ . Ovako pripremljeni uzorci mogu se nanositi na gel ili se čuvati na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Uzorci staničnih lizata prikupljeni su tako da je na gotovo konfluentne stanice u Petrijevoj zdjelici dodana otopina za skupljanje lizata. Otopina je inkubirana sa stanicama 5 minuta pri  $4^{\circ}\text{C}$  i zatim je stanični lizat skupljen struganjem. Stanični lizat prebačen je u mikropruvetu i tako pripremljeni uzorak može se čuvati pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Prije korištenja uzorak je centrifugiran na  $10\,000 \times g$  5 minuta, a supernatant je izložen trima ciklusima ultrazvuka amplitude 30% od 15 sekundi kako bi se pocijepala DNA. Nakon toga uzorak je zagrijavan 3 minute pri  $95^{\circ}\text{C}$  i pomiješan s 2x puferom za nanošenje uzoraka na gel.

Za elektroforezu korišten je gotov gradijentni gel 4-15% (BioRad, SAD) i uređaj za elektroforezu Mini PROTEAN Tetra Cell. U kadicu je stavljen gel, uliven Tris-glicinski pufer za elektroforezu i na gel nanesen standard za određivanje molekulske mase proteina i uzorci te je pokrenuta elektroforeza uz napon od 100 V.

Nakon završetka elektroforeze, proteini su s gela preneseni na nitroceluloznu membranu. Za prijenos proteina na membranu korišten je uređaj Mini PROTEAN Tetra Cell, u koju se stavlja kazeta za prijenos i pufer za prijenos. Prijenos se odvijao pri konstantnoj jakosti struje (400 mA) oko 90 minuta. Po završetku prijenosa, membrana je obojena bojom Amido crno da se provjeri uspješnost prijenosa, nakon čega je membrana odbojana otopinom za odbojavanje, isprana u TBST-u i blokirana u 10%-tnoj otopini mlijeka u TBST-u tijekom 60 minuta s ciljem sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela na mjesta na koja se nisu prenijeli proteini. Nakon blokiranja, membrana je isprana u TBST-u i inkubirana s primarnim protutijelom preko noći pri 4°C. Za neka protutijela potrebno je blokirati membranu u BSA. Odluka o tome treba li membranu blokirati u mlijeku ili BSA donesena je na temelju prijašnjeg iskustva i uputama proizvođača protutijela.

Sljedeći dan je membrana isprana u TBST-u, inkubirana dva sata pri sobnoj temperaturi u sekundarnom protutijelu koje je obilježeno peroksidazom hrena i konačno isprana u TBST-u. Vezanje sekundarnog protutijela vizualizira se nakon inkubacije u otopini kemiluminiscentnog reagensa pomoću uređaja UVITEC ili izlaganjem membrane fotografskom filmu. Ukoliko se koristi UVITEC, odabire se u izborniku detekcija kemiluminiscencije i željeno vrijeme ekspozicije. Kod izlaganja membrane fotografskom filmu, film se razvija u otopini razvijača, ispira destiliranom vodom i fiksira u otopini fiksativa. Film se zatim ispere destiliranom vodom i osuši.

Ista membrana može se koristiti za detekciju više proteina, ali je tada potrebno svaki put ukloniti vezana protutijela, ponovno blokirati membranu i inkubirati je s novim protutijelom. Da bi se protutijela uklonila membrana je kratko isprana u TBST-u i zatim ispirana 40 minuta u otopini glicina ( $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH 2,5) i zatim ponovno blokirana u mlijeku 60 minuta. Nakon blokiranja, stavljen je iduće primarno protutijelo.

*3.2.11. Spektrometrija masa*

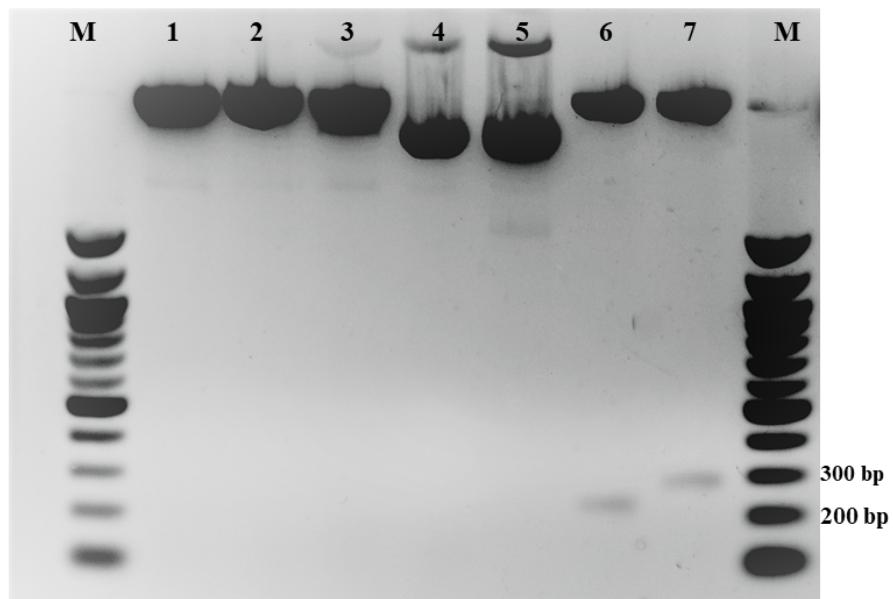
Spektrometrija masa rađena je u laboratoriju Dr. J. D. Humphriesa (Wellcome Trust Centre for Cell Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester). Opis postupka kojega je u Manchesteru radio Dr. M. Paradžik nalazi se u Dodatku.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Izdvajanje klonova stanica MDA-MB-231 stabilno transficiranih plazmidima pSUPER.puro i pSUPER.puro αv

#### 4.1.1. Provjera identiteta plazmida

Prije transfekcije potrebno je provjeriti sadrži li plazmid željeni slijed nukleotida za shRNA specifičnu za podjedinicu integrina αv, cijepanjem s restriktičkim enzimima i razdvajanjem dobivenih odsječaka DNA pomoću elektroforeze u agaroznom gelu. Za provjeru identiteta pSUPER.puro αv korišten je i pSUPER.puro kao kontrola u dvjema reakcijama razgradnje restriktičkim enzimima. Oba plazmida razgrađena su enzimom *Bgl*II ili enzimima *Eco*RI i *Hind*III. Dobiveni odsječci DNA nakon razgradnje razdvojeni su elektroforezom u agaroznom gelu i vizualizirani su etidijevim bromidom te snimljeni kamerom UVITEC (slika 6).



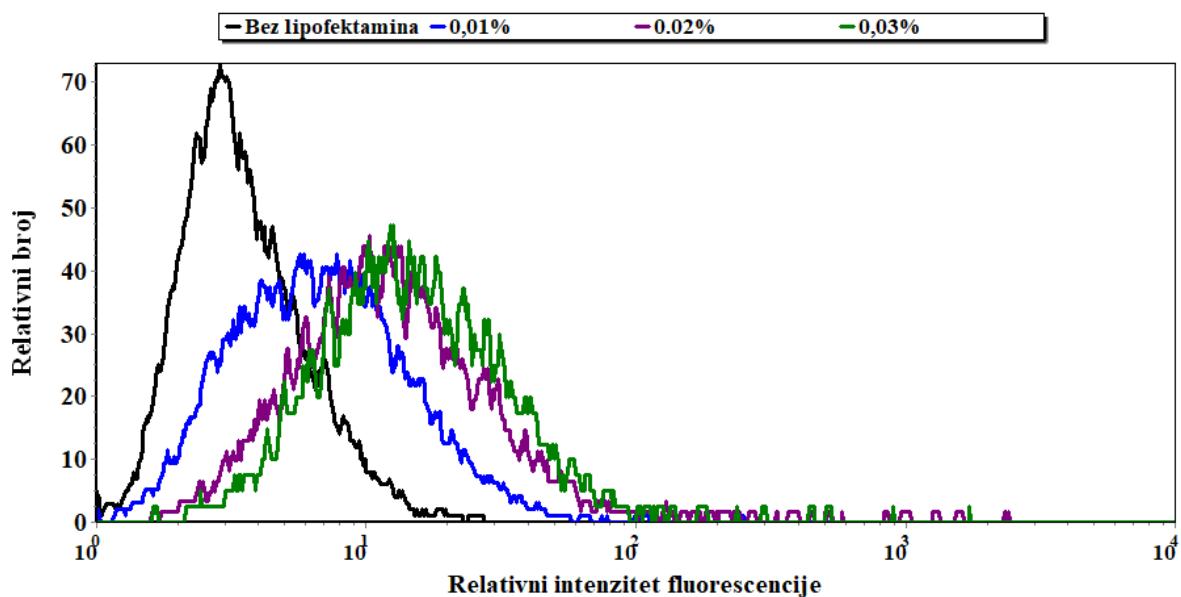
**Slika 6. Provjera identiteta plazmida pSUPER.puro ov cijepanjem restriktičkim enzimima i usporedbom s plazmidom pSUPER.puro.**

M – standard za određivanje dužine odsječaka DNA (NEB 100 bp DNA Ladder), 1 – pSUPER.puro razgrađen s *Eco*RI, 2 – pSUPER.puro razgrađen s *Hind*III, 3 – pSUPER.puro razgrađen s *Bgl*II, 4 – nerazgrađeni pSUPER.puro, 5 – pSUPER.puro ov razgrađen s *Bgl*II, 6 – pSUPER.puro razgrađen s *Eco*RI i *Hind*III, 7 – pSUPER.puro ov razgrađen s *Eco*RI i *Hind*III.

Ugradnjom željenog slijeda nukleotida u plazmid pSUPER.puro dolazi do gubitka restriktičkog mjesta za *Bgl*II, što znači da razgradnja pSUPER.puro ov enzimom *Bgl*II (restriktička smjesa 5) treba dati isti produkt kao restriktička smjesa 4, tj. nerazgrađeni plazmid pSUPER.puro. Istovremeno enzim *Bgl*II uistinu razgrađuje pSUPER.puro (restriktička smjesa 3), potvrđujući ispravnost korištenog enzima *Bgl*II. Dodatni dokaz identiteta pSUPER.puro ov dobiven je dvostrukom razgradnjom s *Eco*RI i *Hind*III čime se dobiva odsječak DNA dužine 287 bp (restriktička smjesa 7), za razliku od dvostrukе razgradnje pSUPER.puro s *Eco*RI i *Hind*III kojom se dobiva odsječak DNA dužine 227 bp (restriktička smjesa 6).

#### 4.1.2. Određivanje učinkovitosti transfekcije

Učinkovitost transfekcije provjerena je tako da su stanice MDA-MB-231 transficirane sa smjesama s različitim udjelom lipofektamina po preporuci proizvođača (0,01%, 0,02%, 0,03%) i jednakom količinom pEGFP koji sadrži gen za ekspresiju zelenog fluorescentnog proteina (engl. *Green Fluorescent Protein*, GFP) pod kontrolom promotora CMV. Nakon pet sati pri 37°C, sa stanica je uklonjen transfekcijski reagens i stanice su uzbudjene još 48 sati. Učinkovitost transfekcije određena je mjeranjem ekspresije GFP pomoću protične citometrije, kako je opisano u odjeljku 3. 2. 7. (slika 7).

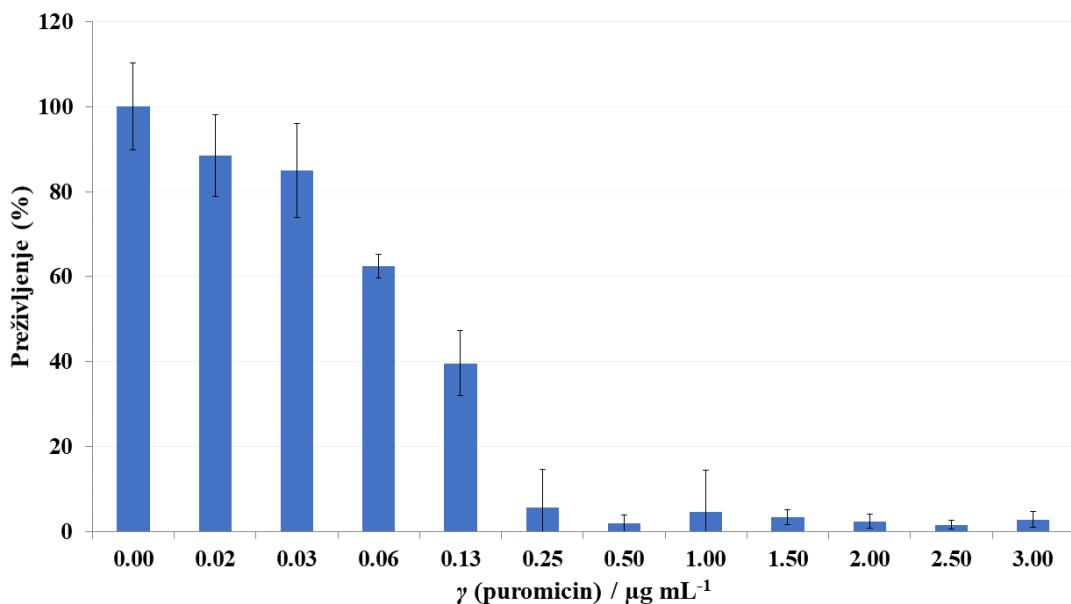


**Slika 7. Provjera učinkovitosti transfekcije određivanjem intenziteta fluorescencije koju daje zeleni fluorescentni protein.** Korištene su otopine s udjelom lipofektamina 0,01%, 0,02%, 0,03% i otopina bez lipofektamina.

Stanice transficirane lipofektaminom pokazuju veći relativni intenzitet fluorescencije u odnosu na netransficirane stanice smjesom bez lipofektamina. Iz slike 7 je također vidljivo da povećanjem udjela lipofektamina s 0,01% na 0,02% dolazi i do povećanja relativnog intenziteta fluorescencije, tj. do povećanog unosa pEGFP u stanice. Budući da povećanjem udjela lipofektamina s 0,02% na 0,03% ne dolazi do značajnog povećanja relativnog intenziteta fluorescencije, a primijećena je veća citotoksičnost (rezultati nisu prikazani), odabran je za daljnje pokuse transfekcije udio lipofektamina 0,02%..

#### 4.1.3. Određivanje koncentracije puromicina za odabir stabilno transficiranih stanica

Koncentracija puromicina određena je metodom MTT čiji su rezultati prikazani na slici 8.



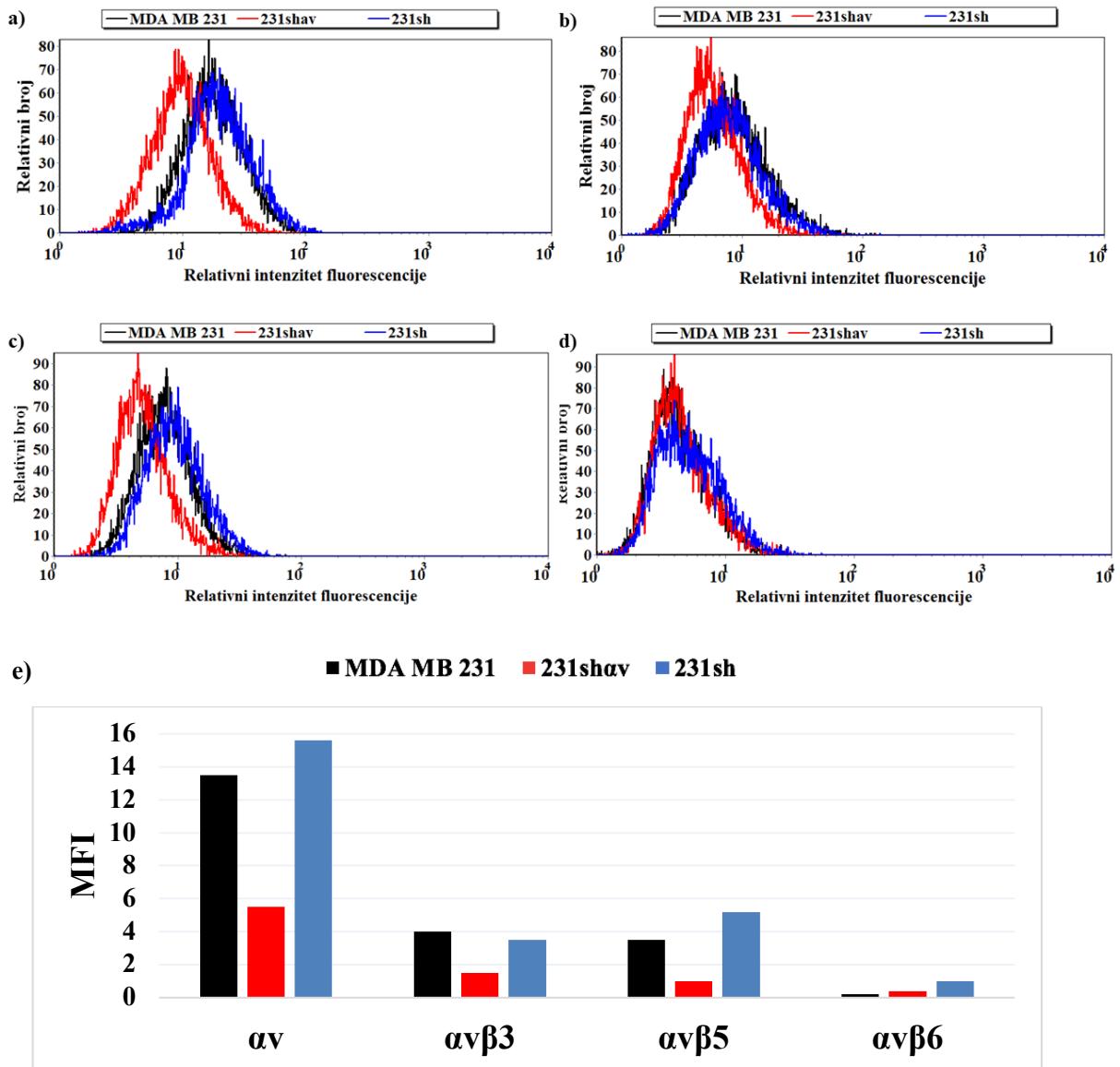
**Slika 8. Utjecaj koncentracije puromicina na preživljenje stanica MDA-MB-231.**

Nasađeno je 2 000 stanica po bunariću, a preživljenje je prikazano kao postotak preživljjenja u odnosu na kontrolne stanice  $\pm$  standardna devijacija.

Kao što je vidljivo na slici 8, preživljenje stanica MDA-MB-231 smanjuje se povećanjem koncentracije puromicina. Pri koncentraciji  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  nema preživjelih stanica MDA-MB-231. Budući da transfekcijom stanica plazmidom pSUPER.puro αv, koji sadrži gen za otpornost na puromicin, osiguravamo otpornost stanica na puromicin, za odabir stabilno transficiranih klonova stanica MDA-MB-231 izabrana je koncentracija puromicina  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

*4.1.4. Izdvajanje klonova stanica MDA-MB-231: kontrolni klon i klon sa smanjenom ekspresijom integrina  $\alpha v$*

Stanice MDA-MB-231 transficirane su plazmidom pSUPER.puro  $\alpha v$ , odnosno plazmidom pSUPER.puro i odvojene od netransficiranih stanica uzgojem u hranjivoj podlozi s puromicinom. Od klonova koji su izrasli odabrana su dva klena, 231sh $\alpha v$  koji je transficiran plazmidom pSUPER.puro  $\alpha v$  i 231sh koji je transficiran plazmidom pSUPER.puro. Za karakterizaciju navedenih klonova korištena je protočna citometrija kako bi se odredila površinska ekspresija podjedinice integrina  $\alpha v$  te heterodimera  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  i  $\alpha v\beta 6$ .

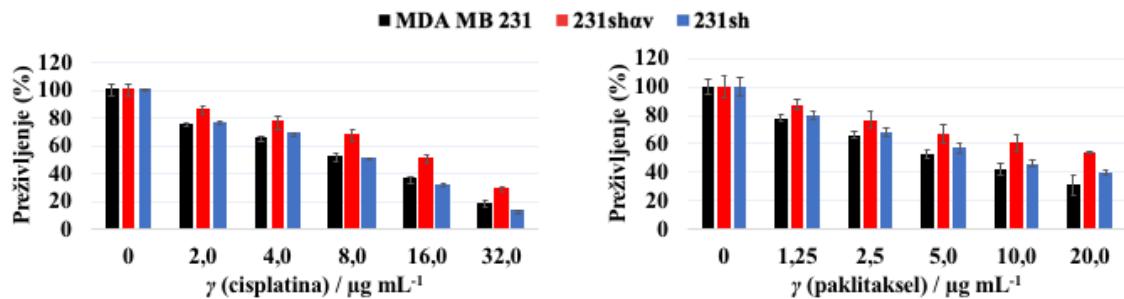


**Slika 10.** Određivanje ekspresije integrina  $\alpha v$  (a),  $\alpha v\beta 3$  (b),  $\alpha v\beta 5$  (c) i  $\alpha v\beta 6$  (d) metodom protočne citometrije u stanicama MDA-MB-231, klonu stanica 231shav stabilno transficiranim plazmidom pSUPER.puro  $\alpha v$  i kontrolnom klonu stanica 231sh stabilno transficiranim plazmidom pSUPER.puro. Stanice su obilježene primarnim mišjim protutijelima za podjedinicu integrina  $\alpha v$ , odnosno heterodimere integrina  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  i  $\alpha v\beta 6$ , a kasnije i sekundarnim, fluorescentno obilježenim, protutijelom usmjerenim na mišji imunoglobulin. Rezultati prikazani pod a), b), c) i d) su prikazani ponovno pod e), ako kao vrijednosti geometrijskog prosjeka intenziteta fluorescencije, MFI (engl. *mean fluorescence intensity*).

Stanice MDA-MB-231 i 231sh pokazuju približno jednaku ekspresiju svih istraživanih proteina na površini stanice ukazujući na to da je ovaj klon dobra kontrola transfekcije. U stanicama 231sh-av je, prema očekivanju, zabilježena smanjena ekspresija podjedinice integrina av i heterodimera integrina avβ3 i avβ5 u odnosu na stanice MDA-MB-231 i 231sh (slika 10a, 10b, 10c, 10e). Ekspresija integrina avβ6 na stanicama MDA-MB-231 je, prema MFI, vrlo niska ili nepostojeća. To potvrđuje i preklapanje krivulja dobivenih s protutijelom specifičnim za avβ6 i krivulje izotipske kontrole (rezultati nisu prikazani). Stoga ne iznenađuje da u stanicama 231sh-av ne dolazi do promjene ekspresije u odnosu na stanice MDA-MB-231 i 231sh (slika 10d, slika 10e). Nakon utišavanja podjedinice integrina av za očekivati je i da će doći i do smanjene ekspresije integrina avβ1 što nismo provjeravali jer protutijelo za ovaj heterodimer ne postoji na tržištu. Ipak, sukladno prethodno objavljenim rezultatima da utišavanje podjedinice integrina av povećava osjetljivost stanica MDA-MB-231 na paklitaksel, cilj našeg rada je bio odrediti adhesom stanične linije MDA-MB-231 odnosno adhesom integrina av u navedenoj staničnoj liniji. Ipak, kako bi se kompletirali rezultati ovog rada bit će potrebno u budućnosti odrediti i ekspresiju integrina avβ1 za što će biti potrebno napraviti imunoprecipitaciju.

#### **4.2. Stabilno utišavanje podjedinice integrina av dovodi do smanjene osjetljivosti stanica na protutumorskse lijekove paklitaksel i cisplatinu**

Nedavno objavljen rad laboratorijskih istraživača u kojem je izrađen ovaj rad pokazao je kako prolazno utišavanje integrina av dovodi do povećanja osjetljivosti stanica MDA-MB-231 na protutumorske lijekove paklitaksel, cisplatinu i vinkristin<sup>[14]</sup>. Upravo je to bio glavni motiv za izdvajanje klonova stanica 231sh-av sa smanjenom ekspresijom integrina av i kontrolnih stanica 231sh kako je opisano u odjeljku 3.2.5. Kako bi se provjerilo mijenja li stabilno utišavanje podjedinice integrina av osjetljivost na cisplatinu i paklitaksel, stanice MDA-MB-231 i klonove 231sh-av i 231sh izložene su tim protutumorskim lijekovima i preživljjenje stanica određeno je metodom MTT (slika 11).



**Slika 11. Klon stanica 231shav pokazuje smanjenu osjetljivost na cisplatinu i paklitaksel u odnosu na stanice MDA-MB-231 i kontrolni klon 231sh.** Stanice MDA-MB-231 i klonovi stanica 231shav i 231sh nasadene su (12 000 stanica po bunariću) i nakon 24 sata izložene različitim koncentracijama cisplatine (a) i paklitaksela (b) tijekom 3 dana. Preživljjenje je zatim mjereno metodom MTT i iskazano kao postotak preživljjenja u odnosu na kontrolne stanice  $\pm$  standardna devijacija.

Kao što je vidljivo na slici 11, po stabilnom utišavanju gena za podjedinicu integrina  $\alpha v$  dolazi do smanjenja osjetljivosti stanica na korištene protutumorske lijekove. Istovremeno nije zabilježena razlika u osjetljivosti na ova dva protutumorska lijeka između stanica MDA-MB-231 i kontrolnog klena 231sh što dodatno potvrđuje da je promjena u osjetljivosti na protutumorske lijekove upravo posljedica stabilne transfekcije sa shRNA specifičnom za integrin  $\alpha v$ .

Još od 1990.-ih godina poznato je da je adhezija tumorskih stanica na izvanstanični matriks bitan čimbenik u razvijanju otpornosti na terapiju. Istraživanja u ovom području podupire tvrdnju da korištenjem metoda koje ciljaju neke integrine tumorske stanice mogu postati osjetljivije na terapiju protutumorskim lijekovima i zračenjem<sup>[43]</sup>. Istraživanja provedena u grupi u kojoj je izrađen i ovaj rad fokusirana su upravo na integrine  $\alpha v \beta 3$  i  $\alpha v \beta 5$  i upućuju na činjenicu da, ovisno o staničnom modelu, ovi integrini osiguravaju signale preživljivanja za stanice tumora nakon izlaganja protutumorskim lijekovima. Pokazali su da nakon *de novo* ekspresije integrina  $\alpha v \beta 3$  u stanicama karcinoma grkljana HEp2, dolazi do povećanja otpornosti stanica na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C zbog povećane razine glutationa u stanicama i uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta nastalih djelovanjem ovih protutumorskih lijekova.<sup>[44]</sup> Slično tome, ali ne istim mehanizmom, u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 *de novo* ekspresija integrina  $\alpha v \beta 3$  dovodi do povećane otpornosti

na čak četiri protutumorska lijeka, cisplatinu, doksorubucin, mitomicin C i 5-fluorouracil, mehanizmom koji uključuje gubitak pSrc(Y418).<sup>[45]</sup>

Upravo obrnuti pristup je primijenjen na stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 koje eksprimiraju integrine  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$ . Prolazno utišavanje podjedinice integrina  $\alpha v$  u ovim stanicama povećava njihovu osjetljivost na protutumorske lijekove cisplatinu, vinkristin i paklitaksel.

Korelacija između ekspresije integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  i migracije i invazije raznih tumora, među kojima je i karcinom dojke, otprije je poznata.<sup>[11]</sup> U stanicama HEp2 i Cal27 ekspresija integrina  $\alpha v\beta 3$  dovela je do povećane migratorne sposobnosti stanica<sup>[23,45]</sup>, a u modelu stanica Cal27 pokazana je i povećana sposobnost invazije.<sup>[45]</sup> Osim toga, u stanicama MDA-MB-231 utišavanje podjedinice integrina  $\alpha v$  smanjilo je migraciju i invaziju ovih stanica.<sup>[14]</sup>

S obzirom na ta saznanja o ulozi integrina  $\alpha v$  u moduliranju otpornosti stanica tumora na protutumorske lijekove, smatra se da ovi integrini predstavljaju potencijalne mete za kombinaciju s protutumorskim lijekovima i stoga se u posljednje vrijeme pojačano istražuju. Otkrivanje i razumijevanje mehanizama koje stanice koriste kako bi izbjegle apoptozu inducirano protutumorskim lijekovima moglo bi se iskoristiti za razvijanje učinkovitijih kombinacija za terapiju tumora u budućnosti.<sup>[46]</sup> Posebice je to bitno za tumore kao što su TNBC budući da za njih ne postoje ciljane terapije. Receptor estrogena česta je meta protutumorskih lijekova koji se koriste za liječenje karcinoma dojke (npr. tamoksifen), no TNBC ne eksprimira ovaj receptor. Slično tome, TNBC ne eksprimira ni HER2 na kojega su također usmjereni protutumorski lijekovi (npr. trastuzumab). Zbog nedostupnosti ciljane terapije za određene tumore, osobito je bitno razumjeti mehanizme koje tumorske stanice koriste kako bi preživjele terapiju protutumorskim lijekovima jer se time postiže veća učinkovitost dostupnih nespecifičnih terapija.

Na temelju prethodno dobivenih rezultata u grupi u kojoj je rad izrađen, koji pokazuju da prolazno utišavanje podjedinice integrina  $\alpha v$  u stanicama MDA-MB-231 povećava osjetljivost stanica na protutumorske lijekove<sup>[14]</sup>, bilo je očekivano da će stabilno utišavanje podjedinice integrina  $\alpha v$  dati sličan rezultat, tj. da će stanice MDA-MB-231 i nakon stabilnog utišavanja integrina  $\alpha v$  pokazati povećanu osjetljivost na djelovanje protutumorskih lijekova. Suprotno očekivanjima, u ovom je radu pokazano da stabilno utišavanje podjedinice integrina  $\alpha v$  dovodi do povećanja otpornosti stanica MDA-MB-231 na protutumorske lijekove cisplatinu i paklitaksel. Iako nemamo objašnjenje za ovaj rezultat prepostavljamo da bi se to moglo

objasniti kompenzacijskim događajem pri odabiru stabilnih klonova za razliku od prolaznog utišavanja. Detaljnije, ovaj rezultat mogao bi se objasniti preslagivanjem integrina (engl. *integrin switching*) budući da pri stabilnom utišavanju stanice imaju vremena postići homeostazu i „odgovoriti“ na novonastalo stanje, dok pri prolaznom utišavanju to nije moguće. Preslagivanje integrina znači da promjena ekspresije jednog heterodimera integrina mijenja ekspresiju drugih heterodimerima. Možemo pretpostaviti dva moguća procesa preslagivanja integrina. Prvi je da utišavanje podjedinice integrina  $\alpha v$  oslobađa  $\beta$  podjedinice integrinskog heterodimera i takve  $\beta$  podjedinice zatim mogu formirati nove heterodimere s drugim raspoloživim  $\alpha$  podjedinicama u stanicu. Ovime se može povećati ekspresija drugih integrina koji bi mogli utjecati na povećanje otpornosti na citostatike. U ovom specifičnom slučaju moglo je doći do oslobođanja podjedinice integrina  $\beta 1$  koja može stvoriti heterodimere s jako velikim brojem podjedinica  $\alpha$ . Poznato je da stanice MDA-MB-231 eksprimiraju heterodimer integrin  $\alpha v \beta 1$ <sup>[47]</sup>. Što se tiče podjedinica  $\beta 3$  i  $\beta 5$ , one stvaraju heterodimere samo s podjedinicom  $\alpha v$  te za njih ne vrijedi ovaj predloženi mehanizam.

U stanicama HEp2 pokazano je da između integrina  $\alpha v \beta 3$  i  $\alpha v \beta 5$  postoji ravnoteža te da povećanjem ekspresije integrina  $\alpha v \beta 3$  dolazi do smanjenja ekspresije integrina  $\alpha v \beta 5$ .<sup>[48]</sup> Nadalje, i u stanicama melanoma MDA-MB-435S pokazano je da između integrina  $\alpha v \beta 3$  i  $\alpha v \beta 5$  postoji ravnoteža i dolazi do preslagivanja integrina uslijed utišavanja jedne od integrinskih podjedinica.<sup>[14]</sup> U prijašnjim istraživanjima primijećeno je da u staničnoj liniji MDA-MB-231 signalni putevi posredovani integrinom  $\beta 1$  značajno inhibiraju apoptozu uzrokovanu paklitakselom i vinkristinom.<sup>[46]</sup> Osim toga, vrlo je vjerojatno da kod prolazne transfekcije integrin  $\alpha v$  specifičnom siRNA je upravo integrin  $\alpha v \beta 1$  odgovoran za povećanje osjetljivosti na protutumorske lijekove<sup>[48]</sup>. Ukoliko dolazi do preslagivanja integrina nakon stabilnog utišavanja integrina  $\alpha v$ , moguće je da  $\beta 1$  podjedinice oslobođene iz heterodimera  $\alpha v \beta 1$  formiraju nove heterodimere s drugim  $\alpha$  podjedinicama, čime signalni putevi zaslužni za inhibiciju apoptoze uzrokowane paklitakselom i vinkristinom postaju aktivni. Drugi mogući način preslagivanja integrina je da utišavanjem integrina  $\alpha v$  dolazi do povećanja ekspresije bilo kojeg drugog integrina koji ne mora s integrinima  $\alpha v$  dijeliti zajedničke podjedinice i koji zatim utječu na povećanje otpornosti stanica na citostatike.<sup>[48–50]</sup> Primjerice, u stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazano je da inaktivacija integrina  $\beta 1$  dovodi do povećanja ekspresije integrina  $\beta 3$  čime je došlo i do povećanog metastaziranja tumora.<sup>[49]</sup> Fenomen preslagivanja integrina je pokazan i na stanicama Cal27 u kojima *de novo* ekspresija

integrina  $\alpha v\beta 3$  dovodi do povećanja ekspresije  $\alpha v\beta 5$ .<sup>[45]</sup> Osim toga neobjavljeni rezultati<sup>[51]</sup> pokazali su da u istom staničnom modelu tj. u stanicama Cal27 nakon *de novo* ekspresije integrina  $\alpha v\beta 3$  dolazi i do povećane ekspresije integrina  $\alpha 6\beta 4$ .

Točni mehanizmi preslagivanja integrina zasada nisu poznati, ali očito je kako su razine ekspresije različitih integrina povezane i da promjena ekspresije jednog integrina utječe na ekspresiju više njih. Stoga je razumijevanje ovog mehanizma bitno kako bi se mogle razviti učinkovitije protutumorske terapije.

Dosad je pokazano kako inhibicija aktivacije integrina može imati veliku primjenu u protutumorskim terapijama, osobito u inhibiciji angiogeneze i nastajanja metastaza. Trenutno se u tu svrhu koriste funkcionalno blokirajuća monoklonska protutijela, peptidni antagonisti i ciklički peptidi koji oponašaju normalne ligande integrina u izvanstaničnom matriksu.<sup>[52,53]</sup> Od cikličkih peptida koji su trenutno u fazi kliničkog ispitivanja posebno je zanimljiv cilengitid, pentapeptid koji sadrži RGD motiv kojega prepoznaju integrini. Smatra se da je primarna meta cilengitida integrin  $\alpha v\beta 3$ , no pokazano je i djelovanje na integrin  $\alpha v\beta 5$ . Djelovanjem cilengitida inhibiraju se integrini, što za posljedicu ima inhibiciju signalnih puteva ERK i PI3K koje stanice tumora koriste pri proliferaciji i migraciji, a aktivacija ovih signalnih puteva smatra se zaslužnom i za izbjegavanje apoptoze u stanicama tumora. Nadalje, inhibicija integrina  $\alpha v$  putem cilengitida čini stanice trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 osjetljivijima na terapiju zračenjem.<sup>[54]</sup> Osim toga pokazano je da inhibicija integrina  $\alpha v\beta 3/\beta 5$  pomoći cilengitida čini stanice MDA-MB-231 osjetljivijima na paklitaksel.<sup>[14]</sup> Ova činjenica govori u prilog da bi preslagivanje integrina mogao biti razlog za različite rezultate prolaznog i stabilnog utišavanja integrina  $\alpha v$ .

#### 4.3. Promjena sastava adhesoma u stanicama MDA-MB-231 nakon stabilnog utišavanja podjedinice integrina αv

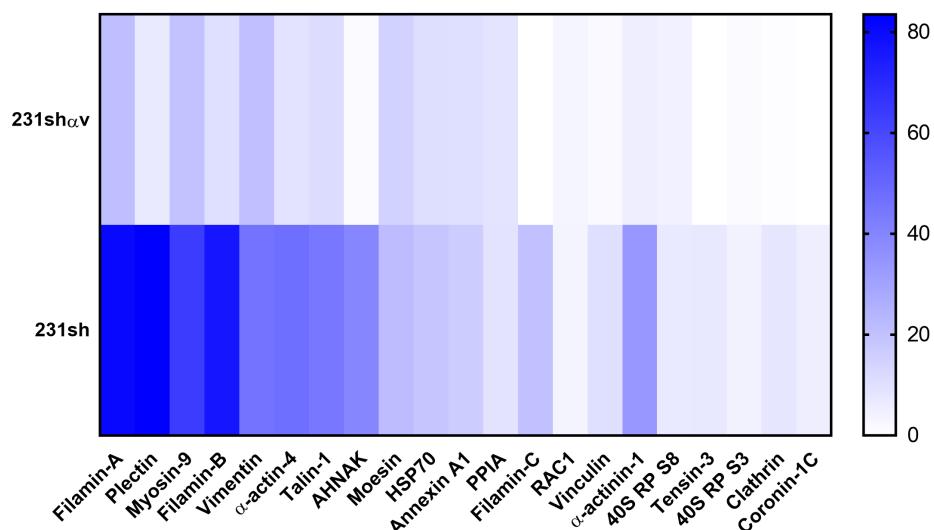
Proteini fokalnih adhezija nalaze se uz staničnu membranu te su među prvima do kojih umreživač dolazi nakon prolaska kroz membranu. Iako duljim vremenom umrežavanja dolazi do boljeg umrežavanja proteina fokalnih adhezija, također dolazi i do umrežavanja proteina koji ne čine fokalne adhezije te je stoga bitno dobro optimizirati vrijeme izlaganja umreživaču.

Kako bi se utvrdilo vrijeme umrežavanja proteina pri kojem je umrežavanje proteina fokalnih adhezija dovoljno dobro, ali da istovremeno ne dolazi i do umrežavanja drugih proteina u stanci, provedeno je izdvajanje fokalnih adhezija i western blot na uzorcima MDA-MB-231 stanica nakon različitih vremena umrežavanja (rezultati nisu prikazani). Za umreživanje proteina korišten je DTBP (Wangov i Richardov reagens) koji može proći kroz membranu stanice. Kao kontrola korištene su stanice bez dodatka umreživača inkubirane u otopini DMEM-HEPES. Dobiveni uzorci analizirani su metodom western blot.

Za optimizaciju metode odabранo je određivanje fosforiliranog oblika proteina FAK (pFAK(Y397)) i paksilina (pPAX(Y113)) budući da se radi o proteinima koji su vrlo česte komponente fokalnih adhezija i čine konsenzusni adhesom.<sup>[55]</sup> Osim njih odabran je i protein γH2AX budući da se radi o proteinu koji se nalazi u jezgri i ne bi trebao biti izdvojen s proteinima fokalnih adhezija. Utvrđeno je kako vrijeme umrežavanja od 15 minuta daje zadovoljavajuću količinu uzorka za analizu metodom western blot, da je pri tim uvjetima količina nespecifičnih proteina još uvijek mala, te je zato korišteno u eksperimentima izdvajanja proteina fokalnih adhezija (rezultati nisu prikazani).

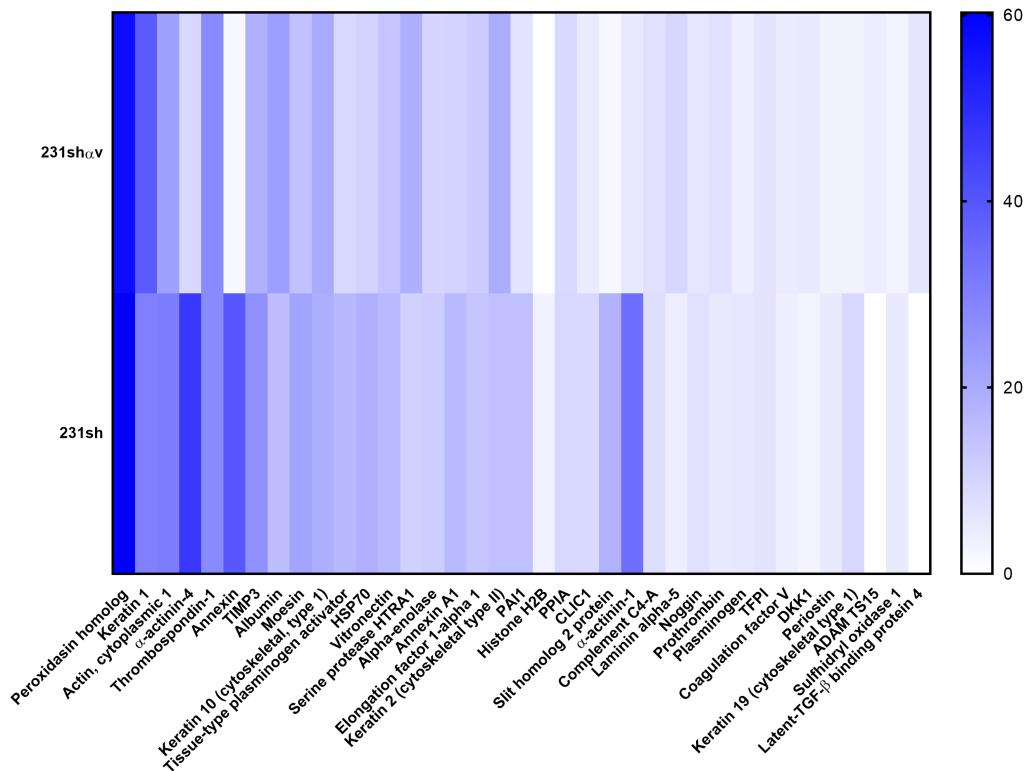
Kako bi se odredio sastav adhesoma korištena je spektrometrija masa i western blot. Uzorci za obje analize skupljeni su na isti način pri istim uvjetima te iz istog broja stanica tako da su proteini prvo umreženi, a zatim su stanice lizirane, a jezgra i citoplazma isprani pod mlazom vodovodne vode te PBS-om. Proteini fokalnih adhezija tj. adhesoma, zaostali na podlozi, skupljeni su struganjem u otopini za izdvajanje adhezija, a zatim koncentrirani taloženjem acetonom.

Spektrometrijom masa u laboratoriju dr. M. J. Humphriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester) analizirani su uzorci izdvojenih fokalnih adhezija. Korištena metoda ionizacije je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionisation*, ESI), a kao detektor masa korišten je Orbitrap. Rezultati su prikazani na slikama 13 i 14. Spektrometrijom masa identificirano je 426 proteina, čiji je popis dan u Dodatku u tablici D1. Korištenjem alata *DAVID Functional Annotation Tool Bioinformatics Resources 6.8.* dostupnim na *DAVID Bioinformatics Database* dobiveno je kako proteini fokalnih adhezija čine 26,4% ukupnog broja identificiranih proteina, a proteini izvanstaničnog matriksa čine 24,4% ukupnog broja identificiranih proteina. P vrijednost za proteine fokalnih adhezija iznosi  $1,6 \times 10^{-82}$  te  $1,6 \times 10^{-84}$  za proteine izvanstaničnog matriksa, a korigirana P vrijednost dobivena pomoću metode Benjamini-Hochberg iznosi  $2,4 \times 10^{-80}$  za proteine fokalnih adhezija, odnosno  $3,7 \times 10^{-82}$  za proteine izvanstaničnog matriksa.<sup>[56,57]</sup>

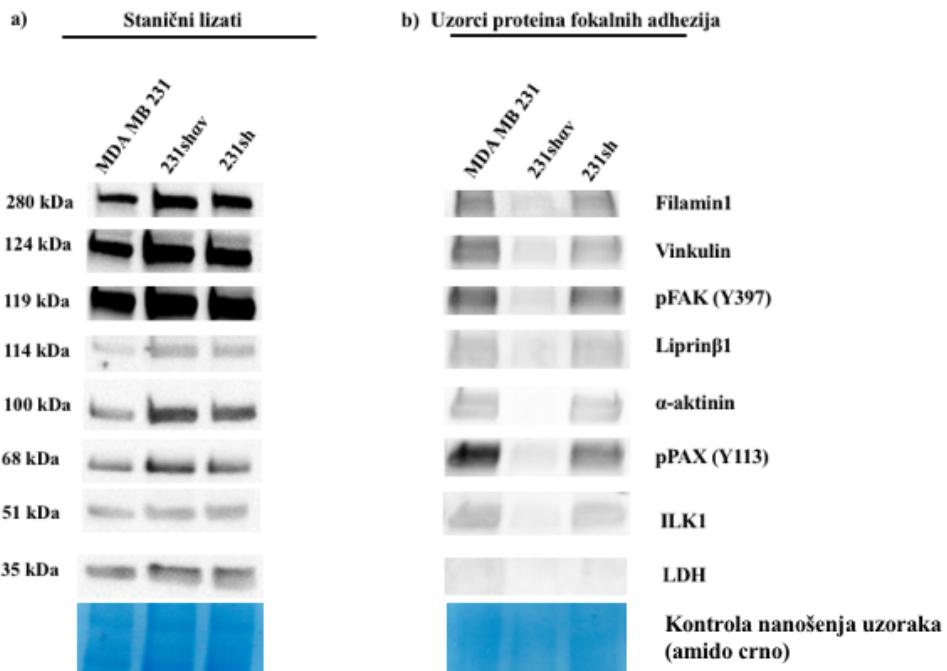


Slika 12. Usporedba ekspresije proteina fokalnih adhezija stanica 231sh<sup>αv</sup> i 231sh.

Prikaz je napravljen pomoću programa GraphPad Prism, verzija 7.0e za operativni sustav Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornija, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).



**Slika 13. Usporedba ekspresije proteina izvanstaničnog matriksa stanica 231sh<sup>αv</sup> i 231sh.** Prikaz je napravljen pomoću programa GraphPad Prism, 7.0e za operativni sustav Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornija, SAD, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).



**Slika 14. Identifikacija proteina prisutnih u uzorcima lizata (a) i izdvojenih fokalnih adhezija (b) iz stanica MDA-MB-231 i klonova stanica 231shav i 231sh metodom western blot.**

Stanični lizati prikupljeni su iz istog broja stanica. Uzorci fokalnih adhezija prikupljeni su iz istog broja stanica i pod istim uvjetima trajanja umrežavanja proteina od 15 minuta. Za detekciju kemilumiscentnog signala korištena je kamera UVITEC. Citoplazmatski protein laktat-dehidrogenaza (LDH) korišten je kao negativna kontrola.

Uzorci izoliranih fokalnih adhezija analizirani su i metodom western blot koristeći protutijela za proteine za koje je pokazano da su prisutni u manjoj količini u stanicama 231shav u odnosu na klon 231sh, a dobiveni rezultati su prikazani na slici 14. Istovremeno je napravljena usporedba ekspresije istih proteina u ukupnim staničnim lizatima stanica MDA-MB-231, 231shav i kontrolnog klona 231sh. Rezultati pokazuju da nakon utišavanja integrina  $\alpha v$  u stanicama 231shav u odnosu na stanice MDA-MB-231 i kontrolni klon 231sh, u uzorcima izdvojenih fokalnih adhezija dolazi do smanjene ekspresije proteina koji čine fokalne adhezije. Ova promjena nije rezultat nanošenja manje količine uzorka budući da bojanje membrane amido crnim pokazuje da je nanesena količina uzorka jednaka za sve uzorce proteina fokalnih adhezija.

Zanimljivo je da u uzorcima staničnih lizata svih korištenih stanica (MDA MB 231, 231shav, 231sh) ima otprilike jednaka količina svih proteina fokalnih adhezija, što sugerira da utišavanjem integrina  $\alpha v$  dolazi do promjene u adhesoru stanica, a ne do promjene u njihovoj

ukupnoj količini u stanici. Pri diskusiji ovih rezultata treba imati na umu da su stanice prije izolacije fokalnih adhezija nasuđene u Petrijeve zdjelice bez da je unaprijed odabранo koje nas fokalne adhezije zanimaju. Drugim riječima, Petrijeve zdjelice nisu oblagane nekim od proteina izvanstaničnog matriksa kako bi adhesom koji promatramo bio odraz samo dijela, a ne svih integrina. Velika većina adhesoma koji su do sada objavljeni je dobivena nasuđivanjem stanica na fibronektin<sup>[12,58,59]</sup> i konsenzus adhesom koji je objavljen<sup>[12]</sup> je konsenzus adhesom dobiven na fibronektinu.

Budući da je motiv za ovo istraživanje bila primijećena povećana osjetljivost stanica na vinkristin i paklitaksel i smanjena mogućnost migracije i invazije stanica MDA-MB-231 nakon utišavanja integrina  $\alpha v$ <sup>[14]</sup>, u ovom smo radu željeli odrediti adhesom upravo pod tim uvjetima. Nadalje, osim osjetljivosti na paklitaksel, htjeli smo provjeriti i osjetljivost stanica na cisplatinu nakon stabilnog utišavanja integrina  $\alpha v$ . Proteini izvanstaničnog matriksa u ovakvom tipu eksperimenta potječu od seruma u kojem se stanice uzgajaju i od samih stanica koje ga izlučuju i stvaraju svoj vlastiti okoliš. Prvi podatak koji smo željeli dobiti ovim eksperimentima je kojim se integrinima stanice MDA-MB-231 vežu na podlogu. Iako je spektrometrijom masa detektiran jako veliki broj proteina, broj spektara za integrine je vrlo malen u sva 4 neovisno pripremljena izolata fokalnih adhezija. Ipak, najzastupljeniji integrini po broju pojavljivanja u stanicama 231sh su integrin  $\alpha v$ , zatim  $\beta 5$  te integrin  $\beta 1$ , dok integrin  $\beta 3$  nije detektiran. Iako je na temelju tako malog broja spektara nemoguće govoriti o kvantitativnoj analizi za integrine, ipak možemo usporediti rezultate kvantitativnog mjerjenja ekspresije integrina  $\alpha v$  protočnom citometrijom s rezultatima spektrometrije masa koju smo izvršili na oba klena 231sh $\alpha v$  i 231sh iz 4 eksperimenta (Tablica D1). U klonu 231sh prosječno je zabilježeno 2.86 spektara za integrin  $\alpha v$  dok u klonu 231sh $\alpha v$  spektri specifični za integrin  $\alpha v$  nisu ni zabilježeni. Što se tiče podjedinice  $\beta 5$  u klonu 231sh prosječno je zabilježeno 2.38 spektrara dok je u klonu 231sh $\alpha v$  otkriveno samo 0.86. Konačno, za podjedinicu  $\beta 1$  također je zabilježena razlika u istom smjeru sa 2.04 spektara u 231sh i 1.29 spektra u klonu 231sh $\alpha v$ . Iako ove vrijednosti ne možemo smatrati statistički značajnim (za takvu analizu broj zabilježenih spektara mora biti najmanje 10), ipak ovi podaci podupiru tvrdnju iz rada Stojanović i sur.<sup>[14]</sup> da od integrina  $\alpha v$  upravo integrin  $\alpha v \beta 5$  ima važnu ulogu u stanicama MDA-MB-231.

Pojedini proteini za koje je zabilježena razlika u izolatima fokalnih adhezija, a nije zabilježena razlika u staničnim lizatima, prisutni su i u drugim odjeljcima u stanci te to može biti razlog za ovakav rezultat. Primjerice, za kinazu fokalne adhezije (pFAK (Y397)) poznato

je da ulazi u sastav fokalne adhezije kada dođe do vezanja integrina i liganda u izvanstaničnom matriksu. Budući da se fokalne adhezije stvaraju uz staničnu membranu, istraživanja pokazuju i da proteini koji ih čine lokaliziraju na staničnoj periferiji. Tako se pFAK(Y397) u normalnim uvjetima nalazi na krajevima aktinskih filamenata, a tek neznatne količine tog proteina prisutne su u jezgri. Kada dođe do promjena uvjeta, primjerice zbog korištenja inhibitora kinaze fokalne adhezije ili stresa izazvanog reaktivnim kisikovim vrstama, može doći do povećane lokalizacije proteina FAK u jezgri stanice.<sup>[60]</sup> U uzorcima proteina fokalnih adhezija dobivenim iz stanica sa stabilno utišanim integrinom  $\alpha v$  metodom western blot utvrđena je smanjena količina kinaze fokalne adhezije (FAK). No, s obzirom na to da FAK nije potvrđen spektrometrijom masa već je smanjenje količine FAK-a u fokalnim adhezijama potvrđeno samo metodom western blot, treba provesti dodatne eksperimente kako bi se potvrdio taj rezultat.

Prekomjerna ekspresija proteina FAK primijećena u velikom broju tumora, uključujući i karcinom dojke, što je povezano i s lošijim kliničkim ishodom. Nadalje, za ovaj protein poznato je i da ima važnu ulogu u rastu i napretku karcinoma dojke, kao i da doprinosi invazivnosti i metastatskom potencijalu karcinoma dojke.<sup>[34,61]</sup> Uzimajući u obzir te činjenice, očekivano je da će smanjenje količine pFAK-a (Y397) ili pak njegov potpuni gubitak dovesti do povećanja osjetljivosti stanica na protatumorske lijekove i smanjenje agresivnosti tumora, no pokazano je da se često događa upravo suprotno – gubitak FAK-a dovodi do otpornosti na paklitaksel.<sup>[62]</sup> Ovaj protein potreban je za stabilizaciju mikrotubula inducirana proteinima iz izvanstaničnog matriksa, stoga njegov gubitak može dovesti do smanjenja broja polimeriziranih mikrotubula, na koje paklitaksel primarno djeluje. Na staničnoj liniji MDA-MB-231 i ranije je pokazano da utišavanjem FAK-a pomoću specifične siRNA dolazi do značajne otpornosti na apoptozu izazvanu paklitakselom.<sup>[14,62]</sup>.

Prijašnja, neobjavljena istraživanja grupe u kojoj je izrađen ovaj rad potvrdila su promjenu u proteinu liprin- $\beta 1$  u adhesoru stanica melanoma MDA-MB-435S nakon utišavanja integrina  $\alpha v$ , a, kao što je vidljivo na slici 12, ovaj protein potvrđen je sada i u stanicama MDA-MB-231, te je pokazana njegova smanjena količina nakon utišavanja integrina  $\alpha v$  metodom western blot. Međutim, spektrometrijom masa u stanicama MDA-MB-231 nije potvrđen ovaj protein, pa bi trebalo dodatnim metodama provjeriti smanjenje njegove ekspresije, kao i ovisnost o integrinu  $\alpha v$ .

Liprin- $\beta 1$  nije dio konsenzusnog adhesoma napravljenom na fibronektinu<sup>[12]</sup>, no moguće je da će daljnja istraživanja potvrditi ulogu ovog proteina u adhesoru integrina  $\alpha v$ .

Proteini iz obitelji liprina (engl. *LAR-interacting protein*) ostvaruju interakcije s obitelji transmembranskih tirozin-fosfataza LAR (engl. *Leukocyte common antigen-related*) za koje se zna da su bitne za razvoj mlijecnih žljezda. Smatra se da liprini pomažu lokalizirati LAR u blizinu fokalnih adhezija. Nadalje, moguće je da liprini čak sudjeluju u rastavljanju fokalnih adhezija.<sup>[63]</sup> Liprin- $\alpha$ 1 pojačano je eksprimiran u karcinomima dojke i čini važan dio mreže proteina koji povećavaju invazivnost karcinoma *in vitro* tako da liprin- $\alpha$ 1 potiče invazivnost na vodećem kraju migrirajuće tumorske stanice te potiče degradaciju izvanstaničnog matriksa. Poznato je da stanice MDA-MB-231 eksprimiraju liprin- $\alpha$ 1 i da taj protein potiče metastaziranje u mišjim modelima. Osim liprina- $\alpha$ 1, stanice MDA-MB-231 eksprimiraju i oba liprina iz  $\beta$  podskupine. Istraživanja upućuju na to da liprin- $\beta$ 1 i liprin- $\beta$ 2 imaju oprečne uloge. Liprin- $\beta$ 1 *in vitro* pokazuje doprinos pokretljivosti tumorskih stanica dok liprin- $\beta$ 2 smanjuje pokretljivost i invazivnost tumorskih stanica *in vitro*.<sup>[64]</sup> Unatoč tome što je uloga liprina- $\alpha$ 1 u invazivnosti i metastaziranju tumora poznata, kao i uloga liprina- $\beta$ 2 u smanjenju invazivnosti tumora, uloga liprina- $\beta$ 1 još je uvelike neistražena i predstavlja zanimljiv predmet za daljnja istraživanja.

U uzorcima adhesoma stanica 231sh $\alpha$ v analizom metodama spektrometrije mase i western blot očita je jako smanjena količina  $\alpha$ -aktinina, unatoč tome što je u staničnom lizatu prisutna ista količina  $\alpha$ -aktinina kao kod stanica MDA-MB-231 i stanica 231sh. Spektrometrijom masa potvrđeno je da dolazi do smanjenja količine  $\alpha$ -aktinina u adhesoru stanica 231sh $\alpha$ v budući da prosječni broj spektara za  $\alpha$ -aktinin-4 u stanicama 231sh iznosi 47, a u stanicama 231sh $\alpha$ v iznosi 9 (tablica D1, slika 13), dok za  $\alpha$ -aktinin-1 prosječni broj spektara u stanicama 231sh iznosi 34, a u stanicama 231sh $\alpha$ v iznosi 5,25 (tablica D1, slika 13).  $\alpha$ -aktinin je protein uključen u regulaciju aktina i stoga bitan kao veza između signala koji dolazi iz izvanstaničnog matriksa preko fokalnih adhezija i citoskeleta i smatra se da on modulira citoplazmatsku pokretljivost i sile koje dovode do pokretanja stanice.<sup>[65]</sup> Smatra se da se  $\alpha$ -aktinin ugrađuje u fokalne adhezije u ranim fazama adhezije stanica i dinamika  $\alpha$ -aktinina regulira rast fokalnih adhezija preko interakcije s drugim adhezijskim proteinima, kao što su ziksin i paksilin.<sup>[66]</sup> Budući da je  $\alpha$ -aktinin u uzorcima proteina fokalnih adhezija iz ovih klonova vrlo malo, moguće je da, iako proteina fokalnih adhezija u stanici ima, ne dolazi do stvaranja fokalnih adhezija i prijenosa signala upravo jer nema dovoljno  $\alpha$ -aktinina u ranim stadijima formiranja fokalnih adhezija.

Metodom western blot potvrđen je rezultat dobiven spektrometrijom masa i utvrđeno je da je količina filamina u adhesomu stanica 231sh<sub>a</sub>v također smanjena. Prosječni broj spektara koji odgovaraju filaminu-A u stanicama 231sh iznosi 80,75, a u stanicama 231sh<sub>a</sub>v iznosi 20,75 (tablica D1, slika 12). Za filamin-B prosječni broj spektara pada s 76,5 u stanicama 231sh na svega 10,25 u stanicama 231sh<sub>a</sub>v (tablica D1, slika 12). Podatci za filamin-C slijede isti trend: prosječni broj spektara u stanicama 231sh iznosi 20,25 dok u stanicama 231sh<sub>a</sub>v filamin-C nije detektiran (tablica D1, slika 12).

Količina filamina u adhesomu je bitna za vezu fokalnih adhezija s aktinskim citoskeletom, budući da su filamini obitelj proteina koji vežu aktinske filamente i smatra se da filamini imaju ulogu u rastavljanju fokalnih adhezija. Dapače, istraživanja pokazuju da utišavanje filamina A smanjuje migraciju i invazivnost karcinoma dojke i regulira rastavljanje fokalnih adhezija preko MAPK/ERK signalnog puta. Iako je mišljenje da su filamini bitni za mehaniku i pokretanje stanice uvelike prihvaćeno, neka istraživanja pokazuju da potpuno utišavanje filamina A nema velikog utjecaja na smanjenje pokretljivosti, pa je uloga filamina u stanici još donekle nepoznata i otvorena za daljnja istraživanja.<sup>[67]</sup>

Metodama spektrometrije masa i western blot pokazano je da je količina vinkulina u adhesomu stanica 231sh<sub>a</sub>v smanjena (slika 12). Prosječni broj spektara pripisanih vinkulinu u stanicama 231sh iznosi 10,25, dok u stanicama 231sh<sub>a</sub>v prosječni broj spektara iznosi tek 1,75 (tablica D1, slika 12). Vinkulin je otprije poznat kao citoplazmatski protein koji veže aktin i često je obogaćen u uzorcima fokalnih adhezija. Novija istraživanja upućuju na to da vinkulin ima ulogu i u generiranju sila u stanici, regulaciji jačine adhezije te da sudjeluje u regulaciji apoptoze i adheziji između stanica posredovanoj kadherinima, a ne samo integrinima s kojima je dosada ovaj protein često bio povezivan.<sup>[68]</sup> U fokalnim adhezijama, vinkulin sudjeluje u procesima izgradnje i razgradnje fokalnih adhezija, njihovoј jačini i prijenosu sila kroz fokalne adhezije. Mehanizmi aktivacije, odnosno inaktivacije, vinkulina još uvijek nisu sasvim poznati, kao ni mehanizmi koji dovode do novačenja vinkulina u fokalne adhezije i njegovog otpuštanja iz njih.<sup>[68]</sup> S obzirom na to da je pokazano da vinkulin ima puno uloga u stanici, uključujući adheziju između stanica i izvanstaničnog matriksa posredovanu integrinima, adheziju između stanica posredovanu kadherinima te regulaciju apoptoze, potrebno je te mehanizme otkriti kako bi se mogli iskoristiti za bolje razumijevanje tumora te primijeniti za razvijanje boljih terapija.<sup>[69]</sup>

Smanjenje količine pPAX(Y113) u adhesomu stanica 231sh<sub>a</sub>v utvrđeno je metodom western blot (slika 14), no ovaj rezultat nije potvrđen spektrometrijom masa. Paktilin (PAX) je multifunkcionalni protein koji se sastoji od nekoliko domena i član je obitelji proteina koja se još sastoji od proteina Hic-5 i leupaksina. Radi se o adaptornom proteinu fokalnih adhezija koji, nakon aktivacije fosforilacijom određenih tirozinskih i serinskih ostataka, sudjeluje u okupljanju strukturnih i signalnih proteina fokalnih adhezija. Paktilin je potreban ne samo za sazrijevanje fokalnih adhezija, već i za njihovo rastavljanje te zbog toga on može imati i pozitivne i negativne efekte na pokretljivost stanice.

Budući da je uvelike povezan s reguliranjem pokretljivosti stanice, paktilin je uključen i u imunosni odgovor, epitelnu morfogenezu i razvoj embrija. Nadalje, paktilin je vrlo važan u patološkim procesima poput oksidativnog stresa, upale te razvoja i metastaziranja tumora. Zbog svojih različitih uloga u stanici paktilin je eksprimiran u gotovo svim tkivima i uglavnom lokaliziran u fokalnim adhezijama, no dio paktilina u stanici lokaliziran je i u citoplazmi te jezgri. Paktilin u jezgri može utjecati na transkripciju gena te predstavlja izravnu poveznicu između izvanstaničnog matriksa, stanične membrane, citoskeleta i jezgre.<sup>[70,71]</sup> Budući da rezultati predstavljeni u ovom radu sugeriraju smanjenu količinu paktilina u uzorcima fokalnih adhezija, moguće je da utišavanje integrina αV uzrokuje povećanu lokalizaciju paktilina u citoplazmi ili jezgri jer su količine paktilina u staničnom lizatu stanica s utišanim integrinom αV slične količinama paktilina u stanicama MDA-MB-231 i stanicama transficiranim praznim plazmidom pSUPER.puro – razlika je prisutna jedino u uzorcima proteina fokalnih adhezija.

Opet, ovaj protein nije u značajnoj mjeri pronađen u eksperimentima spektrometrije masa i treba provesti dodatne eksperimente da bi se utvrdio utjecaj utišavanja integrina αV na količinu paktilina u fokalnim adhezijama, ukoliko takav utjecaj postoji. Moguće je da utišavanje integrina αV samo uzrokuje da u stanicama nastaje manje fokalnih adhezija nego u normalnim uvjetima pa je time smanjena i migratorna sposobnost stanica, ali i količina proteina koji sudjeluju u stvaranju i održavanju fokalnih adhezija.

Zadnji protein za koji posjedujemo paralelne rezultate western blota u lizatima stanica i izolatima fokalnih adhezija te spektrometrije masa u stanicama 231sh<sub>a</sub>v i 231sh je kinaza povezana s integrinima (ILK). Metodom western blot utvrđeno je smanjenje količine ovog proteina u adhesomu stanica 231sh<sub>a</sub>v, što je potvrđeno i spektrometrijom masa budući da u uzorcima dobivenim iz stanica 231sh<sub>a</sub>v nije detektiran ILK.

ILK je serin/treonin-specifična kinaza uključena u regulaciju interakcije stanice i izvanstaničnog matriksa. Primjećeno je kako prekomjerna ekspresija ILK-a dovodi do povećane proliferacije, pokretljivosti i invazivnosti stanica u velikom broju tumora. Utišavanje ILK-a specifičnom siRNA u stanicama tumora gušteriće dovodi do smanjene fosforilacije nizvodnih proteina, poput proteina Akt i MLC, a smanjuje se i migracija stanica.<sup>[72]</sup> ILK ostvaruje interakcije s više proteina među kojima su citoplazmatske domene podjedinice integrina  $\beta 1$  i  $\beta 3$ , adaptorni proteini (npr. PINCH, paksilin) katalitički proteini (npr. PKB/Akt).<sup>[73]</sup> Na C-kraju ILK-a nalazi se kinazna domena na koju se vežu  $\beta$  podjedinice integrina, a na N-kraju nalaze se domene preko kojih ILK ostvaruje interakcije s drugim proteinima. N-kraj ILK-a također je zaslužan za regulaciju lokalizacije ILK-a u fokalnim adhezijama. Točna uloga ILK-a u karcinomu je donekle nepoznata – postoje istraživanja koja ukazuju na to da prekomjerna ekspresija ILK-a uzrokuje apoptozu u stanicama epitela te da dolazi do smanjenja adhezije tih stanica na podlogu, no, s druge strane, niz istraživanja pokazuje da ILK doprinosi preživljjenju stanica karcinoma dojke. Nadalje, pokazano je kako ILK pod utjecajem citokina potiče nastanak metastaza te je u mnogim zločudnim tumorima, uključujući karcinom dojke, primjećena povećana ekspresija ILK-a. Osobe koji imaju tumore s povećanom ekspresijom ILK-a imaju znatno lošije prognoze od onih kod kojih je ekspresija ILK-a vrlo mala ili je uopće nema, no uloga ILK-a u razvoju i napredovanju tumora puno je kompleksnija no što izgleda budući da niz istraživanja govori i o njegovoj ulozi tumor-supresora.<sup>[40,74]</sup> Iz rezultata prikazanih u ovom radu jasno je kako utišavanjem integrina  $\alpha v$  dolazi do smanjenja količine ILK-a u fokalnim adhezijama (potvrđeno metodom western blot i MS-om), što je možda samo rezultat smanjenja količine njegovih interakcijskih partnera, primjerice paksilina, koji sudjeluje u sastavljanju i sazrijevanju fokalnih adhezija.

Spektrometrijom masa je otkriveno nekoliko drugih proteina koji bi mogli biti zanimljivi za daljnja istraživanja. Utišavanjem integrina  $\alpha v$  dolazi do smanjenja količine plektina, talina, miozina-9, moezina (tablica D1) za koje je poznato da imaju uloge u pokretljivosti stanica i adheziji bilo preko direktnog sudjelovanja u fokalnim adhezijama posredovanim integrinom  $\alpha v$  kao što je slučaj kod talina<sup>[75]</sup> ili preko interakcija s citoskeletom, kao što je slučaj kod plektina<sup>[76]</sup>, miozina<sup>[77]</sup> i moezina<sup>[78]</sup>.

Kako bi se dobiveni rezultati potvrdili i nedoumice oko nekih proteina razriješile trebalo bi napraviti dodatne eksperimente. Prvenstveno bi trebalo razriješiti razliku u proteinima adhesoma nakon prolazne i stabilne transfekcije slijedom specifičnim za integrin  $\alpha v$ . Nakon

toga bi trebalo identificirati adhesome pojedinih integrina korištenjem proteina izvanstaničnog matriksa kao što su vitronektin, a dolazi u obzir i korištenje imobiliziranih specifičnih protutijela za heterodimer integrina koja bi omogućila izolaciju adhesoma nastalog samo od kompleksa jednog integrina. Nakon toga mogla bi uslijediti funkcionalna analiza svake pojedine komponente kompleksa adhezije integrina što se, s obzirom na broj proteina u ovim kompleksima, ne čini lakim zadatkom. Integrini prema tome ostaju i dalje vjerni svom imenu da integriraju signale u stanicu i stoga su zanimljivi u istraživanju mnogih procesa u normalnim stanicama. Međutim, zbog promjenjenog repertoara integrina u stanicama tumora oni ostaju i dalje potencijalne mete za terapiju.

## § 5. ZAKLJUČAK

- Iz stanica MDA-MB-231 izdvojeni su klon 231sh<sup>a</sup> s utišanom podjedinicom integrina  $\alpha v$  i kontrolni klon 231sh. U stanicama 231sh<sup>a</sup>, u odnosu na stanice MDA-MB-231 i klon 231sh, potvrđena je smanjena ekspresija integrina  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  na površini stanica.
- Stanice 231sh<sup>a</sup> pokazuju smanjenu osjetljivost na protutumorske lijekove cisplatinu i paklitaksel u odnosu na staničnu liniju 231sh, što je u suprotnosti s rezultatima prolaznog utišavanja integrina  $\alpha v$ . Ovakav rezultat može biti posljedica kompenzacijskih događaja u staniči pri izdvajaju stabilnih transfektanata kao što je preslagivanje integrina.
- U izolatima fokalnih adhezija stanica 231sh spektrometrijom masa identificirano je 426 proteina. Za 107 tih proteina utvrđeno je da pripadaju skupini proteina povezanih s fokalnim adhezijama, a 95 ih pripada skupini proteina povezanih s izvanstaničnim matriksom.
- Spektrometrijom masa pokazano je da su u izolatima fokalnih adhezija stanica 231sh<sup>a</sup> 17 proteina prisutno u manjoj količini u odnosu na izolate fokalnih adhezija stanica 231sh.
- U adhesoru stanica 231sh u najvećoj količini prisutan je integrin  $\alpha v$ , a zatim integrini  $\beta 1$  i  $\beta 5$ , dok u adhesoru stanicama 231sh<sup>a</sup> integrin  $\alpha v$  nije detektiran, a integrini  $\beta 1$  i  $\beta 5$  detektirani su u vrlo malim količinama. Na temelju ovoga zaključeno je da su različito eksprimirani proteini dio adhesora integrina  $\alpha v$ .
- U izolatima fokalnih adhezija stanica 231sh<sup>a</sup> je metodom western blot potvrđena smanjena ekspresija nekoliko proteina identificiranih spektrometrijom masa u odnosu na izolate fokalnih adhezija stanica 231sh. Osim toga pokazana je i smanjena ekspresija liprin- $\beta 1$ , kinaze fokalne adhezije i paksilina koji nisu identificirani spektrometrijom masa.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APS	amonijev persulfat
ARS	otopina za prikupljanje fokalnih adhezija (engl. <i>Adhesion Recovery Solution</i> )
BSA	albumin iz seruma goveda (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<i>c</i>	množinska koncentracija [mol dm <sup>-3</sup> ]
DMEM	Dulbeccova modifikacija Eagleove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DMSO	dimetilsulfoksid
DTBP	dimetil-3,3'-ditiobispropionimidat
DTT	1,4-ditiotreitol
ER	receptor estrogena (engl. <i>Estrogen Receptor</i> )
ERK	kinaza regulirana vanstaničnim signalom (engl. <i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i> )
ESI	Ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>Electrospray Ionisation</i> )
FAK	kinaza fokalne adhezije (engl. <i>Focal Adhesion Kinase</i> )
FCS	fetalni goveđi serum (engl. <i>Fetal Calf Serum</i> )
$\gamma$	masena koncentracija [g dm <sup>-3</sup> ]
HDAC	deacetilaza histona (engl. <i>Histone Deacetylase</i> )
HER2	receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> )
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>Horseradish Peroxidase</i> )
ILK	kinaza povezana s integrinima (engl. <i>Integrin-Linked Kinase</i> )
MAP	protein aktiviran mitogenom (engl. <i>Mitogen Activated Protein</i> )
MCS	višestruko mjesto za kloniranje (engl. <i>Multiple Cloning Site</i> )
MS	spektrometrija masa
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
PARP	polimeraza poli(ADP-riboze) (engl. <i>Poly(ADP-ribose) Polymerase</i> )
PAX	paksilin (engl. <i>Paxillin</i> )

PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> )
PR	receptor progesterona (engl. <i>Progesteron Receptor</i> )
RGD	slijed arginin-glicin-aspartat
RIPA	radioimunoprecipitacija (engl. <i>Radioimmunoprecipitation</i> )
SDS	natrijev dodecilsulfat (engl. <i>Sodium Dodecylsulfate</i> )
SDS-PAGE	diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (engl. <i>Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SRP	čestica za prepoznavanje signala (engl. <i>Signal Recognition Particle</i> )
TEMED	<i>N, N, N, N-tetrametiletilendiamin</i>
TGF-β	transformirajući faktor rasta β (engl. <i>Transforming Growth Factor β</i> )
TNBC	trostruko negativni karcinom dojke (engl. <i>Triple Negative Breast Cancer</i> )
VASP	fosfoprotein stimuliran vazodilatorom (engl. <i>Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein</i> )

## § 7. LITERATURNI IZVORI

- [1] M. D. Allen, G. J. Thomas, S. Clark, M. M. Dawoud, S. Vallath, S. J. Payne, J. J. Gomm, S. A. Dreger, S. Dickinson, D. R. Edwards, et al., *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 344–357.
- [2] <https://www.cancer.gov/>, 20. 6. 2018.
- [3] D. C. Temian, L. A. Pop, A. I. Irimie, I. Berindan-Neagoe, *J. Breast Cancer* **2018**, *21*, 233–243.
- [4] E. Musta, N. Jonji, K. Rajkovi, M. Avirovi, *Med. Flumiensis* **2016**, *52*, 357–361.
- [5] M. L. Plasilova, B. Hayse, B. K. Killelea, N. R. Horowitz, A. B. Chagpar, D. R. Lannin, *Medicine (Baltimore)*. **2016**, *95*, e4614.
- [6] W. A. W. Karima Oualla, Heba M. El-Zawahry, Banu Arun, James M. Reuben, N. T. U. and T. M. F. Heba Gamal El-Din, Bora Lim, Nawfel Mellas, *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2017**, *9*, 493–511.
- [7] E. A. O'Reilly, L. Gubbins, S. Sharma, R. Tully, M. H. Z. Guang, K. Weiner-Gorzel, J. McCaffrey, M. Harrison, F. Furlong, M. Kell, et al., *BBA Clin.* **2015**, *3*, 257–275.
- [8] K. J. Chavez, S. V Garimella, S. Lipkowitz, *Breast Dis.* **2010**, *32*, 35–48.
- [9] A. Manninen, M. Varjosalo, *Proteomics* **2017**, *17*, 1–42.
- [10] S. M. Weis, D. A. Cheresh, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2011**, *1*, 1–14.
- [11] J. Desgrosellier, C. David, *Cancer, Nat Rev* **2015**, *10*, 9–22.
- [12] E. R. Horton, A. Byron, J. A. Askari, D. H. J. Ng, A. Millon-Frémillon, J. Robertson, E. J. Koper, N. R. Paul, S. Warwood, D. Knight, et al., *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1577.
- [13] K. A. Jansen, P. Atherton, C. Ballestrem, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *71*, 75–83.
- [14] N. Stojanović, A. Dekanić, M. Paradžik, D. Majhen, K. Ferenčak, J. Ruščić, *Mol. Pharm.* **2018**, u postupku objavljanja.
- [15] D. Hanahan, R. a Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–74.
- [16] J. Mendelsohn, P. M. Howley, M. A. Israel, J. W. Gray, C. B. Thompson, A. J. Levine, W. Hu, Z. Feng, *Mol. Basis Cancer* **2008**, 31–38.
- [17] <https://pathology.jhu.edu/breast/my-results/types-of-breast-cancer/>, 5. 10. 2018.
- [18] M. Akram, M. Iqbal, M. Daniyal, A. U. Khan, *Biol. Res.* **2017**, *50*, 33.
- [19] G. Bianchini, J. M. Balko, I. A. Mayer, M. E. Sanders, L. Gianni, *Nat. Rev. Clin.*

- Oncol.* **2017**, *13*, 674–690.
- [20] Shaloam Dasari and Paul Bernard Tchounwou, *Eur J Pharmacol* **2014**, *5*, 364–378.
- [21] M. B. Hampton, S. Orrenius, *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 552–6.
- [22] A. Shrivastava, P. M. Kuzontkoski, J. E. Groopman, A. Prasad, *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1161–1172.
- [23] A. Brozovic, D. Majhen, V. Roje, N. Mikac, S. Jakopec, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriovic-Ristov, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 298–306.
- [24] J. Anampa, D. Makower, J. A. Sparano, *BMC Med.* **2015**, *13*, 1–13.
- [25] B. A. Weaver, *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 2677–2681.
- [26] R. Rouzier, C. M. Perou, W. F. Symmans, N. Ibrahim, M. Cristofanilli, K. Anderson, K. R. Hess, J. Stec, M. Ayers, P. Wagner, et al., *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 5678–5685.
- [27] D. F. Hayes, A. D. Thor, L. G. Dressler, D. Weaver, S. Edgerton, D. Cowan, G. Broadwater, L. J. Goldstein, S. Martino, J. N. Ingle, et al., *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 1496–1506.
- [28] I. Ojima, B. Lichtenthal, S. Lee, C. Wang, X. Wang, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 1–20.
- [29] ECACC, *Eur. Collect. Cell Cult.* **2017**, *2780*, 87092802.
- [30] A. Hollestelle, Æ. J. H. A. Nagel, Æ. M. Smid, Æ. S. Lam, Æ. F. Elstrodt, M. Wasielewski, Æ. S. Sue, N. Æ. Pim, J. F. Æ. Justine, K. P. Æ. Marieke, et al., *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *121*, 53–64.
- [31] M. B. Srichai, R. Zent, in *Cell-Extracellular Matrix Interact. Cancer*, Springer New York, New York, NY, **2010**, pp. 19–41.
- [32] I. D. Campbell, M. J. Humphries, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 1–15.
- [33] L. Pan, Y. Zhao, Z. Yuan, G. Qin, *Springerplus* **2016**, *5*, DOI 10.1186/s40064-016-2502-0.
- [34] E. H. J. Danen, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 881–91.
- [35] M. Nieberler, U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H. J. Wester, M. Schwaiger, M. Weinmüller, A. Räder, K. Steiger, H. Kessler, *Cancers (Basel)*. **2017**, *9*, 1–33.
- [36] M. Christmann, K. Diesler, D. Majhen, C. Steigerwald, N. Berte, H. Freund, N. Stojanović, B. Kaina, M. Osmak, A. Ambriović-ristov, et al., *Oncotarget* **2017**, *8*, 27754–27771.

- [37] A. Bianchi-Smiraglia, S. Paesante, A. V. Bakin, *Oncogene* **2013**, *32*, 3049–3058.
- [38] I. Eke, N. Cordes, *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *31*, 65–75.
- [39] K. M. Moore, G. J. Thomas, S. W. Duffy, J. Warwick, R. Gabe, P. Chou, I. O. Ellis, A. R. Green, S. Haider, K. Brouilette, et al., *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*
- [40] B. Wehrle-Haller, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 116–124.
- [41] “<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/focal-adhesion>”, 21. 6. 2018.
- [42] <http://www.reading.ac.uk/cellmigration/adhesion.htm>, 21. 6. 2018.
- [43] E. Dickreuter, N. Cordes, *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 721–735.
- [44] A. Brozovic, D. Majhen, V. Roje, N. Mikac, S. Jakopec, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriovic-Ristiv, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 298–306.
- [45] N. Stojanović, A. Brozovic, D. Majhen, M. H. Bosnar, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriović-Ristov, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 1969–1978.
- [46] F. Aoudjit, K. Vuori, *Oncogene* **2001**, *20*, 4995–5004.
- [47] A. Taherian, X. Li, Y. Liu, T. A. Haas, *BMC Cancer* **2011**, *11*, 293.
- [48] A. Ambriovic-Ristov, J. Gabrilovac, T. Cimbora-Zovko, M. Osmak, *Int J Cancer* **2004**, *110*, 660–667.
- [49] J. G. Parvani, A. J. Galliher-Beckley, B. J. Schiemann, W. P. Schiemann, *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 3449–3459.
- [50] H. H. Truong, J. Xiong, V. P. S. Ghotra, E. Nirmala, S. E. Le Dévédec, H. E. Balciolu, S. He, B. Ewa, E. Vreugdenhil, J. H. N. Meerman, et al., *Sci. Signal.* **2014**, *7*, ra15.
- [51] K. Ćuljak, Karakterizacija adhesoma u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 nakon *de novo* ekspresije integrina  $\alpha v\beta 3$ , **2018**.
- [52] A. Byron, J. D. Humphries, J. a Askari, S. E. Craig, a P. Mould, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **20AD**, *122*, 4009–4011.
- [53] M. Millard, S. Odde, N. Neamati, *Theranostics* **2011**, *1*, 154–188.
- [54] T. Lautenschlaeger, J. Perry, D. Peereboom, B. Li, A. Ibrahim, A. Huebner, W. Meng, J. White, A. Chakravarti, *Radiat. Oncol.* **2013**, *8*, 1.
- [55] E. R. Horton, J. D. Humphries, J. James, M. C. Jones, J. A. Askari, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 4159–4163.
- [56] D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44–57.
- [57] D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1–13.
- [58] J. Robertson, G. Jacquemet, A. Byron, M. C. Jones, S. Warwood, J. N. Selley, D.

- Knight, J. D. Humphries, M. J. Humphries, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6265.
- [59] J. D. Humphries, M. R. Chastney, J. A. Askari, M. J. Humphries, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *56*, 14–21.
- [60] S.-T. S. Lim, *Mol. Cells* **2013**, *36*, 1–6.
- [61] H. Yoon, J. P. Dehart, J. M. Murphy, S. T. S. Lim, *J. Histochem. Cytochem.* **2015**, *63*, 114–128.
- [62] A. A. Ahmed, A. D. Mills, A. E. K. Ibrahim, J. Temple, C. Blenkiron, M. Vias, C. E. Massie, N. G. Iyer, A. McGeoch, R. Crawford, et al., *Cancer Cell* **2007**, *12*, 514–527.
- [63] C. Serra-Pagès, Q. G. Medley, M. Tang, A. Hart, M. Streuli, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15611–20.
- [64] S. Chiaretti, V. Astro, E. Chiricozzi, I. De Curtis, *Biol. Cell* **2016**, *108*, 65–75.
- [65] A. J. Ehrlicher, R. Krishnan, M. Guo, C. M. Bidan, D. A. Weitz, M. R. Pollak, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 6619–6624.
- [66] N. Ye, D. Verma, F. Meng, M. W. Davidson, K. Suffoletto, S. Z. Hua, *Exp. Cell Res.* **2014**, *327*, 57–67.
- [67] Y. Xu, T. A. Bismar, J. Su, B. Xu, G. Kristiansen, Z. Varga, L. Teng, D. E. Ingber, A. Mammoto, R. Kumar, et al., *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 2421–37.
- [68] A. Carisey, C. Ballestrem, *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 157–163.
- [69] J. L. M. Xiao Peng, Elke S. Nelson, K. A. DeMali, *Int Rev Cell Mol Biol* **2011**, *1*, 191–203.
- [70] A. M. López-colomé, I. Lee-rivera, R. Benavides-hidalgo, E. López, *J. Hematol. Oncol.* **2017**, 1–15.
- [71] M. D. Schaller, *Oncogene* **2001**.
- [72] L. A. Shirley, S. McCarty, M. Yang, X. Zhang, J. Phay, M. D. Ringel, S. Chen, T. O. State, *Surgery* **2016**, *159*, 163–170.
- [73] C. Wu, S. Dedhar, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 505–510.
- [74] C. V Hinton, S. Avraham, H. K. Avraham, *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 1517–26.
- [75] B. Klapholz, N. H. Brown, *J. Cell Sci.* **2017**, jcs.190991.
- [76] N. Bonakdar, A. Schilling, M. Spörrer, P. Lennert, A. Mainka, L. Winter, G. Walko, G. Wiche, B. Fabry, W. H. Goldmann, *Exp. Cell Res.* **2015**, *331*, 331–7.
- [77] E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2015**, *1853*, 3132–3142.
- [78] M. Arpin, D. Chirivino, A. Naba, I. Zwaenepoel, *Cell Adh. Migr.* **2011**, *5*, 199–206.

- [79] A. I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4646–58.
- [80] W. Zhou, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, *Cancer Genomics Proteomics* **2012**, *9*, 135–42.
- [81] J. M. Matthews, K. Lester, S. Joseph, D. J. Curtis, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 111–122.
- [82] L. Zhang, J. H. L. Fok, F. E. Davies, *Oncotarget* **2014**, *5*, 1132–48.
- [83] K. L. Pennington, T. Y. Chan, M. P. Torres, J. L. Andersen, *Oncogene* **2018**, 1–18.
- [84] <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ferm-domain>, 29. 9.2018.

## § 8. DODATAK

### 8.1. Spektrometrija masa

Uzorci su naneseni u jažice gela za elektroforezu (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm) i elektroforeza je provođena dok uzorci nisu ušli u gel (3 min, 200 V). Da bi se mogle lako vizualizirati proteinske vrpce gel se boji bojom InstantBlue. Željene vrpce s proteinima izrezane su iz gela i proveden je postupak ispiranja željenih komadića gela te odbojavanja. Komadići gela zatim su inkubirani s 50% acetonitril / 50% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ( $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) otopine u bunarićima pločice s 96 bunarića. Inkubacija je trajala 30 minuta pri sobnoj temperaturi.

Nakon 30 minuta otopina je uklonjena centrifugiranjem pri 1500 rpm 2 minute. Postupak inkubacije komadića gela u 50% acetonitril / 50% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ( $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) otopini i centrifugiranja ponovljen je još jednom. Komadićima gela dodana je otopina acetonitrila kako bi se gel dehidrirao. Komadići gela držani su u acetonitrilu 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je acetonitril uklonjen centrifugiranjem.

Dodatno sušenje komadića gela rađeno je centrifugiranjem u vakuumu 20-30 minuta. Proteini su reducirani inkubacijom s otopinom DTT-a ( $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) pri 56°C u trajanju od 60 minuta. Nakon redukcije, otopina DTT-a uklonjena je centrifugiranjem, a proteini su zatim alkilirani inkubacijom s otopinom jodoacetamida ( $c = 55 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) pri 37°C u mraku, u trajanju od 45 minuta. Jodoacetamid je uklonjen centrifugiranjem, a komadići gela su zatim isprani otopinom NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ( $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je uklonjena centrifugiranjem, a komadići gela ponovno osušeni acetonitrilom, isprani otopinom NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ( $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), osušeni acetonitrilom i zatim centrifugiranjem u vakuum centrifugi. Donja pločica s 96 bunarića zamjenjena je novom, koja će kasnije poslužiti za eluaciju peptida. Komadići gela inkubirani su s otopinom tripsina ( $\gamma = 1,25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) 45 minuta pri 4°C, a zatim preko noći pri 37°C. Idući dan su peptidi skupljeni u donju pločicu s 96 bunarića centrifugiranjem, a zatim ekstrahirani iz komadića gela inkubacijom s otopinom 99,8% (v/v) acetonitril / 0,2% mravlja kiselina pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Ponovnim centrifugiranjem otopina peptida je spuštena u donju pločicu s 96 bunarića. Otopine peptida tada su osušene kako bi se peptidi ukoncentrirali. Sušenje je provedeno u vakuum centrifugi

(40-50 minuta, više po potrebi). Suhi peptidi su resuspendirani u 5%-tnom acetonitrilu u 0,1%-tnoj mravljoj kiselini. Ovako pripremljeni uzorci mogu se čuvati pri -20°C do upotrebe.

Prije analize, uzorci su odsoljeni. Za postupak odsoljavanja, pripremljena je pločica s 96 bunarića s PVDF membranom debljine 0,2 µm i u svaki bunarić stavljene su POROS R3 kuglice. Tomu je dodan 50%-tni (v/v) acetonitril te su kuglice i otopina dobro promiješani, a pločica je zatim centrifugirana na jednu minutu pri sobnoj temperaturi. Otopina je bačena, a u bunariće je dodana 0,1%-tna otopina mravlje kiseline, promiješana, centrifugirana i otopina je bačena. U bunariće je dodan uzorak, promiješan, centrifugiran i otopina je bačena. Zatim je dodana 0,1%-tna otopina mravlje kiseline, ponovljen je isti postupak i dodana je otopina za eluiranje peptida (50% (v/v) acetonitril u 0,1% (v/v) mravljoj kiselini). Postupak centrifugiranja ponovljen je još jednom, ali ovoga puta je otopina zadržana. Postupak elucije ponovljen je još jednom.

Pripremljeni uzorci su analizirani metodom LC-MS/MS. Smjese peptida eluirane su korištenjem gradijenta od 92% otopine A (0,1%-tna mravlje kiseline u vodi) i 8% otopine B (0,1%-tna otopine mravlje kiseline u acetonitrilu) do 33% otopine B u 44 minute. Protok otapala namješten je na 300 nL min<sup>-1</sup>. LC sustav vezan je na Orbitrap Elite detektor masa. Kao metoda ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionisation*, ESI). Podatci su analizirani korištenjem baze podataka Mascot (Matrix science, inačica 2.5.1). Pretraživana je baza podataka Swissprot za proteine čovjeka (inačica 2018\_01, 161629 unosa). Tolerancija za masu prekursora i fragmenata namještena je na 5 PPM, odnosno 0,50 Da. Dobiveni rezultat validirani korištenjem programa Scaffold (inačica 4.8.7. za operativni sustav Mac OS X, Proteome Software). Spektri su identificirani korištenjem algoritma *Scaffold local FDR* uz prag vjerojatnosti 95%. Za identifikaciju proteina korištena je vjerojatnost iznad 99% i prepoznavanje minimalno dva karakteristična peptida. Za ovaj postupak korišten je algoritam *Protein prophet*.<sup>[79]</sup>

Da bi bilo lakše procijeniti količinu proteina korištena je metoda poznata pod nazivom *spectral counting*, tj. određivanje količine proteina u uzorku prema broju identificiranih spektara. Smatra se da je količina proteina u uzorku velika ukoliko postoji deset i više identificiranih njegovih spektara, umjerena ukoliko postoji između dva i deset identificiranih njegovih spektara, a količina proteina u uzorku je mala ukoliko je broj identificiranih spektara za taj protein manji od dva. Ova metoda je semi-kvantitativna budući da ne uzima u obzir veličinu proteina, tj. duljinu njegovog aminokiselinskog slijeda. Nadalje, da bi procjena

količine proteina u uzorku bila točnija, u obzir bi trebalo uzeti i metodu koja je korištena za dobivanje molekulskih iona i koliko je učinkovita fragmentacija početnog proteina. Naime, svi ovi faktori utječu na konačni broj spektara koji će biti dobiven za dani protein.<sup>[80]</sup>

Ukupno je identificirano 426 proteina i njihov popis, zajedno s prosječnim brojem spektara i pripadnim standardnim devijacijama dan je u tablici D1. Pomoću baze podataka DAVID i *Functional Annotation Gene Ontology* alata 107 od tih proteina identificirano je kao skupina proteina fokalnih adhezija s P-vrijednošću  $3,1 \times 10^{-85}$ , odnosno korigiranom Benjamini vrijednošću  $7,2 \times 10^{-83}$  dok je 95 proteina svrstano u skupinu proteina izvanstaničnog matriksa a P-vrijednošću  $2,1 \times 10^{-82}$ , odnosno korigiranom Benjamini vrijednošću  $3,2 \times 10^{-80}$ .

Pomoću alata *Gene Functional Classification*, također dostupnom u bazi podataka DAVID, napravljena je funkcionalna podjela proteina fokalnih adhezija, odnosno proteina izvanstaničnog matriksa. Rezultati su prikazani u tablicama D2, D3, D4 i D5.

**Tablica D1. Proteini identificirani u stanicama 231sh i 231sh<sup>av</sup>. 25,6% ovih proteina su proteini fokalnih adhezija, dok proteini izvanstaničnog matriksa čine 22,7% ukupnog broja proteina.**

#	Gen	Protein	Pristupni broj (UniProt)	Molekulsa masa	Broj spektara								Prosječni broj spektara 231sh	Standardna devijacija 231sh		
					231 shav	231sh	231 shav	231sh	231 shav	231sh	231 shav	231sh				
1	CYR61	Protein CYR61	CYR61_HUMAN (+1)	42 kDa	70	58	50	80	49	50	45	73	53,5	65,25	9,70824392	11,8611762
2	PXDN	Peroxidinas homolog	PXDN_HUMAN	165 kDa	41	51	41	65	77	63	70	62	57,25	60,25	16,4373812	5,44862368
3	FLNA	Filamin-A	FLNA_HUMAN	281 kDa	13	107	7	44	42	62	21	110	20,75	80,75	13,2358415	28,4901299
4	PLEC	Plectin	PLEC_HUMAN	532 kDa	4	121	0	54	18	57	5	102	6,75	83,5	6,75925292	28,8140591
5	MYH9	Myosin-9	MYH9_HUMAN (+1)	227 kDa	15	84	11	47	41	47	12	77	19,75	63,75	12,3566784	16,9318487
6	FLNB	Filamin-B	FLNB_HUMAN	278 kDa	9	111	0	35	20	60	12	100	10,25	76,5	7,15454401	30,5655034
7	VIM	Vimentin	VIME_HUMAN (+1)	54 kDa	13	56	12	21	32	42	25	64	20,5	45,75	8,38152731	16,3152536
8	KRT1	Keratin 1	H6VRF8_HUMAN (+4)	66 kDa	31	32	43	34	47	30	34	24	38,75	30	6,49519053	14,7465739
9	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN (+5)	42 kDa	16	33	15	21	30	26	28	42	22,25	30,5	6,79613861	7,88986692
10	ACTN4	Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN (+1)	105 kDa	8	55	4	22	15	32	9	79	9	47	3,93700394	22,0113607
11	THBS1	Thrombospondin-1	THSP1_HUMAN	129 kDa	26	25	26	31	33	28	25	26	27,5	27,5	3,20156212	2,29128785
12	TLN1	Talin-1	TLN1_HUMAN (+1)	271 kDa	9	59	4	27	21	33	11	59	11,25	44,5	6,17960355	14,6543509
13	ANXA2	Anxinin	A0A024RSZ7_HUMAN (+1)	39 kDa	22	31	18	31	24	17	24	37	22	29	2,44948974	7,34846923
14	AHNK	Neuroblast differenti	AHNK_HUMAN	629 kDa	0	59	0	9	6	34	0	56	1,5	39,5	2,59807621	20,0810856
15 -		Matrix metalloprote	QSTZP0_HUMAN	54 kDa	15	44	4	47	4	46	5	36	7	43,25	4,63680925	4,32290412
16	TMIP3	Metalloproteinase	TMIP3_HUMAN	24 kDa	20	25	18	29	22	24	14	26	18,5	26	2,95803989	1,87082869
17	ALB	Serum albumin	ALBU_HUMAN (+5)	69 kDa	28	15	29	21	15	20	10	23	15,25	5,78791845	3,89711432	
18	EDIL3	EGF-like repeat and c	EDIL3_HUMAN	54 kDa	16	13	14	17	27	18	23	14	20	15,5	5,24404424	2,06155281
19	CTGF	Connective tissue gr	CTGF_HUMAN (+3)	38 kDa	25	17	22	29	19	16	22	19	22	20,25	2,12302304	5,16599458
20	MSN	Moesin	MOES_HUMAN (+1)	68 kDa	15	23	9	23	20	14	14	27	14,5	21,75	3,90512484	4,76313972
21	TUBB	Tubulin beta chain	Q55U16_HUMAN (+1)	50 kDa	4	32	9	13	19	16	22	40	13,5	25,25	7,29725975	11,16633557
22	KRT10	Keratin, type I cytosk	K1C10_HUMAN	59 kDa	16	19	19	22	27	16	18	18	20	18,75	4,18330013	2,16506351
23 -		Tubulin alpha chain	TBA1B_HUMAN (+1)	46 kDa	8	24	4	8	19	11	20	31	12,75	18,5	6,90561366	9,39414711
24	TNC	TNC variant protein	( Q4LE33_HUMAN (+1)	244 kDa	7	10	8	11	29	16	23	9	16,75	11,5	9,49670996	2,6925824
25	GAPDH	Glyceraldehyde-3-ph	G3P_HUMAN (+1)	36 kDa	7	20	8	14	18	12	24	18	14,25	16	7,08431366	3,16227766
26	PLAT	Tissue-type plasmino	TPA_HUMAN (+1)	63 kDa	13	18	9	15	8	17	6	17	9	16,75	2,54950976	1,08972474
27	KRT9	Keratin, type I cytosk	K1C9_HUMAN	62 kDa	13	11	18	19	30	15	14	13	18,75	14,5	6,75925292	2,95803989
28	HSP8	Heat shock cognate 70	HSPC7_HUMAN (+1)	71 kDa	4	25	0	14	17	11	21	24	10,5	18,5	8,7321246	6,10327781
29	HTRA1	Serine protease HTR	HTRA1_HUMAN	51 kDa	19	8	16	14	22	10	18	11	18,75	10,75	2,16506351	2,16506351
30	VTN	Vitronectin	VTNC_HUMAN (+1)	54 kDa	10	17	12	16	19	15	13	18	13,5	16,5	3,35410197	1,11803399
31	HIST1H1E	Histone 1, H1c	A3R0T8_HUMAN (+2)	22 kDa	5	8	13	17	16	13	13	8	11,75	11,5	4,08503366	3,77491722
32	ANXA1	Anxin A1	ANXA1_HUMAN (+1)	39 kDa	6	15	6	17	17	13	12	21	10,25	16,5	4,60298816	2,95803989
33	EFL1A1	Elongation factor 1-a	EFL1A1_HUMAN (+5)	50 kDa	8	16	11	12	13	9	16	17	12	13,5	2,91547555	3,20156212
34	SERPINE1	Plasminogen activator	PAI1_HUMAN (+1)	45 kDa	7	15	5	13	9	11	5	20	6,5	14,75	1,6583124	3,34477204
35	KRT8	Keratin, type II cytosk	K2C8_HUMAN	54 kDa	8	28	6	14	10	14	8	22	8	19,5	1,41421356	5,89491306
36	KRT2	Keratin, type II cytosk	K2E2_HUMAN	65 kDa	17	10	22	25	20	13	19	11	19,5	14,75	1,80277564	6,01560471
37	ENO1	Alpha-enolase	ENO1A_HUMAN (+1)	47 kDa	5	14	4	3	13	7	17	23	9,75	11,75	5,44862368	7,59522877
38	HIST1H2BD	Histone H2B	A0A024QZ77_HUMAN (+1)	14 kDa	12	8	9	13	11	6	14	10	11,5	9,25	1,80277564	2,58602011
39	SLC7A2	Slc7 homolog 2 protei	SLC7A2_HUMAN (+1)	170 kDa	0	21	0	21	4	18	3	13	1,75	18,25	1,78535711	3,28917421
40	RPS23	Protein	PRS23_HUMAN (+1)	43 kDa	8	7	6	14	12	11	4	9	7,5	10,25	2,95803989	2,58602011
41	SPTAN1	Spectrin, alpha, non-	A0A024R889_HUMAN (+3)	282 kDa	0	24	0	0	3	8	0	30	0,75	15,5	1,2903811	12,9312094
42	RPL32	60S ribosomal protel	RIL2_HUMAN (+3)	16 kDa	8	6	7	11	10	9	8	12	8,25	9,5	1,08972474	2,29128785
43	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-tr	PPIA_HUMAN (+2)	18 kDa	6	10	5	4	10	7	14	15	8,75	9	3,56195171	4,0620192
44	IQGAP1	Ras GTPase-activating	IQGAP1_HUMAN (+2)	189 kDa	0	23	0	4	3	9	0	27	0,75	15,75	1,29093811	9,5299848
45	PKM	Pyruvate kinase PKM	PKM_HUMAN (+1)	58 kDa	5	5	0	7	13	4	20	14	9,5	7,5	7,63216876	3,90512484
46	FNC	Filamin-C	FNC_HUMAN	291 kDa	0	29	0	5	0	19	0	28	0	20,25	0	20,25
47	TFPI2	Tissue factor pathway	TFPI2_HUMAN	27 kDa	8	9	9	11	10	8	4	8	7,75	9	2,2776084	1,22474487
48	RPS27A	Ubiquitin-40S riboso	RPS27A_HUMAN	18 kDa	5	10	3	8	9	6	12	7	7,25	7,75	3,49106001	3,47901995
49	ACTN1	Alpha-actinin-1	ACTN1_HUMAN (+1)	103 kDa	8	40	0	14	13	23	0	59	5,25	34	5,53962995	17,1901134
50	C4A	Complement C4-A	C04A_HUMAN (+1)	193 kDa	7	8	8	10	5	6	8	7	7,75	7,75	1,22474487	1,47901995
51	SPTBN1	Spectrin beta chain	A0A087WUZ3_HUMAN (+2)	275 kDa	0	19	0	0	5	8	0	24	1,25	12,75	2,16506351	9,3641604
52	KRT18	Keratin, type I cytosk	K1C18_HUMAN (+2)	48 kDa	0	13	0	6	6	8	2	25	2	13	2,44947894	7,38241153
53	KRT14	Keratin, type I cytosk	K1C14_HUMAN	52 kDa	7	10	12	9	17	6	10	6	11,5	7,75	3,64005495	1,78535711
54	LAMAS	Laminin subunit alpha	LAMAS_HUMAN	400 kDa	4	3	7	6	12	3	15	4	9,5	4	4,2700187	1,22474487
55	CLIC1	Chloride intracellular	CLIC1_HUMAN (+3)	27 kDa	3	10	2	6	7	6	6	13	4,5	8,75	2,06155281	2,94745653
56	A2M	Alpha-2-macroglobu	A2MG_HUMAN	163 kDa	8	5	9	6	7	3	7	4	7,75	4,5	0,8291562	1,11803399
57	VCL	Vinculin	VINC_HUMAN (+2)	124 kDa	2	18	2	4	3	5	0	14	1,75	10,25	1,08972474	5,93190526
58	HIST1H4H	Histone H4	B2R4R0_HUMAN (+2)	11 kDa	8	5	3	5	10	5	8	11	7,25	6,5	2,58602011	2,59807621
59 -		cDNA FU5J3698, high	TFIIS292_HUMAN	79 kDa	6	8	5	6	7	6	7	8	6,25	7	0,8291562	1
60	HNRNP	Heterogeneous nucle	A0A087X0X3_HUMAN (+3)	78 kDa	0	2	0	0	2	2	11	3	3,25	1,75	4,54831535	1,08972474
61	DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1D	YH1C1_HUMAN	532 kDa	0	9	0	0	3	0	4	11	1,75	5	1,78535711	5,04975247
62	NOG	NOGgin	NOGG_HUMAN (+1)	26 kDa	7	8	5	7	6	7	5	6	5,75	7	0,8291562	0,70710678
63	ADAMTS1	A disintegrin and me	AT51_HUMAN (+2)	105 kDa	4	4	5	7	4	6	5	5	4,5	5,5	0,5	1,11803399
64	PLAU	Urokinase-type plas	UROK_HUMAN (+4)	49 kDa	3	6	6	11	7	6	4	5	5	7	1,58113883	2,34520788
65	H3F3B	Histone H3	B2R4P9_HUMAN (+5)	15 kDa	6	4	4	5	5	5	7	5	5,5	4,75	1,11803399	0,4330127
66	C3	Complement C3	C03_HUMAN (+1)	187 kDa	6	7	6	5	5	4	6	0	5,75	4	0,4330127	2,54950976
67	HSP90AB1	Heat shock protein 9	A0A024RD80_HUMAN (+2)	83 kDa	3	13	2	4	6	0	4	20	3,75	9,25	1,47901995	7,79021823
68	RPS8	40S ribosomal protei	R58_HUMAN (+1)	24 kDa	6	8	4	8	3	7	5	5	4,5	7	1,11803399	1,22474487
69	RPL23A	60S ribosomal protel	RL23A_HUMAN	18 kDa	6	4	5	8								

70 F2	Prothrombin	THRB_HUMAN (+1)	70 kDa	10	7	6	4	7	6	6	4	7,25	5,25	1,63935963	1,2903811	
71 PLG	Plasminogen	A0A0F7G8J1_HUMAN	91 kDa	4	5	3	6	4	5	7	4	5,5	5,5	0,70710678	1,11803399	
72 HBA2	Mutant hemoglobin: A0A0K2BMD8_HUMAN (+7)	15 kDa	7	4	5	8	5	6	3	0	5	4,5	1,41421356	2,95803989		
73 TFPI	Tissue factor pathway: TFP1_HUMAN	35 kDa	6	6	5	7	6	6	8	6	6,25	6,25	1,08972474	0,4330127		
74 LMNA	Prelaminin-A/C	LMNA_HUMAN	74 kDa	2	6	2	5	9	5	10	3	5,75	4,75	3,76662979	1,08972474	
75 CLTC	Clathrin heavy chain	CLH1_HUMAN (+1)	192 kDa	0	13	0	0	2	3	0	16	0,5	8	0,8660254	6,67083203	
76 CRISPLD2	Cysteine-rich secretory CRLD2_HUMAN (+2)	56 kDa	8	0	5	5	10	0	5	0	7	1,25	2,12132034	2,16506351		
77 RPL27A	Ribosomal protein L2 Q5N252_HUMAN (+1)	16 kDa	5	4	6	6	6	6	4	5	5,25	5,25	0,8291562	0,8291562		
78 AGRN	Aggrin	AGRIN_HUMAN	217 kDa	2	0	6	3	9	3	8	2	6,25	2	2,68095132	1,22474487	
79 FASN	Fatty acid synthase	FAS_HUMAN (+1)	273 kDa	0	16	0	0	0	0	2	14	0,5	7,5	0,8660254	7,53325959	
80 RPL26	60S ribosomal protel RL26_HUMAN (+4)	17 kDa	4	4	5	7	5	2	5	2	4,75	3,75	0,4330127	2,04633819		
81 LAMB3	Laminin subunit beta	LAMB3_HUMAN (+1)	130 kDa	2	4	0	7	4	4	0	7	1,5	5,5	1,6583124	1,5	
82 TN33	Tensin-3	TENS3_HUMAN	155 kDa	0	8	0	6	0	5	0	11	0	7,5	0	2,29128785	
83 H1FO	Histone H1.0	H1O_HUMAN	21 kDa	5	2	4	8	6	4	3	3	4,5	4,25	1,11803399	2,2776084	
84 F5	Coagulation factor V	FAS5_HUMAN (+1)	252 kDa	3	4	4	6	4	3	7	3	4,5	4	1,22474487		
85 POSTN	Postostin	POSTN_HUMAN (+2)	93 kDa	2	6	4	6	3	3	4	3	4,75	4,75	0,70710678	1,29093811	
86 COL8A1	Collagen alpha-1(VIII)C08A1_HUMAN	73 kDa	3	0	2	4	4	4	3	5	3	3,25	3,25	0,70710678	1,92028644	
87 LDHA	L-lactate dehydrogenase	LDHA_HUMAN (+1)	37 kDa	2	2	3	0	2	0	9	5	4	1,75	2,91547595	2,04633819	
88 EEF2	Elongation factor 2	EF2_HUMAN	95 kDa	0	10	0	0	0	3	4	13	1	6,5	1,73205081	5,22015325	
89 LTPB4	Latent-transforming	LTPB4_HUMAN (+1)	173 kDa	2	0	4	0	10	0	8	0	6	0	3,16227766	0	
90 RPS24	40S ribosomal protel RS24_HUMAN (+2)	15 kDa	5	3	5	6	6	4	3	5	4,75	4,5	1,08972474	1,11803399		
91 SERPINC1	Antithrombin-III	ANT3_HUMAN (+2)	53 kDa	6	4	3	4	4	0	4	2	4,25	2,5	1,08972474	1,6583124	
92 HIST2H2AA3	Histone H2A type 2-H2A2A_HUMAN (+1)	14 kDa	5	3	4	3	6	4	4	4	4,75	3,5	0,8291562	0,5		
93 NTSE	S'-nucleotidase	SNTD_HUMAN (+3)	63 kDa	0	2	0	8	3	2	3	8	1,5	5	1,5	3	
94 RAC1	Ras-related C3 botulli RAC1_HUMAN (+3)	21 kDa	4	5	2	4	3	3	2	3	3,5	3,5	0,70710678	1,11803399		
95 ITIH2	Inter-alpha-trypsin in ITIH2_HUMAN (+3)	106 kDa	6	2	7	4	3	4	3	2	4,75	3	1,78535711	1		
96 KRT6C	Keratin, type II cytoski K2C6C_HUMAN	60 kDa	8	13	9	12	12	9	0	5	7,25	9,75	4,43705894	3,11247479		
97 RPL6	60S ribosomal protel RL6_HUMAN (+4)	33 kDa	3	4	2	9	2	2	0	3	1,75	4,5	1,08972474	2,6925824		
98 RPL36A	60S ribosomal protel J3KQN4_HUMAN (+1)	16 kDa	3	0	3	7	4	7	5	0	3,75	3,5	0,8291562	3,5		
99 EEF1G	Elongation factor 1-g	EF1G_HUMAN (+1)	50 kDa	3	4	2	3	4	4	5	7	3,5	4,5	1,11803399	1,5	
100 PLG	Plasminogen	PLMN_HUMAN (+1)	91 kDa	7	6	0	8	6	6	5	4	4,5	6	2,6925824	1,41421356	
101 KRT5	Keratin, type II cytoski K2C5_HUMAN	62 kDa	8	10	10	13	14	8	9	0	10,25	7,75	2,2776084	4,81534007		
102 DKK1	Dickkopf-related pro DKK1_HUMAN (+1)	29 kDa	4	0	6	4	6	3	4	3	5	2,5	1	1,5		
103 SEMA3C	Semaphorin-3c	SEMC3_HUMAN (+1)	85 kDa	4	3	4	0	4	2	3	3	3,75	2	0,4330127	1,22474487	
104 RPL29	60S ribosomal protel RL29_HUMAN (+2)	18 kDa	5	0	2	6	5	3	2	4	3,5	3,25	1,5	2,16506351		
105 HSPA1B	Heat shock 70 kDa pr A0ADGZJW1_HUMAN (+5)	70 kDa	3	6	0	5	6	4	6	8	3,75	5,75	2,48746859	1,47901995		
106 -	Neuropilin-1 variant	Q5PF20_HUMAN (+2)	100 kDa	0	2	0	2	5	3	0	9	1,25	4	2,16506351	2,91547595	
107 RPL18	60S ribosomal protel J3QQ67_HUMAN	22 kDa	5	3	2	5	3	6	3	3	3,25	4,25	1,08972474	1,29093811		
108 GSXO1	Sulphydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN (+3)	83 kDa	0	6	2	4	5	4	3	5	2,5	4,75	1,80277564	0,8291562	
109 EIF4A1	Eukaryotic initiation	EIF4A1_HUMAN (+1)	46 kDa	0	5	0	0	2	2	2	12	1	4,75	1	4,54831535	
110 RPS3	40S ribosomal protel RS3_HUMAN	27 kDa	0	6	0	5	0	0	6	6	1,5	4,25	2,59807672	2,48746859		
111 SNRPD3	Small nuclear ribon SMD3_HUMAN	14 kDa	3	3	4	4	4	2	4	3	3,75	3	0,4330127	0,70710678		
112 SERPINE2	Serpin peptidase inhi A0A024RA98_HUMAN (+1)	44 kDa	4	2	3	4	4	4	2	4	3,25	3,5	0,8291562	0,8660254		
113 SLC25A5	ADP/ATP translocase ADT2_HUMAN (+1)	33 kDa	2	2	0	3	3	0	4	8	2,25	3,25	1,47901995	2,94745653		
114 ADAMTS15	A disintegrin and me AT51_HUMAN	103 kDa	4	2	3	3	5	3	4	0	4	2	2,70710678	1,22474487		
115 PGK1	Phosphoglycerate kir	PGK1_HUMAN (+1)	45 kDa	0	4	0	2	2	0	9	7	2,75	3,25	3,69966251	2,58602011	
116 AHSG	Alpha-2-HS-glycopro	FEU1_HUMAN (+1)	39 kDa	2	3	5	4	4	5	4	2	3,75	3,5	1,08972474	1,11803399	
117 ANXA5	Annexin A5	ANXA5_HUMAN (+1)	36 kDa	0	4	0	0	4	0	8	7	3	2,75	3,31662479	2,94745653	
118 -	cDNA FLJ57154, high	B4DMX4_HUMAN	51 kDa	2	6	4	4	2	0	3	3	2,75	3,25	0,8291562	2,18506351	
119 KRT19	Keratin, type I cytoski K1C19_HUMAN	44 kDa	7	13	0	5	0	6	4	12	2,75	9	2,94745653	3,53553393		
120 MVP	Major vault protein	MVP_HUMAN (+1)	99 kDa	0	0	0	0	8	0	7	3	3,75	0,75	3,76662979	1,29093811	
121 PFN1	Profilin-1	PROF1_HUMAN	15 kDa	0	4	0	2	5	2	6	6	2,75	3,5	2,77263413	1,6583124	
122 RPS26	40S ribosomal protel RS26_HUMAN (+1)	13 kDa	5	0	4	4	3	2	4	3	4	2,25	0,70710678	1,47901995		
123 LGAL51	Galectin-1	LEG1_HUMAN	15 kDa	0	5	2	4	5	0	3	5	2,5	3,5	1,80277564	2,06155281	
124 TGFBI	Transforming growth	A0A052Z4Q2_HUMAN (+3)	75 kDa	5	2	0	2	6	0	4	0	3,75	1	2,2776084	1	
125 MYL6	Myosin light polypep	B7Z624_HUMAN (+5)	27 kDa	0	5	0	2	2	6	0	6	0,5	4,75	0,8660254	1,63935963	
126 RPL8	60S ribosomal protel RL8_HUMAN	28 kDa	3	0	0	5	3	0	4	2	2,5	1,75	1,5	2,04633819		
127 RAN	GTP-binding nuclear	B5MDF5_HUMAN (+2)	26 kDa	0	5	2	4	2	2	3	5	1,75	4	1,08972474	1,22474487	
128 TPM3	Tropomyosin 3 isofo	A0A052Z4G4_HUMAN (+3)	29 kDa	0	3	0	0	0	2	0	8	0	3,25	0	2,94745653	
129 CORO1C	Coronin-1C	COR1C_HUMAN (+5)	53 kDa	0	8	0	0	0	0	6	0	7	0	5,25	0	3,1124749
130 RPL34	60S ribosomal protel RL34_HUMAN (+1)	13 kDa	3	0	0	3	0	4	0	2	0,75	2,25	1,29903811	1,47901995		
131 SRPX	Sushi repeat-contain	SRPX_HUMAN	52 kDa	5	3	0	2	3	0	0	0	2	1,25	2,12132034	1,29093811	
132 CD55	Complement decay-a	B1AP13_HUMAN	49 kDa	4	0	2	2	3	0	4	0	3,25	0,5	0,8291562	0,8660254	
133 LAMP2	Lamini subunit beta	LAMP2_HUMAN (+1)	196 kDa	0	0	3	2	6	0	6	2	3,75	1	2,48746859	1	
134 YWHAZ	14-3-3 protein zeta/	143Z1_HUMAN (+1)	28 kDa	0	4	0	0	2	3	3	6	1,25	3,25	1,29903811	2,16506351	
135 RPS11	40S ribosomal protel RS11_HUMAN	18 kDa	0	4	2	2	0	0	2	3	1	2,25	1	1,47901995		
136 NTN4	Netrin-4	NET4_HUMAN (+2)	70 kDa	3	3	0	3	0	4	0	4	0,75	3,5	1,29903811	0,5	
137 RPL7A	60S ribosomal protel RL7A_HUMAN	30 kDa	2	2	0	5	0	2	0	3	0,5	3	0,8660254	1,22474487		
138 NACA	Nascent polypeptide	NACAM_HUMAN	205 kDa	0	0	0	5	3	2	2	5	1,25	3	1,29903811	2,12132034	
139 ISOC1	Isochorismatase dom	ISOC1_HUMAN	32 kDa	0	0	0	3	5	0	3	2	2	1,25	2,12132034	1,29093811	
140 MACF1	Microtubule-actin cr	H3BP1_HUMAN (+1)	857 kDa	0	10	0	0	0	0	0	0	3,25	0	4,08503366		

141 C1QTNF3	Complement C1q tur C1QTN3_HUMAN (+2)	27 kDa	3	0	3	2	5	0	3	2	3,5	1	0,8660254	1	
142 RPL35	60S ribosomal protel R135_HUMAN	15 kDa	0	0	2	0	0	2	2	0	1	0,5	1	0,8660254	
143 NM1E1-NME2	Nucleoside diphosph Q32Q12_HUMAN (+1)	33 kDa	0	2	0	0	2	0	3	6	1,25	2	1,29903811	2,44948974	
144 RPL24	60S ribosomal protel R124_HUMAN (+3)	18 kDa	4	0	0	3	0	3	3	3	1,75	2,25	1,7835711	1,29903811	
145 CPNE1	Copine-1	B0QZ18_HUMAN (+2)	60 kDa	0	2	0	2	0	0	2	4	0,5	2	0,8660254	1,41421356
146 FN1	Fibronectin	FINC_HUMAN	263 kDa	0	0	2	2	2	0	3	0	1,75	0,5	1,08972474	0,8660254
147 ITGB5	Integrin beta-5	ITBS_HUMAN (+1)	88 kDa	0	0	0	6	2	2	0	5	0,5	3,25	0,8660254	2,384848
148 TUBB4B	Tubulin beta-4B chail TBB4B_HUMAN (+1)	50 kDa	0	26	0	0	18	15	0	33	4,5	18,5	7,79422263	12,4599358	
149 EZR	Ezrin	EZRL_HUMAN (+3)	69 kDa	0	17	0	0	0	7	0	14	0	9,5	0	6,5764732
150 PRDX1	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN (+1)	22 kDa	0	5	0	0	0	3	4	6	1	3,5	1,73205081	2,29128785
151 HSPAS	78 kDa glucose-regul GRP78_HUMAN (+1)	72 kDa	0	0	0	0	5	0	6	9	2,75	2,25	2,77263413	3,8971432	
152 RPS9	40S ribosomal protel R59_HUMAN (+1)	23 kDa	0	0	0	2	0	2	0	3	0	1,75	0	1,08972474	
153 FAU	40S ribosomal protel RS30_HUMAN (+1)	7 kDa	0	0	4	3	3	3	2	0	2,25	1,5	1,47901995	1,5	
154 RPL7	60S ribosomal protel RL7_HUMAN (+2)	29 kDa	2	2	0	3	2	2	2	2	1,5	2,25	0,8660254	0,4330127	
155 -	cDNA FLJ76554, high A8K309_HUMAN	39 kDa	0	3	0	4	4	3	3	0	1,75	2,5	1,7835711	1,5	
156 HNRNPA2B1	Heterogeneous nucle R0A2_HUMAN	37 kDa	0	0	0	0	0	0	5	5	1,25	1,25	2,16506351	2,16506351	
157 TIM2	Metalloproteinase in TIMP2_HUMAN (+2)	24 kDa	0	2	0	3	0	3	0	3	0	2,75	0	0,4330127	
158 ADAMTS1	ADAMTS-like protein AT1L_HUMAN	193 kDa	5	0	3	0	4	0	5	0	4,25	0	0,8291562	0	
159 GC	Vitamin D-binding pr VTDB_HUMAN (+2)	53 kDa	3	0	2	2	0	3	0	2	1,25	1,75	1,29903811	1,08972474	
160 SERPINF1	Pigment epithelium-C PEDF_HUMAN (+1)	46 kDa	3	2	0	0	4	2	0	3	1,75	1,75	1,7835711	1,08972474	
161 RPL28	60S ribosomal protel RL28_HUMAN (+1)	16 kDa	2	4	0	3	0	4	3	2	1,25	3,25	1,29903811	0,8291562	
162 NCL	Nucleolin	NUCL_HUMAN (+1)	77 kDa	0	3	0	0	6	0	0	2	1,5	1,25	2,59807621	1,29903811
163 HSP90AA1	Heat shock protein H HSP90A_HUMAN (+1)	85 kDa	0	7	0	0	0	0	3	16	0,75	5,75	1,29903811	6,57171973	
164 HSPA9	Stress-70 protein, mi GRP75_HUMAN (+1)	74 kDa	0	0	0	0	4	0	5	5	2,25	1,25	2,27765084	2,16506351	
165 VINC18	50 kDa finger protein 11 VN185_HUMAN	74 kDa	0	5	0	0	0	2	0	4	0	2,75	0	1,92028644	
166 HSPD1	60 kDa heat shock pr CH60_HUMAN (+2)	61 kDa	0	0	0	0	3	0	9	3	3	0,75	3,67423461	1,29903811	
167 RPL20	60S ribosomal protel RL27_HUMAN (+2)	16 kDa	0	2	2	2	2	2	2	2	1,5	2	0,8660254	0	
168 okurib1	Nuclear envelope pr CCD80_HUMAN (+2)	108 kDa	0	0	2	0	5	0	6	0	3,25	0	2,384848	0	
169 PABPC1	Polyadenylate-bindir PABP1_HUMAN (+4)	71 kDa	2	3	0	2	2	0	4	4	2	2,25	1,41421356	1,47901995	
170 LAMA3	Laminin subunit alpha1 LAMA3_HUMAN (+1)	367 kDa	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	1,73205081	0	
171 RDX	Radixin	RADL_HUMAN (+1)	69 kDa	0	17	0	16	0	8	0	15	0	14	0	3,53553391
172 CAP1	Adenyl cyclase-assc D3DP2U2_HUMAN (+4)	52 kDa	0	5	0	0	0	2	0	6	0	3,25	0	2,384848	
173 THSD4	Thrombospondin ty THSD4_HUMAN	112 kDa	0	0	6	0	4	0	4	0	3,5	0	2,17944947	0	
174 RPS15A	40S ribosomal protel RS15A_HUMAN (+2)	15 kDa	0	2	2	2	2	2	3	2	1,75	2	1,08972474	0	
175 RPS23	40S ribosomal protel RS23_HUMAN (+1)	16 kDa	0	0	3	2	2	3	0	0	1,25	1,25	1,29903811	1,29903811	
176 RPL5	Ribosomal protein LS A2RUM7_HUMAN (+4)	34 kDa	0	4	0	3	0	0	2	2	0,5	2,25	0,8660254	1,47901995	
177 RPL22	60S ribosomal protel RL22_HUMAN (+1)	15 kDa	3	4	0	3	0	0	2	2	1,25	2,25	1,29903811	1,47901995	
178 PCBP1	Poly(IrC)-binding pro PCBP1_HUMAN (+1)	37 kDa	0	0	0	0	3	0	0	6	0,75	1,5	1,29903811	2,59807621	
179 IMPDH2	Inosine-5'-monoph HOY4R1_HUMAN (+1)	51 kDa	0	3	0	2	0	2	0	6	0	3,25	0	1,63935963	
180 PLAU	Urokinase plasminogen MOR12_HUMAN (+1)	32 kDa	0	0	3	5	3	0	2	3	2	2	1,22474487	2,12132034	
181 MAP4	Microtubule-associat E7EVAU_HUMAN	245 kDa	0	2	0	0	2	0	4	3	1,5	1,25	1,6583124	1,29903811	
182 PAICS	Phosphoribosylamin AOA024R093_HUMAN (+1)	47 kDa	0	2	0	0	0	0	2	4	0,5	1,5	0,8660254	1,6583124	
183 TP1	Triosephosphate isom TRP1_HUMAN (+1)	31 kDa	0	0	0	0	0	0	4	6	1	1,5	1,73205081	2,59807621	
184 ITGAV	Integrin alpha-V	ITAV_HUMAN (+2)	116 kDa	0	2	0	0	0	0	1	0	2,25	0	2,86138079	
185 ITGB1	Integrin alpha1	ITB1_HUMAN	88 kDa	0	2	0	0	0	0	3	5	0,75	1,75	1,29903811	2,04633819
186 ALDOA	Fruobisphospho ALDOA_HUMAN (+2)	39 kDa	0	0	0	0	0	0	4	5	1	1,25	1,73205081	2,16506351	
187 TKT	Transketolase	TKT_HUMAN (+7)	68 kDa	0	3	0	0	0	0	4	4	1	1,25	1,73205081	1,78535711
188 KRT7	Keratin, type II cytos K27_HUMAN	51 kDa	0	12	0	0	0	0	13	0	7,75	0	5,2141634	0	
189 LTF	Lactoferrin	A0A161I202_HUMAN (+13)	78 kDa	2	0	2	2	0	2	2	2	1,5	1,5	0,8660254	0,8660254
190 SNRBP	Small nuclear ribonu RSMB_HUMAN (+4)	25 kDa	2	2	2	2	2	0	2	3	2	1,75	2	1,08972474	0
191 CFL1	Cofflin-1	COF1_HUMAN (+3)	19 kDa	0	2	0	0	0	0	4	4	1	1,5	1,73205081	1,6583124
192 RPL11	60S ribosomal protel RL11_HUMAN (+2)	20 kDa	2	0	0	0	0	2	0	5	0	2,25	0	1,78535711	0
193 TGFBI2	Transforming growth TGFBI2_HUMAN (+1)	48 kDa	0	0	2	0	3	0	3	0	2	0	1,22474487	0	
194 RPL14	RPL14 protein	Q5PH7_HUMAN	24 kDa	0	2	0	2	2	0	2	3	1	1,75	1	1,08972474
195 SEMA3B	Semaphorin-3B	SEMB3_HUMAN (+3)	83 kDa	2	0	3	0	3	0	2	0	0,5	0	0,5	0
196 AHCY	Adenosylhomocyste SAH_HUMAN (+1)	48 kDa	0	2	0	3	1	0	2	0	1,25	1,25	1,29903811	1,29903811	
197 -	cDNA FLJ90373 fis, h TMP1_HUMAN (+3)	23 kDa	0	4	0	2	0	4	0	0	0	2,5	0	1,6583124	
198 COL4A2	Collagen alpha-2(IV)	CO4A2_HUMAN (+1)	168 kDa	0	3	0	0	0	0	4	4	1	1,75	0	1,78535711
199 Sep-11	Septin-11	D6RERS_HUMAN (+2)	50 kDa	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2	0	2
200 HNRNPK	Heterogeneous nucle R0A1_HUMAN (+2)	51 kDa	0	0	0	0	3	0	5	4	2	1	2,12132034	1,73205081	
201 MYH10	Myosin-10	MYH10_HUMAN	229 kDa	0	15	0	0	0	0	0	11	0	6,5	0	6,65206735
202 PL33	PLST_HUMAN (+2)	71 kDa	0	3	0	0	0	1	0	6	0	2,75	0	2,16506351	
203 CLEC3B	Tetranectin	TETN_HUMAN (+2)	23 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
204 RBP4	Retinol binding prot Q5V3Q_HUMAN (+1)	23 kDa	4	0	0	0	0	0	1	3	0	1,75	0	1,78535711	
205 FST	Follistatin, isoform C1A0A024ZU2_HUMAN (+2)	38 kDa	2	2	0	4	0	0	0	3	0,5	2,25	0,8660254	1,47901995	
206 RPL23	60S ribosomal protel RL23_HUMAN (+4)	15 kDa	0	2	0	0	0	4	3	0	3	1	2	1,73205081	1,22474487
207 RPS18	60S ribosomal protel RS18_HUMAN	18 kDa	0	0	0	0	0	2	0	5	4	1,75	1	2,04633819	1,73205081
208 -	cDNA FLJ53573, high MYO1C_HUMAN (+2)	119 kDa	0	3	0	0	0	0	0	6	0	2,25	0	2,48746859	
209 RPL18A	60S ribosomal protel RL18A_HUMAN (+5)	21 kDa	0	4	0	2	0	2	0	4	0	0	3	0	0
210 RPL30	60S ribosomal protel RL30_HUMAN (+2)	13 kDa	4	2	0	0	0	1	2	0	1	1,5	1,73205081	0,8660254	
211 PRG4	Proteoglycan 4	AOA0U1R2R0_HUMAN	146 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
212 HABP2	Hyaluronan-binding HABP2_HUMAN	63 kDa	2	0	0	5	0	0	0	0	0,5	1,25	0,8660254	2,16506351	
213 FBUN1	Fibulin-1	FBUN1_HUMAN	77 kDa	3	0	3	0	2	0	2	0	2,5	0	0,5	0
214 ANGPTL4	Angiopoietin-related ANGL4_HUMAN	45 kDa	0	2	0	5	0	2	0	4	0	3,25	0	1,29903811	
215 KRT16	Keratin, type I cytos K1C16_HUMAN	51 kDa	0	0	0	0	17	0	0	0	4,25	0	7,36121593	0	
216 PDIM5	PDZ and LM domain AOA024RDEB_HUMAN (+1)	64 kDa	0	3	0	0	0	3	0	4	0	2,5	0	1,75	
217 LOC392748	40S ribosomal protel HOYMV8_HUMAN (+3)	17 kDa	0	2	0	2	2	0	0	3	0,5	1,75	0,8660254	1,08972474	
218 RPL13	60S ribosomal protel RL13_HUMAN (+2)	24 kDa	0	2	0	2	0	2	2	2	0,5	2	0,8660254	0	
219 DDX39B	Spliceosome RNA hel A0A140T9X3_HUMAN (+1)	38 kDa	0	0	0	2	0	0	2	2	0,5	1	0,8660254	1	
220 HBB	Beta-globin	C8C504_HUMAN	16 kDa	2	0	0	3	0	0	0	2	0,5	1,25	0,8660254	1,29903811
221 RPL4	60S ribosomal protel RL4_HUMAN (+2)	48 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0,5	1	0,8660254	1	
222 RHOC	Rho-related GTP-bin RHOC_HUMAN (+2)	22 kDa													

## § 8. Dodatak

248 MYL12A	Myosin regulatory lig M1L2A_HUMAN (+3)	20 kDa	0	4	0	0	0	3	0	4	0	2,75	0	1,63935963	
249 Sep-09	Septin-9	SEPT9_HUMAN (+2)	65 kDa	0	3	0	0	0	0	4	0	1,75	0	1,78535711	
250 ARP4C	Actin-related protein ARP4C_HUMAN	20 kDa	0	2	0	0	0	2	2	2	0,5	1,5	0,8660254	0,8660254	
251 CDC42	Cell division control 1 CDC42_HUMAN (+4)	21 kDa	0	0	2	3	2	0	0	2	1	1,25	1	1,29903811	
252 CRISPLD1	Cysteine-rich secretory B72V9_HUMAN (+1)	35 kDa	3	0	0	0	0	3	0	0	0	1,5	0	1,5	
253 KRT6A	Keratin, type II cytoskeleton K2C6A_HUMAN (+3)	60 kDa	0	0	0	0	0	13	0	0	0	3,25	0	5,62916513	
254 H2AFY	Histone H2A B4D1C3_HUMAN (+1)	22 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	
255 ARF3	ADP-ribosylation factor A0A024R0Y6_HUMAN (+3)	21 kDa	0	0	0	3	2	0	0	0	0,5	0,75	0	0,8660254	
256 CCT8	T-complex protein 1 TCPD_HUMAN (+1)	60 kDa	0	2	0	0	0	0	0	6	0	2	0	2,44948974	
257 LDHB	L-lactate dehydrogenase LDHB_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	0	0	3	0	4	4	1,75	1	1,78535711	
258 -	Rab GDP dissociation GDIB_HUMAN (+2)	51 kDa	0	0	0	0	0	2	0	3	0	1,25	0	1,29903811	
259 -	Testicular tissue prot ADA140VIMD_HUMAN (+1)	117 kDa	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,5	0	1,6583124	
260 PDLM7	PDZ and LIM domain PDLU7_HUMAN	50 kDa	0	4	0	0	0	0	0	6	0	2,5	0	2,59807621	
261 S100A7	Protein S100-A7 S10A7_HUMAN	11 kDa	0	0	0	0	0	8	0	0	0	2	0	3,46410162	
262 -	cDNA FLJ78037, high E3UN46_HUMAN (+2)	20 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0,75	0	1,29903811	
263 COL6A1	Collagen alpha-1(VI) A0A087KQ55_HUMAN (+2)	108 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,5	0	0,8660254	
264 MIF	Macrophage migrat MIF_HUMAN (+1)	12 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0,5	1	0,8660254	
265 RPS2	40S ribosomal prot R52_HUMAN (+2)	31 kDa	0	2	0	0	0	0	3	0	0,75	0,5	1,29903811	0,8660254	
266 ANOS1	Anosmin-1 KALM_HUMAN (+1)	75 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1,73205081	
267 -	cDNA FLJ60461, high PRDX2_HUMAN (+2)	20 kDa	0	3	0	0	0	0	3	3	0,75	1,5	1,29903811	1,5	
268 ANXA6	Annexin (Fragment) A0A052Z2Z6_HUMAN (+3)	76 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0,75	0,5	1,29903811	
269 RNH1	Ribonuclease inhibitor RIN1_HUMAN (+2)	50 kDa	0	3	0	0	0	0	0	5	0	2	0	2,12132034	
270 PDUML1	PDZ and LIM domain PDLU1_HUMAN (+1)	36 kDa	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2	0	2	
271 HAL	Histidine ammonia-lyase HAL_HUMAN	73 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0	
272 RPL21	60S ribosomal prot RL21_HUMAN (+2)	19 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	
273 -	cDNA FLJ75881, high A8KQ82_HUMAN (+1)	85 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,5	0	0,8660254	
274 F10	Cogulation factor X FA10_HUMAN (+1)	55 kDa	2	0	2	2	2	0	0	0	1,5	0,5	0,8660254	0,8660254	
275 HIST1H2B1	Histone H2B A0A024RCJ2_HUMAN (+2)	14 kDa	0	0	0	0	13	0	0	0	0	3,25	0	5,62916513	
276 HNRNP C	Heterogeneous nucleic HNRPC_HUMAN (+15)	34 kDa	0	0	0	0	0	0	3	3	0,75	0,75	1,29903811	1,29903811	
277 SND1	Staphylococcal nucleic A0A140VK49_HUMAN (+5)	102 kDa	0	2	0	0	0	2	0	0	3	0,5	1,25	0,8660254	
278 PGAM1	Phosphoglycerate mi:PGAM1_HUMAN (+4)	29 kDa	0	2	0	0	0	0	3	2	0,75	1	1,29903811	1	
279 DPYSL2	Dihydroxyimidazole DPYL2_HUMAN (+2)	74 kDa	0	2	0	0	0	0	2	0	3	0	1,75	0	1,08972474
280 -	T-complex protein 1 B3KX11_HUMAN (+3)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	
281 Sep-02	Septin-2	SEPT2_HUMAN	41 kDa	0	2	0	0	0	2	0	0	4	0	1,5	
282 LAMC1	Laminin subunit gam LAMC1_HUMAN (+1)	178 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	
283 HSPA4	Heat shock 70 kDa pr A0A087WTS8_HUMAN (+6)	53 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	
284 CNN3	CALPONIN-3 CNN3_HUMAN	36 kDa	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,5	0	1,6583124	
285 RPL9	NPC-A-16 Q53Z07_HUMAN (+3)	22 kDa	0	3	0	2	0	0	0	2	0	1,75	0	1,08972474	
286 SNRPD2	Small nuclear ribonu SMND2_HUMAN	14 kDa	0	0	2	0	2	0	0	0	1	0	1	0	
287 PRC295	Peroxisome proliferator GNC1_HUMAN (+2)	293 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811	
288 HSPH1	Heat shock 105kDa/1A0A024RDQD_HUMAN (+2)	92 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	
289 EIF5A	Eukaryotic translation IF5A_HUMAN (+2)	17 kDa	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1,25	0	2,16506351	
290 PDI4A	Protein disulfide-isom PDI45_HUMAN	48 kDa	0	0	0	0	0	0	3	6	0,75	1,5	1,29903811	2,59807621	
291 HGFC	Hepatocyte growth f D6R4R4_HUMAN (+1)	71 kDa	2	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254	
292 RPS14	40S ribosomal prot RS14_HUMAN	16 kDa	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0,5	1	0,8660254	
293 RPL3	60S ribosomal prot RL3_HUMAN (+7)	46 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	
294 TUBA1C	Tubulin alpha-1C cha TUBA1C_HUMAN (+2)	50 kDa	0	0	0	0	0	16	0	0	29	4	7,25	6,928203254	
295 C9	Complement compor A0A024R035_HUMAN (+1)	53 kDa	3	0	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811	
296 RPS3A	40S ribosomal prot A8K4W0_HUMAN (+3)	30 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0,5	0,75	0,8660254	
297 HSP90B1	Endoplasmic ENPL_HUMAN (+2)	92 kDa	0	0	0	0	0	0	2	3	4	1,25	1	1,29903811	
298 KPNB1	Importin subunit bet IMBL1_HUMAN (+1)	97 kDa	0	1	3	0	0	0	0	3	0	1,5	0	1,5	
299 ZYX	Zyxin ZYX_HUMAN	61 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811	
300 -	T-complex protein 1 TCPD_HUMAN (+1)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	
301 RHO2	Rho-associated prot ROCK2_HUMAN	161 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,8660254	
302 CEL1	Exportin-2 XPO2_HUMAN	110 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0,17320581	
303 -	cDNA FLJ53357, high PSMD2_HUMAN (+1)	99 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1,25	0,216506351	
304 EIF4G1	Eukaryotic translati IF4G1_HUMAN (+8)	175 kDa	0	3	0	0	0	0	0	3	0	1,5	0	1,5	
305 LIMA1	UM domain and actin LIMA1_HUMAN (+3)	85 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811	
306 -	cDNA FLJ58365, wea BTZ2J4_HUMAN (+9)	103 kDa	0	4	0	0	0	0	0	3	0	1,75	0	1,78535711	
307 ATP5B	ATP synthase subunit ATPB_HUMAN (+2)	57 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0,75	0,75	1,29903811	
308 RANBP5	RAN binding protein RANBP5_HUMAN (+2)	124 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	5	0	1,75	0,204633819	
309 -	cDNA FLJ56021, high SYEP_HUMAN (+4)	111 kDa	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,5	0	1,6583124	
310 TMEM33	Transmembrane prot A0A024R9W7_HUMAN (+2)	28 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811	
311 YBX1	Nuclease-sensitive ex YBOX1_HUMAN (+2)	36 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811		
312 RPL10	60S ribosomal prot RL10_HUMAN (+6)	25 kDa	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1	0	1	
313 NPM1	Nucleophosmin isofo A0A052Z491_HUMAN (+3)	33 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1	0	
314 HNRNP C	Heterogeneous nucleic HNRPU_HUMAN (+3)	91 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	
315 THBD	Inter-alpha-trypsin RI A0A087W437_HUMAN (+5)	75 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811		
316 RAB10	Ras-related protein RAB10_HUMAN	23 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	
317 HLA-A	MHC Class I Antigen A0A054XK4_HUMAN (+3)	41 kDa	0	0	0	0	0	2	0	2	2	1	0,5	1	
318 KANK2	KN motif and ankyrin KANK2_HUMAN	91 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811	
319 SERPINH1	Serpin H1 SERPH_HUMAN (+1)	46 kDa	0	0	0	0	0	2	0	3	1	0,75	1	1,29903811	
320 VASP	Vasodilator-stimulat A0A024R0V4_HUMAN (+3)	40 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811	
321 MPO	Myeloperoxidase PERM_HUMAN	84 kDa	0	0	0	0	3	0	0	3	0,75	0,75	1,29903811	1,29903811	
322 AP2A1	AP-2 complex subu AP2A1_HUMAN	108 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811	
323 PRDX6	Peroxiredoxin-6 PRDX6_HUMAN (+1)	25 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0,5	0,75	0,8660254	
324 CAD	CAD protein PYR1_HUMAN (+2)	243 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	
325 DHX9	ATP-dependent RNA DHX9_HUMAN	141 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0,75	0,5	1,29903811	
326 DST	Dystonin DSTY_HUMAN (+3)	861 kDa	0	6	0	0	0	0	0	4	0	2,5	0	2,59807621	
327 -	Chaperonin containi TCPH1_HUMAN (+1)	59 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	
328 S100A6	Protein S100 (Fragm RGN98_HUMAN (+1)	10 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	1,5	0	1,5	0	
329 PPP1R13L	RelA-associated inhibi IASPP_HUMAN (+1)	89 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	
330 -	cDNA FLJ59571, high D3DQ9V_HUMAN (+4)	110 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	
331 EEF1D	Elongation factor 1-6 A0A087X1X7_HUMAN (+5)	69 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081	
332 YWHAE	14-3-3 protein epsilon YWHAE_HUMAN (+3)	29 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811	
333 RPSA	40S ribosomal prot A0A024R2P0_HUMAN (+4)	33 kDa	0	0	0										

355 PRAG1	Tyrosine-protein kini PRAG1_HUMAN	150 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
356 VDAC2	Voltage-dependent a A0A024QZNS_HUMAN (+4)	34 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
357 ANGPTL2	Angiopoietin-like 2, i A0A024R868_HUMAN (+2)	57 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
358 YWHAG	14-3-3 protein gamm 1433G_HUMAN	28 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081
359 TUBB1	Tubulin beta-1 chain TBB1_HUMAN	50 kDa	0	0	0	0	0	6	0	0	0	1,5	0	2,59807621
360 C3orf58	Deleted in autism prc DIA1_HUMAN (+1)	49 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811
361 -	Methylenetetrahydrc A0A024R652_HUMAN (+3)	102 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
362 CORO1B	Coronin A0A024R5K1_HUMAN (+2)	54 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0
363 HYOU1	Hypoxia up-regulate A0A087X054_HUMAN (+3)	105 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
364 TUBB3	Tubulin beta-3 chain TBB3_HUMAN	50 kDa	0	0	0	0	0	0	0	25	0	6,25	0	10,8253176
365 DBN1	Drebrin DRB1_HUMAN	71 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811
366 TAGLN2	Transgelin-2 TAGL2_HUMAN	22 kDa	0	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	1
367 PTX3	Pentraxin-related prc PTX3_HUMAN	42 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0,75	0	1,29903811
368 GSTP1	Glutathione S-transferase GSTP1_HUMAN (+1)	23 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
369 -	Uncharacterized prot H7C49_HUMAN	36 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
370 -	Importin subunit alp1 IMA1_HUMAN (+2)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0,1,29903811
371 -	cDNA FUJ54333, high B4DDU6_HUMAN (+11)	57 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0,1,29903811
372 -	cDNA FUJ51290, high GANAB_HUMAN (+2)	113 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081
373 TNPO1	Transportin 1, isoform A0A024RAM0_HUMAN (+1)	102 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
374 CAPZB	Capping protein (Act B1AK87_HUMAN (+4)	29 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
375 MFGEB	Milk fat globule-EGF A0A024RC55_HUMAN (+6)	43 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,5	0,0,8660254
376 RPL10A	60S ribosomal prot RL10A_HUMAN	25 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
377 GPI	Glyceraldehyde-3-phosphate A0A0A0MTS2_HUMAN (+4)	65 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254
378 ATP5A1	ATP synthase subunit ATPA_HUMAN (+1)	60 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254
379 FHL2	Four and a half LIM 2 FHL2_HUMAN (+6)	32 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
380 SCRIB	Protein scribble hom A0A02GJ5M7_HUMAN (+3)	165 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
381 -	cDNA FUJ60713, high D6RBZD_HUMAN (+5)	35 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
382 SVIL	Supervillin SVIL_HUMAN	248 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
383 ANXA3	Anxinin A3 ANXA3_HUMAN (+1)	36 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
384 DKF2p686F1	Uncharacterized prot A8K3D0_HUMAN (+8)	50 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0,1,73205081
385 EIF3I	Eukaryotic translatio EIF3I_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
386 MDH1	Malate dehydrogena B9A041_HUMAN (+3)	23 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
387 RTCA	tRNA-splicing ligase F RTCB_HUMAN	55 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0,1,29903811
388 ARP1C18	Actin-related protein ARC1B_HUMAN (+1)	41 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
389 TCP1	T-complex protein 1 TCPA_HUMAN	60 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0,1,29903811
390 -	cDNA FUJ76863, high STIP1_HUMAN (+2)	63 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
391 DSP	Desmoplakin DESP_HUMAN	332 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0,5	0	0,8660254	0
392 VCP	Translational endoplas TERA_HUMAN (+2)	89 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	0,1,29903811	
393 GARS	Glycyl-tRNA syntheta A0A090N8G0_HUMAN (+1)	78 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
394 PDCD6IP	Programmed cell dea PDC61_HUMAN (+1)	96 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
395 NAP1L1	Nucleosome assembl A0A024RB87_HUMAN (+14)	45 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
396 -	Stathmin A0A14DV1W2_HUMAN (+3)	20 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
397 ALYREF	THO complex subunit E9PB61_HUMAN (+1)	28 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
398 -	Protein disulfide-isom PDIA3_HUMAN (+3)	55 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
399 RVUBL1	RuvB-like helicase (Fr B5BUB1_HUMAN (+1)	50 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
400 CTNA1	Catenin alpha-1 CTNA1_HUMAN (+4)	100 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
401 IPO4	Importin-4 IPO4_HUMAN (+6)	119 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
402 UNC45A	Protein unc-45 home UN45A_HUMAN (+1)	118 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
403 PSMA2	Proteasome subunit A0A024RA52_HUMAN (+1)	26 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
404 ARP C3	Actin-related protein ARPC3_HUMAN (+3)	21 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
405 ITGA6	Integrin alpha-6 ITA6_HUMAN	127 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
406 RANGAP1	Ran GTPase activating A0A024R1U0_HUMAN (+3)	64 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
407 UTRN	Utriphilin UTRD_HUMAN	394 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,0,8660254
408 TXNRD1	Thioredoxin reducta A0A024RBK9_HUMAN (+11)	68 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0,1,29903811
409 RVUBL2	RuvB-like 2 RVUB2_HUMAN	51 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0,1,29903811
410 -	E3 ubiquitin-protein ITCH_HUMAN (+2)	93 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
411 KPRP	Keratinocyte proline- KPRP_HUMAN	64 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
412 PPP1CC	Serine/threonine-prc A0A024RP2_HUMAN (+12)	37 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
413 SYNCR1	Heterogeneous nucle B7Z645_HUMAN (+4)	52 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
414 TGM2	Protein-glutamine ga TGM2_HUMAN (+3)	77 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0,1,29903811
415 PLEKHG1	Pleckstrin homology A0A024R687_HUMAN (+4)	78 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,0,8660254
416 CCT6A	Chaperonin containi A0A024RD1L_HUMAN (+5)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
417 CAPN51	Calpain small subuni A0A075B7C0_HUMAN (+5)	22 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
418 -	Perilipin A0A14DVIN8_HUMAN (+2)	47 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
419 ATXN10	Ataxin-10 ATX10_HUMAN	53 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
420 CSDE1	Cold shock domain-c CSDE1_HUMAN (+4)	89 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,0,8660254
421 KHSRP	Far upstream elemen FUBP2_HUMAN (+1)	73 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
422 PSMB6	Proteasome subunit PSB6_HUMAN (+1)	25 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
423 RARS	Arginine-tRNA ligase SYRC_HUMAN (+1)	75 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
424 CYTSA	CYTSA protein B2RMV2_HUMAN (+3)	125 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
425 RPS19	40S ribosomal prote B0ZB00_HUMAN (+2)	16 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254
426 G3BP1	Ras GTPase-activating G3BP1_HUMAN (+4)	52 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0,0,8660254

**Tablica D2. Funkcionalna analiza proteina fokalnih adhezija pomoću alata *Gene Functional Classification* pri bazi podataka DAVID.** Korišteni parametri za razvrstavanje proteina su: *similarity term overlap*: 4; *similarity threshold*: 0,30; *initial group membership*: 3; *final group membership*: 3; *multiple linkage threshold*: 0,50.

Skupina	Koeficijent obogaćenja: 33,83	
	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji sudjeluju u kotranslacijskom upućivanju proteina na staničnu membranu ovisno o SRP-u</b>	RL30_HUMAN	Protein L30 (RPL30)
	RS9_HUMAN	Protein S9 (RPS9)
	RL27_HUMAN	Protein L27 (RPL27)
	RS8_HUMAN	Protein S8 (RPS8)
	RS7_HUMAN	Protein S7 (RPS7)
	RL23_HUMAN	Protein L23 (RPL23)
	RL22_HUMAN	Protein L22 (RPL22)
	RL10A_HUMAN	Protein L10a (RPL10A)
	RS4X_HUMAN	Protein S4 (RPS4X)
	GDIB_HUMAN	Inhibitor disocijacije GDP-a <sub>2</sub>
	A8K4W0_HUMAN	Protein S3A (RPS3A)
	RS3_HUMAN	Protein S3 (RPS3)
	J3QQ67_HUMAN	Protein L18 (RPL18)
	RS2_HUMAN	Protein S2 (RPS2)
	RL12_HUMAN	Protein L12 (RPL12)
	Q53Z07_HUMAN	Protein L9 (RPL9)
	RL8_HUMAN	Protein L8 (RPL8)
	RL7A_HUMAN	Protein L7a (RPL7A)
	RL7_HUMAN	Protein L7 (RPL7)
	B0ZBD0_HUMAN	Protein S19 (RPS19)
	AHNK_HUMAN	Nukleoprotein AHNAK
	RL6_HUMAN	Protein L6 (RPL6)
	RS18_HUMAN	Protein S18 (RPS18)
	A2RUM7_HUMAN	Protein L5 (RPL5)
	RL4_HUMAN	Protein L4 (RPL4)

<b>Proteini koji sudjeluju u kotranslacijskom upućivanju proteina na staničnu membranu ovisno o SRP-u</b>	RS17_HUMAN	Protein S17(RPS17)
	RS16_HUMAN	Protein S16 (RPS16)
	RL3_HUMAN	Protein L3 (RPL3)
	PABP1_HUMAN	Protein koji veže poli(A) RNA
	RS14_HUMAN	Protein S14 (RPS14)
	RS13_HUMAN	Protein S13 (RPS13)
	RS11_HUMAN	Protein S11 (RPS11)
<b>Koeficijent obogaćenja: 24,94</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini s LIM domenom*</b>	PDLI7_HUMAN	PDZ i LIM domena 7
	FHL2_HUMAN	LIM domene 2
	ZN185_HUMAN	Protein 185 s LIM domenom
	PDLI1_HUMAN	PDZ i LIM domena 1
	LIMA1_HUMAN	LIM domena i aktin-vezujuća domena 1
	ZYX_HUMAN	Ziksin
	LASP1_HUMAN	LIM i SH3 protein 1
<b>Koeficijent obogaćenja: 15,91</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Obitelj <i>heat shock</i> proteina**</b>	GRP78_HUMAN	Član 5 obitelji A <i>heat shock</i> proteina (HSPA5)
	GRP75_HUMAN	Član 9 obitelji A <i>heat shock</i> proteina (HSPA9)
	HSP7C_HUMAN	Član 8 obitelji A <i>heat shock</i> proteina (HSPA8)
<b>Koeficijent obogaćenja: 15,56</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini s 14-3-3 domenom***</b>	1433Z_HUMAN	Protein koji aktivira tirozin-3-monooksigenazu i triptofan-5-monooksigenazu zeta (YWHAZ)
	1433G_HUMAN	Protein koji aktivira tirozin-3-monooksigenazu i

<b>Proteini s 14-3-3 domenom***</b>		triptofan-5-monooksigenzu gamma (YWHAG)
	1433E_HUMAN	Protein koji aktivira tirozin-3-monooksigenazu i triptofan-5-monooksigenzu epsilon (YWHAE)
<b>Koeficijent obogaćenja: 15,25</b>		
<b>Skupina</b>	<b>Pristupni broj (UniProt)</b>	<b>Protein</b>
<b>Proteini koji sudjeluju u adheziji između stanica</b>	TLN1_HUMAN	Talin 1
	A0A024R0V4_HUMAN	Fosfoprotein stimuliran vazodilatorom (VASP)
	VINC_HUMAN	Vinkulin
<b>Koeficijent obogćenja: 14,71</b>		
<b>Skupina</b>	<b>Pristupni broj (UniProt)</b>	<b>Protein</b>
<b>Proteini koji vežu aktinske filamente</b>	A0A024R5K1_HUMAN	Koronin 1B
	ARC1B_HUMAN	Protein povezan s aktinom (ARPC1B)
	COR1C_HUMAN	Koronin 1C
<b>Koeficijent obogaćenja: 12,26</b>		
<b>Skupina</b>	<b>Pristpuni broj (UniProt)</b>	<b>Protein</b>
<b>Proteini koji drže aktinske filamente pod velikim kutevima</b>	FLNC_HUMAN	Filamin C
	FLNB_HUMAN	Filamin B
	FLNA_HUMAN	Filamin A
<b>Koeficijent obogaćenja: 11,68</b>		
<b>Skupina</b>	<b>Pristpuni broj (UniProt)</b>	<b>Protein</b>
<b>Proteini s FERM domenom****</b>	TLN1_HUMAN	Talin 1
	EZRI_HUMAN	Ezrin
	A0A024R687_HUMAN	Član 2 obitelji fermitina
	MOES_HUMAN	Moezin
	RADI_HUMAN	Radiksin
<b>Koeficijent obogaćenja: 9,75</b>		
<b>Skupina</b>	<b>Pristupni broj (UniProt)</b>	<b>Protein</b>

<b>Kompleks šaperona endoplazmatskog retikuluma</b>	A0A087X054_HUMAN	Protein povećano eksprimiran u hipoksiji 1
	GRP78_HUMAN	Član 5 obitelji <i>heat shock</i> proteina family A
	PPIB_HUMAN	Peptidilprolil-izomeraza B
	ENPL_HUMAN	Član 1 obitelji <i>heat shock</i> proteina 90β
<b>Koeficijent obogaćenja: 7,66</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji vežu aktin</b>	ACTN1_HUMAN	Aktinin-α-1
	DYST_HUMAN	Distonin
	PLEC_HUMAN	Plektin
	ACTN4_HUMAN	Aktinin-α-4
<b>Koeficijent obogaćenja: 6,36</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Membranski receptori</b>	ITB5_HUMAN	Podjedinica integrina β5
	ITB1_HUMAN	Podjedinica integrina β1
	ITA6_HUMAN	Podjedinica integrina α6
	A0A140VJM0_HUMAN	Podjedinica integrina α3
	ITAV_HUMAN	Podjedinica integrina αv

\* Proteini s LIM domenom prepoznati su kao proteini povezani s nizom tumora, uključujući karcinom dojke.<sup>[81]</sup>

\*\* *Heat shock* proteini su šaperoni s ključnom ulogom u smatanju proteina i održavanju proteinske homeostaze u stanici.<sup>[82]</sup>

\*\*\* Proteini s domenom 14-3-3 čine veliku obitelj proteina koja regulira više staničnih signalnih puteva.<sup>[83]</sup>

\*\*\*\* FERM domenu imaju proteini ERM obitelji (ezrin/radiksin/moezin), kao i neki drugi proteini, npr. Talin. Smatra se da ova domena posreduje međumolekulske interakcije.<sup>[84]</sup>

Proteini koji ne pripadaju ni jednoj od gore navedenih skupina prikazani su u tablici D3. Prema korištenoj bazi podataka DAVID, ovi proteini ne pokazuju sličnost ni s jednom skupinom

proteina, a da pri tome sličnost među njima prelazi prag sličnosti (engl. *similarity threshold*) korišten za analizu. Smanjenjem zadane vrijednosti praga više proteina se svrstava u funkcionalne skupine, no tada one postaju preopćenite i ti podatci ne daju značajan doprinos analizi.<sup>[56,57]</sup>

**Tablica D3. Proteini fokalnih adhezija koji nisu svrstani u skupine.**

Pristupni broj (UniProt)	Protein
G3BP1_HUMAN	Faktor sastavljanja G3BP1
IQGA1_HUMAN	IQ motiv koji sadrži protein koji aktivira GTPazu
RAB10_HUMAN	RAB10, član obitelji onkogena RAS
S10A7_HUMAN	Protein koji veže kalcij A7
ACTB_HUMAN	Aktin-beta
ARPC3_HUMAN	Protein povezan s aktinom 2/3
D3DPU2_HUMAN	Protein povezan s adenilat-ciklazom
ANXA1_HUMAN	Aneksin A1
ANXA5_HUMAN	Aneksin A5
A0A0S2Z2Z6_HUMAN	Aneksin A6
CNN3_HUMAN	Kalponin 3
CTNA1_HUMAN	Katenin-alfa 1
CDC42_HUMAN	Protein povezan sa staničnim ciklusom 42 (CDC42)
CLH1_HUMAN	Teški lanac klatrina
COF1_HUMAN	Kofilin 1
EGFR_HUMAN	Receptor epidermalnog faktora rasta
A0A0G2JIW1_HUMAN	Član Hsp70 obitelji
HNRPK_HUMAN	Heterogeni nukleoprotein K
A0A0A0MTH3_HUMAN	Kinaza povezana s integrinima
MYH9_HUMAN	Teški lanas miozina-9
Q59F20_HUMAN	Neuropilin 1
A0A0S2Z491_HUMAN	Nukelofosmin
PALLD_HUMAN	Paladin
PPIA_HUMAN	Peptidilprolil-izomeraza A
M0R1I2_HUMAN	Aktivator plazminogena i receptor urokinaze (PLAUR)
UROK_HUMAN	Aktivator plazminogena i urokinaza(PLAU)
PROF1_HUMAN	Profilin 1
PDC6I_HUMAN	Protein povezan s programiranim staničnom smrti 6
PDIA3_HUMAN	Disulfid-izomeraza
A0A024RBP2_HUMAN	Katalitička podjedinica γ protein-fosfataze 1
H0YBP1_HUMAN	Protein tirozin-kinaza 2
RAC1_HUMAN	Rac1
SVIL_HUMAN	Supervilin
Q4LE33_HUMAN	Tenascin C
TENS3_HUMAN	Tenzin 3
TGM2_HUMAN	Transglutaminaza 2

**Tablica D4. Funkcionalna analiza proteina izvanstaničnog matriksa pomoću alata *Gene Functional Classification* pri bazi podataka DAVID.** Korišteni parametri za razvrstavanje proteina su: *similarity term overlap*: 4; *similarity threshold*: 0,30; *initial group membership*: 2; *final group membership*: 2; *multiple linkage threshold*: 0,50.

Koeficijent obogaćenja: 23,17		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji sudjeluju u kotranslacijskom upućivanju proteina na staničnu membranu ovisno o SRP-u</b>	RL30_HUMAN	Protein L30 (RPL30)
	RL27_HUMAN	Protein L27 (RPL27)
	RS7_HUMAN	Protein S7 (RPS7)
	RL23_HUMAN	Protein L23 (RPL23)
	RL22_HUMAN	Protein L22 (RPL22)
	RS4X_HUMAN	Protein S4 (RPS4X)
	A8K4W0_HUMAN	Protein S3A (RPS3A)
	RS3_HUMAN	Protein S3 (RPS3)
	RL12_HUMAN	Protein L12 (RPL12)
	RS25_HUMAN	Protein S25 (RPS25)
	RL11_HUMAN	Protein L11 (RPL11)
	Q53Z07_HUMAN	Protein L9 (RPL9)
	B0ZBD0_HUMAN	Protein S19 (RPS19)
	RS18_HUMAN	Protein S18(RPS18)
	RS17_HUMAN	Protein S17 (RPS17)
	RS16_HUMAN	Protein S16 (RPS16)
	RS15A_HUMAN	Protein S15a (RPS15A)
	RS14_HUMAN	Protein S14 (RPS14)
	RS13_HUMAN	Protein S13 (RPS13)
	RS11_HUMAN	Protein S11 (RPS11)
Koeficijent obogaćenja: 15,20		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji vežu nesmotane proteine</b>	GRP78_HUMAN	Član 5 obitelji A <i>heat shock</i> proteina (HSPA5)
	CH60_HUMAN	Član 1 obitelji D <i>heat shock</i> proteina family D (HSPD1)

<b>Proteini koji vežu nesmotane proteine</b>	A0A024RDL1_HUMAN	Šaperonin koji sadrži podjelinicu TCP1
	GRP75_HUMAN	Član 9 obitelji A <i>heat shock</i> proteina (HSPA9)
	HSP7C_HUMAN	Član 8 obitelji A <i>heat shock</i> proteina (HSPA8)
<b>Koeficijent obogaćenja: 13,81</b>		
<b>Inhibitori serinskih proteaza (serpini)</b>	Pristupni broj (UniProt)	Protein
	PEDF_HUMAN	Član 1 obitelji F serpina (SERPINF1)
	PAI1_HUMAN	Član 1 obitelji E serpina (SERPINE1)
	A0A024R498_HUMAN	Član 2 obitelji E serpina (SERPINE2)
<b>Koeficijent obogaćenja: 12,45</b>		
<b>Strukturni proteini izvanstaničnog matriksa</b>	Pristupni broj (UniProt)	Protein
	CO8A1_HUMAN	Lanac $\alpha$ 1 kolagena tipa VIII
	CO4A2_HUMAN	Lanac $\alpha$ 2 kolagena tipa IV
	A0A087X0S5_HUMAN	Lanac $\alpha$ 1 kolagena tipa VI
<b>Koeficijent obogaćenja: 10,92</b>		
<b>Proteini intermedijarnih filamenata</b>	Pristupni broj (UniProt)	Protein
	H6VRF8_HUMAN	Keratin 1
	LMNA_HUMAN	Lamin A/C
	VIME_HUMAN	Vimentin
<b>Koeficijent obogćenja: 10,62</b>		
<b>Proteini koji sudjeluju u organizaciji izvanstaničnog matriksa</b>	Pristupni broj (UniProt)	Protein
	A0A0S2Z4Q2_HUMAN	Inducirani transformirajući faktor rasta $\beta$ (TGFB1)
	POSTN_HUMAN	Periostin
	VTNC_HUMAN	Vitronektin
<b>Koeficijent obogaćenja: 9,94</b>		
<b>Skupina</b>	<b>Pristupni broj (UniProt)</b>	<b>Protein</b>

<b>Proteini koji sudjeluju u posttranslacijskim modifikacijama (hidroksilacija aspartata i asparagina)</b>	LTBP4_HUMAN	Protein koji veže latentni transformirajući faktor rasta $\beta$
	EDIL3_HUMAN	Ponavljanja slična epidermalnom faktoru rasta
	FBLN1_HUMAN	Fibulin 1
	A0A024R9B9_HUMAN	Matrilin 2
<b>Koeficijent obogaćenja: 8,20</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini bazalne lamine</b>	LAMC1_HUMAN	$\gamma 1$ podjedinica laminina
	LAMB2_HUMAN	$\beta 2$ podjedinica laminina
	LAMA5_HUMAN	$\alpha 5$ podjedinica laminina
<b>Koeficijent obogaćenja: 7,42</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji vežu RNA</b>	Q86VG2_HUMAN	<i>Splicing</i> faktor bogat prolinom i glutaminom
	A0A087X0X3_HUMAN	Heterogeni ribonukleoprotein M
	HNRPU_HUMAN	Heterogeni ribonukleoprotein U
	HNRPK_HUMAN	Heterogeni ribonukleoprotein K
<b>Koeficijent obogaćenja: 6,25</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini citoskeleta</b>	TBB4B_HUMAN	Tubulin- $\beta$ 4B
	Q5SU16_HUMAN	Tubulin- $\beta$
<b>Koeficijent obogaćenja: 5,54</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Inhibitori metalopeptidaza</b>	TIMP3_HUMAN	TIMP inhibitor metalopeptidaze 3
	TIMP2_HUMAN	TIMP inhibitor metalopeptidaze 2
<b>Koeficijent obogaćenja: 5,20</b>		

Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji sudjeluju u nastajanju koštanog tkiva</b>	FETUA_HUMAN	Glikoprotein α2-HS
	TETN_HUMAN	Član B obitelji 3 proteina s C tipom domene slične lektinu
<b>Koeficijent obogaćenja: 4,85</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji sudjeluju u sintezi ATP-a</b>	ATPA_HUMAN	α podjedinica ATP sintaze
	ATPB_HUMAN	ATP sintaza, β polipeptid
<b>Koeficijent obogaćenja: 4,10</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji sudjeluju u glikolizi</b>	KPYM_HUMAN	Piruvat-kinaza
	PFKAP_HUMAN	Fosfofruktokinaza
<b>Koeficijent obogaćenja: 3,61</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji drže aktinske filamente pod velikim kutevima</b>	FLNB_HUMAN	Filamin B
	FLNA_HUMAN	Filamin A
<b>Koeficijent obogaćenja: 3,60</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini koji povezuju citoskelet s adhesomom</b>	DESP_HUMAN	Dezmoplakin
	PLEC_HUMAN	Plektin
<b>Koeficijent obogaćenja: 3,44</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Modulatori adhezije</b>	Q4LE33_HUMAN	Tenascin C
	FINC_HUMAN	Fibronektin 1
<b>Koeficijent obogaćenja: 3,37</b>		
Skupina	Pristupni broj (UniProt)	Protein
<b>Proteini s GTP-aznom aktivnošću</b>	B5MDF5_HUMAN	RAN
	EF2_HUMAN	Eukariotski faktor elongacije 2

Slično kao što je bio slučaj i s proteinima fokalnih adhezija, ni pri ovoj pretrazi nisu svi proteini klasificirani. Popis ovih proteina dan je u tablici D5.

**Tablica D5. Popis proteina izvanstaničnog matriksa koji nisu svrstani ni u jednu skupinu.**

Pristupni broj (UniProt)	Protein
ARF4_HUMAN	Faktor ribozilacije ADP-a 4
HTRA1_HUMAN	Serinska peptidaza 1 HtrA
AGRIN_HUMAN	Agrin
A0A024R5Z7_HUMAN	Aneksin A2
CLH1_HUMAN	Teški lanac klatrina
COF1_HUMAN	Kofilin
CYR61_HUMAN	Protein koji inducira angiogenezu bogat cisteinom 61
DYHC1_HUMAN	Teški lanac dineina 1
IF4A1_HUMAN	Eukariotski faktor inicijacije translacije 4A
LEG1_HUMAN	Galektin 1
GANAB_HUMAN	Glukozidaza II, $\alpha$ podjedinica Gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH)
G3P_HUMAN	Član 1 obitelji A <i>heat shock</i> proteina 90 $\alpha$
HS90A_HUMAN	Član 1 obitelji <i>heat shock</i> proteina 90 $\beta$
ENPL_HUMAN	Klaster histona 4 H4
B2R4R0_HUMAN	Kinaza povezana s integrinima
A0A0A0MTH3_HUMAN	EGF faktor 8
A0A024RC55_HUMAN	Teški lanac miozina-9
MYH9_HUMAN	Laki lanac miozina-6
B7Z6Z4_HUMAN	Peroksidazin
PXDN_HUMAN	Peroksiredoksin 1
PRDX1_HUMAN	Aktivator plazminogena
TPA_HUMAN	Rac1
RAC1_HUMAN	Član 5 obitelji 25 obitelji SLC (engl. <i>solute carrier</i> )
ADT2_HUMAN	Trombospondin 1
TSP1_HUMAN	Trombospondin 1, domena 4
THSD4_HUMAN	TFPI2
TFPI2_HUMAN	Transformirajući faktor rasta $\beta$ 2
TGFB2_HUMAN	Transglutaminaza 2
TGM2_HUMAN	

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Zrinka Vitković

Datum rođenja: 28. prosinac 1993.

Mjesto rođenja: Vinkovci

### Obrazovanje

2000. – 2008. Osnovna škola Vladimira Nazora, Vinkovci

2008. – 2010. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2010. – 2012. St Leonards-Mayfield School, Mayfiel, East Sussex, UK

2012. – 2016. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2016. – 2018. Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane Analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2019. - Doktorski studij biokemije, School of Chemical and Biological Sciences, Queen Mary University of London, UK

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013. – 2017. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2012. – 2018. Znanstvene čarolije

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

2018. M. Paradžik, Z. Vitković, J. D. Humphries, A. Dekanić, N. Stojanović, M. J. Humphries, A. Ambriović-Ristov, *Proteomic Analysis of Integrin Alpha V-dependent Adhesion Complex in Triple Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231*, 5th meeting of the Croatian Association for Cancer Research: Translating Science to Medicine – Targets and Therapeutics