

Utjecaj salinomicina na N-glikom u modelu tumorskih matičnih stanica

Kliček, Filip

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:497797>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Filip Kliček

UTJECAJ SALINOMICINA NA N-GLIKOM U MODELU TUMORSKIH MATIČNIH STANICA

Diplomski rad

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

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Genos-u d.o.o. te Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Marka Marjanovića, znan. sur. te dr. sc. Mislava Novokmeta. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom: „*A multidisciplinary approach to discover selective drugs targeting cancer stem cells: The role of potassium transport – MultiCaST^c* (HRZZ 5660).

Zahvale

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordanu Laucu na mogućnosti stjecanja znanja i iskustva u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos.

Hvala mojim neposrednim voditeljima dr. sc. Marku Marjanoviću i dr. sc. Mislavu Novokmetu ponajprije na strpljenju te dobroj volji i neprocjenjivim savjetima.

Hvala mojoj obitelji koja me je podržavala svih ovih godina da stignem do svog cilja.

Hvala Karli, Mariji i svim ostalim prijateljima koji su trpjeli sve moje mušice dugi niz godina, sa mnom nebrojene sate kave pili te mi uvijek bili velika moralna podrška kad je bilo najteže.

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| SAŽETAK | IX |
| ABSTRACT | XI |
| § 1. UVOD | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 3 |
| 2.1. Tumori dojke | 3 |
| 2.2. Tumorske matične stanice dojke | 3 |
| 2.3. Salinomicin i monenzin te njihov utjecaj na tumorske matične stanice | 5 |
| 2.4. HMLE-pBp i HMLE-Twist..... | 7 |
| 2.5. N-glikozilacija..... | 8 |
| 2.6. Tekućinska kromatografija i masena spektrometija | 12 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. Materijali | 15 |
| 3.1.1. Kemikalije | 15 |
| 3.1.2. Materijali | 15 |
| 3.2. Instrumenti | 15 |
| 3.3. Metode..... | 16 |
| 3.3.2. Propagacija staničnih kultura..... | 16 |
| 3.3.3. Brojanje stanica | 17 |
| 3.3.4. Tretman staničnih linija salinomicinom i monenzinom | 17 |
| 3.3.5. Izolacija sekretiranih proteina te određivanje koncentracije proteina..... | 18 |
| 3.3.7. Obilježavanje slobodnih glikana i njihovo pročišćavanje | 19 |
| 3.3.8. Separacija i analiza slobodnih glikana te njihovih fragmenata | 20 |
| 3.3.9. Obrada podataka | 22 |
| § 4. REZULTATI | 23 |
| 4.1.1. Razlika u koncentraciji proteina iz sekretoma HMLE-pBp i HMLE-Twist staničnih linija..... | 23 |
| 4.1.2. Analiza profila N-glikoma iz sekretoma HMLE-pBp i HMLE-Twist staničnih linija | 25 |
| 4.1.3. Analiza utjecaja salinomicina i monenzina na glikozilaciju sekretoma HMLE-pBp i HMLE Twist staničnih linija..... | 28 |
| 4.1.4. Usporedba glikozilacijskih profila HMLE-pBp i HMLE Twist staničnih linija..... | 29 |
| 4.1.5. Glikanske strukture u profilu N-glikoma sekretoma HMLE-pBp i HMLE-Twist stanične linije. | 30 |
| § 5. RASPRAVA | 33 |
| § 6. ZAKLJUČAK | 41 |

| | |
|---|-------|
| § 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 43 |
| § 8. LITERATURNI IZVORI..... | 45 |
| § 9. DODATAK..... | XV |
| 9.1. Slike..... | xv |
| 9.2. Tablice..... | xxiii |
| § 10. ŽIVOTOPIS..... | XLII |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ SALINOMICINA NA N-GLIKOM U MODELU TUMORSKIH MATIČNIH STANICA

Filip Kliček

N-glikozilacija je post-translacijska modifikacija proteina koja se odvija u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. Modifikacije N-glikana u Golgijevom aparatu su pH ovisne te je narušavanje homeostaze pH u Golgijevom aparatu vidljivo u promjeni struktura N-glikana. Efekt salinomicina istraživani je na profilu N-glikana na modelu TMS (HMLE-pBp i HMLE-Twist). Za salinomicin je prethodno pokazano selektivno djelovanje na tumorske matične stanice (TMS). Profil N-glikoma sekretiranih proteina se promijenio nakon tretmana salinomicinom u obje stanične linije. Najuočljivija razlika u profilima nakon tretmana je izostanak razgranatih kompleksnih glikanskih struktura te relativno povećanje jednostavnih glikana, što upućuje na to da salinomicin narušava homeostazu u Golgijevom aparatu dok endoplazmatski retikulum ostaje nepromijenjen. Nadalje, primijetili samo da je efekt naglašeniji na HMLE-Twist nego na HMLE-pBp staničnoj liniji.

(46 stranice, 46 slika, 21 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: Golgijev aparat, LC-MS, N-glikozilacija, salinomicin, tumorske matične stanice

Mentor: prof. dr. sc. Gordan Lauc

Neposredni voditelji: dr. sc. Marko Marjanović, znan. sur. i dr. sc. Mislav Novokmet

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. prof. dr. sc. Nives Galić
 3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 12. prosinca 2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

EFFECT OF SALINOMYCIN ON N-GLYCOME IN A CANCER STEM CELL MODEL

Filip Kliček

N-glycosylation is a post-translational modification of proteins that occurs in endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus. Modifications of N-glycans in the Golgi apparatus are pH dependent and a disruption of pH homeostasis in Golgi apparatus is visible in the change of N-glycan structures. We investigated the effect of salinomycin, a cancer stem cell (CSC) targeting compound, on N-glycan profile of a CSC model (HMLE-pBp and HMLE-Twist cell lines). N-glycome profile of secreted proteins changed in both cell lines after treatment with salinomycin. The most evident difference in profiles after treatment is the loss of highly branched complex glycan structures and the relative increase of simpler glycans, indicating that salinomycin disrupts the Golgi apparatus homeostasis while the endoplasmatic reticulum remains intact. Moreover, we noticed that the effect of is more prominent on HMLE-Twist than on HMLE-pBp cell line.

(46 pages, 46 figures, 21 tables, 33 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: Golgi apparatus, LC-MS, N-glycosylation, salinomycin, cancer stem cells

Mentor: Dr. Gordan Lauc, Prof.

Assistant mentors: Dr. Marko Marjanović, Res. Assoc. and Dr. Mislav Novokmet

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assist. Prof.

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assist. Prof.

2. Dr. Nives Galić, Prof.

3. Dr. Biserka Prugovečki, Prof.

Substitute: Dr. Marko Močibob, Assist. Prof.

Date of exam: 12th December 2018

§ 1. UVOD

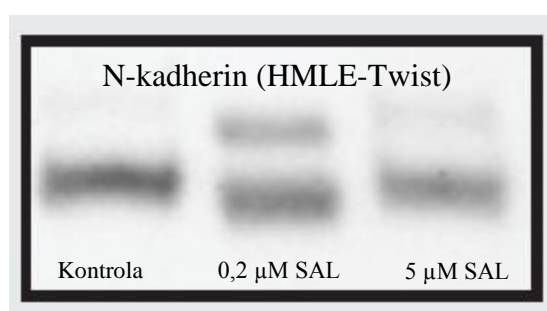
Tumorske matične stanice (TMS) su vrlo mala subpopulacija stanica unutar karcinoma.¹ TMS imaju veliki potencijal pri razvitku karcinoma te predstavljaju veliki terapijski problem jer su u pravilu rezistentne na klasičnu kemoterapiju i radioterapiju.² TMS dojke posjeduju specifične molekularne markere koji se ne pojavljuju u ostatku karcinoma dojke.¹ Iste markere eksprimiraju i stanice koje su prošle epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT). EMT je molekularni program koji se aktivira u procesu organogeneze te omogućava pravilnu raspodjelu stanica unutar tkiva i organa.³ EMT se može postići *in vitro* na nekoliko različitih načina, npr. utišavanjem translacije E-kadherina ili ekspresijom transkripcijskog faktora Twist. Kao modelni sustav za izučavanje TMS-a, u ovom radu su korištene stanice koje su prošle EMT nakon inducirane povećane ekspresije Twist-a (HMLE-Twist). Za kontrolu smo koristili staničnu liniju HMLE-pBp koja je bila transformirana praznim vektorom. HMLE stanice su nastale redukcijom mamoplastikom, a dodatno su modificirane za uspješan i dugotrajan rast u kulturi.²

N-glikozilacija je post-translacijska modifikacija koja obuhvaća gotovo sve membranske i sekretirane proteine.⁴ Proces N-glikozilacije je podijeljen u dva stanična organela: endoplazmatski retikulum (ER) i Golgijev aparat (GA). Navedeni organeli ujedno konstituiraju veći dio sekretornog puta.^{4,5} Proteini koji se glikoziliraju, unose se kotranslacijski u ER te vezikularnim prometom prelaze u Golgijev aparat, a potom dalje prema trans-Golgijevoj mreži. Glikozilacija se odvija u svim navedenim staničnim odjeljcima.⁵ Na membrani ER se odvija sinteza prekursora N-glikozilacije, koji se zatim u bloku veže za asparagin (Asn) na rastući protein unutra konsenzusnog slijeda Asn-X-Ser/Thr. Modifikacija prekursora započinje u ER-u te se nastavlja kroz Golgijev aparat gdje se odvija većina N-glikozilacijskog procesa. Unutar Golgijevog aparata proces se odvija konsekutivno i bez kalupa.⁴

Za normalno odvijanje procesa N-glikozilacije nužno je održavanje pH vrijednosti lumena Golgijevog aparata u blago kiselom području. Narušavanje homeostaze pH dovodi do promjene u količini i strukturi glikana te do morfoloških promjena samog Golgijevog aparata.^{6,7} Tako na primjer, monenzin, kemijski spoj koji pripada skupini ionofora koja

zamjenjuje natrij za proton preko lipidnog dvosloja Golgijevog aparata, mijenja morfologiju Golgijevog aparata i N-glikozilacijski profil.⁶

U Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju je prethodno istraživao utjecaj salinomicina na Golgijev aparat te je uočen sličan efekt kao i kod tretmana monenzinom. (Marjanović i suradnici, neobjavljeni rezultati). Na primjer, primjećeno je da dolazi do nepotpunog procesiranja N-kadherina, markera koji je eksprimiran isključivo u HMLE-Twist staničnoj liniji. Pojava dulje, neprocesirane verzije proteina (proN-kadherin) je vidljiva tijekom SDS-PAGE elektroforeze i ukazuje na poremećaj u funkciji Golgijevog aparata nakon tretmana salinomicinom. (Slika 1.)



Slika 1. Rezultat SDS-PAGE elektroforeze membranskog proteina N-kadherina iz HMLE-Twist stanične linije. M = mol/dm³, SAL = salinomicin.

Cilj ovog rada je pobliže opisati profil N-glikana sekretiranih proteina na modelu TMS-a te utjecaj salinomicina na profil N-glikana sekretiranih proteina obiju staničnih linija. U navedenu svrhu HMLE-pBp i HMLE-Twist stanične linije su uzgajane te su tretirane medijem u kojem se nalazila određena koncentracija salinomicina. Sekretirani proteini iz medija iznad stanica su prekoncentrirani te im je spektrofotometrijski određena koncentracija. Količina proteina je normalizirana na 30 μg po analiziranom uzorku. Proteini su denaturirani i potom enzimski deglikozilirani pomoću enzima PNGaseF. Slobodni glikani su fluorescentno obilježeni i analizirani na vezanom sustavu tekućinske kromatografije normalnih faza uz fluorescentnu detekciju spregnutom sa spektrometrijom masa.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Tumori dojke

Karcinomi su drugi prema uzroku smrtnosti u svijetu. Do danas je identificirano više od 277 različitih karcinomnih oboljenja.⁸ U muškoj populaciji najzastupljeniji su karcinomi prostate, pluća i bronhi, kolona i rektuma te mokraćnog mjehura. S druge strane u populaciji žena najveću zastupljenost ima karcinom dojke te potom pluća i bronhi, kolona i rektum, maternice te štitnjače. Budući da je karcinom dojke prvi po smrtnosti žena oboljelih od nekog oblika karcinoma, u svijetu se ulaže puno truda u njegovu prevenciju, rano otkrivanje i liječenje.^{8,10}

Karcinom dojke iskazuje iznimnu staničnu kompleksnost i heterogenost na molekularnoj i morfološkoj razini. Do sad je klasificiran, prema ekspresiji gena, u 5 subkategorija: Luminal–A, Luminal–B, HER2–pozitivan, nalik bazalnim stanicama (eng. *basal-like*) te nalik normalnim stanicama dojke. Ovisno o podtipu karcinoma, ovisit će način liječenja i dugoročna prognoza za pacijenta.^{9,11}

2.2. Tumorske matične stanice dojke

Tumorske matične stanice (TMS) predstavljaju subpopulaciju stanica unutar karcinoma dojke. TMS su dobile ime prema karakteristikama koje dijele s normalnim matičnim stanicama: proliferacija, diferencijacija i samo-obnova. Izolacija i identifikacija TMS-a dojki izvedena je pomoću eksprimiranih markera na površini stanice $ESA^+CD44^+CD24^{-/low}Lineage^-$ za koje je pokazano da se eksprimiraju u TMS-u, ali ne u ostatku tumorskih stanica.¹ ESA je epitel-specifični antigen, CD44 i CD24 su molekule koje sudjeluju u međustaničnoj adheziji, Lineage je skupina staničnih markera (CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 i CD140b)¹. Svega 200 stanica s gore navedenim markerima u ksenograftu miša je dalo potpuno razvijeni tumor s heterogenošću jednakom kao i u roditeljskom tumoru, što govori o velikom potencijalu TMS u nastanku i razvoju tumora. Naprotiv tomu, čak 20000 stanica koje eksprimiraju $CD44^+CD24^+$ markere nikada nisu formirale tumor, dajući dodatnu potvrdu o postojanju TMS.¹

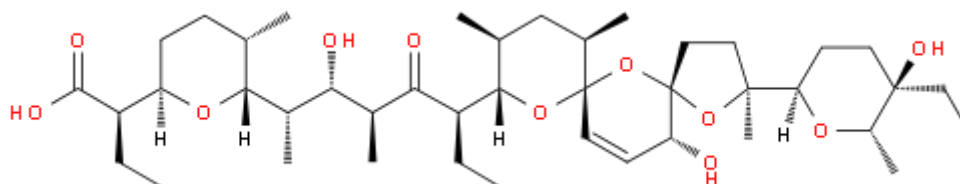
Postoje dvije teorije o nastanku TMS-a koje se međusobno ne isključuju. Prva teorija tvrdi da TMS dolaze od normalnih i već prisutnih matičnih stanica.¹² Toj teoriji u prilog ide postojanje markera koji su eksprimirani kod normalnih matičnih stanica i TMS-a.¹³ U tkivu dojke su prirodno prisutne matične stanice mliječne žlijezde¹⁴ koje su zbog dugog životnog vijeka podložne onkogenim mutacijama. Druga teorija tvrdi da TMS nastaju iz tumorskih stanica koje su u epitelno – mezenhimalnoj tranziciji.¹² Epitelno – mezenhimalna tranzicija (EMT) je slijed biokemijskih procesa koji omogućavaju epitelnim stanicama da poprime mezenhimalni, pokretljivi fenotip.^{3,14} EMT je u normalnim uvjetima ključan za proces organogeneze embrija te postaje latentan kod odraslog čovjeka, a aktivira se tek u slučaju obnove tkiva.¹⁴ Četiri signalna puta su zaslužna za indukciju EMT-a: Wnt signalni put koji kada je aktivan suprimira E-kadherin, aktivirani TNF- α /NF- κ B signalni put koji inducira transkripcijske faktore povezane s EMT, Notch signalni put koji sudjeluje u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi te TGF- β signalni put koji u ranim fazama suprimira tumore te ujedno pospješuje indukciju EMT.¹⁵ Među navedenim signalnim putovima ključan je Wnt signalni put jer suprimira E-kadherin koji se nalazi na površini stanica te sudjeluje u međustaničnoj adheziji.¹⁴ Navedenom opažanju ide u prilog da kada je u epitelnoj staničnoj kulturi inhibirana translacija E-kadherina uz pomoć kratke RNA ukosnice (shRNA) te stanice poprimaju mezenhimalni fenotip.² Uz EMT prisutan je povratni proces mezenhimalno – epitelne tranzicije (MET) zbog čega TMS iskazuju iznimnu plastičnost.¹⁵

Metastaze se pojavljuju u terminalnim fazama karcinoma za koje ne postoji učinkovita terapija te njihova pojava stoga najčešće rezultira smrću.¹⁶ Karakteristika metastaza je izostanak kompetentne međustanične adhezije pri čemu je ključan izostanak E-kadherina.^{16,17} Za nastanak kompetentnih metastaza nije dostatan samo izostanak međustanične adhezije, već je nužna aktivacija EMT-a. Eksperimentalno je pokazano da kada se eksprimira E-kadherin bez ektodomene ne rezultira nastankom metastaza, ali u slučaju potpunog izostanka E-kadherina aktivira se EMT te stanice poprimaju fenotip metastaza.¹⁷ Pokazano je da metastaze eksprimiraju karakteristične markere kao i TMS te se stoga smatra da su TMS izvor metastaza u organizmu.¹⁵ Nadalje, nastanak metastaza može biti potaknut ekspresijom transkripcijskog faktora Twist za koji je pokazano da aktivira EMT program. Ekspresija Twist-a između ostalog, suprimira transkripciju E-kadherina, čiji izostanak je ključan za inicijaciju EMT-a.¹⁸ Twist dodatno može stimulirati AKT2 ekspresiju te na taj način može pridonijeti rezistentnosti TMS-a na konvencionalne metode liječenja.¹⁴

U zapadnim zemljama se danas kao standardne metode liječenja koriste radioterapija i kemoterapija za koje je pokazano da ne djeluju na TMS.¹⁹ Neučinkovitost standardnih metoda liječenja je posljedica raznih mehanizama rezistentnosti koje TMS posjeduje, poput npr. ekspresije ABC transportera, aktivacije Wnt signalnog puta, aktivacije NF- κ B signalnog puta, itd.¹⁹ Stoga je nužan razvoj novih terapijskih metoda i lijekova koji će smanjiti ili u potpunosti eliminirati TMS u oboljelom tkivu te na taj način najdjelotvornije djelovati na tretman karcinoma.

2.3. Salinomicin i monenzin te njihov utjecaj na tumorske matične stanice

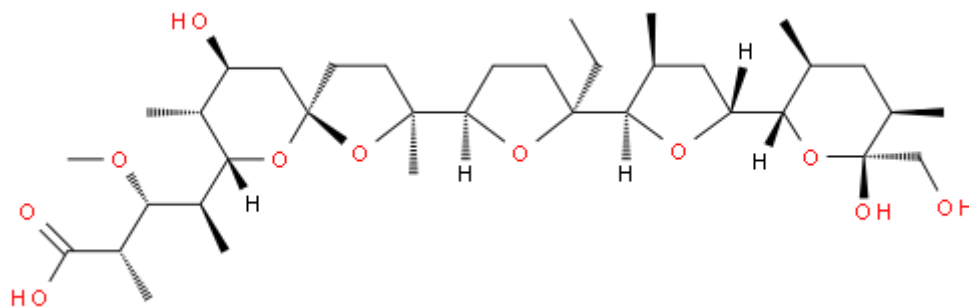
Salinomicin (SAL) odnosno prema IUPAC-u (2R)-2-[(2R,5S,6R)-6-[(2S,3S,4S,6R)-6-[(2S,5S,7R,9S,10S,12R,15R)-2-[(2R,5R,6S)-5-etil-5-hidroksi-6-metil-terahidro-2H-piran-2-il]-15-hidroksi-2,10,12-trimetil-1,6,8-trioksodispiro[4.1.5.3]pentadek-13-en-9-il]-3-hidroksi-4-metil-5-oksooktan-2-il]-5-metil-teraidro-2H-piran-2-il]butionska kiselina je organska molekula koja pripada velikoj skupini polieterskih ionofora koju prirodno proizvodi bakterija *Streptomyces albus*. SAL je slaba kiselina čiji pK_a iznosi 6,4 u dimetilformamidu. Molekulska formula SAL je $C_{42}H_{70}O_{11}$ te ima molarnu masu od 751 g/mol.²⁰



Slika 2. Struktura salinomicina (SAL). (preuzeto iz ref. 22)

SAL se danas upotrebljava u veterini u borbi protiv mikroba te je svoju primjenu ponajprije našao u peradarstvu i govedarstvu. Djeluje kao izmjenjivač kationa te na taj način narušava homeostazu ciljanog patogena. Pasivnom difuzijom SAL može prolaziti kroz lipidne membrane citoplazme i mitohondrija stvarajući metalne komplekse, a osobito kompleks s K^+ te je poznato da djeluje kao K^+/H^+ izmjenjivač. Zbog prethodne činjenice, u ljudskom organizmu djeluje kao neurotoksin jer je za normalno funkcioniranje živčanog tkiva nužna homeostaza Na^+/K^+ .²⁰

Monenzin ili prema IUPAC-ovoj nomenkalturi (2S,3R,4S)-4-[(2S,5R,7S,8R,9S)-2-[(2R,5S)-5-etil-5-[(2R,3S,5R)-5-[(2S,3S,5R,6R)-6-hidroksi-6-(hidroksimetil)-3,5-dimetiloksan-2-yl]-3-metiloksan-2-yl]oksolan-2-yl]-7-hidroksi-2,8-dimetil-1,10-dioksaspiro[4.5]dekan-9-il]-3-metoksi-2-metilpentatonična kiselina²³ je organska molekula strukturno i funkcionalno srodna salinomicinu. U biološkim sustavima preko hidrofobne membrane prebacuje jedan Na⁺ u zamjenu za jedan H⁺.⁶



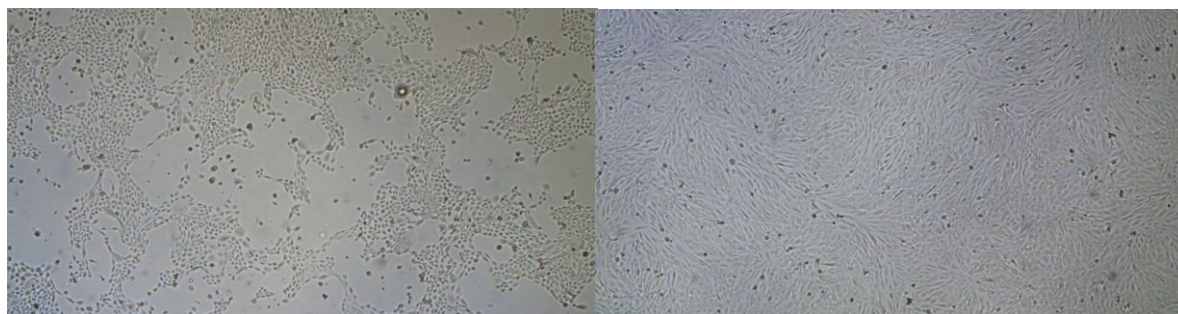
Slika 3. Struktura monenzina (MON). (preuzeto iz ref. 24)

Monenzin je poznati agens koji narušava protonsku homeostazu u Golgijevom aparatu. Pod djelovanjem monenzina dolazi od bubrenja Golgijevih cisterni pri čemu efekt bubrenja raste od *cis*- prema *trans*-cisterni. U eksperimentu s intestinalnim apsorptivnim stanicama štakora primijećena su dva tipa djelovanja monenzina. Prvi se odnosi na ranu vakolizaciju *trans*-Golgijeve cisterne te drugi u kojem dolazi do bubrenja Golgijevog aparata.⁶

Interes za salinomicin i srodne spojeve je porastao od kad je zabilježeno da imaju negativan i selektivan utjecaj na TMS dojke.^{2,20} Gupta i suradnici su prilikom probira među 16000 spojeva identificirali spojeve koji uspješno i selektivno ubijaju HMLE stanične linije koje su prošle kroz EMT (npr. HMLE-Twist staničnu liniju). SAL se pokazao kao najselektivniji, pri čemu je razlika u preživljavanju TMS naspram kontrolnih bila gotovo 100 puta. Nadalje, pokazali su da salinomicin ima isti efekt na stanice bez obzira na mehanizam indukcije EMT-a, ekspresijom Twista ili supresijom E-kadherina. Zbog svega navedenog salinomicin je okarakteriziran kao potencijani terapeutik u liječenju metastaza i recidivnog tumora.²

2.4. HMLE-pBp i HMLE-Twist

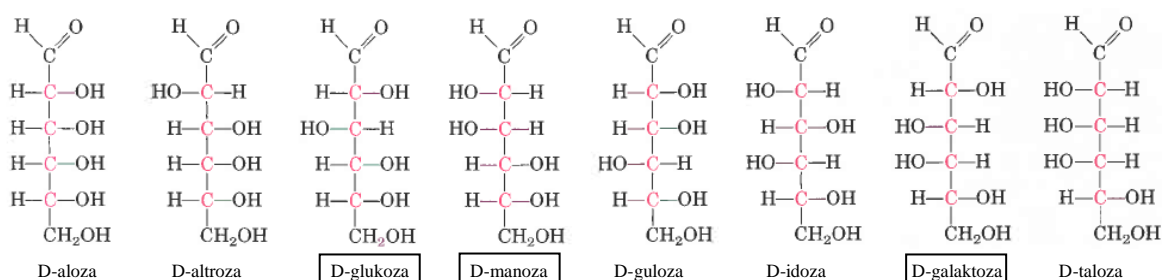
U ovom radu korišten je biološki model za tumorske matične stanice. Model je nastao transformacijom ljudskih epitelnih stanica dojke (eng. *Human mammary epithelial cells*, HMEC). HMEC su potom transformirane s ciljem beskonačne diobe stanica u kulturi. Stoga je u HMEC stanicama inducirana ekspresija telomeraze te su dodatno inficirane s dijelom genoma SV40 virusa (veliki i mali T protein). Ekspresija telomeraza i SV40 dala je HMLE staničnu liniju u kojoj je potom transdukcijom povećano eksprimiran transkripcijski faktor Twist te su dobivene stanice HMLE-Twist. HMLE-pBp stanična linija je dobivena jednakim postupkom kao i HMLE-Twist izuzev ekspresije Twist transkripcijskog faktora te se koristi kao kontrola u staničnim eksperimentima. Ovaj stanični par se koristi kao stanični model za TMS jer je ekspresija Twist transkripcijskog dovela do EMT u staničnoj liniji HMLE-Twist.² Uočava se morfološka razlika među staničnim linijama. HMLE-pBp stanica je epitelnog oblika, dok HMLE-Twist stanice poprimaju vretenast izgled tipičan za mezenhimalne stanice (Slika 4). Također, indukcijom EMT, HMLE-Twist stanice zadobile su markere tipične za TMS (CD44⁺CD24^{-low}).



Slika 4. Lijevo je prikazana HMLE-pBp stanična linija, a desno HMLE-Twist stanična linija. HMLE-pBp stanice su okruglog oblika, dok HMLE-Twist stanice poprimaju vretenast izgled

2.5. N-glikozilacija

Glikani su velika skupina polimernih biomolekula čiji monomeri su jednostavni ugljikohidrati koji iskazuju veliku strukturnu raznolikost. Na primjer, u prirodi se pojavljuje osam strukturno različitih D-aldoza sa šest ugljikovih atoma (Slika 5).



Slika 5. Niz D-aldosa sa šest C atoma. Imena u kvadratićima se najčešće pojavljuju u biološkim sustavima. Kiralni C atomi su označeni crvenom bojom. (preuzeto i modificirano iz ref. 21)

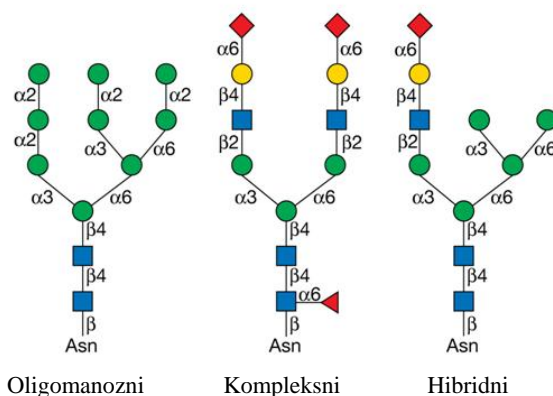
Monomeri se povezuju glikozidnom vezom. Veza nastaje između anomernog ugljika jednog ugljikohidrata te hidroksilne skupine drugog ugljikohidrata. Dva jednostavna /monomerna ugljikohidrata međusobnim povezivanjem daju veliku raznolikost u stereoizomeriji i regioizomeriji zbog velikog broja mogućih načina povezivanja. Nadalje, na ugljikohidratu može doći do grananja što pridodaje kompleksnosti u strukturi glikana. Na taj način nastaju različite trodimenzionalne forme koje imaju različitu biološku funkciju.⁴ Kako bi prikaz i zapis struktura bili što jednostavniji, razvijen je sustav kratica i simbola za ugljikohidrate (Slika 6.)

| | | |
|------------------------------|--------|---|
| Fukoza | Fuc | ▲ |
| Galaktoza | Gal | ● |
| Glukoza | Glc | ● |
| Manoza | Man | ● |
| N-acetilglukozanim | GlcNAc | ■ |
| N-acetilgalaktozamin | GalNAc | ■ |
| N-acetilneuraminska kiselina | Neu5Ac | ◆ |

Slika 6. Kratice i pripadajući simboli najučestalijih ugljikohidrata koji se pojavljuju kod eukariota. (Prema ref. 21)

Glikozilacija je enzimski katalizirano kovalentno vezanje ugljikohidrata na protein, lipid, polinukleotid, ugljikohidrat ili neku drugu organsku molekulu. Reakciju uglavnom katalizira glikoziltransferaza. Na proteinima se razlikuje N- i O-glikozilacija ovisno o aminokiselini koja je akceptor glikana. N-glikozilacija se odvija na bočnom ogranku asparagina unutar konsenzusnog aminokiselinskog slijeda Asp-X-Ser/Thr, pri čemu X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina. Ukoliko su bočni ogranci serina i treonina akseptori ugljikohidrata, radi se o O-glikozilaciji.⁴

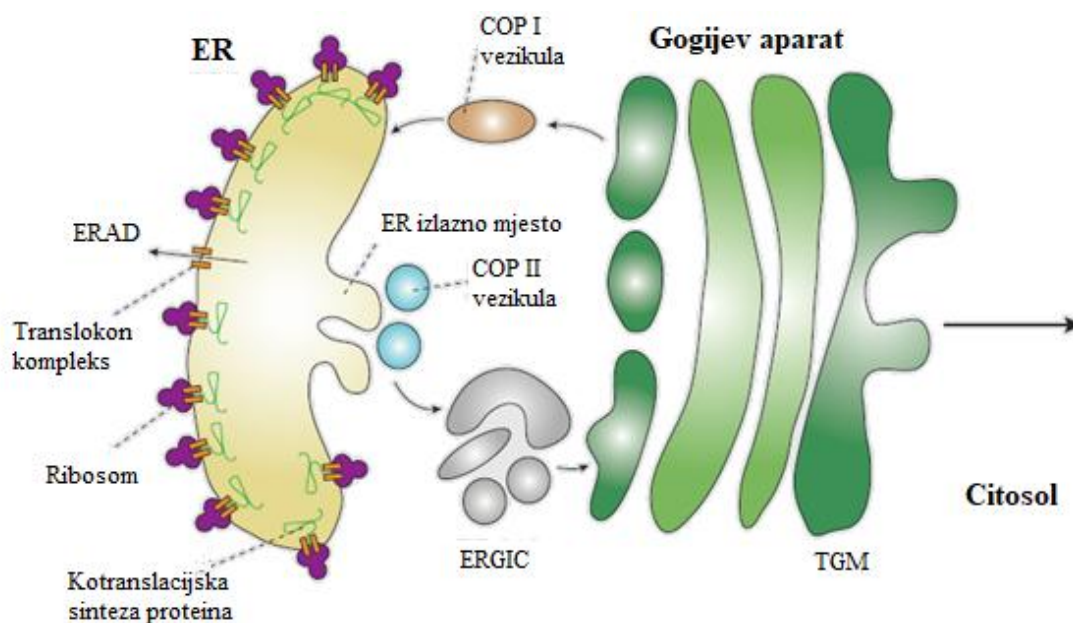
Svi N-glikani imaju jednaki početni niz ugljikohidrata $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ koji se naziva jezgra. Jezgra N-glikana se nadograđuje granama ili antenama, prema čijem sastavu razlikujemo tri tipa glikanskih struktura kod čovjeka: oligomanozni glikani, kompleksni glikani te hibridni glikani (Slika 7). Oligomanozni glikani u sastavu antena imaju isključivo manozu, kompleksni glikani započinju s GlcNAc na obje manoze na jezgri te hibridni imaju bar jednu granu kompleksnu, a drugu oligomanoznu.⁴



Slika 7. Tipovi N-glikana u euakriotima se mogu svrstati u tri generalne skupine: oligomanozni glikani, kompleksni glikani te hibridni glikani. (Preuzeto iz ref. 4)

N-glikozilacija se odvija unutra sekretornog puta koji obuhvaća hrapavi endoplazmatski ritikulum (ER) te Golgijev aparat (GA), što je razlog zašto su skoro svi sekretirani i membranski proteini glikozilirani. Sekretija svih proteina koji posjeduju odgovarajuću signalnu sekvencu započinje u ER-u. U ER-u se odvija smatanje proteina i kontrola pravilne provedbe tog procesa, a ako je protein pravilno smotan tada se isti pakira u vezikule. Vezikule se spajaju u *cis*-Golgijevu cisternu ili *cis*-Golgijevu mrežu. Prema teoriji sazrijevanja Golgijevih cisterni, *cis*-Golgijeva cisterna fizički se pomiče u stanici od *cis* prema *trans* položaju tj. cisterne se gibaju od ER (jezgre) prema staničnoj membrani. Na taj način

slijedno *cis*-Golgijeva cistrena prelazi u *medial*-Golgijevu cisternu, pa potom u *trans*-Golgijevu cisternu te konačno u *trans*-Golgijevu mrežu. Uz navedeno prisutan je i retrogradni vezikularni transport. (Slika 8.)^{4,5}



Slika 8. Sekretorni put proteina od endoplazmatskog retikuluma (ER) kroz Golgijev aparat do stanične membrane (s lijeva na desno). *Trans*-Golgijeva mreža (TGM), endoplazmatski retikulum – Golgijev aparat intremedijalna cisterna (ERGIC), razgradnja proteina u endoplazmatskom retikulumu (ERAD). (preuzeto i modificirano iz ref. 25)

Glikozilacija je enzimski katalizirana glikoziltransferazama koje dodaju aktivirane monosaharide, te glikozidazama, koje uklanjaju monosaharide. Enzimi su membranski te pripadaju tipu I ili najčešće tipu II membranskih proteina. Prije dodatka nove monosaharidne jedinice na rastući glikan, potrebno je tu monosaharidnu jedinicu prevesti u aktivirani oblik. Aktivirani, visoko energetska oblik monosaharida se sastoji od nukleotid difosfata (NDP) i monosaharida. Sintaza aktiviranog oblika se odvija u citosolu, no aktivirani oblik ne difundira kroz lipidni dvosloj te je stoga potrebno prenijeti aktivirane oblike monosaharida iz citosola u lumen GA. Prijenos se odvija preko seta prenositelja koji se nalaze u membrani GA.⁴

S citosolne strane ER-a počinje sinteza prekursora, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolikor}$, koji se u bloku pomoću flipaze prebacuje u lumen ER-a te se nakon toga navedeni oligosaharid prenosi na asparagin unutra konsenzusnog slijeda tijekom sinteze proteina. Sintaza i prijenos prekursora su evolucijski vrlo očuvani jer navedeni oligosaharid sudjeluje u kontroli pravilnog smatanja proteina. Zadržavanjem glikoproteina u ER-u dolazi do cijepanja terminalnih glukoza te se prije prelaska proteina iz ER u GA uklanja manozama na središnjoj grani. U *cis*-Golgijevoj cisterni se nastavlja proces modifikacije glikana na proteinu gdje dolazi do cijepanja glikozidne veze među manozama. Nadalje, u *medijalnoj*-Golgijevoj

cisterni započinje sinteza kompleksnih i hibridnih glikana te se konačna modifikacija glikana odvija u *trans*-Golgijevom aparatu. Enzimi su lokalizirani unutar GA. U lokalizaciji sudjeluje, uz ostale mehanizme, transmembranska regija enzima čija veličina se mijenja prema položaju unutar GA jer se debljina membrane GA povećava s *cis*- prema *trans*-cisterni.²⁷ Debljinu membrane GA diktira udio kolesterola u membrani, tj. povećanjem udjela kolesterola povećava se i debljina membrane.⁴

2.6. Tekućinska kromatografija i masena spektrometrija

Tekućinska kromatografija je vrlo rasprostranjena metoda separacije jednog ili više analita iz kompleksnih uzoraka. Osnovne komponente svake tekućinske kromatografije su pokretna tekuća faza i stacionarna faza koja može biti tekuća ili kruta. Preduvjeti za uspješnu separaciju su: topljivost analita u tekućoj fazi te da se stacionarna i mobilna faza ne miješaju. Tekućinska kromatografija se može podijeliti prema geometriji stacionarne faze (kolonska ili plošna kromatografija) te prema mehanizmu separacije (razdjelna, adsorpcijska i afinitetna kromatografija, ionska izmjena te kromatografija isključenjem). Razdjelna tekućinska kromatografija ima široku primjenu zbog velikog raspona kombinacija mobilne i stacionarne faze. Nadalje, ovisno o polarnosti mobilne faze razlikujemo kromatografiju normalnih faza kada je mobilna faza nepolarna (organska otapala) te kromatografiju obrnutih faza kada je mobilna faza polarna. U obje navedene kromatografije stacionarna faza je suprotne polarnosti. Prilikom separacije istraživanih uzoraka korištena je razdjelna tekućinska kromatografija normalnih faza na koloni (eng. *hydrophilic interaction chromatography*, HILIC).²⁶

U početku se za pokretanje mobilne faze kroz kolonu koristila gravitacija, zbog čega je kromatografija bila dugotrajna, te su bile potrebne velike količine otapala i uzorka. Razvojem tehnologije omogućen je razvitak instrumenata za tekućinsku kromatografiju. Razvijeni je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) te najnovije generacije tekućinski kromatograf ultra-visoke djelotvornosti (eng. *ultrahigh-performance liquid chromatography*, UPLC). Glavna karakteristika instrumenta je uporaba visokih tlakova za pokretanje mobilne faze kroz kolonu vrlo malog promjera. Instrumenti koriste male količine otapala te su potrebne male količine uzorka (desetak mikrolitara). Detekcija analita se u klasičnoj kolonskoj kromatografiji vrši kemijskim postupcima (prskanjem sumporne kiseline, uporabom joda, itd...) dok se danas u instrumentaliziranoj tekućinskoj kromatografiji koriste spektrofotometri s protočnom ćelijom, detektira se ili UV/Vis ili fluorescencija uzorka. Nužan preduvjet za spektrofotometrijsku detekciju uzorka je posjedovanje kromofora/fluorofora na analitu. U slučaju da analit ne posjeduje kromofor/fluorofor potrebno je kemijski modificirati analit dodatkom kromofora/fluorofora na analit.²⁶

Spektrometrija masa je instrumentalna tehnika za identifikaciju, kvantifikaciju i određivanje strukture kemijskih i biokemijskih spojeva. Svaki spektrometar masa se sastoji od ionizatora, analizatora i detektora. Do danas je razvijen veliki broj ionizatora i analizatora čije

međusobno kombiniranje omogućuje analizu velikog broja spojeva, od jednostavnih organskih do složenih biopolimera. Funkcija ionizatora je prevesti analiziranu molekulu u ion. Ionizatori se primarno dijele prema agregatnom stanju analizirane tvari u trenutku ionizacije: ionizacija tvari u plinovitom stanju (ionizacija brzim elektronima, kemijska ionizacija i ionizacija poljem) te desorpciju, tj. analit je u tekućem ili krutom stanju, (desorpcija poljem, elektrosprej, matricom potpomognuta laserska desorpcija i dr.). Ionizacija elektrosprejem je postala najvažnija tehnika ionizacije u analizi biomolekula te se odvija pod atmosferskim tlakom. Mehanizam ionizacije se zasniva na evaporaciji otapala i ionizaciji analita. Evaporacijom otapala smanjuje se volumen i povećava gustoća naboja kapljice sve do Rayleighove granice, tj. trenutka kada površinska napetost ne može podnijeti naboj kapljice. Proces se ponavlja sve dok otapalo nije u potpunosti evaporiralo. Prednost elektrospreja u odnosu na druge ionizatore je mogućnost povezivanja tekućinskog kromatografa sa masenim spektrometrom.²⁶

Nakon ionizacije nužno je odvajanje analita u uzorku što se postiže analizatorom. Ovisno o željenoj rezoluciji spektra i vrsti analita ovisit će i izbor analizatora. Danas se koriste takozvani hibridni analizatori, npr. kvadrupol-vrijeme leta analizator. Navedeni analizator se često koristi u vezanim sustavima s tekućinskom kromatografijom jer omogućava simultano razdvajanje uz visoko razlučivanje iona u spektru.²⁶

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

HuMEC Ready Medium (1X) (*Thermo Fisher Scientific*), *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) (*Sigma - Aldrich*), inzulini (*Sigma - Aldrich*), L-glutamin, hidrokortizon (*Sigma-Aldrich*), penicilin/streptomycin (*Sigma-Aldrich*), fosfatni pufer koji ne sadrži magnezij i kalcij (PBS) (*Lonza*), tripsin (*Thermo Fisher Scientific*), MilliQ voda $R = 18.2 \Omega$, acetonitril, LC – MS stupnja čistoće (*VWR*), dimetilfulfoksid (DMSO) (*Sigma-Aldrich*), ledena octena kiselina (*Sigma-Aldrich*), etanol 99,8 % (*Sigma-Aldrich*), 2 – pikolin boran (*Sigma-Aldrich*), Prokainamid (*Acros Organics*), Chromabond sorbent C18 (*Macherey-Nagel*), trifluoroctena kiselina (*Sigma-Aldrich*), salinomycin (*Sigma-Aldrich*), hidrat natrijevog monenziata (*Sigma-Aldrich*), BCA set (*Sigma-Aldrich*), PNGase F (*Promega*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Invitrogen*), Igepal CA-360 (*Sigma-Aldrich*)

3.1.2. Materijali

Stanična kultura HMLE-pBp i HMLE Twist, pločice za uzgoj stanica (*TPP*), Amicon Ultra centrifugalni filteri od 2 mL, 10k (*Millipore*), mikroeprevete (*Eppendorf*), epruvete (*Eppendorf*), GHP filterske pločice 1mL (*Pall*), PCR pločica AB-1300 (*Thermo Scientific*), pločica sa 96 jažica 1 mL (*Waters*), vialice (*Waters*), tipsevi za pipete (*Rainin*), kromatografska kolona *Acquity UPLC BEH Glycan 1.7 μ m 2.1x150mm* (*Water*)

3.2. Instrumenti

Pipet-Lite XLS automatske mikropipete raznih volumena (*Rainin*), invertni svjetlosni mikroskop CKX41 (*Olympus*), Multiskan spektrofotometar (*Thermo Fisher Scientific*), centrifuga (*Eppendorf*), SpeedVac Concentrator SC210A uređaj za centrifugu s vakuum otparivačem (*Thermo*), tresilica (*GFL*), Laboratory Incubator inkubator (*M.R.C.*), inkubator INC108 (*Memmert*), Vacuum manifold za vakuumsko odsisavanje pločica (*Pall*), ACQUITY UPLC H class tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti (*Waters*), Compact Q-TOF spektrometar masa (*Bruker*)

3.3. Metode

3.3.1. Priprema medija za propagaciju i tretman stanica

DMEM medij se kompletira s fetalnim goveđim serumom (eng. *fetal bovine serum*, FBS) ukupnog 10%-tnog volumnog udjela u mediju, L-glutaminom konačne koncentracija 2 mmol dm⁻³ te antibioticima penicilinom i streptomycinom konačne koncentracije 1 µg mL⁻¹.

Medij za propagaciju stanica pripremljen je miješanjem kompletiranog DMEM i HuMEC ready medija u volumnom omjeru 1:1 te su dodani suplementi u volumnim udjelima: 0,50% Gibco suplement, 0,25% ekstrakta hipofize. Uz suplemente još je dodan hidrokortizon konačne masene koncentracije 0,5 µg mL⁻¹ i inzulin konačne množinske koncentracije 0,2 mmol dm⁻³.

Pripremljena su dva medija za tretman stanica na identičan način kao i medij za propagaciju staničnih kultura s izuzećem FBS-a i Gibco suplementa, u jedan je dodan salinomycin konačne koncentracije 0,2 µmol dm⁻³ te drugi u koji je dodan monenzin konačne koncentracije 0,2 µmol dm⁻³. Sva priprema medija rađena je u sterilnim uvjetima.

3.3.2. Propagacija staničnih kultura

Stanice se čuvaju u tekućem dušiku te ih je potrebno odmrznuti prije rada s njima. Ampula koja sadrži stanice je najprije stavljena u vodenu kupelj na 37 °C dok se otopina stanica ne postane tekuća. Stanice se potom dodaju u sterilnu epruvetu u kojoj se nalazi 10 mL kompletiranog medija za propagaciju. Nadalje, epruveta sa stanicama se centrifugira 5 min na 250 g. Supernatant se odlije te se talog stanica resuspendira u 5 mL novog kompletiranog medija za propagaciju. Stanice su sada spremne za nasađivanje.

Nakon odmrzavanja, 1/10 stanica je presađena svakih 48 – 72 sata na nove ploče za uzgoj staničnih kultura u odgovarajući medij. Propagacija staničnih kultura izvršena je tako da se prvo ukloni stari medij. Sve stanične kulture se potom isperu s 5 mL PBS te se na njih doda 1,5 mL prethodno priređene otopine tripsina 0,25%-tnog volumnog udjela u PBS-u. Kulture se inkubiraju na 37 °C, 3 min za HMLE-Twist liniju te 10 min za HMLE-pBp liniju. Djelovanje tripsina se prekida dodatkom 5 mL medija za propagaciju te se stanice dodatno mehanički odljepljuju s podloge za uzgoj stanica ispiranjem iste s prethodno dodanim medijem za propagaciju. Na nove pločice stavi se 0,5 mL otopine stanica i 9 mL medija za

propagaciju kulture. Ploče za uzgoj se potom inkubiraju pri temperaturi od 37 °C, 5% volumnog udjela ugljikovog dioksida i 95% relativne vlažnosti.

3.3.3. Brojanje stanica

Prije nego što su stanične kulture tretirane salinomycinom i monenzinom potrebno ih je izbrojiti, tj. odrediti količinu stanica u volumenu koji će se nasaditi za tretman. Naime, ciljana popunjenost površine pločice za uzgoj je 80% što se postiže nasađivanjem 10^6 stanica te se pomoću prebrojavanja odredi volumen u kojem se nalazi ciljani broj stanica.

Za prebrojavanje stanice su skinute s podloge kako je to prethodno opisano te su prebačene u sterilnu epruvetu. Nakon resuspendiranja, 20 μ L stanica je pomiješano s 80 μ L prethodno priređene otopine tripanskog modrila u jažici mikrotitarske pločice. Tako priređena suspenzija je prebačena pod pokrovno stakalce Neubauer komorice za brojanje. Stanice su prebrojane pod svjetlosnim mikroskopom tako da su pobrojane samo one koje su se nalazile unutar rešetke. Zbog razrjeđenja potrebno je preračunati broj stanica na početnu koncentraciju te je isto rađeno prema jednadžbi:

$$N = \frac{n}{4} \cdot 5 \cdot 10^4$$

pri čemu N označava broj stanica u mililitru suspenzije, n označava broj stanica u zadanom polju točno poznatog volumena, 4 označuje broj prebrojanih rešetki, množenje brojem 5 se odnosi na peterostruko razrjeđenje suspenzije u mikrotitarskoj jažici te se 10^4 odnosi na volumen komore iznad jedne rešetke za brojanje.

3.3.4. Tretman staničnih linija salinomycinom i monenzinom

Nakon definiranja količine stanica u mililitru suspenzije za svaku staničnu liniju, izračunat je volumen (V) u kojem se nalazi 10^6 stanica prema jednadžbi

$$V[mL] = \frac{10^6 [br. st.]}{N [br. st./mL]}$$

Izračunati volumen nasađen je na ploče za uzgoj te je dodan medij za propagaciju tako da ukupan volumen na petrijevcu bude 10 mL. Stanice se inkubiraju 24h na 37 °C u atmosferi CO₂ volumnog udjela 5% i 95 % relativne vlažnosti.

Sljedeći dan medij za propagaciju se ukloni iznad stanica te se svaka pločica ispiru 4 puta s 5 mL PBS-a. Na odgovarajuće pločice doda se novi medij s nosačem (DMSO, kontrolni uzorak) koji ne sadrži FBS te zasebno medij sa salinomycinom i monenzinom. Nastavi se inkubacija u trajanju od 48h pri istim uvjetima kao i za propagaciju kulture.

3.3.5. Izolacija sekretiranih proteina te određivanje koncentracije proteina

Nakon 48 satne inkubacije pločice su stavljene na led. Medij iznad stanica, volumena 10 mL, je prebačen u epruvete. Medij je centrifugiran 10 min na 2000 g pri +4°C te je supernatant prebačen u nove epruvete.

Centrifugalne filter kolone su hidratizirane dva puta s 1 mL MiliQ vode uz centrifugiranje na 750 g i 5 min. Potom je dodavan po 1 mL sakupljenog medija dok nije profiltriran ukupni volumen. Nakon svakog dodatka medija kolone su centrifugirane 15 min na 4000 g. Koncentrat je sakupljen u mikroepuvete okretanjem kolone te centrifugiranjem 2 min pri 1000 g. Površina filtera je dodatno isprana s 300 µL MiliQ vode te su kolone centrifugirane 2 min pri 1000 g.

Koncentracija proteina je određena prema komercijalno dostupnom BCA protokolu. Ukratko, koncentracija je određivana u mikrotirarskim pločicama s 96 jažica. U jažice se pipetiraju duplikati proteinskog standarda, albumin iz seruma goveda (eng. „*bovine serum albumin*“, BSA), volumena 10 µL u koncentracijama 2,0 mg mL⁻¹, 1,5 mg mL⁻¹, 1,0 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹, 0,25 mg mL⁻¹ te 0,125 mg mL⁻¹. U duplikatima se također pipetiraju uzorci (10 µL). Indikatorska otopina BCA seta se priredi miješanjem otopina A i B u omjeru 50:1, prema preporuci proizvođača. U svaku jažicu sa standardom i uzorkom se doda 190 µL indikatorske otopine koje se dobro promiješaju pipetiranjem. Pločica se nakon toga inkubira 30 min na 37 °C. Po završetku inkubacije intenzitet obojenja indikatorske otopine se određuje spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 570 nm. Pomoću poznate koncentracije standarda i izmjerene apsorbancije konstruira se baždarni dijagram iz kojeg se interpolacijom odredi nepoznata koncentracija proteina u uzorcima.

3.3.6. Deglikozilacija sekretiranih proteina

Deglikozilirano je 30 µg proteina od svakog eksperimentalnog uzorka za tretmane i kontrole svake stanične linije. Prije same deglikozilacije volumen otopine koji sadrži 30 µg proteina je

ispipetiran u pločicu od 96 jažica volumena 1 mL te stavljen na sušenje preko noći. Nakon sušenja na istu pločicu u zasebne jažice je dodano 10 μ L plazma standarda. Potom je pipetirano 20 μ L SDS-a masenog udjela 2% na plazma standard te 30 μ L SDS-a masenog udjela 1,33% na uzorke. Pločica se prekrije aluminijskom adhezivnom folijom te se takva pločica inkubira 10 min na 65 °C. Nakon inkubacije, pločica se 30 min hladi na sobnoj temperaturi. U svaku jažicu s uzorkom i standardom, na ohlađenu pločicu, se doda 10 μ L Igepal-a masenog udjela 4%. Smjesa se miješa 15 min uz lagano potresanje na tresilici.

Enzimaska otopina PNGaze F se priredi dodatkom 10 μ L 5x PBS-a i 0,3 μ L PNGaze F po uzorku ukupno.

Na uzorke i standard se doda 10 μ L svježe priređene enzimske otopine. Pločica se potom ponovo prekrije aluminijskom adhezivnom folijom te se zatim inkubira 18h na 37 °C.

3.3.7. Obilježavanje slobodnih glikana i njihovo pročišćavanje

Prilikom svakog obilježavanja korištena je svježja otopina fluorescentne boje prokainamida. Otopina za obilježavanje po uzorku sadrži: 25 μ L octene kiseline volumnog udjela 30% u dimetil sulfoksidu, 1,08 mg prokainamida te 1,12 mg 2-pikolin-borana. Otopina se priprema tako da se prvo priredi otopina octene kiseline volumnog udjela 30% u dimetil-sulfoksidu koja se dodaje na izvagani prokainamid. Sve se pomiješa na tresilici te se tako priređena otopina dodaje na izvagani 2-pikolin-boran koji se otopi na tresilici.

U svaki uzorak i standard dodaje se 25 μ L svježe priređene otopine fluorescentne oznake prokainamida. Pločica se prekrije s adhezivnom aluminijskom folijom te se inkubira 2h na 65 °C. Nakon inkubacije pločica se hladi na sobnoj temperaturi ~ 30 min.

Pročišćavanje slobodnih glikana je rađeno na GHP pločici, ekstrakcija na čvrstoj fazi, uz pomoć vakuum manifolda. GHP pločica se ispire 200 μ L svježe pripremljenom otopinom etanola volumnog udjela 70%, 200 μ L ultračiste vode te 200 μ L hladne otopine acetonitrila volumnog udjela 96%, svaka otopina je odsisana u otpad prije nanošenja sljedeće.

U jažicu s uzorcima se dodaje 700 μ L 100%-tnog hladnog acetonitrila te se sav volumen prebaci na GHP pločicu, inkubira 2 min te odsisa u otpad. Uzorci se ispiru 4 puta s 200 μ L hladne otopine acetonitrila volumnog udjela 96% koji se potom odsisana u otpad poslije svakog dodatka otopine acetonitrila. Potom se na GHP pločicu dodaje se 200 μ L hladnog acetonitrila volumnog udjela 96% te se pločica centrifugira 5 min na 170 g.

Prilikom elucije, GHP pločica se postavi iznad nove pločice za prikupljanje uzorka, doda se 90 μL ultra-čiste vode te se sve zajedno stavi na tresilicu u trajanju od 15 min. Nakon toga, GHP pločica se centrifugira 5 min na 200 g. Ovaj postupak se još jednom ponovi. Konačni volumen obilježenih i pročišćenih glikana iznosi 180 μL .

Uzorci s HMLE-Twist stanične linije su dodatno pročišćeni na C18 obrnutoj fazi. Po uzorku se priredi 200 μL masene koncentracije 50 mg mL^{-1} C18 obrnute faze u acetonitrilu volumnog udjela 80% te se doda 200 μL obrnute faze u jažice *Orochem* filtarske pločice koja je postavljena iznad vacuum manifolda. Obrnuta faza je aktivirana i kondicionirana ispiranjem faze prvo tri puta s 200 μL acetonitrila volumnog udjela 80%, nakon svakog dodatka acetonitril je odsisan u otpad. Potom je tri puta isprana s 200 μL trifluoroctene kiseline volunog udjela 0,1%, nakon svakog dodatka kiselina je odsisana u otpad. Uzorci su razrijeđeni deset puta s trifluorocetnom kiselinom volunog udjela 0,1%. Nadalje, razrijeđeni uzorci su dodani na *Orochem* filtarsku pločicu i inkubirani na sobnoj temperaturi 2 min. Uzorci su ispirani tri puta s 200 μL otopine trifluoroctene kiseline volunog udjela 0,1%, nakon svakog dodatka kiselina je odsisana u otpad. Potom se na uzorke doda otopina acetonitrila volunog udjela 20% te se inkubira 2 min na sobnoj temperaturi. Glikani su eluirani u čistu pločicu centrifugiranjem sa stepenastim povećavanjem brzine centrifugiranja od 15 g do 108 g u trajanju od 5 min. Eluat je osušen u vakuumskom uparivaču te potom resuspendiran u 100 μL ultra-čiste vode.

3.3.8. Separacija i analiza slobodnih glikana te njihovih fragmenata

Uzorci su analizirani na vezanom sustavu tekućinske kromatografije hidrofilnih interakcija (eng. „*hydrophilic interaction liquid chromatography*“ (HILIC)) ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa (HILIC – UPLC – MS). Pomoću HILIC – UPLC-a glikani su separirani te fluorescentno detektirani, a pomoću MS-a im je određena masa. Uzorci su pripremljeni u plastičnim vialama tako da konačni volumni udjeli budu: 25% vodene faze uzorka te 75% organske faze, acetonitrila. Priređivan je volumen od ukupno 60 μL te je injektirano 50 μL na kolonu. Prilikom elucije korišten je gradijentni program, tj. promjena brzine protoka i udjela otapala u vremenu, kako je prikazano u Tablici 1. uz uporabu dva otapala: otapalo A (vodena otopina amonijeva formijata koncentracije 100 mmol dm^{-3}) te otapalo B (100% ACN).

Tablica 1. Kromatogramski program korišten prilikom separacije glikana na hidrofilnoj koloni (eng. „*hydrophilic interaction liquid chromatography*“ (HILIC)). Korištena su dva otapala: otapalo A je vodena otopina amonijeva formijata koncentracije 100 mmol dm⁻³ te otapalo B, 100% ACN.

| <i>t</i> / min | protok / mL min ⁻¹ | A / % | B / % |
|----------------|-------------------------------|-------|-------|
| 0,00 | 0,561 | 30,0 | 70,0 |
| 1,47 | 0,561 | 30,0 | 70,0 |
| 24,81 | 0,561 | 47,0 | 53,0 |
| 25,50 | 0,250 | 100,0 | 0,0 |
| 28,00 | 0,250 | 100,0 | 0,0 |
| 29,00 | 0,250 | 30,0 | 70,0 |
| 32,50 | 0,561 | 30,0 | 70,0 |
| 45,00 | 0,400 | 0,0 | 100,0 |
| 55,00 | 0,000 | 0,0 | 100,0 |

Kolona je termostatorana tijekom cijele kromatografije na 25 °C, a uzorci se prije injektiranja nalaze na 10 °C. Glikani su detektirani pomoću fluorescentne boje prokainamida koji je ekscitiran pri 310 nm te je emisija detektirana pri 370 nm.

Po eluiranju glikana s kolone, tj. nakon separacije, mjereni su spektri masa za svaki uzorak. Mjerene su mase u rasponu 50 – 3700 m/z pomoću hibridnog analizatora: kvadrupol i vrijeme leta te je brzina akvizicije spektara iznosila 0,50 Hz. Za izvor iona je korišten IonBooster u pozitivnom modu. Napon na izlasku s ionizatora iznosio je 4000 V dok je napon na kapilari iznosio 6000 V. Dušik je korišten za raspršivanje i sušenje. Tlak plina za raspršivanje iznosio je 10000 Pa, a protok plina za sušenje iznosio je 5 L min⁻¹. Temperatura sušenja bila je 220 °C.

Tandemna spektrometrija masa (MS/MS) je snimana u rasponu masa 50 – 3700 m/z. Za izvor iona je korišten IonBooster u pozitivnom modu te su ostali uvjeti snimanja jednaki kao i kod snimanja MS spektara. Fragmentacija glikana provodila se nakon detekcije i odabira 3 najintenzivnija prekursora pri brzini akvizicije spektara od 0,50 do 2 Hz. Fragmentacija je izvršena u kvadrupolu kao kolizijskoj ćeliji uz argon kao kolizijski plin.

3.3.9. Obrada podataka

Dobiveni kromatogrami su integrirani i modificirani pomoću softverskog alata unutar programskog paketa *Compass DataAnalysis* (Bruker). Ekstrahirane su vrijednosti omjera signala prema šumu, retencijska vremena, apsolutne i relativne površine kromatografskih pikova za koje je izračunata standardna devijacija i centralna varijacija za sve uzorke. Standardna devijacija je izračunata pomoću računalnog programa *Prism 5*, a centralna varijacija je izračunata u *Microsoft Office Excel 2007*. Numeracija pikova između kontrola i tretiranih kultura je rađena ručno u *Microsoft Office Excel 2007*.

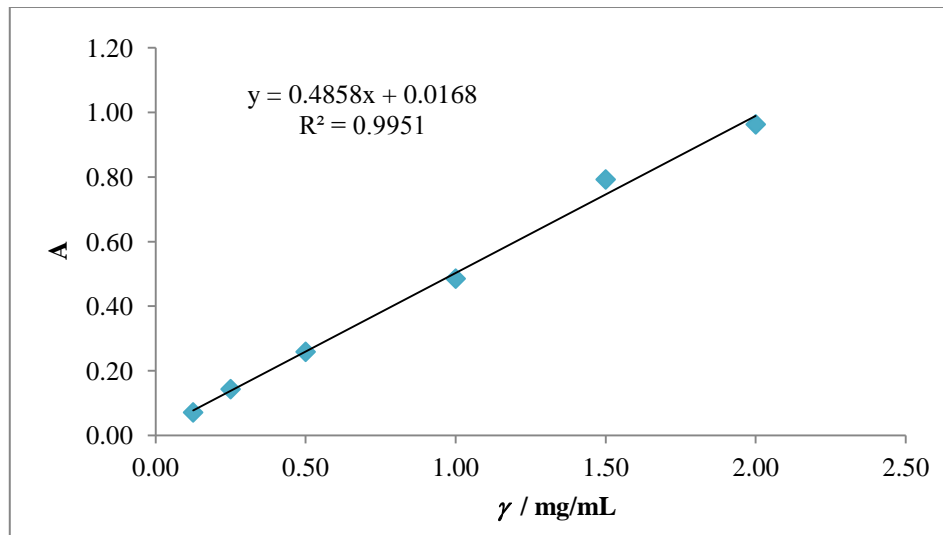
Programskim paketom *Compass DataAnalysis* analizirani su MS spektri. Analizom snimljenih m/z vrijednosti i fragmentacijskih spektara određeni su sastav i osnovne strukturalne karakteristike detektiranih glikana pomoću GlycoMod alata pri ExPASy²⁷ bioinformatičkom portalu i programa *GlycoWorkbench*.²⁸

§ 4. REZULTATI

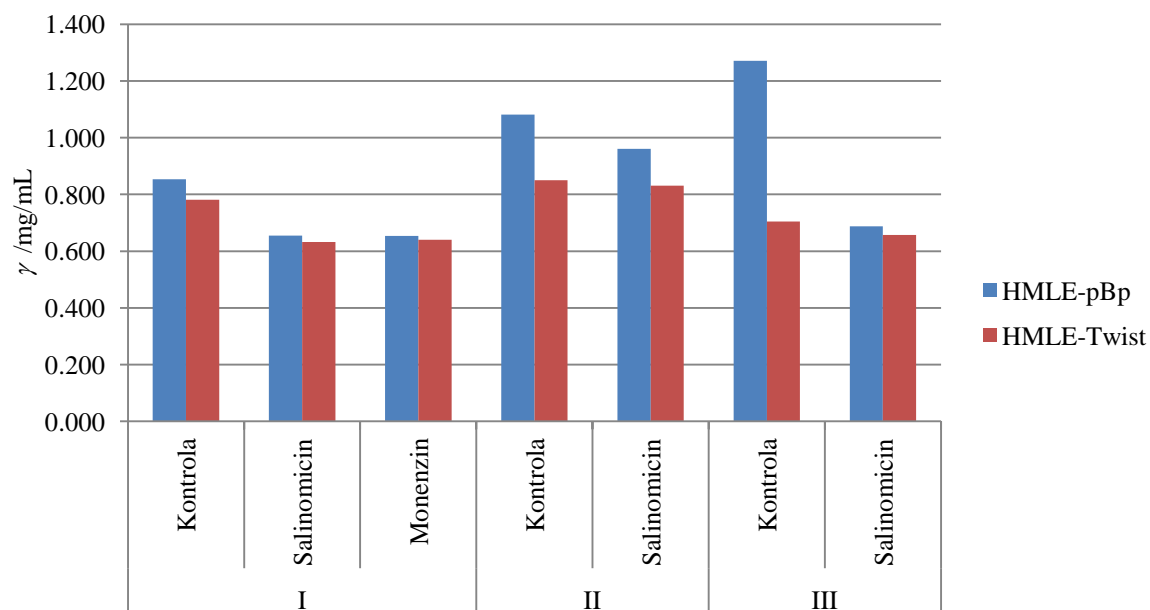
4.1.1. Razlika u koncentraciji proteina iz sekretoma HMLE-pBp i HMLE-Twist staničnih linija

Koncentracija proteina iz sekretoma HMLE-pBp i HMLE-Twist staničnih linija je određivana kako bi se normalizirala količina proteina koja je naknadno deglikozilirana. Koncentracija je određivana u četiri zasebna eksperimenta (Slika 9 i 10).

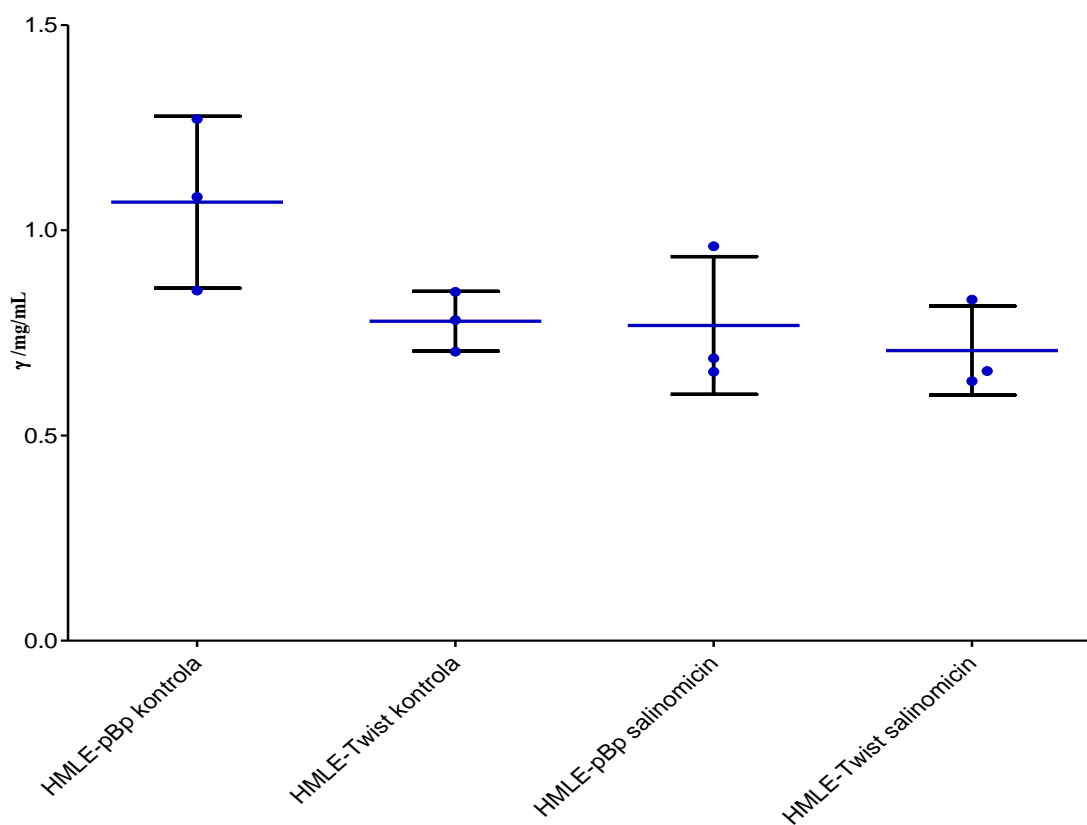
Za izradu baždarnog dijagrama i kasnije određivanje nepoznate koncentracije proteina korištene su standardne BSA te je dobivena linearna ovisnost masene koncentracije BSA o apsorbanciji kako je to prikazano na Slici 9. te slikama D1 – D3.



Slika 9. Primjer baždarnog dijagrama dobiven mjerenjem poznatih masenih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) prema tablici D1. te pripadajuća jednačba pravca prema kojoj je određena nepoznata koncentracija proteina u sekretumu stanične linije HMLE-pBp i HMLE-Twist.



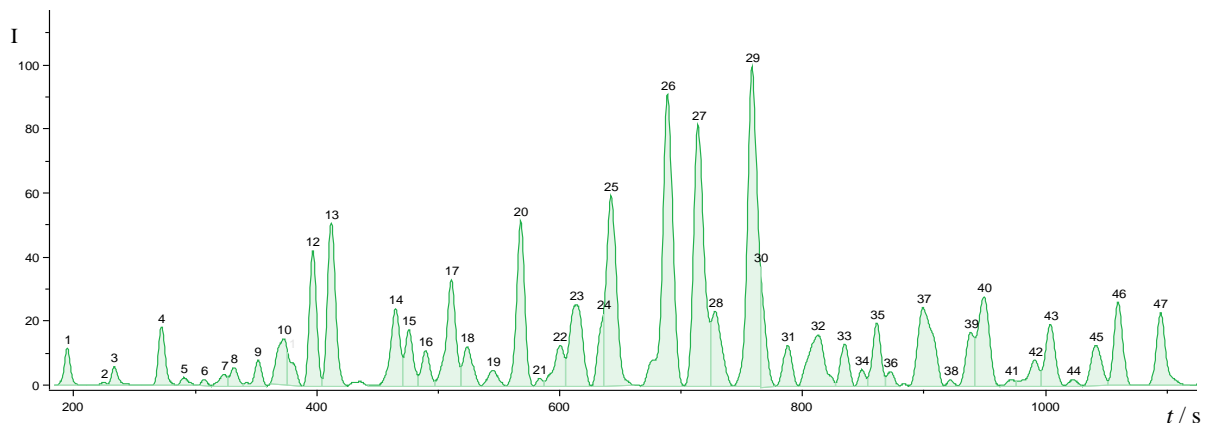
Slika 10. Usporedba masenih koncentracija proteina sekretoma iz staničnih linija HMLE-pBp i HMLE-Twist. Rimskim brojevima je označen broj eksperimenta.



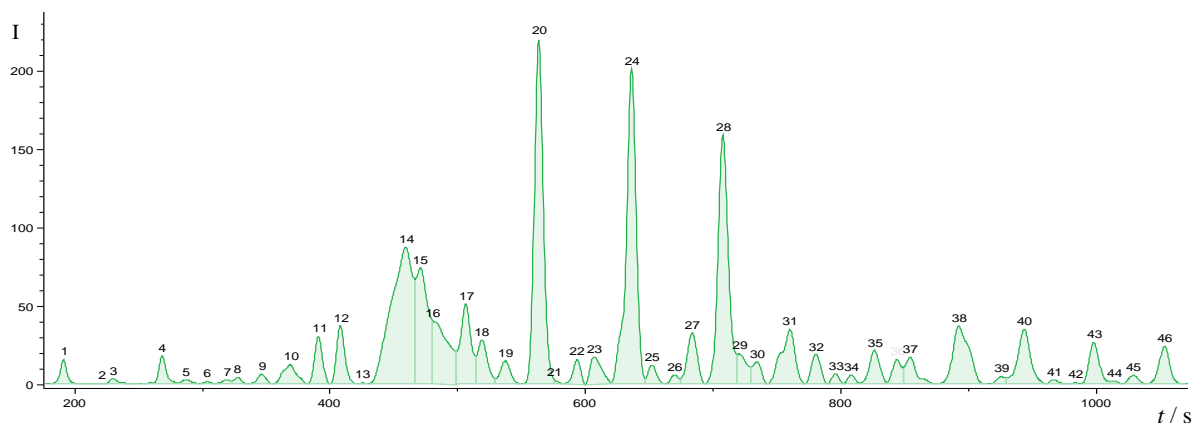
Slika 11. Odnos masenih koncentracija proteina netretiranih (kontrola) i salinomycin tretiranih staničnih kultura iz obje stanične linije nakon filtriranja kroz Amicon filter kolone. Plave točke označavaju koncentraciju nakon pojedinog mjerenja, plava linija označava prosječnu koncentraciju te crne linije označavaju raspon standardne devijacije.

4.1.2. Analiza profila N-glikoma iz sekretoma HMLE-pBp i HMLE-Twist staničnih linija

Slobodni glikani su separirani tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC) u analitičkim triplikatima iz sekretoma staničnih linija HMLE-pBp i HMLE-Twist nakon tretmana sa salinomycinom (SAL) i monenzinom (MON) te bez tretmana, (kontrola, CTRL). (Slika D4 – D9). Jedan uzorak u triplikatu HMLE-Twist nakon tretmana monenzinom je uništen, najvjerojatnije u postupku pročišćavanja slobodnih glikana te rezultat kromatografije za taj uzorak nije prikazan. Kromatogram je vremenski omeđen između 180 i 1300 sekundi, u čijem rasponu se pojavljuju separirani glikani. Integracijom kromatograma definirano je 47 kromatografskih pikova za kontrolni uzorak HMLE-pBp te 46 kromatografskih pikova za kontrolni uzorak HMLE-Twist stanične linije (Slika 12. i 13.)

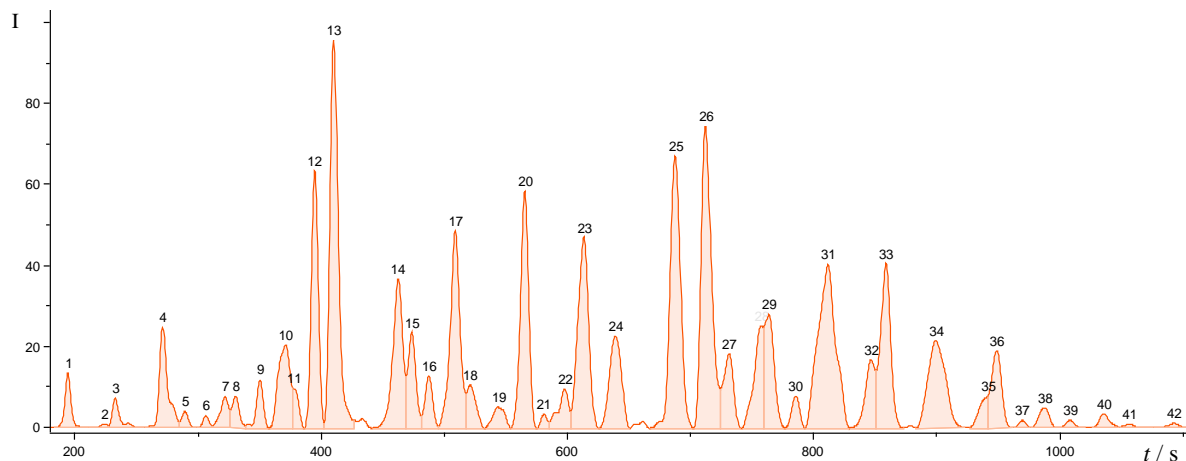


Slika 12. Kromatogram slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma kontrolnog uzorka HMLE-pBp stanične linije. Fluorescentna detekcija je ostvarena pri valnoj duljini od 370 nm.

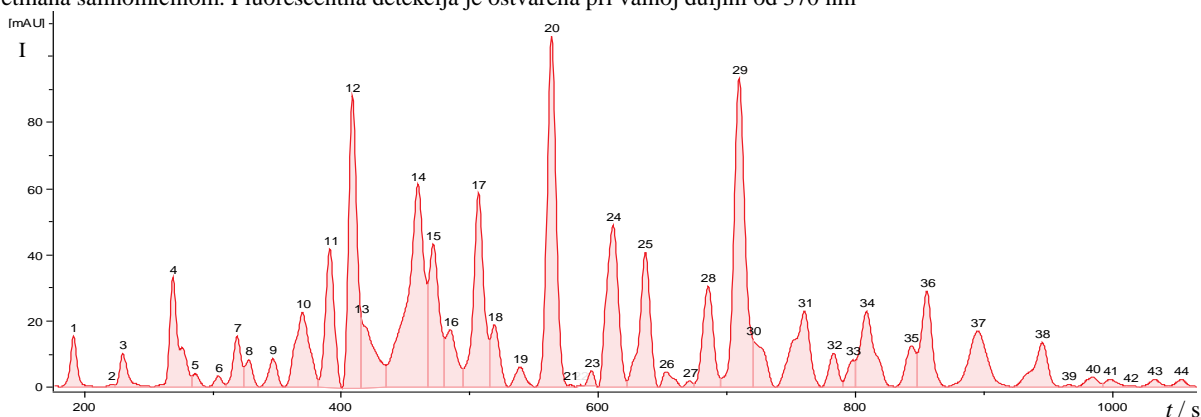


Slika 13. Kromatogram slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma kontrolnog uzorka HMLE-Twist stanične linije. Fluorescentna detekcija je ostvarena pri valnoj duljini od 370 nm. I = intenzitet

Kromatogrami glikana nakon tretmana staničnih linija sa SAL i MON imaju manji broj pikova u usporedbi s kontrolnim uzorkom, ali međusobno jednak broj pikova. Definirana su 42 pika u HMLE-pBp te 44 pika u HMLE-Twist staničnoj liniji nakon tretmana sa SAL i MON (Slika 14 i 15, samo SAL). Kromatogrami glikana iz sekretoma staničnih kultura nakon tretmana monenzinom su u dodatku (Slika D10 – D11).



Slika 14. Kromatogram slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Fluorescentna detekcija je ostvarena pri valnoj duljini od 370 nm

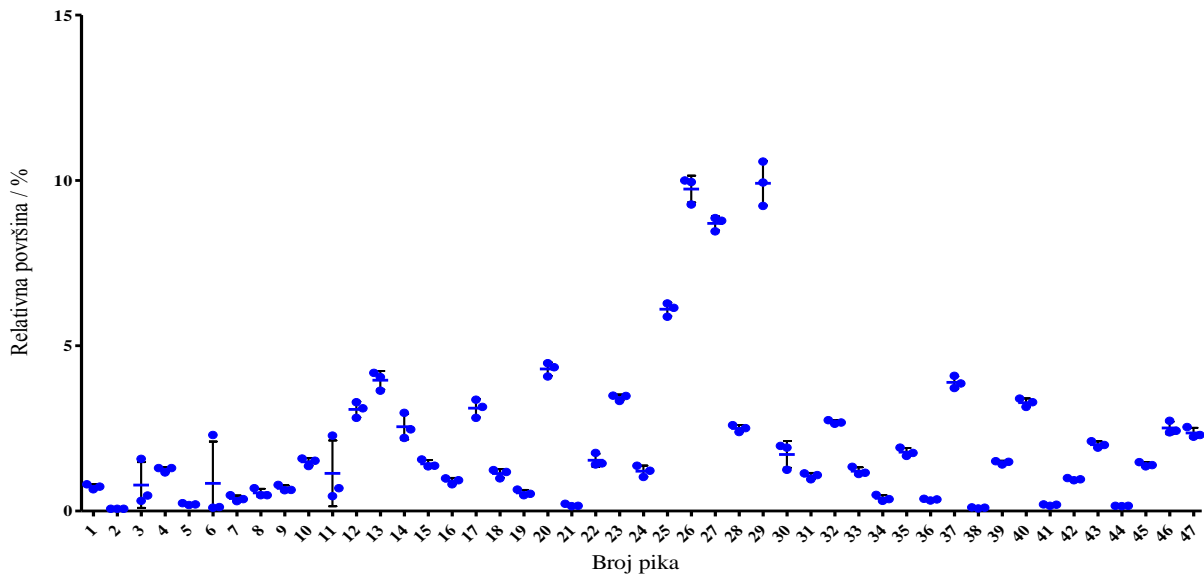


Slika 15. Kromatogram slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Fluorescentna detekcija je ostvarena pri valnoj duljini od 370 nm.

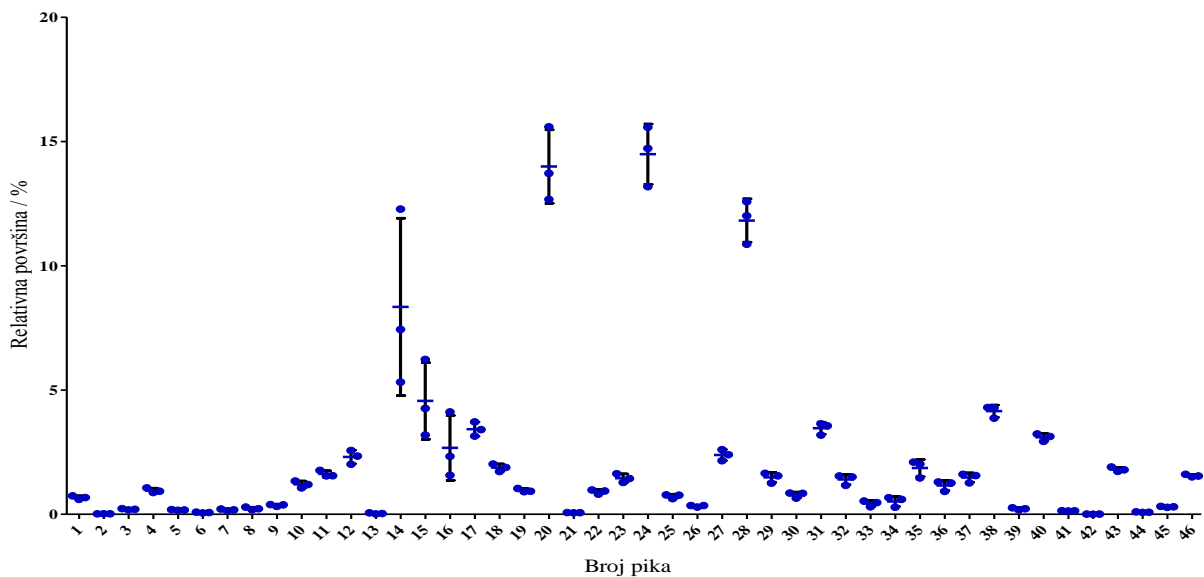
Tablice s retencijskim vremenima, apsolutnim i relativnim površinama te pripadajućim omjerom signala i šuma svakog pika se nalaze u dodatku (Tablica D4 – D20).

Prema vrijednostima relativnih površina pojedinog kromatograma unutar triplikata je izračunata standardna devijacija (SD) kako bi se odredila reproducibilnost cijelog postupka od uzorkovanja do analize. Rasap podataka, srednja vrijednost i pripadajuća SD je prikazana na Slici 16 za kontrolni uzorak HMLE-pBp te na Slici 17 za kontrolni uzorak HMLE-Twist stanične linije. Općenito, vrijednost SD-a je mala što ukazuje na dobru reproducibilnost cijelog postupka. Međutim, nekoliko pikova ima velike vrijednosti SD-a: HMLE-pBp kontrola, pikovi 3, 6, 11 te HMLE-Twist kontrola, pikovi 14 – 16, uzrok tomu je ko-elucija

nečistoće kojima nije poznato podrijetlo (Slike 11 i 12 te D10 – D11). Ova nečistoća ko-eluiraju uz glikane te također fluorescira i stoga utječe na intenzitet i oblik kromatografskih pikova. Pregledom masenih spektara uočena je m/z vrijednost od 801,4 jakog intenziteta koja predstavlja molekulu koja je izvor onečišćenja.



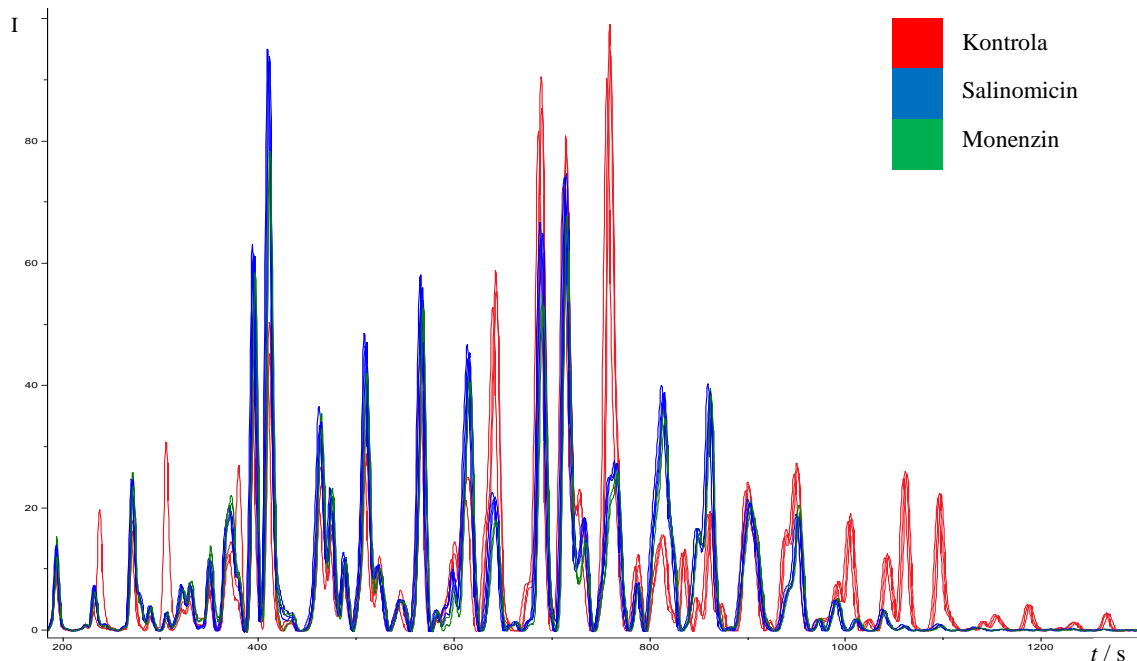
Slika 16. Odnos relativnih površina unutar triplikata kontrolnih uzoraka za HMLE-pBp staničnu liniju.



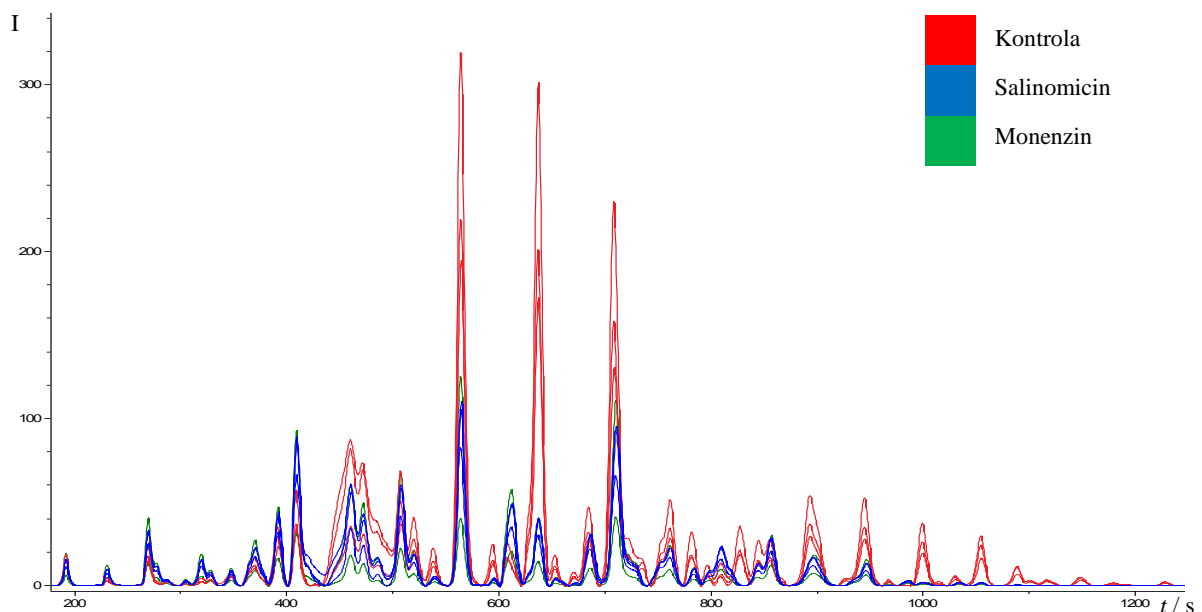
Slika 17. Odnos relativnih površina unutar triplikata kontrole za HMLE-Twist staničnu liniju.

4.1.3. Analiza utjecaja salinomicina i monenzina na glikozilaciju sekretoma HMLE-pBp i HMLE Twist staničnih linija

Uspoređivani su kromatogrami glikana za kontrolne uzorke i kromatogrami glikana nakon tretmana salinomicinom odnosno monenzinom u obje stanične linije. Slika 18. prikazuje usporedbu kromatograma glikana dobivenih iz sekretoma u staničnoj liniji HMLE-pBp te Slika 19. prikazuje usporedbu u kromatograma glikana dobivenih iz sekretoma u staničnoj liniji HMLE-Twist.



Slika 18. Usporedba kromatograma triplikata sekretiranih N-glikana HMLE-pBp stanične linije kontrole (crveno) te HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana salinomicinom (plavo) i monenzinom (zeleno).

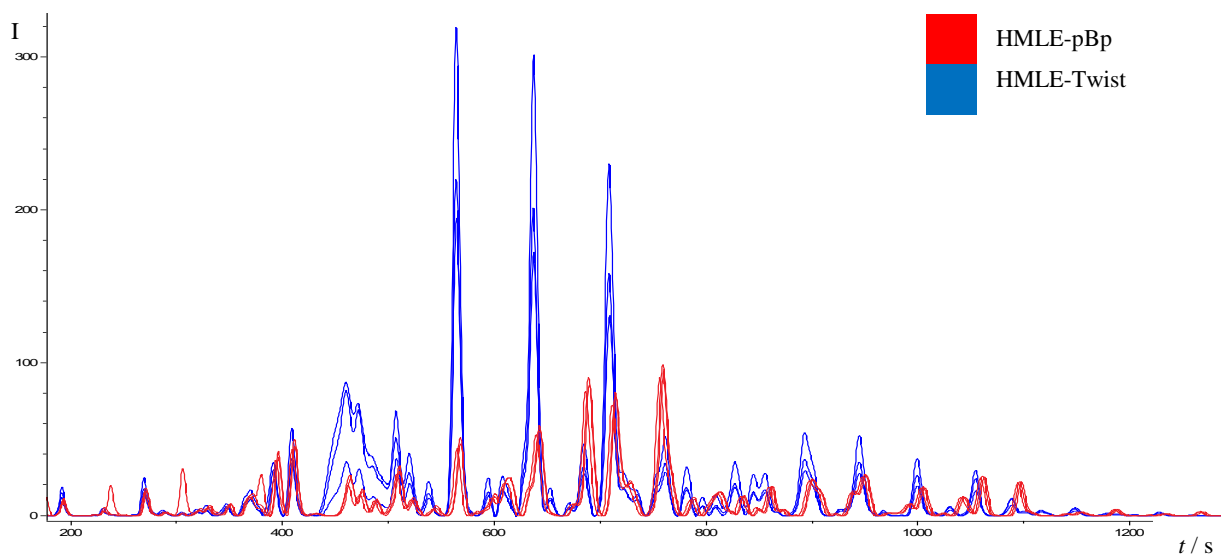


Slika 19. Usporedba kromatograma triplikata sekretiranih N-glikana HMLE-Twist stanične linije kontrole (crveno) te HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana salinomicinom (plavo) i duplikata tretiranih monenzinom (zeleno).

Kromatografski profili kontrolnih uzoraka i onih tretiranih sa salinomycinom pokazuju vrlo sličan sastav glikanskih struktura koji se očituje u pikovima identičnih retencijskih vremena. Značajna razlika se međutim vidi u intenzitetima i relativnim površinama velikog broja pikova između kontrolnih i tretiranih staničnih linija. Izraženija razlika je vidljiva na HMLE-Twist staničnoj liniji nego na HMLE-pBp. Kod manjih retencijskih vremena pikovi u tretiranim staničnim linijama su većeg intenziteta u odnosu na kontrolne uzorke te kako se pomičemo prema većim retencijskim vremenima dolazi do obrata u odnosu intenziteta gdje su sada pikovi u kontrolnim uzorcima većeg intenziteta nego u tretiranim staničnim linijama. Utjecaj tretmana salinomycinom i monenzinom ima sličan utjecaj na obje stanične linije u vidu promjene intenziteta pojedinih struktura. Za razliku od netretiranih stanica, u uzorcima HMLE-pBp tretman salinomycinom odnosno monenzinom dovodi do manjeg broja pikova. S druge strane, u uzorcima HMLE-Twist nakon tretmana dolazi do pojave dodatnog pika u odnosu na kontrolni uzorak.

4.1.4. Usporedba glikozilacijskih profila HMLE-pBp i HMLE Twist staničnih linija

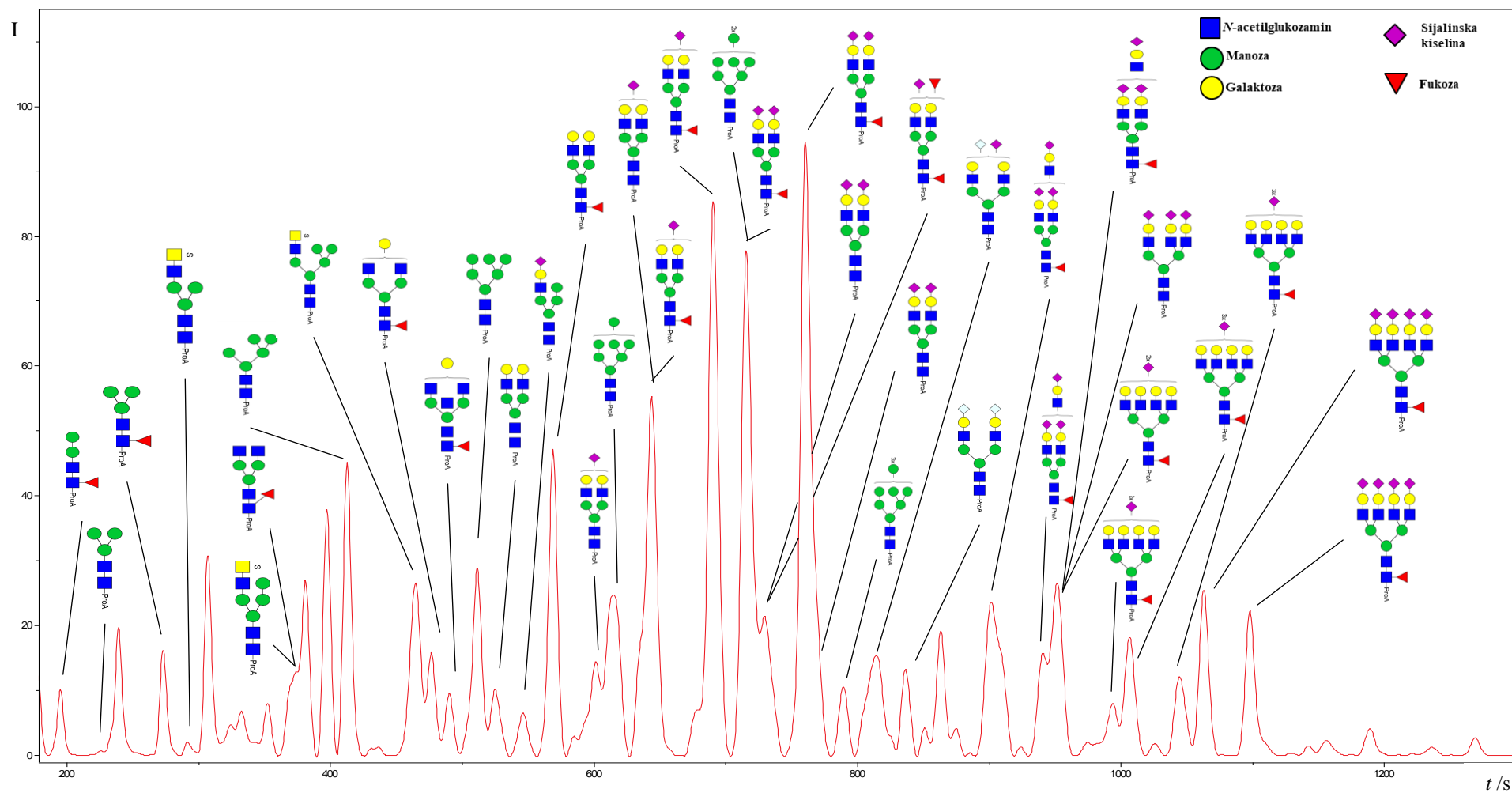
Usporedbom kromatografskih profila kontrolnih uzoraka objiju staničnih linija uočene su značajne razlike u relativnim omjerima glikanskih struktura, a pokazale su se i razlike, u manjoj mjeri, u sastavu glikana između sekretoma dviju staničnih linija. Razlika u glikomu definitivno reflektira razliku u glikozilacijskom aparatu u kompleksnom spletu enzima involviranih u sintezu glikana. Također, ukazuje i na razlike u sekretomu između dviju staničnih linija s obzirom da povećanje ili smanjenje određenog glikoproteina može utjecati i na relativne omjere detektiranih struktura (Slika 20.)



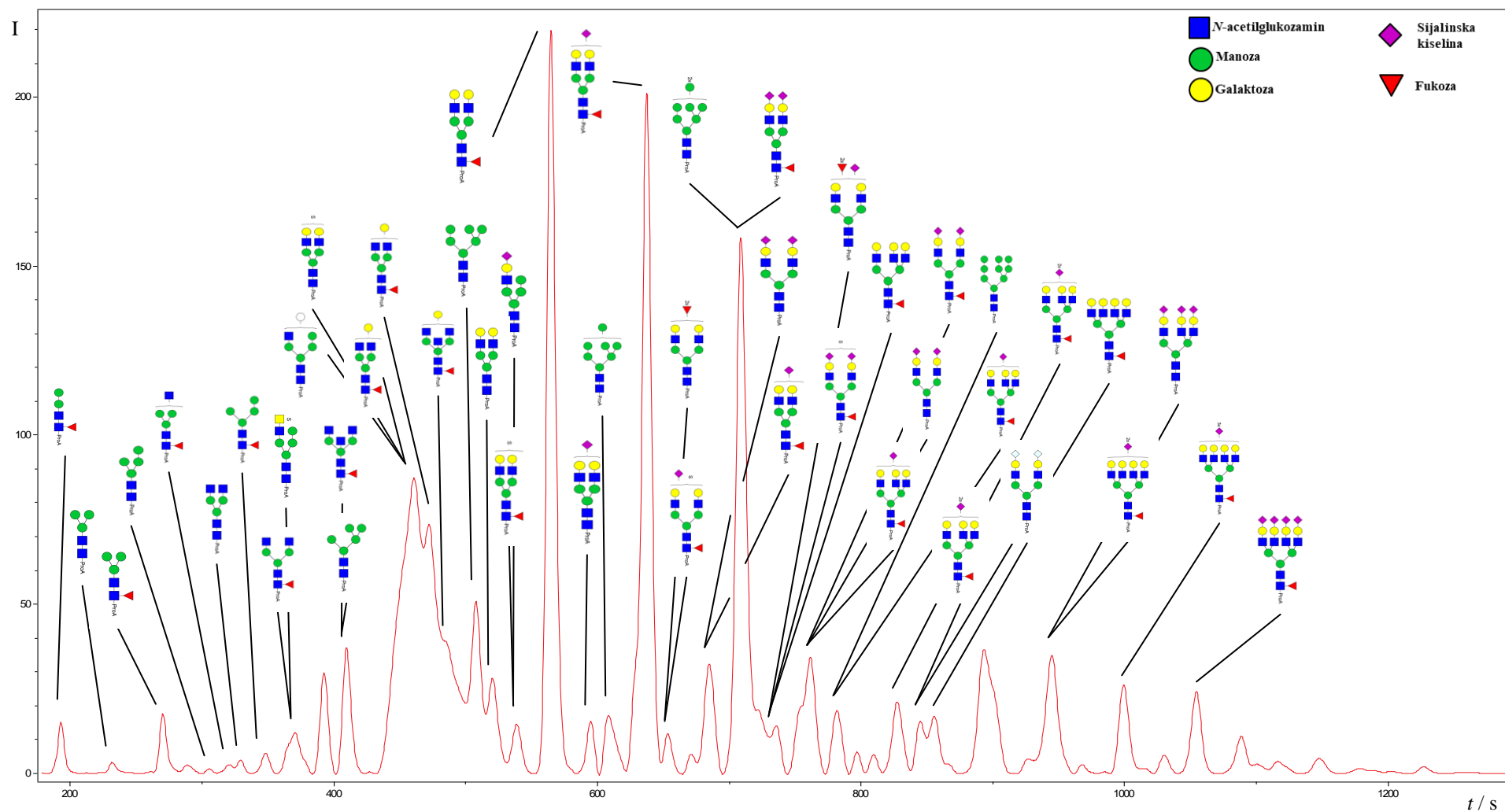
Slika 20. Usporedba kromatografskih profila kontrolnih uzoraka staničnih linija HMLE-pBp (crveno) i HMLE-Twist (plavo).

4.1.5. *Glikanske strukture u profilu N-glikoma sekretoma HMLE-pBp i HMLE-Twist stanične linije*

Opažena je promjena u sastavu glikana te njihovim strukturama u sekretomima obiju staničnih linija (vidi gore). Kako se povećava retencijsko vrijeme glikanskih struktura, povećava se i njihova veličina, a time i kompleksnost. Dobiveni N-glikom sekretoma staničnih linija pokazao je veliku kompleksnost i detektirali smo izuzetno veliki broj pikova pod kojima se eluira veliki broj jednostavnih i kompleksnih N-glikana. Kako se radi o kompleksnom biološkom uzorku s mnoštvo srodnih struktura te izoformi, određivanje sastava i strukture svake od njih je predstavljalo veliki izazov. Glavnina pikova odnosno glikana uspješno je anotirana dok za pojedine pikove nismo imali dovoljno podataka za određivanje sastava ili strukture (Slika 21 i 22). Osnovni problem je bio u intenzitetu signala, odnosno u količini eluirane strukture, a koja nije bila dovoljna za kvalitetnu analizu spektrometrijom masa.



Slika 21. Glikanske strukture u profilu N-glikoma sekretoma HMLE-pBp stanične linije



Slika 22. Glikanske strukture u profilu N-glikoma sekretoma HMLE-Twist stanične linije

§ 5. RASPRAVA

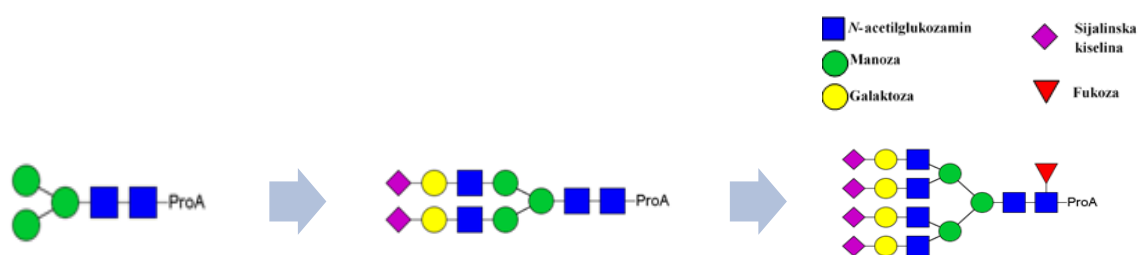
Ovim radom je istraživana utjecaj salinomicina na kromatografski profil N-glikana sekretoma staničnih linija HMLE-pBp te HMLE-Twist koji predstavljaju stanični model za istraživanje tumorskih matičnih stanica. Indukcija transkripcijskog faktora Twist u stanicama pokreće molekularni program epitelno-mezanhimalne tranzicije (EMT) te stanice nakon EMT-a imaju markere koji su asocirani s TMS. Stoga smo u ovom istraživanju koristili HMLE-Twist staničnu liniju kao model tumorskih matičnih stanica. Inače se EMT aktivira u procesu organogeneze te je proces nužan za pravilno prostorno smještanje stanica u organizmu.³ Prethodno je pokazano da salinomicin selektivno negativno djeluje na rast TMS (HMLE-Twist linije).² Gupta i suradnici su pokazali da osim salinomicina i neki drugi prirodni ionofori (nigericin, monenzin) pokazuju selektivnost spram TMS, no još do danas sam mehanizam njihovog djelovanja nije razjašnjen. S obzirom na to da je za monenzin i nigericin poznato da negativno djeluju na funkciju Golgijevog aparata te da je GA iznimno bitan za sekreciju i glikozilaciju velikog broja staničnih proteina, odlučili smo istražiti profile N-glikoma u modelu TMS-a nakon tretmana salinomicinom i monenzinom.

Svaki analizirani uzorak je sadržavao 30 µg proteina s kojim se išlo u reakciju deglikozilacije. Normalizacija prema količini proteina je izvršena kako bi se mogle usporediti relativne količine glikana između HMLE-pBp te HMLE-Twist staničnih linija, te nakon tretmana. Usporedbom njihovih glikanskih profila zapaža se relativno više glikana u uzorcima iz sekretoma HMLE-Twist nego u uzorcima sekretoma HMLE-pBp stanične linije. Opažena je i veća koncentracija proteina u HMLE-pBp nego u HMLE-Twist staničnoj liniji (Slika 10.). Objašnjenje za navedena opažanja smo pronašli u razlici transkriptoma pojedinih staničnih linija. U radu, Haihui i suradnici, su odredili translacijski profil HMLE staničnih linija te je otkrivena promjena u ekspresiji 460 membranskih i izvanstaničnih proteina.²⁹

Već na razini apsolutnih površina kromatograma N-glikoma kontrolnih uzoraka, a koje reflektiraju količinu detektiranih glikana, uočena je velika razlika između staničnih linija. Ukupna količina glikana oslobođenih iz proteina stanične linije HMLE-Twist veća je u svim triplikatima u odnosu na staničnu liniju HMLE-pBp (Slika 20). Uzevši u obzir da je reakcija deglikozilacije normalizirana na količinu proteina, i da se u svaku reakciju išlo sa količinom

od 30 µg, ovaj rezultat upućuje na to da postoji značajna razlika u sastavu sekretoma uočljiva i na razini ukupnog glikoma. Povećana razina glikozilacije na istoj količini proteina može se objasniti jedino velikim razlikama u sastavu glikoproteina između dviju staničnih linija. Ta razlika može biti u omjerima određenih glikoproteina ili u ekspresiji potpuno drugačijih glikoproteina. S obzirom da glikoproteini mogu imati od jednog pa do vrlo često 5 glikozilacijskih mjesta (moguće je i daleko više), očito je da različita ekspresija proteina ili promjena u njihovim omjerima može rezultirati u značajno različitoj količini glikanskih struktura.

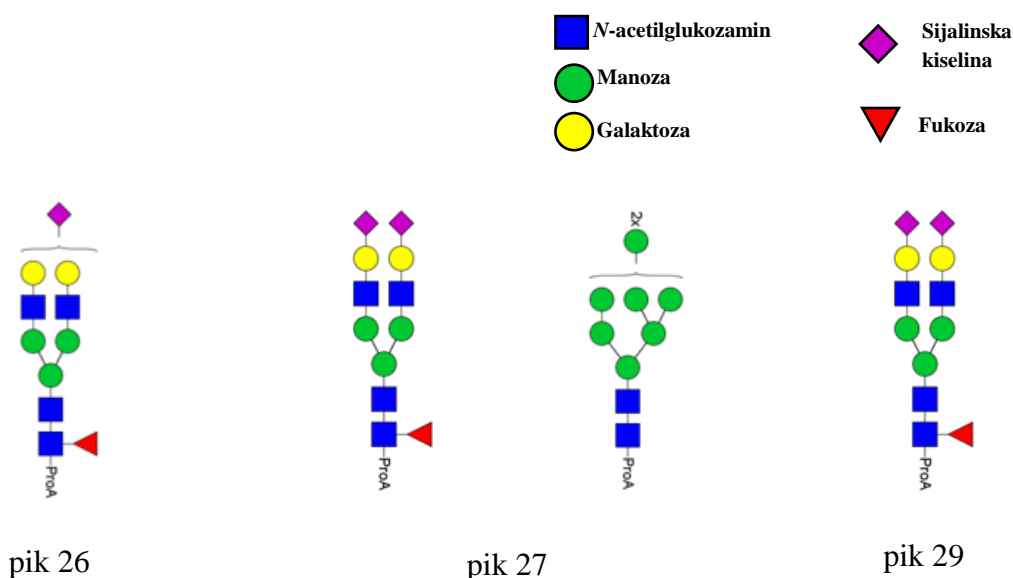
Uz osnovnu informaciju o razlikama u apsolutnim količinama oslobođenih glikana, detaljna analiza N-glikoma tretiranih i netretiranih staničnih linija otkrila je veliku razliku u relativnom odnosu glikana, ali i razliku u njihovom sastavu. Određeno je 47 kromatografskih pikova u profilu i 38 glikanskih struktura u kontroli HMLE-pBp stanične linije. Glikani su separirani prema naboju, veličini i strukturi. S kromatografske kolone su prvo eluirane male, neutralne i jednostavne glikanske strukture te potom negativno nabijene, velike i razgranate strukture (Slika 23). Nabrojene karakteristike glikanskih struktura za posljedicu određuje vrijeme zadržavanja pojedinog glikana na koloni. Vrlo razgranati, a time i veliki glikani ostvaruju veći broj interakcija s hidrofilnom kolonom u odnosu na manje i jednostavnije glikane. Nadalje, nosioc negativnog naboja na glikanima je sijalinska kiselina koja ima acetatnu skupinu. Acetat lako disocira na proton te negativno nabijenu karboksilnu skupinu koja ostvaruje jaku ion-trajni dipol interakciju te se eluira tek pri visokim udjelima pufera za eluiranje.



Slika 23. Promjena naboja, veličine i strukture glikana s povećanjem retencijskog vremena. Nosioc negativnog naboja na glikanima je sijalinska kiselina, ostale monosaharidne jedinice su neutralne. *ProA* označava fluorescentnu boju prokainamid.

Kromatogram tj. profil N-glikana HMLE-pBp stanične linije ima tri dominantna pika (Slika 18 i 24) (pikovi 26, 27 i 29) koji predstavljaju 26,96% površine u ukupnom

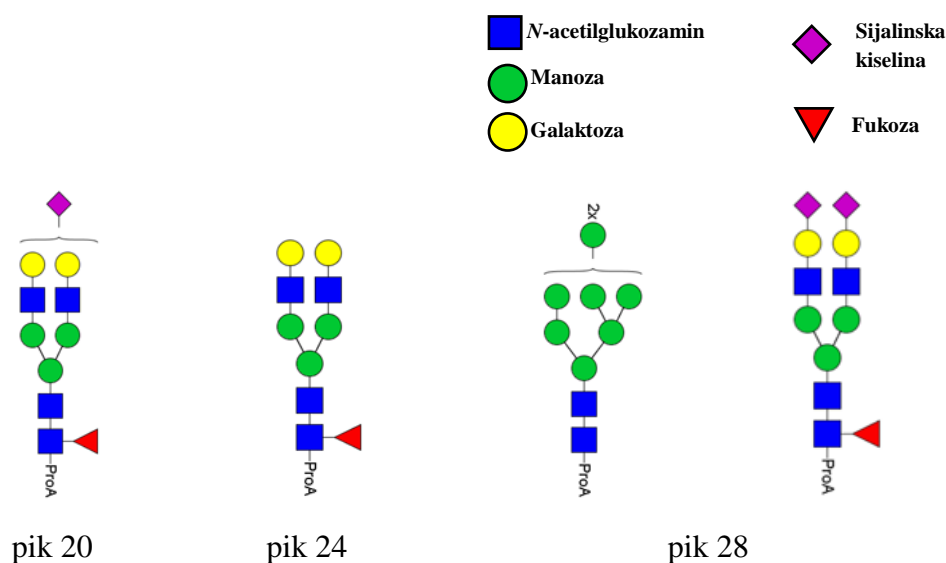
kromatogramu. Navedeni pikovi odgovaraju biantenarnim sijaliniziranim kompleksnim glikanima te su u piku 27 koeluirane dvije glikanske strukture, oligomanozna (M8) te sržno fukozilirana biantenarna struktura s dvije sijalinske kiseline (FA2G2S2) (sastav i predložene strukture su prikazane na slici 24). Disijalinizirani kompleksni glikani ispod pika 27 i 29 su



Slika 24. Sastav i predložene strukture N-glikana eluiranih ispod dominantnih pikova u kromatogramu slobodnih i prokainamidom obilježenih N-glikana HMLE-pBp stanične linije. Kod pika 27 koeluiraju jedan oligomanozni glikan dok ostali glikani pripadaju kompleksnim glikanima. *ProA* označava fluorescentnu boju prokainamid

identični po sastavu, ali je došlo do njihovog razdvajanja. Uzrok separacije sastavom identičnih glikana može se objasniti u različitom načinu povezivanja sijalinske kiseline s galaktozom, a koja može biti α -2,3 ili α -2,6 vezana.³¹

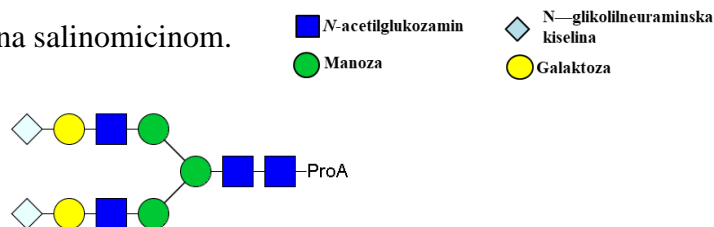
U slučaju HMLE-Twist stanične linije definirano je 46 kromatografskih pikova te 50 glikanskih struktura. Elucija glikana s kolone prati istu raspodjelu kao i kod HMLE-pBp stanične linije, eluiraju se prvo jednostavnije i neutralne strukture te potom složenije i nabijene. U profilu se ističu tri izrazito dominantna kromatografska pika (20, 24 i 28) (Slika 25) koji predstavljaju 36,72% površine u ukupnom kromatogramu. Svi navedeni pikovi su digalaktozilirani, sržno fukozilirani biantenarni glikani te se ispod pika 28 koeluiraju oligomanozni (M8) te disijalinizirani sržno fukozilirani glikan (FA2G2S2) (Slika 25). Detektirana kontaminacija se pri našim kromatografskim uvjetima izrazito razvlači preko nekoliko glikanskih pikova, a zbog činjenice da fluorescira, onemogućava kvalitetnu rezoluciju u tom dijelu kromatograma.



Slika 25. Sastav i pretpostavljena struktura N-glikana eluiranih ispod dominantnih pikova u kromatogramu slobodnih i prokainamidom obilježenih N-glikana HMLE-Twist stanične linije. Kod pika 28 koeluirira jedan oligomanozni glikan dok ostali glikani pripadaju kompleksnim glikanima. *ProA* označava fluorescentnu boju prokainamid

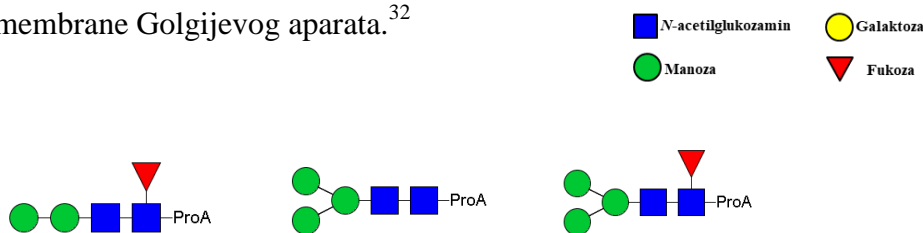
U N-glikomima staničnih linija detektirali smo i strukture koje sadrže N-glikolilneuraminsku kiselinu (Neu5Gc). Ona je strukturno izrazito slična N-acetilneuraminskoj kiselini (Neu5Ac). S obzirom da su ljudi evolucijski izgubili mogućnost sinteze Neu5Gc-a, dok ostalih kralješnjaci sintetiziraju Neu5Gc te se ona može naći na površini stanica kao i u citosolu.³⁰ postavlja se pitanje kako je moguće da se nalazi u humanim staničnim linijama. Detaljnim skeniranjem naših protokola uočili smo da su stanične kulture uzgajane u mediju koji je suplementiran ekstraktom goveđe hipofize bez kojeg stanice nisu mogle proliferirati u kulturi. Ekstrakt hipofize sadrži proteine (glikoproteine) te hormone neophodne za rast stanica u kulturi. Postupak izolacije proteina za reakciju deglikozilacije ne diskriminira proteine sekretirane iz staničnih linija i proteine iz ekstrakta hipofize, pa je stoga uočena glikanska kontaminacija čije podrijetlo je iz ekstrakta hipofize. Sastav i struktura glikanske kontaminacije su prikazani na slici 26. Navedena struktura je dominantna u pik 35 (1,67% je udio površine pika u ukupnom kromatogramu) kod HMLE-pBp stanične linije te u pik 37 (1,46% je udio površine pika u ukupnom kromatogramu) kod HMLE-Twist stanične linije. Spomenute glikanske strukture koje potječu iz suplementa nismo mogli odstraniti. U teoriji, ove strukture su mogle uzrokovati veliki šum i prekriti razlike između tretiranih i netretiranih staničnih linija, no analiza same hranjive podloge pokazala je nizak intenzitet u odnosu na analizu N-glikoma sekretoma te je time

predstavljala slabi pozadinski šum. S obzirom da je kontaminacija suplementom identična u svim provedenim eksperimentima postojala je samo opasnost da efekt tretmana ne bude uočen. To se nije dogodilo, efekt je bio izrazito jak te je unatoč pozadinskom šumu uočena promjena u N-glikomu nakon tretmana salinomycinom.



Slika 26. Sastav i struktura glikanske kontaminacije u profilu N-glikana u obje stanične linije. Struktura je dominantna u piknu 35 kod HMLE-pBp te piknu 37 kod HMLE-Twist stanične linije. *ProA* označava fluorescentnu boju prokainamid.

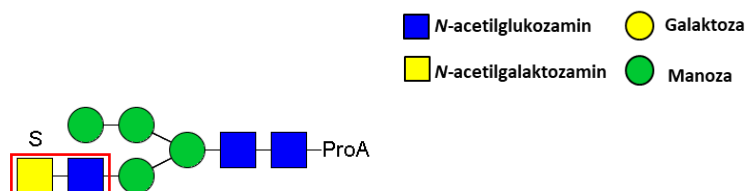
Uz tri glavne skupine N-glikana (kompleksni, oliomanozni te hibridni glikani⁴) u N-glikomu staničnih linija detektirali smo paukimanoznu strukturu $\text{Man}_{3-4}\text{GlcNAc}_2$.⁴ Karakterizira ih mali broj manoznih jedinica u strukturi do maksimalno četiri manoze. Prema literaturi kralješnjaci ne mogu sintetizirati paukimanozne glikane jer ne ekspimiraju gen koji kodira enzim β -N-acetilheksosaminidazu, ključan enzim u sintezi paukimanoznih glikana. Unatoč tome, Lee i suradnici su detektirali paukimanozne glikanske strukture prilikom određivanja profila N-glikana iz sekretoma u više staničnih linija karcinoma dojke.³¹ (Slika 27.). Nadalje, u svom radu, Maszczak-Seneczko i suradnici su prilikom supresije UDP-GlcNAc transportera uočili pojavu paukimanoznih glikana. UDP-GlcNAc je transporter koji unosi aktivirani oblik GlcNAc-a preko membrane Golgijevog aparata.³²



Slika 27. Sastav i potencijalne strukture paukimanoznih glikana. Strukture su određene u HMLE-pBp i HMLE-Twist staničnoj liniji. Smatra se da kralješnjaci nisu enzimski u stanju sintetizirati paukimanozne glikane. *ProA* označava fluorescentnu boju prokainamid

Prilikom određivanja profila N-glikana i njihovih struktura nađena je disaharidna jedinica GalNAc- β -1-4-GlcNAc odnosno LacdiNAc. U radu Lee i suradnika je određivan profil i strukture N-glikana u tumorskim stanicama dojke te je nađeno da se LacdiNAc ekspimirira u staničnim linijama koje pripadaju bazalnom B molekularnom tipu karcinoma dojke te u zdravom epitelnom tkivu. Ekspresija LacdiNAc-a je dvostruko veća u staničnim linijama karcinomima nego u zdravom epitelnom tkivu zbog čega je LacdiNAc potencijalni

marker za bazalni B tip karcinom dojke.³¹ Ista disaharidna jedinica je pronađena u obje istraživane stanične linije te je dodatno sulfonirana. LacdiNAc u staničnim linijama bi mogao upućivati na kancerogena svojstva TMS, što je potrebno detaljnije istražiti na većem broju staničnih linija i karcinoma. Kod HMLE-pBp stanične linije su određene tri strukture koje u svom sastavu imaju LacdiNAc, dok je u HMLE-Twist staničnoj liniji detektirana jedna struktura (Slika 21 i 22).



Slika 28. N-glikan kojem je određena disaharidna jedinica GalNAc- β -1-4-GlcNAc (LacdiNAc), označena je crvenim pravokutnikom. Struktura je određena u obje stanične linije. S označava sumpor, ProA označava fluorescentnu boju prokainamid.

Proces glikozilacije je raspodijeljen unutar Golgijevog aparata, tj. enzimi koji kataliziraju modifikaciju glikana su lokalizirani unutar različitih dijelova Golgijevog aparata.⁴ Golgijev aparat je podijeljen na *cis*-, *medial*- i *trans*-Golgijevu cisternu te *trans* Golgijevu mrežu. Unutar *cis*-Golgijeve cisterne manozidaze modificiraju Man₈GlcNAc₂ do Man₅GlcNAc₂ koji je ključan intermedijer za sintezu kompleksnih i hibridnih glikana. *Medial*-Golgijeva cisterna je mjesto inicijacije sinteze kompleksnih i hibridnih glikana. Na kraju glikoproteini prelaze u *trans*-Golgijevu cisternu gdje se odvija fukozilacija, sijalinizacija te dodatak galaktoze na antenarni GlcNAc.⁴ Uz enzime lokalizirane u cisternama Golgijevog aparata, za proces glikozilacije značajni su i transporter koji prenose aktivirani oblik monosaharida. Transporteri su transmembranski proteini koji se protežu cijelom širinom membrane te pripadaju tipu III membranskih proteina. Djeluju kao antiporter, izmjenjuju nukleotid-difosfat monosaharid za nukleotid-monofosfat.³³

Usporedbom profila N-glikana netretirane i salinomicinom tretirane stanične kulture HMLE-pBp i HMLE-Twist uočavaju se značajne razlike. Velike složene glikanske strukture su u potpunosti izostale nakon tretmana salinomicinom, konkretnije sijalinizirani tetraantenarni glikani uopće nisu detektirani u staničnim linijama nakon tretmana. Također je došlo do smanjivanja relativnog udjela biantenarnih kompleksnih struktura s galaktozom i sijalinskom kiselinom dok se relativni udio jednostavnijih struktura (G0, visoko manozne strukture) povećao. Mogući razlog navedenih promjena može se objasniti narušavanjem funkcionalnosti *medial*-Golgijeve cistrene gdje se odvija početak sinteze razgranatih

kompleksnih glikana. Pokazano je da supresijom UDP-N-acetilglukozamin transportera u Golgijevom aparatu izostaju tri- i tetraatenarne glikanske strukture. Zbog izostanka aktiviranog supstrata za sintezu početka antene dolazi do nakupljanja jednostavnijih struktura pri čemu se ne uočavaju promjene u biantennarnim glikanskim strukturama.³² Autori navode da je izostanak promjene na bi-antennarnim glikanima posljedica više faktora: postojanje alternativnog transportera koji transportira UDP-GlcNAc enzimima za sintezu mono- i biantennarnih glikana; različita aktivnost enzima koji sintetiziraju mono-/biantennarne te tri-/tetraantennarne glikanske strukture, što u slučaju nedostatka supstrata usmjerava katalizu prema biantennarnim strukturama glikana.³² Pod utjecajem salinomicina mijenja se morfologija Golgijevog aparata (neobjavljeni rezultati M. Marjanović), pa pretpostavljamo da također dolazi do promjene u lipidnom dvosloju što za posljedicu ima moguću promjenu u funkcionalnosti UDP-N-acetilglukozamin transportera koji je sastavni dio dvosloja. Promjena u funkcionalnosti bi se u tom slučaju reflektirala na koncentraciju UDP-GlcNAc u lumenu Golgijevog aparata prije i nakon tretmana, što u sklopu ovog istraživanja nije mjereno. Mora se uzeti u obzir da je salinomicin ionofor te uslijed promjene pH lumena Golgijevog aparata dolazi do promjene pH vrijednosti i citosola što moguće narušava razne sintetske procese, stoga je moguće da je u citosolu u nekoj mjeri inhibirana sinteza UDP-GlcNAc-a. Nadalje, poznato je da promjena pH, tj. povećanje pH vrijednosti lumena Golgijevog aparata, pod utjecajem monenzina, izaziva fragmentaciju Golgijevog aparata,⁷ pa se izostanak visoko razgranatih glikanskih struktura može pojasniti delokalizacijom esencijalnih proteina za ovaj proces. S obzirom da je efekt tretmana monezinom i salinomicinom gotovo identičan, za pretpostaviti je i da su mehanizmi u pozadini slični ili čak identični.

U profilima HMLE-Twist stanične linije uočava se izražena razlika u relativnoj količini glikanskih struktura dominantnih pikova među profilima. Primijećen je jači efekt salinomicina na HMLE-Twist nego na HMLE-pBp staničnu liniju. HMLE-Twist je dobiven *in vitro* indukcijom epitel-mezenhimalne tranzicije ekspresijom transkripcijskog faktora Twist.² Na oko vidljiva promjena prilikom indukcije Twista je promjena fenotipa i morfologije stanice, tj. stanice poprimaju mezenhimalni fenotip. Literaturno je poznat izraženiji utjecaj monenzina na Golgijev aparat u slučaju kada membrana ima veći udio kolesterola.⁶ Uzimajući u obzir pretpostavku da su mehanizmi djelovanja monezina i salinomicina slični, povećani udio kolesterola u membrani Golgijevog aparata stanične linije

HMLE-Twist (u odnosu na HMLE-pBp) bi mogao objasniti jače izraženi efekt oba agensa na ovu staničnu liniju.

§ 6. ZAKLJUČAK

- HMLE-pBp stanična linija sekretira veću količinu proteina od HMLE-Twist stanične linije. Profili N-glikoma sekretoma obiju staničnih linija nakon tretmana salinomicinom se ne razlikuju značajno od tretmana monenzinom što upućuje na sličan mehanizam djelovanja ova dva kemijska spoja na stanice.
- Tretman salinomicinom dovodi do izostanka kompleksnih više-antenarnih glikanskih struktura te do povećanja udjela jednostavnijih glikanskih struktura u sekretomima HMLE-pBp i HMLE-Twist staničnih linija iz čega se zaključuje da salinomicin prvenstveno negativno utječe na pravilan rad Golgijevog aparata.
- Efekt salinomicina na N-glikom sekretoma je izraženiji kod HMLE-Twist nego kod HMLE-pBp stanične linije, što možda proizlazi iz mogućih različitih udjela kolesterola u membranama organela ovih staničnih linija.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

| | |
|-------|---|
| BSA | Albumin iz goveđeg seruma |
| CTRL | Kontrola |
| EMT | Epitelno-mezenhimalna trantacija |
| ER | Endoplazmatski retikulum |
| ERAD | Razgradnja proteina u endoplazmatskom retikulumu |
| ERGIC | Endoplazmatski retikulum – Gilgijev aparat intremedijalna cisterna |
| GA | Golgijev aparat |
| HILIC | Razdjelna tekućinska kromatografija normalnih faza na koloni |
| HMEC | Ljudske epitelne stanice dojke |
| HMLE | HMEC stanice transformirane za beskonačnu propagaciju u staničnoj kulturi |
| MET | Mezenhimalno-epitelna trantacija |
| MON | Monenzin |
| MS | Masena spektrometrija |
| pBp | Stanice su transficirane plazmidom bez ekspresije ijednog proteina |
| SAL | Salinomycin |
| TGM | <i>trans</i> -Golgijeva mreža |
| TMS | Tumorske matične stanice |
| Twist | Transkripcijski faktor Twist |
| UPLC | Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti |

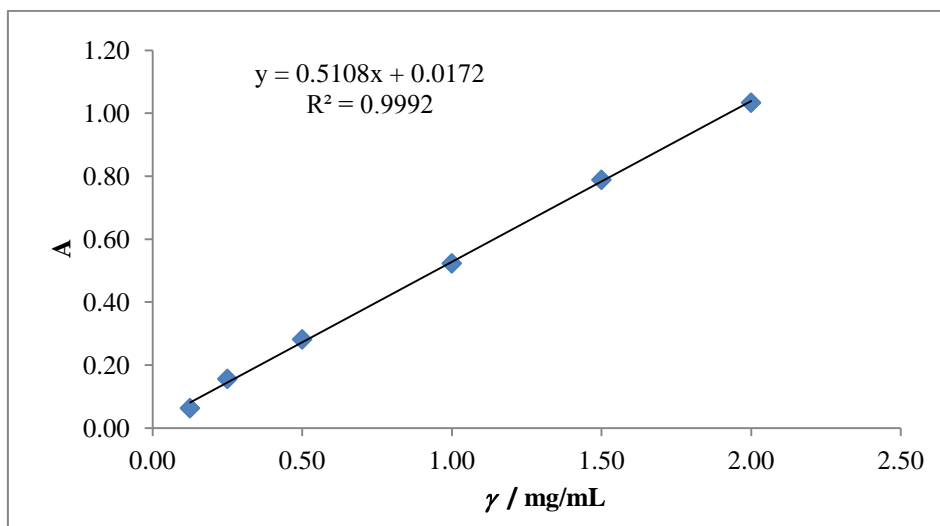
§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, M. F. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 3983–3988.
2. P. B. Gupta, T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg, E. S. Lander, *Cell* **138** (2009) 645–659.
3. R. Kalluri, R. A. Weinberg, *J. Clin. Invest.* **119** (2009) 1420–1428.
4. A. Varki, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor, New York, 2009 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1917/?report=classic> (datum pristupa 25.7.2018.)).
5. H. Lodish, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, 2004, str. 701–707.
6. A. Dinter, E. G. Berger, *Histochem. Cell Biol.* **109** (1998) 571–590.
7. S. Kellokumpua, R. Sormunenb, I. Kellokumpuc, *FEBS Lett.* **516** (2012) 217–224.
8. S. H. Hassanpour, M. Dehghani, *Journal of Cancer Research and Practice* **4** (2017) 127–129.
9. http://hlpr.hr/images/uploads/RAK_DOJKE_za_web.pdf (datum pristupa 18.11.2018).
10. M. Ghoncheh, Z. Pournamdar, H Salehiniya, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **17** (2016) 43–46.
11. O. Yersal, S. Barutca, *World J. Clin. Oncol.* **5** (2014) 412–424.
12. M. A. Velasco-Velázquez, N. Homsí, M. De La Fuente, R. G. Pestell, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44** (2012) 573–577.
13. U. Karsten, S. Goletz, *SpringerPlus* **2** (2013).
14. C. D. May, N. Sphyrís, K. W. Evans, S. J. Werden, W. Guo, S. A Mani, *Breast Cancer Res.* **13** (2011).
15. S. Kotiyal, S. Bhattacharya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453** (2014) 112–116.
16. T. N. Seyfrie, L. C. Huysentruyt, *Crit. Rev. Oncog.* **18** (2013) 43–73.
17. T. T. Onder, P. B. Gupta, S. A. Mani, J. Yang, E. S. Lander, R. A. Weinberg, *Cancer Res* **68** (2008) 3645–3654.
18. J. Yang, S. A. Mani, J. L. Donaher, S. Ramaswamy, R. A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson, R. A. Weinberg, *Cell* **177** (2004) 927–939.
19. C. Naujokat, R. Steinhart, *J. Biomed. Biotechnol.* **2012** (2012).

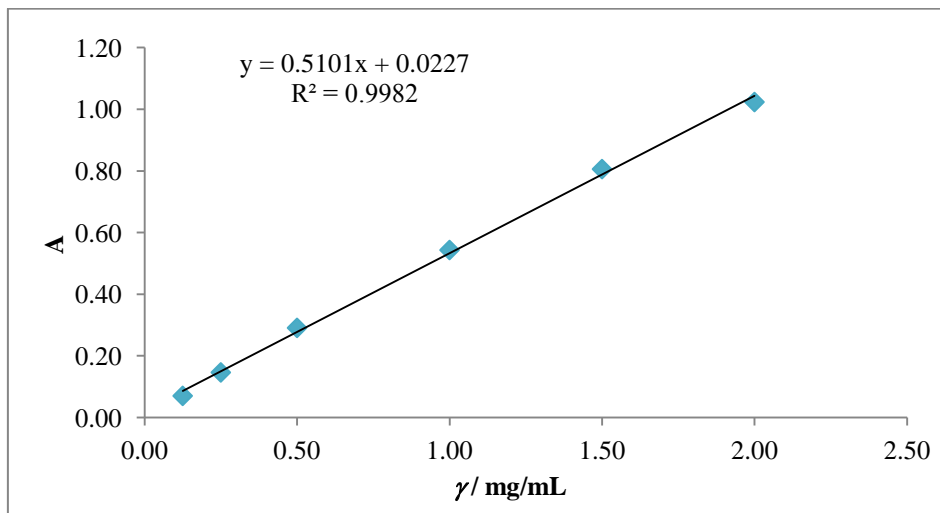
20. A. Piperno, A. Marrazzo, A. Sciala, A. Rescifina, DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/targets.2016.19.177> (datum pristupa 6.8.2018.).
21. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, W H. Freeman and Company, New York, 2008.
22. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2342058.html> (datum pristupa 17.8.2019).
23. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/monensin#section=Names-and-Identifiers> (datum pristupa 8.8.2018).
24. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.389937.html?rid=ba7af92-f1e3-4bcd-92c0-c619257ba461> (datum pristupa 17.8.2019).
25. L. Ellgard, A. Helenius, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4** (2003) 181–191.
26. D. A. Skoog, *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2009, str. 550–562 i 762–764.
27. <https://web.expasy.org/glycomod/> (datum pristupa 9.8.2018).
28. A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, Anne Dell, S. M. Haslam, *J. Proteome Res.* **7** (2008) 1650 – 1659.
29. H. Lu, K. R. Clauser, W. L. Tam, J. Fröse, X. Ye, E. N. Eaton, Ferenc Reinhardt, V. S. Donnerberg, R. Bhargava, S. A. Carr, R. A. Weinberg, *Nat. Cell Biol.* **16** (2014) 1105–1117.
30. A. Varki, *Yearb. Phys. Anthropol.* **44** (2001) 54–69.
31. L. Y. Lee, M. Thaysen-Andersen, M. S. Baker, N. H. Packer, W. S. Hancock, S. Fanayan *J. Proteome Res.* **13** (2014) 4783–4795.
32. D. Maszczak-Seneczko, P. Sosicka, T. Olczak, P. Jakimowicz, M. Majkowski, M. Olczak, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 21850–21860.
33. B. Hadley, A. Maggioni, A. Ashikov, C. J. Day, T. Haselhorst, J. Tiralongo, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **10** (2014) 23–32.

§ 9. DODATAK

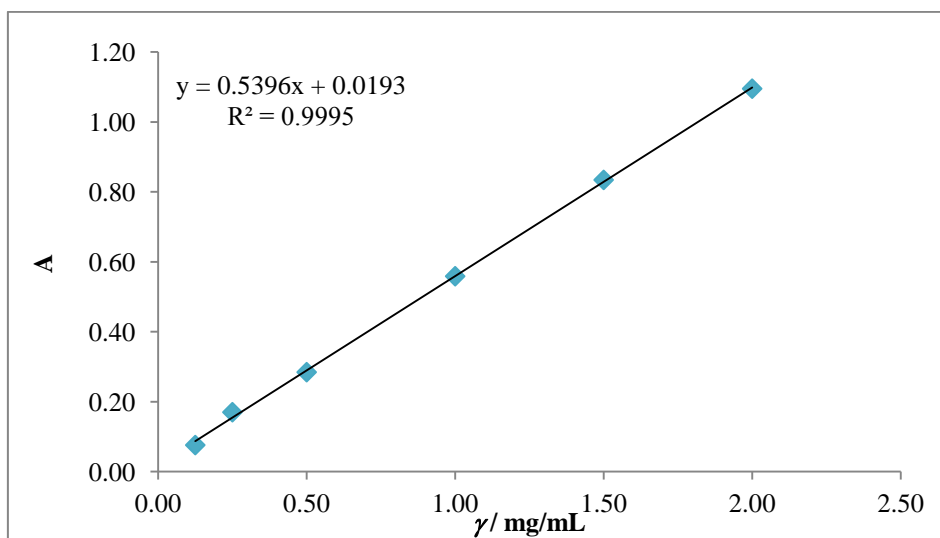
9.1. Slike



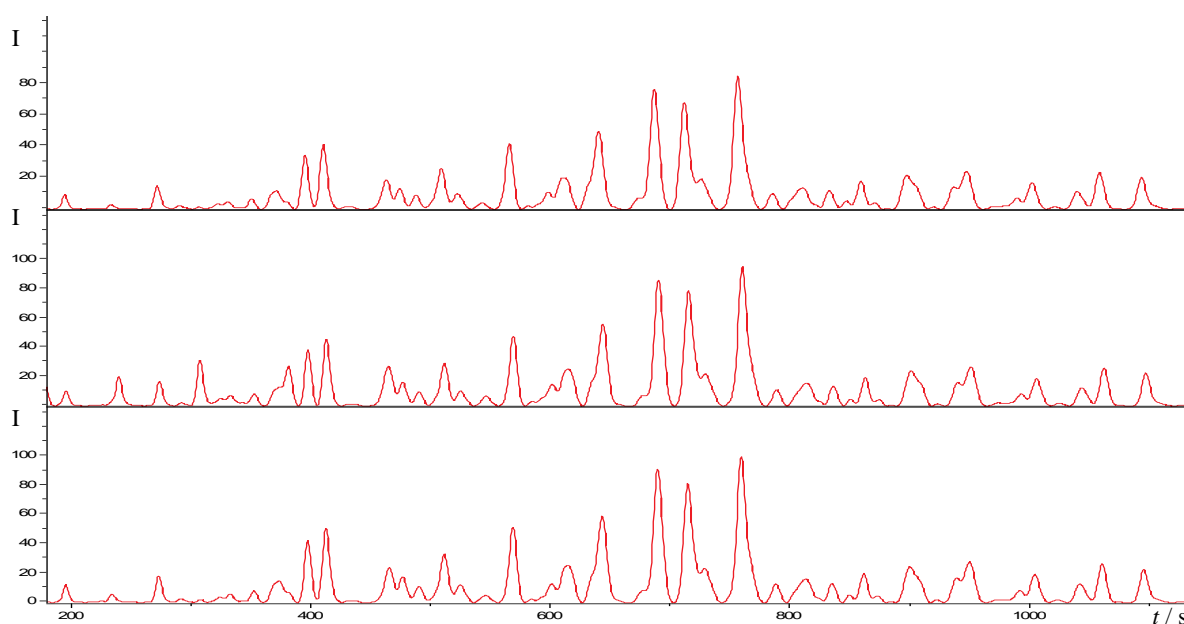
Slika D1. Baždarni dijagram dobiven mjerenjem poznatih masenih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) prema tablici 2. te pripadajuća jednadžba pravca prema kojoj je određena nepoznata koncentracija proteina u sekretumu stanične linije HMLE-pBp i HMLE-Twist.



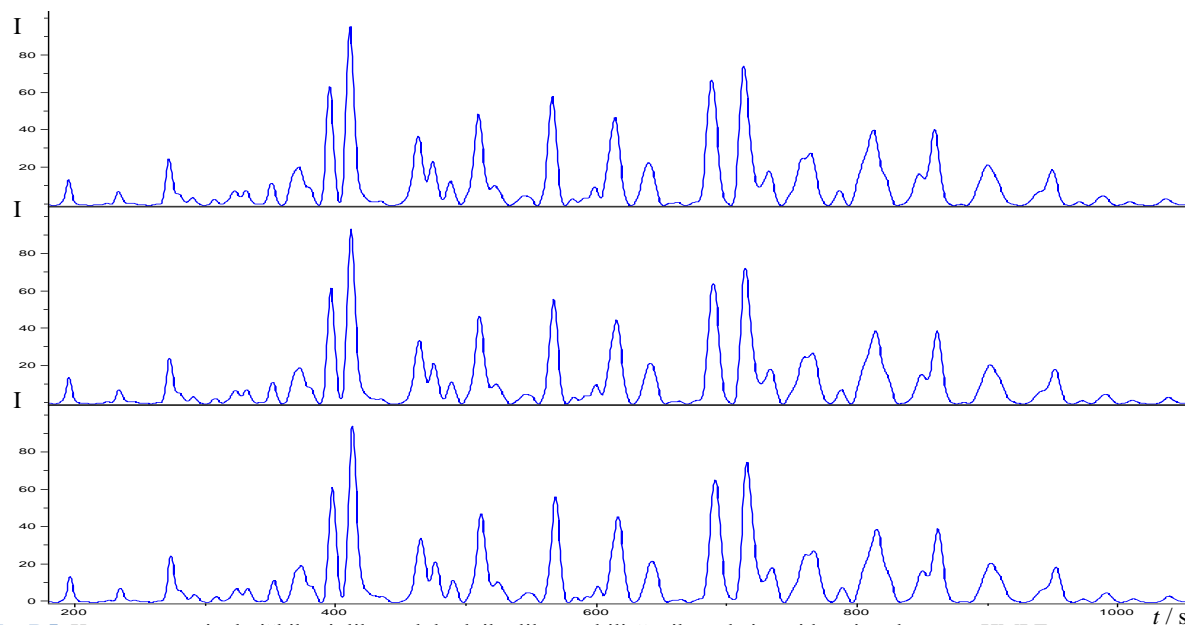
Slika D2. Baždarni dijagram dobiven mjerenjem poznatih masenih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) prema tablici 3. te pripadajuća jednadžba pravca prema kojoj je određena nepoznata koncentracija proteina u sekretumu stanične linije HMLE-pBp.



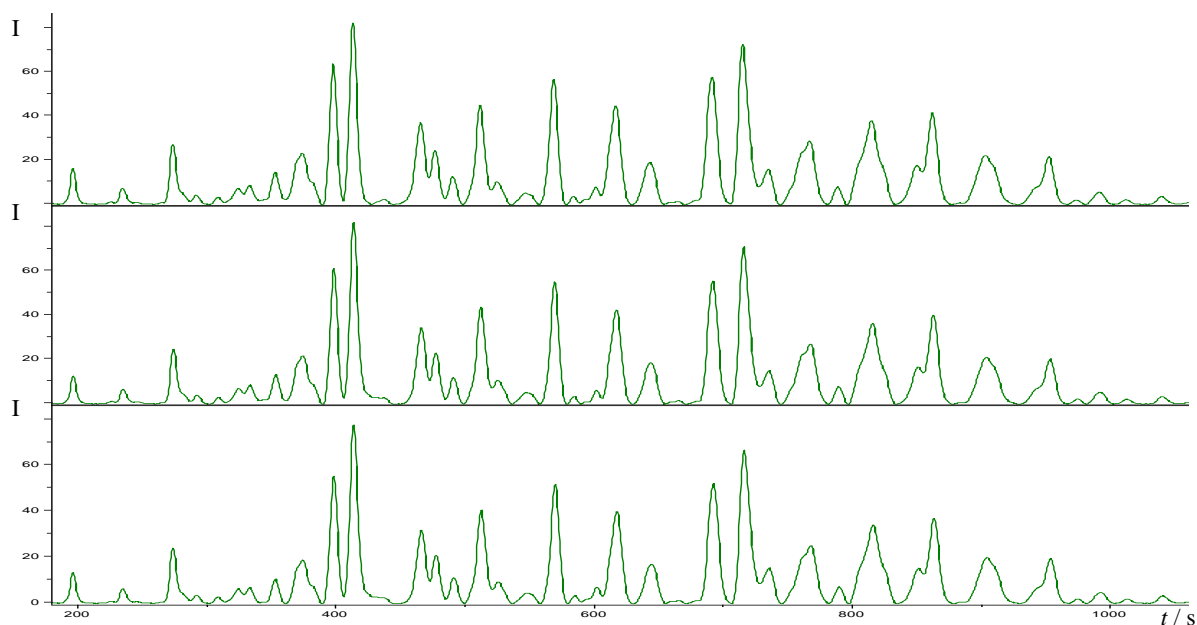
Slika D3. Baždarni dijagram dobiven mjerenjem poznatih masenih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA) prema tablici 4. te pripadajuća jednadžba pravca prema kojoj je određena nepoznata koncentracija proteina u sekretomu stanične linije HMLE-Twist.



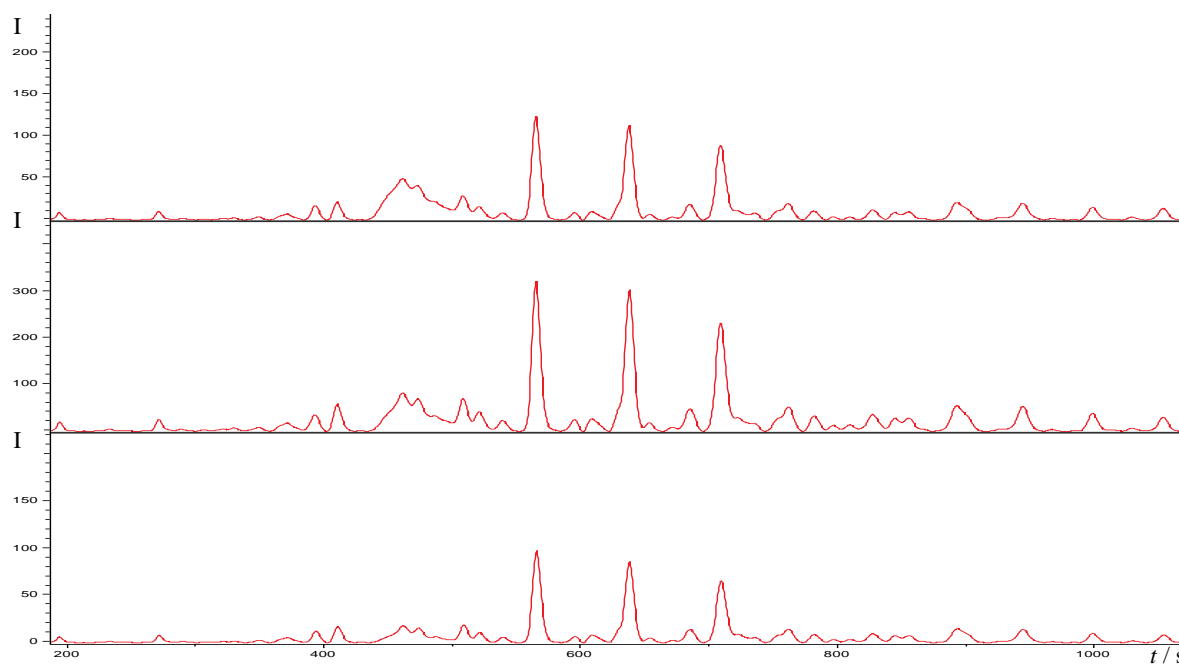
Slika D4. Kromatogrami tehničkih triplikata slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma kontrole HMLE-pBp stanične linije uz fluorescentnu detekciju pri 370 nm



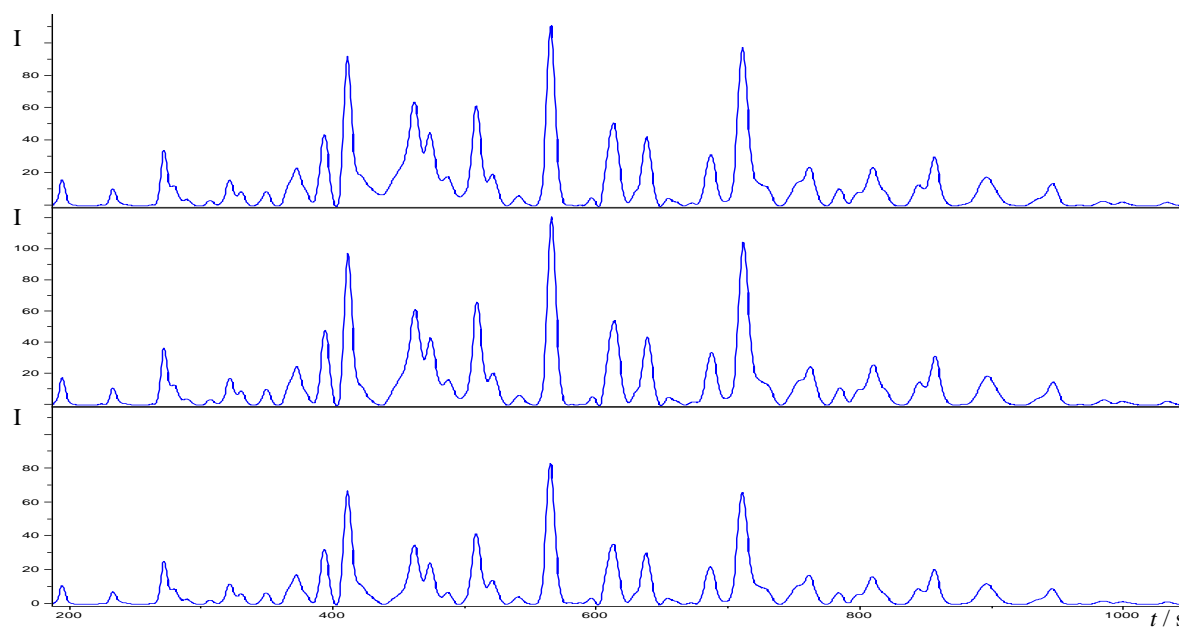
Slika D5. Kromatogrami tehničkih triplikata slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana salinomycinom uz fluorescentnu detekciju pri 370 nm



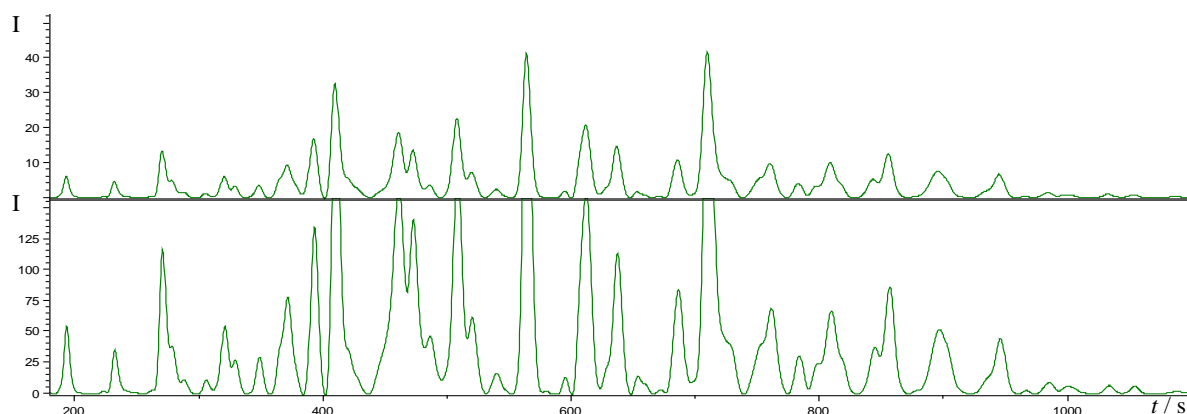
Slika D6. Kromatogrami tehničkih triplikata slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma HMLE-pBp nakon tretmana monenzimom stanične linije uz fluorescentnu detekciju pri 370 nm



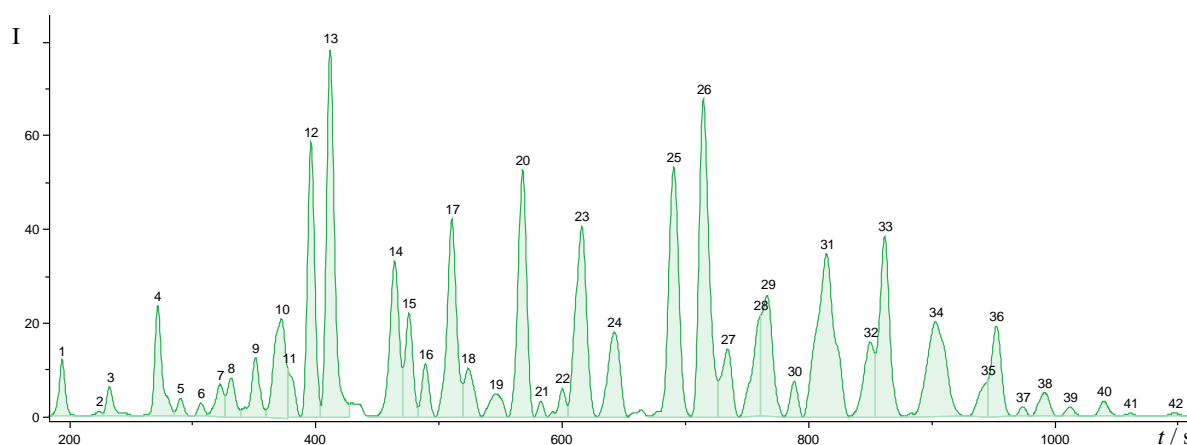
Slika D7. Kromatogrami tehničkih triplikata slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma kontrole HMLE-Twist stanične linije uz fluorescentnu detekciju pri 370 nm



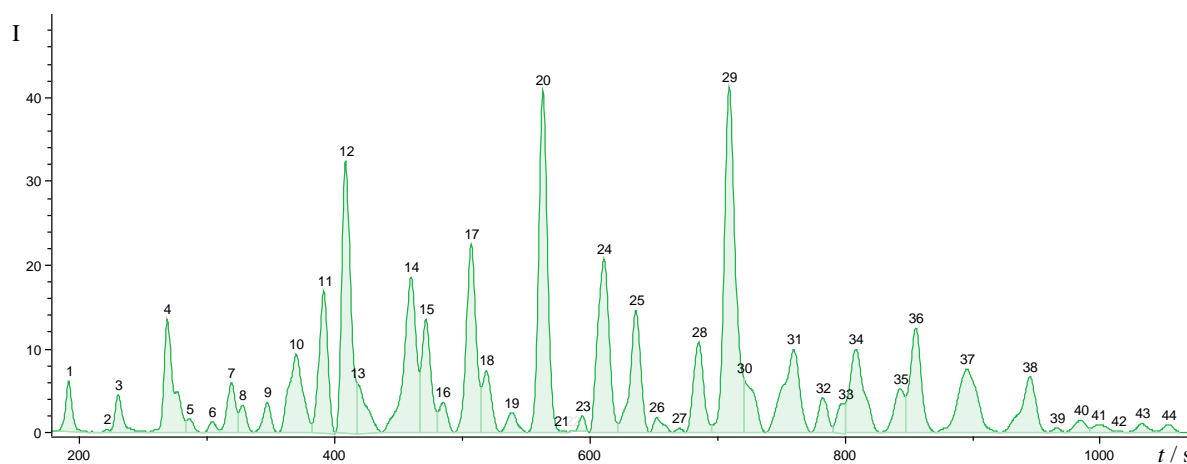
Slika D8. Kromatogrami tehničkih triplikata slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana salinomycinom uz fluorescentnu detekciju pri 370 nm



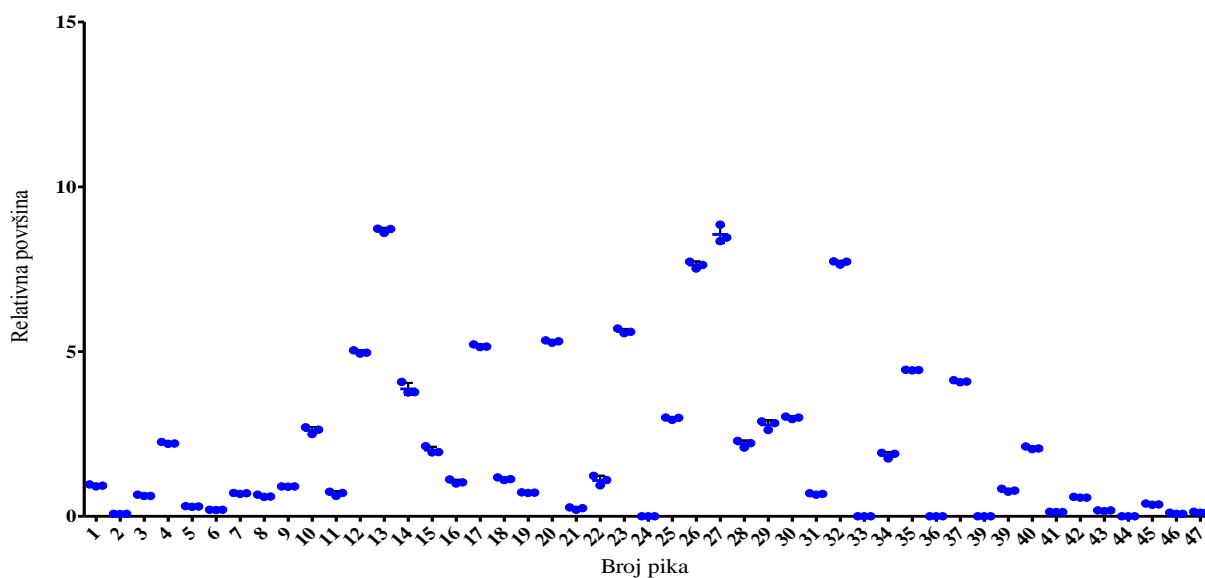
Slika D9. Kromatogrami tehničkih duplikata slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana monenzinom uz fluorescentnu detekciju pri 370 nm



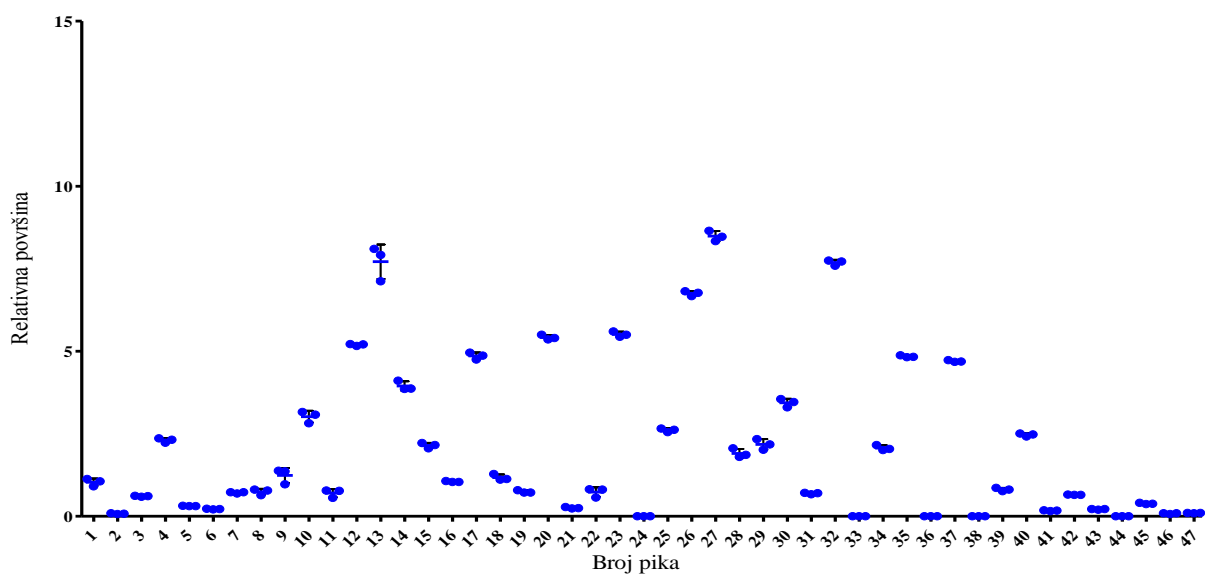
Slika D10. Kromatogram slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma nakon tretmana monenzinom HMLE-pBp stanične linije. Fluorescentna detekcija pri valnoj duljini od 370 nm



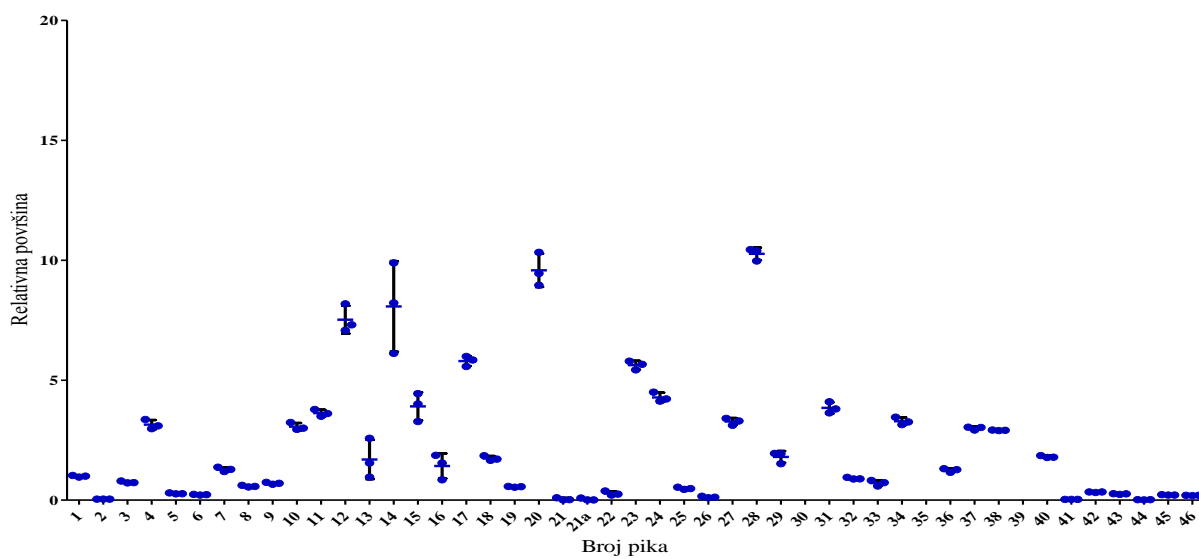
Slika D11. Kromatogram slobodnih glikana obilježenih prokainamidom iz sekretoma nakon tretmana monenzinom HMLE-Twist stanične linije. Fluorescentna detekcija pri valnoj duljini od 370 nm



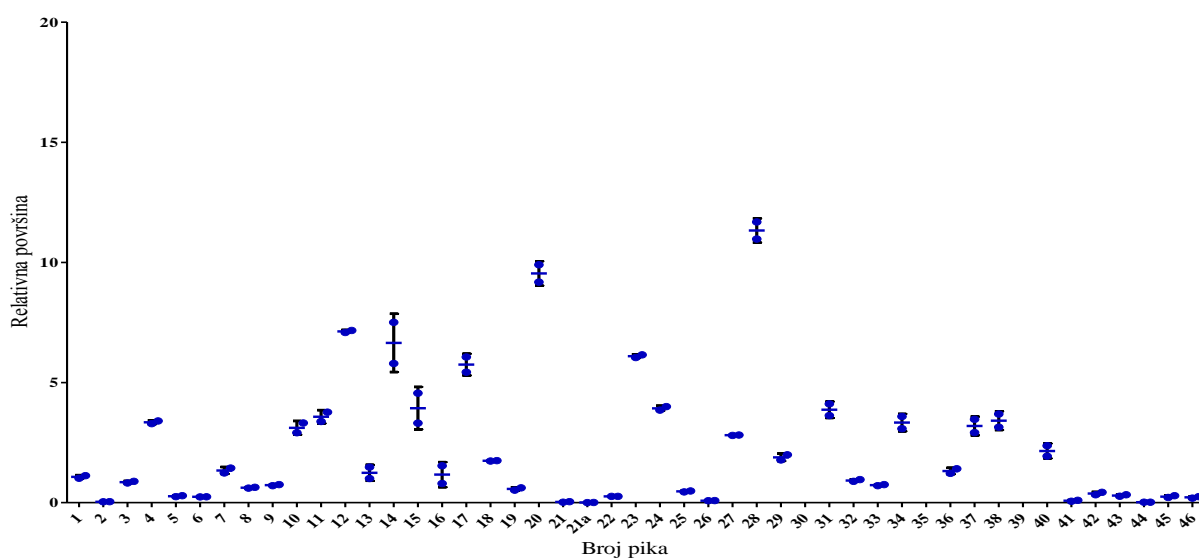
Slika D12. Odnos relativnih površina unutar triplikata za HMLE-pBp staničnu liniju nakon tretmana salinomycinom.



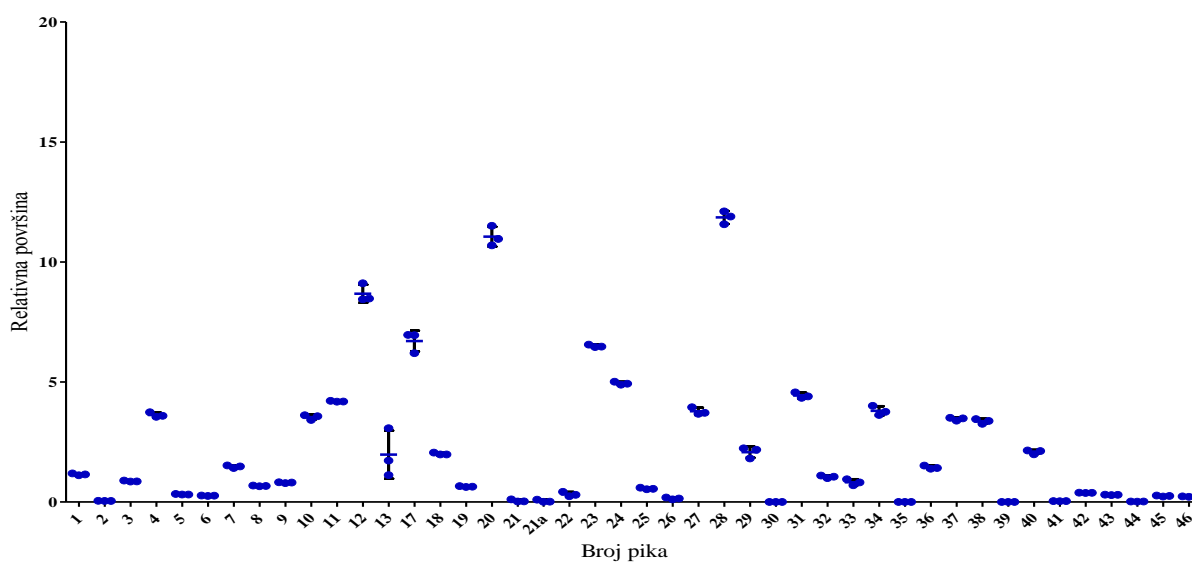
Slika D13. Odnos relativnih površina unutar triplikata za HMLE-pBp staničnu liniju nakon tretmana monenzinom.



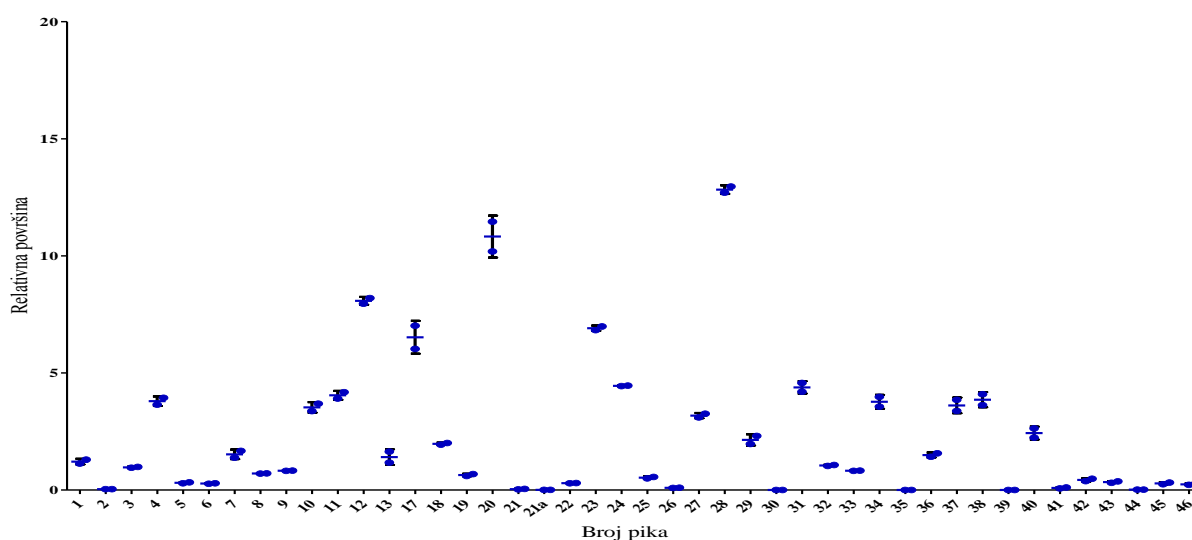
Slika D14. Odnos relativnih površina unutar triplikata za HMLE-Twist staničnu liniju nakon tretmana salinomycinom.



Slika D15. Odnos relativnih površina unutar triplikata za HMLE-Twist staničnu liniju nakon tretmana monenzinom.



Slika D16. Relativne površine kromatograma slobodnih glikana u sekretumu HMLE-Twist stanične linije, nakon tretmana salinomycinom, izračunate nakon što su iz ukupne površine isključeni pikovi 14-16 u kojima se koeluirala fluorescirajuća nečistoća te pripadajuće standardne devijacije.



Slika D18. Relativne površine kromatograma slobodnih glikana u sekretumu HMLE-Twist stanične linije, nakon tretmana monensinom, izračunate nakon što su iz ukupne površine isključeni pikovi 14-16 u kojima se koeluirala fluorescirajuća nečistoća te pripadajuće standardne devijacije.

9.2. Tablice

Tablica D1. Izmjerene apsorbancije nepoznate masene koncentracije proteina u sekretomu staničnih linija HMLE-pBp i HMLE-Twist u kontroli (CTRL) te nakon tretmana salinomycinom (SAL) i monezinom (MON) pri valnoj duljini od 570nm . Albumin iz goveđeg seruma (BSA) je korišten za standard te su prikazane apsorbancije poznatih koncentracija BSA. Za slijepu probu (SP) korištena je Milli Q voda.

| | BSA | | | | | | pBp | | Twist | | SP |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| | | | | | | | SAL | CTRL | SAL | CTRL | |
| A ₁ | 1,185 | 0,985 | 0,713 | 0,479 | 0,35 | 0,253 | 0,686 | 0,745 | 0,618 | 0,627 | 0,186 |
| A ₂ | 1,27 | 0,98 | 0,721 | 0,472 | 0,35 | 0,261 | 0,717 | 0,781 | 0,652 | 0,663 | 0,201 |
| Prosijek | 1,2275 | 0,9825 | 0,717 | 0,4755 | 0,35 | 0,257 | 0,7015 | 0,763 | 0,635 | 0,645 | 0,1935 |
| Prosijek – SP | 1,034 | 0,789 | 0,5235 | 0,282 | 0,1565 | 0,0635 | 0,508 | 0,5695 | 0,4415 | 0,4515 | 0 |
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 2 | 1,5 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,961 | 1,081 | 0,831 | 0,850 | |

Tablica D2. Izmjerene apsorbancije nepoznate masene koncentracije proteina u sekretomu stanične linije HMLE-pBp u kontroli (CTRL) te nakon tretmana salinomycinom (SAL) i monezinom (MON) pri valnoj duljini od 570nm . Albumin iz goveđeg seruma (BSA) je korišten za standard te su prikazane apsorbancije poznatih koncentracija BSA. Za slijepu probu (SP) korištena je Milli Q voda.

| | BSA | | | | | | pBp | | SP |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|
| | | | | | | | SAL | CTRL | |
| A ₁ | 1,238 | 0,977 | 0,714 | 0,474 | 0,321 | 0,236 | 0,548 | 0,847 | 0,175 |
| A ₂ | 1,145 | 0,971 | 0,709 | 0,444 | 0,308 | 0,241 | 0,536 | 0,832 | 0,162 |
| Prosijek | 1,192 | 0,974 | 0,712 | 0,459 | 0,315 | 0,239 | 0,542 | 0,840 | 0,169 |
| Prosijek – SP | 1,023 | 0,806 | 0,543 | 0,291 | 0,146 | 0,070 | 0,374 | 0,671 | 0,000 |
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 2,000 | 1,500 | 1,000 | 0,500 | 0,250 | 0,125 | 0,688 | 1,271 | |

Tablica D3. Izmjerene apsorbancije nepoznate masene koncentracije proteina u sekretumu stanične linije HMLE-Twist u kontroli (CTRL) te nakon tretmana salinomycinom (SAL) i monezinom (MON) pri valnoj duljini od 570nm . Albumin iz govedeg seruma (BSA) je korišten za standard te su prikazane apsorbancije poznatih koncentracija BSA. Za slijepu probu (SP) korištena je Milli Q voda.

| | BSA | | | | | | Twist | | SP |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|
| | | | | | | | SAL | CTRL | |
| A ₁ | 1,210 | 0,949 | 0,728 | 0,437 | 0,321 | 0,232 | 0,510 | 0,589 | 0,159 |
| A ₂ | 1,295 | 1,034 | 0,704 | 0,446 | 0,333 | 0,234 | 0,549 | 0,521 | 0,156 |
| Prosjek | 1,253 | 0,992 | 0,716 | 0,442 | 0,327 | 0,233 | 0,530 | 0,555 | 0,158 |
| Prosjek – SP | 1,095 | 0,834 | 0,559 | 0,284 | 0,170 | 0,076 | 0,372 | 0,398 | 0,000 |
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 2,000 | 1,500 | 1,000 | 0,500 | 0,250 | 0,125 | 0,657 | 0,704 | |

Tablica D4. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma kontrole HMLE-Twist stanične linije. Jedan od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|-----------|---------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 194,4 | 93,8519 | 1392,8 | 0,673 | 30 | 736,3 | 118,9565 | 132,8 | 0,853 |
| 2 | 224,6 | 2,7516 | 3,9 | 0,02 | 31 | 762,1 | 444,1786 | 3153,2 | 3,185 |
| 3 | 233,2 | 24,854 | 298,3 | 0,178 | 32 | 782,2 | 162,2651 | 1715,8 | 1,164 |
| 4 | 271,6 | 122,4742 | 165,4 | 0,878 | 33 | 797,5 | 41,7607 | 604 | 0,299 |
| 5 | 290 | 22,0112 | 229,6 | 0,158 | 34 | 810,1 | 39,7926 | 523,7 | 0,285 |
| 6 | 306,7 | 7,6042 | 121,5 | 0,055 | 35 | 828 | 204,1658 | 1951 | 1,464 |
| 7 | 321,9 | 20,2332 | 245,1 | 0,145 | 36 | 845,5 | 128,6264 | 1432,2 | 0,922 |
| 8 | 330,4 | 25,6999 | 356,8 | 0,184 | 37 | 856 | 176,1692 | 1557,4 | 1,263 |
| 9 | 349,5 | 44,4362 | 552,2 | 0,319 | 38 | 893,8 | 539,3397 | 3354,6 | 3,868 |
| 10 | 371,7 | 148,3163 | 1114,9 | 1,064 | 39 | 927,3 | 36,8065 | 399,8 | 0,264 |
| 11 | 393,8 | 216,5908 | 2746,9 | 1,553 | 40 | 945 | 408,9239 | 3202,2 | 2,933 |
| 12 | 410,8 | 281,2265 | 3399,2 | 2,017 | 41 | 968 | 19,6212 | 250,6 | 0,141 |
| 13 | 428,3 | 2,0694 | 4,9 | 0,015 | 42 | 984,9 | 0,6563 | 18,5 | 0,005 |
| 14 | 461,9 | 1712,0377 | 7973,5 | 12,278 | 43 | 999,5 | 241,0388 | 2402,3 | 1,729 |
| 15 | 473,3 | 869,0107 | 684,9 | 6,232 | 44 | 1015,1 | 10,6168 | 143,5 | 0,076 |
| 16 | 483 | 573,9288 | 373,8 | 4,116 | 45 | 1030,2 | 44,165 | 494,1 | 0,317 |
| 17 | 508,9 | 518,6564 | 4654,9 | 3,72 | 46 | 1054,6 | 224,1532 | 2212,8 | 1,608 |
| 18 | 521,3 | 263,1716 | 2566,2 | 1,887 | | | | | |
| 19 | 539,7 | 129,0063 | 1329,1 | 0,925 | | | | | |
| 20 | 565,6 | 1766,8805 | 2040,2 | 12,671 | | | | | |
| 21 | 578 | 8,7234 | 24,6 | 0,063 | | | | | |
| 22 | 595,8 | 112,797 | 1443,1 | 0,809 | | | | | |
| 23 | 609,3 | 179,0529 | 1608,8 | 1,284 | | | | | |
| 24 | 638,2 | 1837,9911 | 18354,8 | 13,181 | | | | | |
| 25 | 654,2 | 87,5694 | 1084 | 0,628 | | | | | |
| 26 | 672 | 40,5062 | 531,8 | 0,29 | | | | | |
| 27 | 685,5 | 300,5912 | 2959,2 | 2,156 | | | | | |
| 28 | 709,6 | 1515,4048 | 1471,2 | 10,868 | | | | | |
| 29 | 722,4 | 175,2012 | 176,1 | 1,256 | | | | | |

Tablica D5. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma kontrole HMLE-Twist stanične linije. Dva od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|-----------|---------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 194,6 | 112,569 | 1656 | 0,6 | 30 | 734,8 | 121,3526 | 117,3 | 0,65 |
| 2 | 224,7 | 4,656 | 5,3 | 0,02 | 31 | 762,4 | 666,1393 | 4571,2 | 3,56 |
| 3 | 233,1 | 37,3186 | 440,8 | 0,2 | 32 | 782,6 | 288,0011 | 2850 | 1,54 |
| 4 | 271,8 | 174,4066 | 2182,9 | 0,93 | 33 | 797,6 | 99,3113 | 1105,9 | 0,53 |
| 5 | 289,3 | 31,0973 | 345,2 | 0,17 | 34 | 810,4 | 125,3902 | 1214,2 | 0,67 |
| 6 | 306,9 | 17,0504 | 219,3 | 0,09 | 35 | 828,2 | 393,5193 | 3134,7 | 2,1 |
| 7 | 322 | 39,0965 | 407,7 | 0,21 | 36 | 845,5 | 242,9491 | 2423,6 | 1,3 |
| 8 | 330,4 | 54,8629 | 611,8 | 0,29 | 37 | 856,3 | 301,386 | 2468,9 | 1,61 |
| 9 | 349,5 | 73,4832 | 697,5 | 0,39 | 38 | 893,8 | 801,9817 | 4762,7 | 4,28 |
| 10 | 371,9 | 225,1661 | 1507,9 | 1,2 | 39 | 931 | 33,118 | 29,7 | 0,18 |
| 11 | 393,5 | 289,6879 | 3097,5 | 1,55 | 40 | 945,1 | 586,1978 | 357,7 | 3,13 |
| 12 | 410,9 | 438,5728 | 5043,9 | 2,34 | 41 | 967,7 | 23,7415 | 321,4 | 0,13 |
| 13 | 428,7 | 5,596 | 109 | 0,03 | 42 | 985,9 | 1,7532 | 31,4 | 0,01 |
| 14 | 462 | 1394,0454 | 7211 | 7,44 | 43 | 999,5 | 355,0868 | 3296,4 | 1,9 |
| 15 | 473,7 | 797,7106 | 6098,2 | 4,26 | 44 | 1014,8 | 18,9071 | 225,8 | 0,1 |
| 16 | 486,5 | 436,1469 | 2864 | 2,33 | 45 | 1030,4 | 53,0834 | 545,1 | 0,28 |
| 17 | 509 | 638,517 | 6066,5 | 3,41 | 46 | 1054,6 | 283,211 | 2630 | 1,51 |
| 18 | 521,5 | 377,8571 | 3624,3 | 2,02 | | | | | |
| 19 | 539,7 | 194,8067 | 1975,4 | 1,04 | | | | | |
| 20 | 565,7 | 2568,7507 | 2170 | 13,72 | | | | | |
| 21 | 578,5 | 10,5388 | 25,8 | 0,06 | | | | | |
| 22 | 595,7 | 183,671 | 2231,6 | 0,98 | | | | | |
| 23 | 609,4 | 269,0564 | 2337 | 1,44 | | | | | |
| 24 | 638,6 | 2756,6499 | 26510,9 | 14,72 | | | | | |
| 25 | 654,1 | 144,5658 | 1653,1 | 0,77 | | | | | |
| 26 | 672 | 66,1688 | 781,3 | 0,35 | | | | | |
| 27 | 685,8 | 450,3516 | 4185,8 | 2,4 | | | | | |
| 28 | 709,6 | 2249,7788 | 20228,6 | 12,01 | | | | | |
| 29 | 722,7 | 290,5474 | 198,5 | 1,55 | | | | | |

Tablica D6. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma kontrole HMLE-Twist stanične linije. Tri od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|-----------|---------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 194,6 | 74,5348 | 1308,7 | 0,74 | 30 | 736,1 | 85,1624 | 1200 | 0,84 |
| 2 | 225 | 2,4904 | 4,1 | 0,02 | 31 | 762,5 | 369,123 | 3159,8 | 3,64 |
| 3 | 233,3 | 23,4094 | 322 | 0,23 | 32 | 782,6 | 152,1863 | 1894,4 | 1,5 |
| 4 | 272,1 | 107,5504 | 1677 | 1,06 | 33 | 797,8 | 47,7469 | 704 | 0,47 |
| 5 | 290,3 | 19,6415 | 252,3 | 0,19 | 34 | 810,5 | 60,3072 | 760,5 | 0,6 |
| 6 | 307,2 | 7,1417 | 131,6 | 0,07 | 35 | 828,2 | 204,3814 | 2079,1 | 2,02 |
| 7 | 322,5 | 18,5136 | 261,1 | 0,18 | 36 | 845,7 | 127,9826 | 1596,7 | 1,26 |
| 8 | 330,9 | 22,6066 | 373,1 | 0,22 | 37 | 856,5 | 158,2746 | 1673,7 | 1,56 |
| 9 | 350 | 38,8121 | 562,5 | 0,38 | 38 | 894,2 | 435,4952 | 3244 | 4,3 |
| 10 | 372,3 | 136,1778 | 1182 | 1,34 | 39 | 928 | 22,5881 | 334,2 | 0,22 |
| 11 | 394,4 | 179,7648 | 2638,7 | 1,77 | 40 | 945,3 | 327,1805 | 3056,4 | 3,23 |
| 12 | 411,4 | 260,1358 | 3801,8 | 2,57 | 41 | 968,2 | 13,924 | 222,1 | 0,14 |
| 13 | 429,2 | 6,5106 | 117,5 | 0,06 | 42 | 985,3 | 0,616 | 17,7 | 0,01 |
| 14 | 462,4 | 538,7357 | 3928,6 | 5,32 | 43 | 999,8 | 181,4539 | 2157,5 | 1,79 |
| 15 | 474,3 | 322,821 | 3426,3 | 3,19 | 44 | 1016 | 8,0148 | 125,5 | 0,08 |
| 16 | 487,6 | 159,1154 | 1388,5 | 1,57 | 45 | 1030,8 | 30,5895 | 411,1 | 0,3 |
| 17 | 509,5 | 319,4432 | 4101,1 | 3,15 | 46 | 1055 | 155,5857 | 1811,9 | 1,54 |
| 18 | 521,9 | 174,6323 | 2316,1 | 1,72 | | | | | |
| 19 | 540,1 | 91,8881 | 1266,8 | 0,91 | | | | | |
| 20 | 566,2 | 1578,8657 | 2221,3 | 15,59 | | | | | |
| 21 | 578,5 | 7,0305 | 23,7 | 0,07 | | | | | |
| 22 | 596,2 | 95,3956 | 1485,1 | 0,94 | | | | | |
| 23 | 609,6 | 165,5474 | 1809,4 | 1,63 | | | | | |
| 24 | 638,6 | 1577,363 | 18977 | 15,57 | | | | | |
| 25 | 654,4 | 79,3522 | 1144,5 | 0,78 | | | | | |
| 26 | 672,3 | 35,4049 | 539,6 | 0,35 | | | | | |
| 27 | 685,8 | 263,5793 | 3054,9 | 2,6 | | | | | |
| 28 | 710,1 | 1273,64 | 14416,2 | 12,58 | | | | | |
| 29 | 722,9 | 167,5313 | 1949,1 | 1,65 | | | | | |

Tablica D7. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Jedan od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-Twist. Pikovi obilježeni slovima se ne pojavljuju u kromatogramu kontrole dok se pik sa praznim poljima se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|-----|--------|----------|---------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 2 | 224,6 | 3,6752 | 11,6 | 0,04 | 31 | 762,2 | 348,118 | 2240 | 3,64 |
| 3 | 233,4 | 68,7045 | 977,4 | 0,72 | 32 | 784,8 | 84,4054 | 990,3 | 0,88 |
| 4 | 272,2 | 284,8506 | 3218,4 | 2,98 | 33 | 799,5 | 56,0646 | 124,1 | 0,59 |
| 5 | 289,3 | 24,9246 | 380,2 | 0,26 | 34 | 810,5 | 301,3127 | 350,1 | 3,15 |
| 6 | 307,2 | 20,3887 | 315,2 | 0,21 | 35 | | | | |
| 7 | 322 | 113,4648 | 1489,5 | 1,19 | 36 | 845,3 | 111,1947 | 1217,1 | 1,16 |
| 8 | 330,6 | 52,6084 | 804,7 | 0,55 | 37 | 857,3 | 279,4311 | 2834,9 | 2,92 |
| 9 | 349,9 | 63,2459 | 826,7 | 0,66 | 38 | 896,8 | 277,307 | 1662,6 | 2,9 |
| 10 | 372,8 | 286,7311 | 2222,5 | 3 | 39 | | | | |
| 11 | 394 | 335,0178 | 4123,9 | 3,5 | 40 | 946,9 | 170,407 | 1299,6 | 1,78 |
| 12 | 411,5 | 677,5006 | 1361,1 | 7,08 | 41 | 967,5 | 3,3221 | 51,4 | 0,03 |
| 13 | 418,5 | 246,56 | 326,8 | 2,58 | 42 | 985,6 | 30,6337 | 277,5 | 0,32 |
| 14 | 462,3 | 945,7299 | 6017,4 | 9,89 | 43 | 999,7 | 23,2797 | 216,3 | 0,24 |
| 15 | 474 | 425,1631 | 4256,8 | 4,44 | 44 | 1015 | 1,2605 | 19,7 | 0,01 |
| 16 | 487,3 | 178,8789 | 1713,4 | 1,87 | 45 | 1033,9 | 20,2515 | 204,8 | 0,21 |
| 17 | 509,4 | 558,2006 | 5774,7 | 5,84 | 46 | 1054,6 | 18,7479 | 205,2 | 0,2 |
| 18 | 521,5 | 158,6905 | 1850 | 1,66 | | | | | |
| 19 | 541,4 | 53,2891 | 594 | 0,56 | | | | | |
| 20 | 565,8 | 857,5187 | 10398,4 | 8,96 | | | | | |
| 21 | 580,9 | 2,2521 | 8,4 | 0,02 | | | | | |
| 21a | 588,4 | 1,39 | 35,3 | 0,01 | | | | | |
| 22 | 596,8 | 24,1213 | 435,9 | 0,25 | | | | | |
| 23 | 613,5 | 518,979 | 4797,7 | 5,43 | | | | | |
| 24 | 638,7 | 395,1062 | 3998,2 | 4,13 | | | | | |
| 25 | 655,1 | 42,7752 | 458,2 | 0,45 | | | | | |
| 26 | 673,1 | 11,4513 | 182,2 | 0,12 | | | | | |
| 27 | 687,5 | 298,0114 | 2980,5 | 3,12 | | | | | |
| 28 | 711,5 | 953,752 | 1439 | 9,97 | | | | | |
| 29 | 722,5 | 145,402 | 223,9 | 1,52 | | | | | |

Tablica D8. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Dva od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-Twist. Pikovi obilježeni slovima se ne pojavljuju u kromatogramu kontrole dok se pik sa praznim poljima se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|-----|--------|----------|---------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 194,9 | 95,8903 | 1617,2 | 1,03 | 30 | | | | |
| 2 | 224,7 | 3,6693 | 11,1 | 0,04 | 31 | 762,9 | 354,099 | 2313,3 | 3,8 |
| 3 | 233,5 | 67,9931 | 1028,8 | 0,73 | 32 | 785,5 | 88,2404 | 1050,5 | 0,95 |
| 4 | 272,2 | 288,7188 | 3400,5 | 3,1 | 33 | 803 | 76,6403 | 147 | 0,82 |
| 5 | 289,4 | 24,9692 | 384,4 | 0,27 | 34 | 810,9 | 322,3122 | 358,7 | 3,46 |
| 6 | 307,4 | 21,9597 | 340,8 | 0,24 | 35 | | | | |
| 7 | 322,2 | 119,3243 | 1605 | 1,28 | 36 | 845,8 | 122,3315 | 1369,6 | 1,31 |
| 8 | 330,7 | 53,4785 | 833,9 | 0,57 | 37 | 857,8 | 282,255 | 2919,8 | 3,03 |
| 9 | 350,1 | 65,2359 | 937,3 | 0,7 | 38 | 897,5 | 271,7004 | 1732,1 | 2,91 |
| 10 | 372,9 | 274,7057 | 2341,9 | 2,95 | 39 | | | | |
| 11 | 394,6 | 336,9128 | 4513,4 | 3,61 | 40 | 947,5 | 173,1551 | 1373,7 | 1,86 |
| 12 | 411,8 | 681,5362 | 1330,6 | 7,31 | 41 | 968,1 | 2,8031 | 51,5 | 0,03 |
| 13 | 420 | 89,7466 | 192,9 | 0,96 | 42 | 986,1 | 31,3828 | 312,1 | 0,34 |
| 14 | 462,8 | 765,9253 | 5697,8 | 8,22 | 43 | 1000,1 | 24,3479 | 32,5 | 0,26 |
| 15 | 474,6 | 374,0659 | 4037,7 | 4,01 | 44 | 1011,5 | 1,6037 | 4,4 | 0,02 |
| 16 | 488 | 144,1212 | 1529,1 | 1,55 | 45 | 1034,2 | 21,4819 | 233,2 | 0,23 |
| 17 | 509,9 | 558,5753 | 6161,9 | 5,99 | 46 | 1055,1 | 18,2953 | 30,7 | 0,2 |
| 18 | 522 | 159,4877 | 1938,8 | 1,71 | | | | | |
| 19 | 542,1 | 50,7571 | 594,5 | 0,54 | | | | | |
| 20 | 566,5 | 881,3951 | 11241,7 | 9,45 | | | | | |
| 21 | 581,6 | 1,2373 | 39,1 | 0,01 | | | | | |
| 21a | 589,1 | 1,0767 | 32,5 | 0,01 | | | | | |
| 22 | 597,5 | 19,3978 | 401,1 | 0,21 | | | | | |
| 23 | 614 | 527,2305 | 5094,4 | 5,66 | | | | | |
| 24 | 639,2 | 393,0752 | 4116,5 | 4,22 | | | | | |
| 25 | 655,7 | 44,6091 | 491,4 | 0,48 | | | | | |
| 26 | 674,1 | 15,2076 | 228,3 | 0,16 | | | | | |
| 27 | 688,1 | 317,7222 | 3173,5 | 3,41 | | | | | |
| 28 | 712,1 | 973,7349 | 1422,3 | 10,44 | | | | | |
| 29 | 722 | 180,4419 | 259,2 | 1,94 | | | | | |

Tablica D9. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Tri od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je uskladen s numeracijom u kontroli HMLE-Twist. Pikovi obilježeni slovima se ne pojavljuju u kromatogramu kontrole dok se pik sa praznim poljima se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|-----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 194,9 | 65,3776 | 1155,6 | 1 | 30 | | | | |
| 2 | 224,6 | 2,4875 | 10,4 | 0,04 | 31 | 762 | 268,2058 | 1792,3 | 4,1 |
| 3 | 233,4 | 52,5608 | 762 | 0,8 | 32 | 784,5 | 58,5083 | 732,9 | 0,89 |
| 4 | 272,2 | 219,5464 | 2642,1 | 3,36 | 33 | 802,5 | 47,9679 | 128,1 | 0,73 |
| 5 | 289,3 | 19,7266 | 309,5 | 0,3 | 34 | 810,1 | 212,9433 | 337,8 | 3,26 |
| 6 | 307,1 | 15,367 | 249,2 | 0,23 | 35 | | | | |
| 7 | 322,2 | 89,4625 | 1244,4 | 1,37 | 36 | 845,2 | 83,2268 | 959,6 | 1,27 |
| 8 | 330,6 | 40,266 | 643,5 | 0,62 | 37 | 857,2 | 199,0482 | 2155,5 | 3,04 |
| 9 | 349,9 | 48,4886 | 707,4 | 0,74 | 38 | 896,7 | 191,3298 | 1263,7 | 2,92 |
| 10 | 372,6 | 212,1706 | 1842,9 | 3,24 | 39 | | | | |
| 11 | 394 | 247,5642 | 3416,6 | 3,78 | 40 | 946,7 | 116,8597 | 957,8 | 1,79 |
| 12 | 411,5 | 534,9545 | 1383,1 | 8,18 | 41 | 967,5 | 2,1473 | 36,8 | 0,03 |
| 13 | 420,5 | 101,4311 | 251 | 1,55 | 42 | 985,6 | 22,1174 | 213,8 | 0,34 |
| 14 | 462,3 | 400,3868 | 3648,1 | 6,12 | 43 | 999,9 | 17,9445 | 33,3 | 0,27 |
| 15 | 474,1 | 214,8306 | 2565,4 | 3,28 | 44 | 1012,5 | 1,1609 | 3,7 | 0,02 |
| 16 | 487,6 | 55,7381 | 762,6 | 0,85 | 45 | 1034,2 | 13,4959 | 153,4 | 0,21 |
| 17 | 509,3 | 364,2546 | 4366,4 | 5,57 | 46 | 1055 | 12,6807 | 29,5 | 0,19 |
| 18 | 521,4 | 120,7649 | 1482 | 1,85 | | | | | |
| 19 | 541,2 | 37,5812 | 459,8 | 0,57 | | | | | |
| 20 | 565,5 | 675,6501 | 8689,8 | 10,33 | | | | | |
| 21 | 580,6 | 6,4777 | 116,7 | 0,1 | | | | | |
| 21a | 588 | 5,7333 | 107,1 | 0,09 | | | | | |
| 22 | 596,4 | 24,9834 | 415,1 | 0,38 | | | | | |
| 23 | 613,1 | 378,9997 | 3724,3 | 5,79 | | | | | |
| 24 | 638,2 | 294,5096 | 3174 | 4,5 | | | | | |
| 25 | 654,8 | 35,1856 | 394,4 | 0,54 | | | | | |
| 26 | 672,5 | 6,5679 | 112,8 | 0,1 | | | | | |
| 27 | 687,1 | 215,9203 | 2332,9 | 3,3 | | | | | |
| 28 | 711,3 | 679,447 | 1369,7 | 10,39 | | | | | |
| 29 | 721,5 | 127,819 | 253,5 | 1,95 | | | | | |

Tablica D10. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana monezinom. Jedan od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-Twist. Pikovi obilježeni slovima se ne pojavljuju u kromatogramu kontrole dok se pik sa praznim poljima se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|-----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 194,7 | 36,4752 | 735,2 | 1,02 | 30 | | | | |
| 2 | 224,6 | 1,3498 | 7,6 | 0,04 | 31 | 761,7 | 147,3806 | 1207,9 | 4,11 |
| 3 | 233,3 | 31,9563 | 550,8 | 0,89 | 32 | 784,6 | 34,5674 | 509,3 | 0,96 |
| 4 | 272 | 117,7641 | 366,5 | 3,29 | 33 | 802 | 26,7609 | 98,1 | 0,75 |
| 5 | 289 | 10,4983 | 200,5 | 0,29 | 34 | 810,2 | 128,53 | 272 | 3,59 |
| 6 | 306,9 | 8,7201 | 160 | 0,24 | 35 | | | | |
| 7 | 321,8 | 44,5804 | 739,1 | 1,24 | 36 | 844,9 | 50,6198 | 648,6 | 1,41 |
| 8 | 330,6 | 22,91 | 411,5 | 0,64 | 37 | 857,1 | 124,283 | 1520,7 | 3,47 |
| 9 | 349,9 | 26,7625 | 440 | 0,75 | 38 | 897,2 | 132,0272 | 922 | 3,69 |
| 10 | 372,5 | 119,0397 | 1154,5 | 3,32 | 39 | | | | |
| 11 | 393,9 | 134,8937 | 2078,9 | 3,77 | 40 | 946,5 | 84,863 | 818,1 | 2,37 |
| 12 | 411,3 | 256,7901 | 889,6 | 7,17 | 41 | 967,6 | 3,4437 | 58,6 | 0,1 |
| 13 | 420 | 52,8423 | 164,1 | 1,48 | 42 | 986,1 | 15,5325 | 176,6 | 0,43 |
| 14 | 462,2 | 207,3079 | 2285,1 | 5,79 | 43 | 1000,1 | 11,9815 | 25,7 | 0,33 |
| 15 | 474,1 | 118,5834 | 1653,5 | 3,31 | 44 | 1016,1 | 0,7003 | 3,7 | 0,02 |
| 16 | 487,3 | 28,5464 | 444,1 | 0,8 | 45 | 1034 | 10,4436 | 126,3 | 0,29 |
| 17 | 509,3 | 194,6456 | 2771 | 5,43 | 46 | 1054,8 | 8,8074 | 114,1 | 0,25 |
| 18 | 521,3 | 62,5821 | 902,2 | 1,75 | | | | | |
| 19 | 541,2 | 22,0605 | 293,5 | 0,62 | | | | | |
| 20 | 565,5 | 328,9231 | 1116,3 | 9,18 | | | | | |
| 21 | 580,2 | 0,8543 | 5,7 | 0,02 | | | | | |
| 21a | 588,4 | 0,2471 | 10,8 | 0,01 | | | | | |
| 22 | 596,4 | 9,3853 | 217,1 | 0,26 | | | | | |
| 23 | 613,3 | 220,322 | 2535,8 | 6,15 | | | | | |
| 24 | 638,3 | 143,2301 | 1794,2 | 4 | | | | | |
| 25 | 654,5 | 16,1224 | 219,4 | 0,45 | | | | | |
| 26 | 672,1 | 2,8369 | 61,4 | 0,08 | | | | | |
| 27 | 687,4 | 100,1738 | 1321 | 2,8 | | | | | |
| 28 | 711,3 | 418,4 | 1130 | 11,68 | | | | | |
| 29 | 722,5 | 63,6481 | 180,2 | 1,78 | | | | | |

Tablica D11. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-Twist stanične linije nakon tretmana monezinom. Dva od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-Twist. Pikovi obilježeni slovima se ne pojavljuju u kromatogramu kontrole dok se pik sa praznim poljima se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|-----|--------|-----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 194,7 | 114,4517 | 1898 | 1,127 | 30 | | | | |
| 2 | 224,5 | 3,8211 | 81,8 | 0,038 | 31 | 762,4 | 368,2454 | 2406,8 | 3,627 |
| 3 | 233,2 | 83,4252 | 1225,2 | 0,822 | 32 | 785 | 90,0137 | 1091,9 | 0,887 |
| 4 | 272 | 345,4441 | 4049,6 | 3,403 | 33 | 803 | 71,7822 | 122,6 | 0,707 |
| 5 | 289,1 | 25,4014 | 400,6 | 0,25 | 34 | 810,8 | 312,5102 | 321,1 | 3,078 |
| 6 | 307 | 25,091 | 389,4 | 0,247 | 35 | | | | |
| 7 | 321,9 | 146,4375 | 1889,8 | 1,442 | 36 | 845,9 | 124,1443 | 1317 | 1,223 |
| 8 | 330,4 | 61,3346 | 950,5 | 0,604 | 37 | 857,8 | 296,0734 | 3003,4 | 2,917 |
| 9 | 349,9 | 72,0124 | 1036,5 | 0,709 | 38 | 898 | 318,8062 | 1820,8 | 3,14 |
| 10 | 372,5 | 295,7238 | 2731,9 | 2,913 | 39 | | | | |
| 11 | 394,2 | 342,9837 | 4699,8 | 3,379 | 40 | 947,1 | 196,3176 | 1556,8 | 1,934 |
| 12 | 411,3 | 719,149 | 1267,5 | 7,084 | 41 | 968,1 | 6,2783 | 98,6 | 0,062 |
| 13 | 420 | 102,1847 | 184,5 | 1,007 | 42 | 986,4 | 33,7061 | 321,5 | 0,332 |
| 14 | 462,1 | 762,0455 | 5965,5 | 7,507 | 43 | 1001,3 | 27,1458 | 30,3 | 0,267 |
| 15 | 474 | 462,459 | 4909,8 | 4,556 | 44 | 1012 | 1,8352 | 6,1 | 0,018 |
| 16 | 487,2 | 155,9346 | 1638,8 | 1,536 | 45 | 1034,6 | 21,7951 | 235,9 | 0,215 |
| 17 | 509,4 | 615,5948 | 6689,3 | 6,064 | 46 | 1055,2 | 19,2449 | 215,1 | 0,19 |
| 18 | 521,4 | 176,2289 | 2150,3 | 1,736 | | | | | |
| 19 | 541,1 | 52,9155 | 590,1 | 0,521 | | | | | |
| 20 | 565,6 | 1004,8633 | 1700,4 | 9,899 | | | | | |
| 21 | 580,9 | 4,0838 | 12,4 | 0,04 | | | | | |
| 21a | 587,9 | 0,4653 | 2,6 | 0,005 | | | | | |
| 22 | 596,6 | 26,5694 | 476,2 | 0,262 | | | | | |
| 23 | 613,2 | 613,3806 | 5726,9 | 6,042 | | | | | |
| 24 | 638,5 | 391,1598 | 3991,4 | 3,853 | | | | | |
| 25 | 654,9 | 49,3328 | 517,8 | 0,486 | | | | | |
| 26 | 673,1 | 8,842 | 145,7 | 0,087 | | | | | |
| 27 | 687,7 | 286,1228 | 2958,1 | 2,818 | | | | | |
| 28 | 711,6 | 1113,8082 | 1510,4 | 10,972 | | | | | |
| 29 | 721,5 | 202,4863 | 266,3 | 1,995 | | | | | |

Tablica D12. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma kontrole HMLE-pBp stanične linije. Jedan od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 196,5 | 60,5995 | 847,3 | 0,66 | 30 | 767 | 179,8674 | 314,6 | 1,97 |
| 2 | 227,3 | 6,7377 | 66,8 | 0,07 | 31 | 789,8 | 87,5144 | 920,7 | 0,96 |
| 3 | 240,6 | 144,3545 | 1695,5 | 1,58 | 32 | 814,8 | 240,9227 | 1332,2 | 2,64 |
| 4 | 274,3 | 107,0346 | 1397,6 | 1,17 | 33 | 836,9 | 106,0794 | 1149,8 | 1,16 |
| 5 | 292,8 | 16,4387 | 187,8 | 0,18 | 34 | 851,4 | 28,3876 | 379,5 | 0,31 |
| 6 | 308,2 | 209,7317 | 2643,1 | 2,3 | 35 | 863,7 | 152,3225 | 1640,7 | 1,67 |
| 7 | 325,5 | 43,7874 | 422,9 | 0,48 | 36 | 875,1 | 29,2349 | 361,3 | 0,32 |
| 8 | 333,7 | 62,6479 | 600 | 0,69 | 37 | 901,9 | 339,6724 | 2025,1 | 3,72 |
| 9 | 353,4 | 71,8257 | 68,1 | 0,79 | 38 | 924,1 | 7,5236 | 120,3 | 0,08 |
| 10 | 377 | 123,9226 | 110,6 | 1,36 | 39 | 941,1 | 128,884 | 1353,7 | 1,41 |
| 11 | 382,1 | 207,9404 | 225,7 | 2,28 | 40 | 951,7 | 287,4656 | 2271,6 | 3,15 |
| 12 | 398,4 | 256,8985 | 3252,5 | 2,82 | 41 | 974,9 | 17,0187 | 179 | 0,19 |
| 13 | 413,7 | 331,8619 | 375,6 | 3,64 | 42 | 994 | 87,8423 | 693 | 0,96 |
| 14 | 465,6 | 271,009 | 2293,1 | 2,97 | 43 | 1006,8 | 175,244 | 1560,1 | 1,92 |
| 15 | 477,5 | 123,2123 | 1370,1 | 1,35 | 44 | 1025,8 | 14,1432 | 159,9 | 0,16 |
| 16 | 491,2 | 73,794 | 830,7 | 0,81 | 45 | 1044,5 | 123,1154 | 1040,7 | 1,35 |
| 17 | 512,3 | 257,3634 | 2474,9 | 2,82 | 46 | 1063 | 216,781 | 210,4 | 2,38 |
| 18 | 525,9 | 90,0129 | 881,6 | 0,99 | 47 | 1097,9 | 205,0324 | 1904,8 | 2,25 |
| 19 | 547,1 | 58,9879 | 571 | 0,65 | | | | | |
| 20 | 569,8 | 371,0842 | 4032,1 | 4,07 | | | | | |
| 21 | 585,9 | 19,6372 | 265,7 | 0,22 | | | | | |
| 22 | 602,2 | 160,3548 | 1248,9 | 1,76 | | | | | |
| 23 | 615,4 | 317,6257 | 2126,8 | 3,48 | | | | | |
| 24 | 637,5 | 94,2163 | 161,4 | 1,03 | | | | | |
| 25 | 644,5 | 536,5753 | 456,1 | 5,88 | | | | | |
| 26 | 691,2 | 846,0859 | 7285,9 | 9,27 | | | | | |
| 27 | 716,2 | 771,9492 | 6645 | 8,46 | | | | | |
| 28 | 730 | 218,0816 | 1843,6 | 2,39 | | | | | |
| 29 | 761 | 842,0778 | 779,5 | 9,23 | | | | | |

Tablica D13. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma kontrole HMLE-pBp stanične linije. Dva od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 196,2 | 73,2824 | 1060,9 | 0,81 | 30 | 766,5 | 173,0694 | 327,6 | 1,92 |
| 2 | 226,2 | 6,7713 | 84,3 | 0,07 | 31 | 789,1 | 102,5921 | 1127 | 1,14 |
| 3 | 234,8 | 42,0233 | 524,5 | 0,47 | 32 | 814 | 241,8464 | 1426,3 | 2,68 |
| 4 | 273,8 | 117,0203 | 1623,4 | 1,3 | 33 | 835,9 | 101,5073 | 1177,6 | 1,12 |
| 5 | 292,3 | 18,3661 | 220,1 | 0,2 | 34 | 850,5 | 32,71 | 457,3 | 0,36 |
| 6 | 308,8 | 10,7446 | 181,6 | 0,12 | 35 | 862,5 | 158,9964 | 1776 | 1,76 |
| 7 | 324,9 | 27,5265 | 316,9 | 0,3 | 36 | 874 | 31,9646 | 410,8 | 0,35 |
| 8 | 333,5 | 43,0341 | 513,7 | 0,48 | 37 | 900,9 | 348,6939 | 2194,7 | 3,86 |
| 9 | 353,2 | 56,7566 | 69,3 | 0,63 | 38 | 923,3 | 10,2595 | 163 | 0,11 |
| 10 | 374,3 | 137,3394 | 124,4 | 1,52 | 39 | 940,1 | 136,1409 | 1497,9 | 1,51 |
| 11 | 377,5 | 62,779 | 88,6 | 0,69 | 40 | 950,7 | 297,4474 | 2477,8 | 3,29 |
| 12 | 398,3 | 296,966 | 3797,8 | 3,29 | 41 | 973,3 | 14,8395 | 171,8 | 0,16 |
| 13 | 413,5 | 377,7448 | 4550,9 | 4,18 | 42 | 992,8 | 84,0243 | 736 | 0,93 |
| 14 | 466,3 | 222,9295 | 2170,7 | 2,47 | 43 | 1005,3 | 180,8129 | 1725,6 | 2 |
| 15 | 477,5 | 141,2983 | 1580,9 | 1,56 | 44 | 1024 | 14,3476 | 172,6 | 0,16 |
| 16 | 491,1 | 89,1882 | 996,9 | 0,99 | 45 | 1043 | 125,8824 | 1132,1 | 1,39 |
| 17 | 512,2 | 304,5763 | 2965,8 | 3,37 | 46 | 1061,4 | 219,3325 | 228,4 | 2,43 |
| 18 | 525,5 | 112,0756 | 1106,1 | 1,24 | 47 | 1096,2 | 208,1045 | 196,9 | 2,3 |
| 19 | 546,7 | 46,5593 | 440,7 | 0,52 | | | | | |
| 20 | 569,6 | 404,104 | 4610,1 | 4,47 | | | | | |
| 21 | 585 | 13,4916 | 209,7 | 0,15 | | | | | |
| 22 | 601,8 | 127,5094 | 1149,6 | 1,41 | | | | | |
| 23 | 615,3 | 315,4271 | 2272,8 | 3,49 | | | | | |
| 24 | 637,5 | 110,0904 | 196,1 | 1,22 | | | | | |
| 25 | 644 | 567,6108 | 516,1 | 6,28 | | | | | |
| 26 | 690,5 | 898,8323 | 8160,5 | 9,95 | | | | | |
| 27 | 715,5 | 793,5756 | 7298,8 | 8,78 | | | | | |
| 28 | 729,4 | 235,2118 | 2085 | 2,6 | | | | | |
| 29 | 760,1 | 898,1641 | 867,3 | 9,94 | | | | | |

Tablica D14. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma kontrole HMLE-pBp stanične linije. Tri od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 195,4 | 61,0274 | 968,1 | 0,74 | 30 | 765,5 | 102,6341 | 256,6 | 1,25 |
| 2 | 225,2 | 5,7837 | 69 | 0,07 | 31 | 786,2 | 89,6206 | 1050 | 1,09 |
| 3 | 233,9 | 25,0666 | 313 | 0,31 | 32 | 811,3 | 225,4591 | 1430,7 | 2,75 |
| 4 | 272,6 | 106,3571 | 1561,5 | 1,3 | 33 | 833,5 | 109,6092 | 1263,5 | 1,34 |
| 5 | 290,9 | 19,3824 | 237,7 | 0,24 | 34 | 847,9 | 40,561 | 541,5 | 0,49 |
| 6 | 307,4 | 8,255 | 149,7 | 0,1 | 35 | 860,1 | 157,3292 | 1871 | 1,92 |
| 7 | 323,2 | 29,7779 | 348,9 | 0,36 | 36 | 871,3 | 30,205 | 419,9 | 0,37 |
| 8 | 331,6 | 39,2493 | 492,5 | 0,48 | 37 | 898,5 | 335,3231 | 2253,4 | 4,09 |
| 9 | 351,4 | 52,4423 | 70,1 | 0,64 | 38 | 920,5 | 8,5038 | 145,9 | 0,1 |
| 10 | 372,2 | 130,7717 | 124,1 | 1,59 | 39 | 937,9 | 121,9674 | 1491,7 | 1,49 |
| 11 | 377 | 36,9966 | 59,6 | 0,45 | 40 | 948,1 | 278,7186 | 2516,5 | 3,4 |
| 12 | 396 | 255,1765 | 3601,8 | 3,11 | 41 | 971,9 | 16,5386 | 196,1 | 0,2 |
| 13 | 411,3 | 332,6179 | 4299,6 | 4,05 | 42 | 990,4 | 82,1851 | 743,4 | 1 |
| 14 | 463,8 | 181,2603 | 1968,7 | 2,21 | 43 | 1002,9 | 173,3629 | 1762,9 | 2,11 |
| 15 | 474,9 | 111,9875 | 1410,4 | 1,37 | 44 | 1021,9 | 12,0745 | 159,7 | 0,15 |
| 16 | 488,6 | 76,0279 | 953,8 | 0,93 | 45 | 1040,6 | 121,2048 | 1171,1 | 1,48 |
| 17 | 509,8 | 258,2776 | 2710,8 | 3,15 | 46 | 1059,3 | 223,6999 | 246,5 | 2,73 |
| 18 | 523,2 | 96,727 | 1032,8 | 1,18 | 47 | 1094,4 | 208,0826 | 2137,8 | 2,54 |
| 19 | 543,9 | 39,4888 | 428,1 | 0,48 | | | | | |
| 20 | 566,6 | 356,7891 | 4373,3 | 4,35 | | | | | |
| 21 | 582,3 | 13,5187 | 219,5 | 0,16 | | | | | |
| 22 | 599 | 118,4412 | 1162,1 | 1,44 | | | | | |
| 23 | 612,1 | 273,5963 | 2116,1 | 3,33 | | | | | |
| 24 | 635 | 112,3659 | 218,5 | 1,37 | | | | | |
| 25 | 641 | 504,7041 | 525,9 | 6,15 | | | | | |
| 26 | 687,6 | 820,7428 | 8036,9 | 10 | | | | | |
| 27 | 712,6 | 726,6313 | 7142,1 | 8,86 | | | | | |
| 28 | 726,6 | 206,0919 | 2019,3 | 2,51 | | | | | |
| 29 | 757,2 | 867,2694 | 894,9 | 10,57 | | | | | |

Tablica D15. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Jedan od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-pBp. Pik sa praznim poljem se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 195,8 | 78,3097 | 1167,7 | 0,91 | 30 | 764,9 | 254,9892 | 341,8 | 2,95 |
| 2 | 225,4 | 6,7657 | 90,5 | 0,08 | 31 | 786,9 | 58,4456 | 691 | 0,68 |
| 3 | 234,1 | 53,1852 | 89,9 | 0,62 | 32 | 812,9 | 668,2527 | 3511,6 | 7,73 |
| 4 | 272,8 | 190,4967 | 2161,3 | 2,2 | 33 | | | | |
| 5 | 290,9 | 25,8766 | 350,4 | 0,3 | 34 | 848,3 | 164,2841 | 1468,6 | 1,9 |
| 6 | 307,8 | 17,6776 | 259,6 | 0,2 | 35 | 860,1 | 383,6656 | 3521,6 | 4,44 |
| 7 | 323,2 | 61,7346 | 662,6 | 0,71 | 36 | | | | |
| 8 | 331,9 | 56,7213 | 683,9 | 0,66 | 37 | 900,8 | 353,5277 | 1877,6 | 4,09 |
| 9 | 351,6 | 78,8893 | 146 | 0,91 | 38 | | | | |
| 10 | 372,5 | 227,0595 | 251,5 | 2,63 | 39 | 943 | 65,08 | 96,7 | 0,75 |
| 11 | 378 | 61,1549 | 125,1 | 0,71 | 40 | 950,1 | 183,4608 | 233,5 | 2,12 |
| 12 | 396,1 | 426,8157 | 5522,7 | 4,94 | 41 | 971 | 11,7632 | 157,8 | 0,14 |
| 13 | 411,7 | 743,4914 | 1171,4 | 8,6 | 42 | 988,9 | 49,6746 | 437,3 | 0,57 |
| 14 | 463,9 | 352,5796 | 3211 | 4,08 | 43 | 1009,7 | 15,294 | 161,8 | 0,18 |
| 15 | 475,1 | 184,0312 | 2057,5 | 2,13 | 44 | | | | |
| 16 | 488,8 | 96,4494 | 1132,6 | 1,12 | 45 | 1037,2 | 33,4887 | 306,4 | 0,39 |
| 17 | 510,2 | 450,8124 | 4247,9 | 5,22 | 46 | 1057,7 | 9,2107 | 11,7 | 0,11 |
| 18 | 522,6 | 95,4746 | 928,6 | 1,1 | 47 | 1093,9 | 12,4709 | 98,8 | 0,14 |
| 19 | 545,4 | 61,7225 | 457,5 | 0,71 | | | | | |
| 20 | 566,8 | 461,4631 | 5074 | 5,34 | | | | | |
| 21 | 582,4 | 21,5639 | 307,3 | 0,25 | | | | | |
| 22 | 599,3 | 95,2284 | 854,1 | 1,1 | | | | | |
| 23 | 614,9 | 484,0292 | 4091 | 5,6 | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | |
| 25 | 640,6 | 259,1023 | 1980,2 | 3 | | | | | |
| 26 | 689,1 | 659,1993 | 5827,4 | 7,63 | | | | | |
| 27 | 713,7 | 721,2672 | 6467 | 8,35 | | | | | |
| 28 | 732,9 | 180,6012 | 1596,6 | 2,09 | | | | | |
| 29 | 759 | 226,1047 | 307,4 | 2,62 | | | | | |

Tablica D16. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Dva od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-pBp. Pik sa praznim poljem se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 196,1 | 81,4385 | 1301 | 0,97 | 30 | 766,3 | 251,4382 | 346,1 | 3 |
| 2 | 225,9 | 6,6459 | 98,1 | 0,08 | 31 | 788,4 | 54,8701 | 699,8 | 0,66 |
| 3 | 234,5 | 55,0183 | 94,5 | 0,66 | 32 | 814,6 | 647,2457 | 3652,5 | 7,74 |
| 4 | 273,4 | 185,1414 | 2276,2 | 2,21 | 33 | | | | |
| 5 | 291,5 | 23,8994 | 351,7 | 0,29 | 34 | 850,1 | 147,0049 | 1457,3 | 1,76 |
| 6 | 308,3 | 16,2459 | 259,9 | 0,19 | 35 | 862 | 372,1052 | 3642,3 | 4,45 |
| 7 | 323,9 | 58,41 | 669,2 | 0,7 | 36 | | | | |
| 8 | 332,5 | 50,4402 | 702,2 | 0,6 | 37 | 902,6 | 345,5629 | 1946,9 | 4,13 |
| 9 | 352,4 | 76,3733 | 146 | 0,91 | 38 | | | | |
| 10 | 373,3 | 226,2777 | 250,9 | 2,7 | 39 | 946 | 70,2261 | 103,7 | 0,84 |
| 11 | 379,5 | 51,8507 | 122,7 | 0,62 | 40 | 952,2 | 170,9828 | 235,2 | 2,04 |
| 12 | 397,1 | 421,4461 | 5779,8 | 5,04 | 41 | 973,1 | 10,9265 | 157,8 | 0,13 |
| 13 | 412,5 | 730,8053 | 1183,8 | 8,73 | 42 | 990,9 | 49,7626 | 468,4 | 0,59 |
| 14 | 464,8 | 314,6342 | 3159,8 | 3,76 | 43 | 1011,7 | 14,7267 | 167,7 | 0,18 |
| 15 | 475,9 | 161,9866 | 2034,6 | 1,94 | 44 | | | | |
| 16 | 489,6 | 86,2753 | 1120 | 1,03 | 45 | 1039,3 | 29,9579 | 307,2 | 0,36 |
| 17 | 511 | 430,2247 | 4368,1 | 5,14 | 46 | 1060,6 | 6,7865 | 9,8 | 0,08 |
| 18 | 523,5 | 94,2262 | 1006,1 | 1,13 | 47 | 1096,6 | 9,4355 | 95,3 | 0,11 |
| 19 | 546,6 | 61,4841 | 489,9 | 0,73 | | | | | |
| 20 | 567,9 | 440,891 | 5238,3 | 5,27 | | | | | |
| 21 | 583,4 | 22,3108 | 334,7 | 0,27 | | | | | |
| 22 | 600,4 | 102,9336 | 955,9 | 1,23 | | | | | |
| 23 | 616 | 477,0024 | 4207,5 | 5,7 | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | |
| 25 | 642 | 245,0542 | 2024,3 | 2,93 | | | | | |
| 26 | 690,3 | 629,1479 | 6005,9 | 7,52 | | | | | |
| 27 | 714,8 | 707,9783 | 6782,9 | 8,46 | | | | | |
| 28 | 734,1 | 191,5002 | 1743 | 2,29 | | | | | |
| 29 | 760,4 | 236,6873 | 317,7 | 2,83 | | | | | |

Tablica D17. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana salinomycinom. Tri od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-pBp. Pik sa praznim poljem se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 197,1 | 78,4215 | 1250,3 | 0,93 | 30 | 767,4 | 255,7308 | 351 | 3,03 |
| 2 | 226,9 | 5,8959 | 92,6 | 0,07 | 31 | 789,3 | 58,678 | 728,3 | 0,7 |
| 3 | 235,6 | 52,0618 | 94,7 | 0,62 | 32 | 815,6 | 644,9648 | 3583,7 | 7,64 |
| 4 | 274,4 | 190,9583 | 2273 | 2,26 | 33 | | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 292,5 | 26,0421 | 370,3 | 0,31 | 34 | 850,8 | 162,6603 | 1534,9 | 1,93 |
| 6 | 309,3 | 16,9937 | 265,6 | 0,2 | 35 | 862,6 | 373,7582 | 3604,7 | 4,43 |
| 7 | 324,7 | 57,7851 | 667,9 | 0,68 | 36 | | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 333,4 | 49,4808 | 668,1 | 0,59 | 37 | 903,2 | 343,2592 | 1923,5 | 4,07 |
| 9 | 353,3 | 75,9134 | 149,2 | 0,9 | 38 | | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 374,3 | 211,2868 | 252,2 | 2,5 | 39 | 946,5 | 66,2025 | 102,7 | 0,78 |
| 11 | 379 | 63,5961 | 134 | 0,75 | 40 | 953 | 173,7115 | 238,6 | 2,06 |
| 12 | 398,2 | 419,0343 | 5647,7 | 4,97 | 41 | 974 | 10,7972 | 156,3 | 0,13 |
| 13 | 413,6 | 736,0192 | 1201,6 | 8,72 | 42 | 991,8 | 48,0891 | 448,6 | 0,57 |
| 14 | 465,9 | 318,3915 | 3155,8 | 3,77 | 43 | 1012,5 | 13,5422 | 162,7 | 0,16 |
| 15 | 477,1 | 164,3128 | 2003,3 | 1,95 | 44 | | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 490,8 | 83,9967 | 1077 | 1 | 45 | 1039,9 | 29,7779 | 294,3 | 0,35 |
| 17 | 512,2 | 434,4977 | 4341,9 | 5,15 | 46 | 1061,1 | 6,7341 | 10 | 0,08 |
| 18 | 524,8 | 99,6614 | 1000,4 | 1,18 | 47 | 1097,1 | 9,9158 | 93,1 | 0,12 |
| 19 | 548,1 | 60,3483 | 472,4 | 0,72 | | | | | |
| 20 | 569,3 | 448,0127 | 5170,9 | 5,31 | | | | | |
| 21 | 584,5 | 17,0466 | 272,5 | 0,2 | | | | | |
| 22 | 601,8 | 79,2228 | 111,7 | 0,94 | | | | | |
| 23 | 617,2 | 469,5408 | 4194,8 | 5,56 | | | | | |
| 24 | | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 25 | 643,4 | 252,2059 | 2020,5 | 2,99 | | | | | |
| 26 | 691,7 | 652,1044 | 5990,6 | 7,73 | | | | | |
| 27 | 716,1 | 746,8044 | 6884,8 | 8,85 | | | | | |
| 28 | 735,2 | 187,062 | 1702 | 2,22 | | | | | |
| 29 | 761,4 | 243,4011 | 326,4 | 2,88 | | | | | |

Tablica D18. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana monezinom. Jedan od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-pBp. Pik sa praznim poljem se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 197,1 | 70,5526 | 1123,8 | 0,91 | 30 | 768,2 | 267,225 | 339,3 | 3,46 |
| 2 | 227,1 | 6,8649 | 97,9 | 0,09 | 31 | 790,1 | 55,0256 | 714 | 0,71 |
| 3 | 235,7 | 46,8853 | 82,3 | 0,61 | 32 | 816,4 | 585,5683 | 3275,9 | 7,59 |
| 4 | 274,8 | 171,7041 | 2221,6 | 2,23 | 33 | | | | |
| 5 | 293,1 | 24,2166 | 355,5 | 0,31 | 34 | 851,6 | 157,4202 | 1500,7 | 2,04 |
| 6 | 309,8 | 16,2547 | 261,2 | 0,21 | 35 | 863,5 | 376,6747 | 3630,6 | 4,88 |
| 7 | 325,4 | 56,0093 | 639,6 | 0,73 | 36 | | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 334,1 | 62,1795 | 766 | 0,81 | 37 | 904,5 | 361,6948 | 264,5 | 4,69 |
| 9 | 354,1 | 104,8112 | 166,1 | 1,36 | 38 | | | | |
| 10 | 375 | 237,5277 | 277,2 | 3,08 | 39 | 947 | 62,2637 | 102,9 | 0,81 |
| 11 | 380 | 60,0909 | 138,1 | 0,78 | 40 | 953,9 | 186,5549 | 253,3 | 2,42 |
| 12 | 399 | 403,1053 | 5525,7 | 5,22 | 41 | 975,1 | 13,9652 | 195,2 | 0,18 |
| 13 | 414,3 | 610,7036 | 1028,6 | 7,92 | 42 | 992,6 | 50,8653 | 478,2 | 0,66 |
| 14 | 466,7 | 298,8393 | 3123,4 | 3,87 | 43 | 1013,3 | 16,6431 | 188,4 | 0,22 |
| 15 | 478 | 166,9009 | 2085 | 2,16 | 44 | | | | |
| 16 | 491,6 | 80,4834 | 1075,1 | 1,04 | 45 | 1040,7 | 28,7244 | 303,2 | 0,37 |
| 17 | 512,9 | 382,3162 | 3965,1 | 4,96 | 46 | 1062,4 | 5,6878 | 8,3 | 0,07 |
| 18 | 526,1 | 99,0953 | 974,1 | 1,28 | 47 | 1098,4 | 7,263 | 70,6 | 0,09 |
| 19 | 548,3 | 60,9927 | 477,3 | 0,79 | | | | | |
| 20 | 570,1 | 416,9816 | 4969,4 | 5,4 | | | | | |
| 21 | 585,1 | 18,3797 | 315 | 0,24 | | | | | |
| 22 | 602,5 | 43,7129 | 78,5 | 0,57 | | | | | |
| 23 | 618 | 419,9182 | 3833,3 | 5,44 | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | |
| 25 | 644,5 | 205,3448 | 1699,6 | 2,66 | | | | | |
| 26 | 692,5 | 514,8757 | 5010,6 | 6,67 | | | | | |
| 27 | 716,5 | 653,3809 | 6388,4 | 8,47 | | | | | |
| 28 | 736 | 139,1311 | 1359 | 1,8 | | | | | |
| 29 | 763 | 168,4137 | 282,5 | 2,18 | | | | | |

Tablica D19. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana monezinom. Dva od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-pBp. Pik sa praznim poljem se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 196,9 | 79,1376 | 1186,5 | 1,06 | 30 | 768,6 | 265,5436 | 341,1 | 3,55 |
| 2 | 226,7 | 5,358 | 79,3 | 0,07 | 31 | 790,4 | 52,3974 | 649,1 | 0,7 |
| 3 | 235,5 | 44,3706 | 86,2 | 0,59 | 32 | 816,9 | 576,8723 | 3063,4 | 7,72 |
| 4 | 274,4 | 173,7684 | 2140,8 | 2,32 | 33 | | | | |
| 5 | 292,6 | 22,9356 | 314,9 | 0,31 | 34 | 852 | 149,9819 | 1369,6 | 2,01 |
| 6 | 309,4 | 16,6924 | 248,3 | 0,22 | 35 | 863,9 | 360,2393 | 3320,7 | 4,82 |
| 7 | 325 | 51,5758 | 560 | 0,69 | 36 | | | | |
| 8 | 333,9 | 47,5279 | 611,9 | 0,64 | 37 | 904,9 | 353,9384 | 271,3 | 4,73 |
| 9 | 353,7 | 72,5359 | 144,8 | 0,97 | 38 | | | | |
| 10 | 374,9 | 211,1253 | 256,9 | 2,82 | 39 | 947,5 | 64,5785 | 108,7 | 0,86 |
| 11 | 381 | 41,6426 | 109,8 | 0,56 | 40 | 954,2 | 185,2356 | 266,2 | 2,48 |
| 12 | 398,9 | 389,1452 | 4964,5 | 5,21 | 41 | 975,3 | 13,0198 | 172,1 | 0,17 |
| 13 | 414,3 | 605,4659 | 1054,7 | 8,1 | 42 | 993 | 48,9414 | 432,2 | 0,65 |
| 14 | 466,8 | 288,9261 | 2849,4 | 3,86 | 43 | 1013,7 | 16,6116 | 172,8 | 0,22 |
| 15 | 478,2 | 154,324 | 1880,7 | 2,06 | 44 | | | | |
| 16 | 491,9 | 78,0782 | 1007,4 | 1,04 | 45 | 1041,1 | 30,9579 | 296,1 | 0,41 |
| 17 | 513,2 | 364,4004 | 3638,3 | 4,87 | 46 | 1062,5 | 6,6884 | 8,9 | 0,09 |
| 18 | 526,3 | 84,6015 | 841,2 | 1,13 | 47 | 1098,7 | 7,8307 | 70,1 | 0,1 |
| 19 | 548,6 | 53,5848 | 414,3 | 0,72 | | | | | |
| 20 | 570,5 | 411,472 | 4642,5 | 5,5 | | | | | |
| 21 | 585,8 | 20,6129 | 312,8 | 0,28 | | | | | |
| 22 | 602,9 | 60,834 | 637,8 | 0,81 | | | | | |
| 23 | 618,3 | 411,3278 | 3584,1 | 5,5 | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | |
| 25 | 645 | 195,8083 | 1545,4 | 2,62 | | | | | |
| 26 | 693 | 506,3053 | 4680,2 | 6,77 | | | | | |
| 27 | 716,9 | 646,4827 | 5979,2 | 8,65 | | | | | |
| 28 | 736,2 | 153,78 | 1389,7 | 2,06 | | | | | |
| 29 | 767 | 151,2027 | 292,4 | 2,02 | | | | | |

Tablica D20. Retencijska vremena (RT), površina, omjer signala i šuma (S/N) te relativna površina dobivenih integracijom kromatograma glikana iz sekretoma HMLE-pBp stanične linije nakon tretmana monezinom. Tri od tri unutar triplikata. Integracija je odrađena pomoću algoritma unutar programa *Compass DataAnalysis*. Broj pika je usklađen s numeracijom u kontroli HMLE-pBp. Pik sa praznim poljem se ne pojavljuje u tretiranoj kulturi.

| # | RT / s | Površina | S/N | Relativna površina / % | # | RT / S | Površina | S/N | Relativna površina / % |
|----|--------|----------|--------|------------------------|----|--------|----------|--------|------------------------|
| 1 | 196,8 | 90,6214 | 1379,1 | 1,13 | 30 | 767,5 | 265,4712 | 329,2 | 3,3 |
| 2 | 226,6 | 6,2232 | 92,4 | 0,08 | 31 | 789,2 | 54,151 | 676 | 0,67 |
| 3 | 235,3 | 49,8359 | 84,4 | 0,62 | 32 | 815,5 | 623,6144 | 3259,4 | 7,75 |
| 4 | 274,3 | 189,9792 | 2319,8 | 2,36 | 33 | | | | |
| 5 | 292,4 | 25,4763 | 352,8 | 0,32 | 34 | 850,7 | 173,5347 | 1503,9 | 2,16 |
| 6 | 309,2 | 18,175 | 268,9 | 0,23 | 35 | 862,7 | 388,2292 | 3553,4 | 4,83 |
| 7 | 324,9 | 58,4347 | 624,7 | 0,73 | 36 | | | | |
| 8 | 333,8 | 62,5231 | 717,6 | 0,78 | 37 | 903,6 | 376,1419 | 253,8 | 4,68 |
| 9 | 353,5 | 111,1863 | 164,1 | 1,38 | 38 | | | | |
| 10 | 374,6 | 254,2464 | 263,8 | 3,16 | 39 | 945,5 | 61,2817 | 95,4 | 0,76 |
| 11 | 380 | 61,5711 | 127,4 | 0,77 | 40 | 952,9 | 202,0947 | 246,3 | 2,51 |
| 12 | 398,5 | 414,8821 | 5477,8 | 5,16 | 41 | 974,1 | 12,9755 | 173,3 | 0,16 |
| 13 | 413,9 | 572,5259 | 944,3 | 7,12 | 42 | 992 | 52,3053 | 470,5 | 0,65 |
| 14 | 466,1 | 330,942 | 3185,3 | 4,11 | 43 | 1012,6 | 16,0642 | 23,7 | 0,2 |
| 15 | 477,4 | 178,4939 | 2086,9 | 2,22 | 44 | | | | |
| 16 | 491,1 | 86,3594 | 1083,7 | 1,07 | 45 | 1040,2 | 30,3976 | 295,6 | 0,38 |
| 17 | 512,3 | 382,3631 | 3852,4 | 4,75 | 46 | 1062,1 | 6,9383 | 8,9 | 0,09 |
| 18 | 525,4 | 89,5606 | 884,8 | 1,11 | 47 | 1098,1 | 7,6673 | 70,6 | 0,1 |
| 19 | 547,6 | 57,8299 | 448,3 | 0,72 | | | | | |
| 20 | 569,3 | 431,253 | 4852,3 | 5,36 | | | | | |
| 21 | 584,6 | 20,4938 | 315,3 | 0,25 | | | | | |
| 22 | 601,9 | 65,7187 | 679,5 | 0,82 | | | | | |
| 23 | 617,3 | 450,6587 | 3833,2 | 5,6 | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | |
| 25 | 643,9 | 205,3371 | 1637 | 2,55 | | | | | |
| 26 | 691,9 | 548,5582 | 4942,5 | 6,82 | | | | | |
| 27 | 715,8 | 671,092 | 6217,8 | 8,34 | | | | | |
| 28 | 735,5 | 149,2831 | 1367,4 | 1,86 | | | | | |
| 29 | 763 | 188,009 | 276,9 | 2,34 | | | | | |

§ 10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Filip Kliček

Datum rođenja: 23. lipnja 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001–2009 Osnovna škola Veliko Trgovišće, Veliko Trgovišće

2009–2013 Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Zabok

2013–2016 Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb

Nagrade i priznanja

2013 Posebna Rektorova nagrada

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014–2018 Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2015 Smotra sveučilišta u Zagrebu

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. F. Kliček, M. Novokmet, M. Marjanović, G. Lauc, M. Kralj, *Utjecaj salinomicina na N-glikom u modelu tumorskih matičnih stanica*, 2nd GlycoCom Conference and 1st Human Glycome Project Meeting, Dubrovnik, 2018, Knjiga sažetaka, str. 106