

# BIOINFORMATIČKA ANALIZA UČINKA STANIČNE PARABIOZE I GENSKE EKSPRESIJE NA NASTANAK I METASTAZIRANJE TUMORA

---

Vidović, Tinka

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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:217:440716>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Tinka Vidović

**BIOINFORMATIČKA ANALIZA UČINKA  
STANIČNE PARABIOZE I GENSKE  
EKSPRESIJE NA NASTANAK I  
METASTAZIRANJE TUMORA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Tinka Vidović

**BIOINFORMATIC ANALYSIS OF INFLUENCE OF  
CELLULAR PARABIOSIS AND GENE  
EXPRESSION ON TUMORIGENESIS AND  
METASTASIS FORMATION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024

Ovaj je doktorski rad izrađen u Grupi biologija robusnosti na Mediteranskom institutu za istraživanje života (MedILS), pod vodstvom akademika prof. dr. sc. Miroslava Radmana, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Posebnu zahvalnost dugujem svojem mentoru akademiku Miroslavu Radmanu na poticaju za izradu disertacije, uvijek dostupnoj pomoći te konstruktivnim kritikama i savjetima. Zahvaljujem svim djelatnicima Mediteranskog instituta za istraživanje života na pomoći u izradi disertacije, a posebno nasl. doc. dr. sc. Andrei Gelemanović i nasl. doc. dr. sc. Katarini Trajković. Posebno zahvaljujem svojoj obitelji: mami, tati i sestri na neizmjernoj podršci.*

**BIOINFORMATIČKA ANALIZA UČINKA STANIČNE PARABIOZE I GENSKE  
EKSPRESIJE NA NASTANAK I METASTAZIRANJE TUMORA**

TINKA VIDOVIĆ

Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS),

Šetalište Ivana Meštrovića 45, 21000 Split

U ovom radu se istražio utjecaj stanične parabioze i genske ekspresije na specifičnost nastanka tumora. Pokazali smo da tkiva koja povećano izražavaju gene koje pripadaju kategorijama nedostatak IRAK4 te MET aktivira Rap1 i Rac1 su podložnija nastanku metastazi. Navedeni rezultat je u skladu s početnom hipotezom da se manipulacijom staničnom parabiozom mogu spriječiti maligni tumori budući da su Rho-GTPaze regulatori aktinskog citoskeleta i stanične migracije. Koristeći metodu ponderirane genske koekspresije pronađeni su ključni geni za nastanak tumora, koji su se usporedili s normalnom ekspresijom gena u svim tkivima. Cilj ove analize je bio vidjeti kako su ključni geni u tumorima izraženi u svim normalnim tkivima, budući da obrazac ekspresije gena u normalnom tkivu može biti uzrok specifičnosti metastaziranja. Također su pronađeni i diferencijalno eksprimirani (DE) geni između ranih i kasnih stadija, te se na temelju ekspresije DE gena postignuti odlični rezultati razlikovanja ranih i kasnih stadija tumora metodom potpornih vektora.

(129 stranica, 19 slika, 18 tablica, 154 literaturni navod, 33 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: maligni tumor, metastaze, organ-specifičnost, stanična parabioza, genska ekspresija

Mentor: prof. dr. sc. Miroslav Radman

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Rosa Karlić

prof. dr. sc. Nada Oršolić

doc. dr. sc. Petar Ozretić

**BIOINFORMATIC ANALYSIS OF INFLUENCE OF CELLULAR PARABIOSIS  
AND GENE EXPRESSION ON TUMORIGENESIS AND METASTASIS  
FORMATION**

TINKA VIDOVIĆ

Mediterranean Institute for Life Sciences (MedILS),

Šetalište Ivana Meštrovića 45, 21000 Split

In this work, the influence of cellular parabiosis and gene expression on the specificity of tumor formation was investigated. We showed that tissues that overexpressed genes belonging to the IRAK4 deficiency and MET activates Rap1 and Rac1 categories are more susceptible to metastases. This result is in accordance with the initial hypothesis that malignant tumors can be prevented by manipulation of cellular parabiosis since Rho-GTPases are regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. Using the method of weighted gene co-expression, core genes for the formation of tumors were found, which were compared with normal gene expression in all tissues. The aim of this analysis was to see how core genes in tumors are expressed in all normal tissues, since the pattern of gene expression in normal tissue may be the cause of the specificity of metastasis. Differentially expressed (DE) genes between early and late stages were also found, and based on the expression of the DE gene, excellent results were achieved in distinguishing between early and late tumor stages by support vector machine method.

(129 pages, 19 figures, 18 tables, 154 references, 33 supplementary figures, original in Croatian)

Keywords: cancer, metastasis, organ-specific, cellular parabiosis, gene expression

Supervisor: Professor Miroslav Radman, PhD

Reviewers: Assistant Professor Rosa Karlić, PhD

Professor Nada Oršolić, PhD

Assistant Professor Petar Ozretić, PhD

## Sadržaj

Popis slika.....	ii
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Hipoteza.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Ciljevi istraživanja.....</b>	<b>4</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Tumori.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Metastaziranje .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1. Epitelno-mezenhimska tranzicija .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2. Intravazacija, preživljenje u cirkulaciji i ekstravazacija tumorskih stanica .</b>	<b>10</b>
<b>2.2.3. Metastatska kolonizacija.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.4 Formiranje pre-metastatske niše .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.5 Organ-specifične metastaze.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Molekularni mehanizam nastanka organ-specifičnih metastazi.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1. Egzosomi.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2. Matriksne metaloproteinaze i remodeliranje izvanstaničnog matriksa .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.3. Imunosni sustav .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.4. Kemokini i kemokinski receptori.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Stanična parabioloza .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Korišteni podaci.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Identifikacija gena sa značajnom varijacijom u genskoj ekspresiji u normalnim tkivima .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena između tumora i normalnog tkiva ...</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Pronalazak ključnih diferencijalno eksprimiranih gena te analiza puteva i genske ontologije ključnih gena .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Razlikovanje ranih i kasnih stadija malignih tumora pomoću strojnog učenja... 26</b>	



<b>4. REZULTATI</b> .....	30
<b>4.1. Povećano ili smanjeno eksprimirani geni u normalnim tkivima u odnosu na ostala normalna tkiva</b> .....	30
<b>4.2. Korelacija između postotka smanjeno ili povećano eksprimiranih gena u normalnim organima i pojavnosti primarnih tumora po organima</b> .....	31
<b>4.3. Korelacija između postotka smanjeno ili povećano eksprimiranih gena u normalnim organima i pojavnosti nastanka metastaza</b> .....	34
<b>4.4. Genska ontologija i analiza puteva diferencijalno eksprimiranih ključnih gena između malignih tumora i odgovarajućeg normalnog tkiva</b> .....	36
<b>4.5. Ekspresija diferencijalno eksprimiranih ključnih gena povezanih sa malignim fenotipom u normalnim tkivima</b> .....	58
<b>4.6. Razlikovanje ranijih i kasnijih stadija tumora pomoću metode potpornih vektora</b> .....	66
<b>5. RASPRAVA</b> .....	75
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	84
<b>7. LITERATURA</b> .....	86
<b>8. PRILOZI</b> .....	96
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	129

## Popis slika

Slika 1. Proces metastaziranja malignih solidnih tumora .....	10
Slika 2. Prikaz fenotipske supresije malignosti od strane stanične parabioze, te fenotipske ekspresije nakon prekida stanične parabioze od strane upale (preuzeto od M. Radman, 2019). .....	20
Slika 3. Grafički prikaz analize kojom su dobivene genske kategorije koje značajno koreliraju sa nastankom primarnih ili metastatskih tumora .....	23
Slika 4. Grafički prikaz analize kojom su dobivena predviđena mjesta metastazi koristeći ekspresiju ključnih DE gena u normalnim tkivima .....	26
Slika 5 Grafički prikaz analize razlikovanja ranih i kasnih stadija tumora koristeći gensko ekspresijske podatke i metodu potpornih vektora.....	29
Slika 6. Prikaz rezultata analize broja povećano i smanjeno eksprimiranih gena u normalnim tkivima u odnosu na prosječnu ekspresiju pojedinih gena u svim normalnim tkivima. ..	30
Slika 7. Pojavnost primarnih tumora u 2020. godini za oba spola u obliku postotka.....	32
Slika 8. Prikaz jedine statistički značajne korelacije ( $FDR < 0,05$ ) između postotka smanjeno eksprimiranih gena koji pripadaju kategorijama staničnih obilježja u normalnim tkivima i pojavnosti primarnih tumora u normalnim tkivima. ....	33
Slika 9. Pojavnost metastazi u MSK MetTropism studiji. ....	34
Slika 10. Prikaz statistički značajne korelacije između postotka povišeno eksprimiranih gena Reactome kategorije nedostatak IRAK4 (TLR2/4) u normalnim tkivima i pojavnosti metastatskih tumora u normalnim tkivima. ....	35
Slika 11. Prikaz statistički značajne korelacije između postotka povišeno eksprimiranih gena Reactome kategorije: MET aktivira RAP1 i RAC1, u normalnim tkivima u odnosu na sva ostala tkiva i pojavnosti metastatskih tumora u normalnim tkivima. ....	36
Slika 12. Rezultati autopsijske studije pojavnosti metastazi za više od 40 primarnih tumora.	61
Slika 13. Ekspresija smanjeno eksprimiranih ključnih gena povezanih sa malignim fenotipom u normalnim tkivima. ....	63
Slika 14. Ekspresija povećano eksprimiranih ključnih gena povezanih sa malignim fenotipom u normalnim tkivima. ....	65
Slika 15. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena.....	70

Slika 16. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem. ....	71
Slika 17. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena koji međusobno ne koreliraju značajno.....	72
Slika 18. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena i metodu poduzorkovanja SMOTE. ....	73
Slika 19. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem i metodu poduzorkovanja SMOTE. ....	74

## 1. UVOD

Pronalaženje novih načina liječenja zloćudnih bolesti je od velike važnosti, budući da učestalost i smrtnost od malignih bolesti raste u svijetu. U 2020. godini rak je uzrokovao približno 10 milijuna smrtnih slučajeva, te je u istoj godini bilo dijagnosticirano 19.3 milijuna novih slučajeva. Procjenjuje se da će do 2040. godine u svijetu biti dijagnosticirano 28.4 milijuna novih slučajeva raka, što je povećanje od 47% u odnosu na 2020. godinu <sup>1</sup>.

Poznato je da su pojedini organi, kao što su dojka, prostata, debelo crijevo, pluća i želudac češća mjesta nastanka primarnih tumora <sup>1</sup>, dok su jetra, pluća, limfni čvorovi i kosti najčešći organi u kojima nastaju metastaze <sup>2-4</sup>. Različitost u podložnosti pojedinih organa za nastanak primarnih i metastatskih tumora još nije u potpunosti objašnjena. Razumijevanje specifičnosti nastanka metastaza samo u pojedinim organima omogućilo bi uspješnije liječenje malignih tumora, budući da su metastaze vodeći uzrok smrtnosti od malignih tumora te sposobnost metastaziranja razlikuje maligne od benignih tumora <sup>5</sup>.

Dvije su teorije o mehanizmu preferencijalnog mjesta metastaza: Pagetova teorija i mehanička teorija. Paget je prvi put primijetio ne-slučajan obrazac metastaziranja 1889. godine. Izjavio je da ako najprikladnije "sjeme" (stanica tumora) padne na "neplodno tlo" (organ), neće doći do "klijanja" (metastaziranja). Budući da primarni tumor vrlo rijetko metastazira u primarnom organu, osobine udaljenih organa mogle bi biti važnije od biologije stanice tumora <sup>6</sup>. Ewing je 1928. pretpostavio da je specifičnost metastaziranja povezana s anatomijom krvožilnog sustava. Ewingova hipoteza je bila dominantna sve dok Isaiah Fidler nije u 1980-ima pokazao da iako su mehanička svojstva krvotoka važna, uspješno metastaziranje se može dogoditi samo na određenim organima <sup>7</sup>. Fidlerovo otkriće je dodatno potkrijepilo Pagetovu teoriju, i ponovo potaklo na razmišljanje o specifičnosti mjesta metastaza <sup>8</sup>. Specifičnost metastaziranja samo u određenim organima se zove organotropizam, i jedno je od najintrigantnijih nerazjašnjenih pitanja u tumorskoj biologiji <sup>3</sup>.

U ovom radu se pokušalo razumjeti specifičnost tropizma nastanka primarnih i metastatskih tumora koristeći podatke o genskoj ekspresiji u normalnim organima, budući da postoji mogućnost da intrinzična organ-specifična svojstva imaju važnu ulogu u nastanku primarnih i metastatskih tumora. Nedavno je predložen koncept stanične parabioze, koji može

objasniti suzbijanje nastanka malignog staničnog fenotipa kroz interakcije sa zdravim stanicama u njihovom okolišu <sup>9</sup>.

Pojedine stanice koje imaju stečene mutacije ili epigenetske promjene mogu ili izraziti ili prikriti fiziološke (fenotipske) posljedice promjena genoma, ovisno o interakcijama između stanica uspostavljenim u izvanstaničnom prostoru <sup>9</sup>. Pojam parabioza, što znači "zajednički život", prvi se put koristio za opisivanje fizioloških učinaka povezivanja krvotoka dvaju miševa. Parabioza između starog i mladog miša, pomlađuje starog partnera i ublažava bolesti povezane sa starenjem u roku od nekoliko tjedana. Međutim, ubrzo nakon razdvajanja parabiotičkih partnera, ponovno se pojavljuju početni uvjeti koji pokazuju da je parabioza kompenzacija, a ne ispravljanje uzroka tih stanja <sup>10</sup>. Stanice u tkivima parabiotički su povezane raznim strukturama (tunelske nanocijevi, propusne veze, filopodiji, egzozomi itd.) koje omogućuju molekularni promet, pa čak i prijenos mitohondrija između stanica u interakciji <sup>11</sup>, <sup>12</sup>. Takva parabioza teži homogenizaciji staničnih fenotipova i odgovorna je za usklađivanje staničnih aktivnosti u tkivima, što se naziva tkivna homeostaza <sup>9</sup>.

Fenotipsko preokretanje staničnih defekata događa se čak i u kulturi stanica. Suzbijanje rasta tumorskih stanica naslaganih na jedan sloj fibroblasta prikazao je M. Stoker, a opsežno proučavao G. Klein, s tim da molekularni mehanizam nije razjašnjen <sup>13</sup>, <sup>14</sup>. S druge strane, klasična ispitivanja eksperimentalnih karcinogena od strane I. Berenbluma otkrila su postojanje brojnih latentnih ili uspavanih tumora na koži miša koja je tretirana s kancerogenima. Takvi su se latentni tumori aktivirali produljenim djelovanjem ne-kancerogenim upalnim nadražujućim sredstvom za kožu <sup>15</sup>. Predloženo je da svi ti fenomeni mogu biti posljedica stanične parabioze, budući da upale sprečavaju komunikaciju među stanicama.

U ovom radu ćemo pokušati odgovoriti na pitanje može li stanična parabioza biti uzrok specifičnosti metastaziranja tumora. Otprije je poznato, da se stanica tumora za ulazak u cirkulaciju treba odvojiti od primarnog tumora, a proces upalne epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) to omogućuje. Gubljenjem epitelnog fenotipa i stjecanjem mezenhimske fenotipa stanice tumora postaju invazivne <sup>16</sup>. U vezivanju stanice tumora s udaljenim organom, stanica tumora mora biti sposobna uspostaviti nove kontakte sa susjednim stanicama. U procesu uspostavljanja novih kontakata sa susjednim stanicama važnu ulogu igra mezenhimsko-epitelna tranzicija (MET), proces suprotan od EMT <sup>17</sup>.

EMT se može definirati kao trans-diferencijacija epitelnih stanica u mezenhimalne stanice koje imaju sposobnost razgradnje izvanstaničnog matriksa (ECM, engl. *extracellular*

*matrix*), te navedeni proces ima glavnu ulogu u nastajanju fibroze, kronične upale i progresije malignih tumora. Razgradnja izvanstaničnog matriksa mogla bi igrati bitnu ulogu u procesu odvajanja tumorskih stanica od primarnog tumora i omogućivanju invazivnosti tumorskih stanica, a postupak vezivanja za ECM udaljenog organa mogao bi dovesti do udaljenih metastaza. Moglo bi se reći da gubitak stanično-stanične komunikacije može dovesti do ulaska stanice tumora u cirkulaciju, dok bi stjecanje stanično-stanične komunikacije moglo dovesti ili do uspostavljanja ili neuspostavljanja metastaza na udaljenom organu. Organi koji sintetiziraju određene proteine koji su smanjeno eksprimirani u stanici tumora, ne bi bili pogodno tlo za nastanak metastazi za razliku od onih organa koji ne sintetiziraju navedene proteine. Dakle, mi smatramo da stanično-stanična komunikacija ili stanična parabioza omogućuje mnogim tkivima koja izražavaju određene proteine koji su smanjeno eksprimirani u tumoru da budu rezistentna na metastaziranje. Međutim, tkiva koja ne eksprimiraju proteine koji su smanjeno eksprimirani u tumoru i čija smanjena ekspresija je jedan od uzroka nastanka tumora, bi bili potencijalno mjesto metastaze prema našoj hipotezi. Ovdje tražimo dokaze za suzbijanje metastatskog maligniteta staničnom parabiozom pretpostavljajući da isti mehanizam koji uzrokuje dugo razdoblje latencije u rastu primarnih tumora, tj. dobivanje proteina ili mitohondrija s tumor supresorskom aktivnosti iz zdravih susjednih stanica, sprječava rast metastatskih stanica u zdravim organima. Prvi korak u uspješnom zasijavanju stanice tumora je uspostavljanje parabioze s normalnim tkivom ili vezivanje stanice tumora na ECM normalnog tkiva. Kada se stanica malignog tumora poveže sa stanicama normalnog tkiva, postoje dvije mogućnosti: stanica tumora će ili primiti iz normalnih stanica mRNA ili proteine koji nedostaju tumorskim stanicama (i time suzbijaju maligni rast) ili je stanica tumora neće primiti i rasti će u metastazu. Ako stanica tumora primi mRNA ili protein zbog čijeg je nedostatka postala maligna, onda se neće dogoditi metastaza. Organi koji ne izražavaju specifične tumor supresore ili ne uspostavljaju parabiotske veze, omogućili bi rast metastaza iz upada primarnih tumorskih stanica. Takve smo dokaze tražili u bazama podataka o ekspresiji gena. Naglasak je bio na specifičnosti metastaza u organu/tkivu: postoji li dosljedna specifična razlika u ekspresiji gena između zdravih tkiva koja dopuštaju i onih koja ne dopuštaju rast stanica iz određenih primarnih tumora?

## 1.1. Hipoteza

1. Intrinzična svojstva organa povezana su s nastankom i primarnih tumora i metastaza.

2. Zbog genske ekspresije organa u normalnim uvjetima pojedini organi su češća mjesta nastanka primarnih tumora, dok su određeni organi češća mjesta za nastanak metastazi.
3. Ako su ključni geni koji su smanjeno eksprimirani ili nefunkcionalni u tumoru, smanjeno eksprimirani i u određenom normalnom tkivu, to tkivo će biti podložnije za nastanak metastatskog tumora.
4. Ako su ključni geni koji su povećano eksprimirani u tumoru, povećano eksprimirani i u određenom tkivu u normalnim uvjetima, to tkivo će biti podložnije za nastanak metastatskog tumora.
5. Rani i kasni stadiji tumora mogu se razlikovati na temelju ekspresije diferencijalno eksprimiranih gena između tih stadija.
6. Fenotipska supresija malignosti, po ovoj hipotezi, je rezultat međustanične komplementacije putem „molekularnog prometa“ između susjednih stanica, tj. stanične parabioze.

## 1.2. Ciljevi istraživanja

Primarni cilj ovog istraživanja je identificirati signalne puteve i genske kategorije koje su ključne za nastanak tumorskog i metastatskog fenotipa. U radu će se pronaći geni koji su smanjeno ili povećano eksprimirani u normalnim tkivima u odnosu na sva normalna tkiva. Postotak smanjeno/povećano eksprimiranih gena u normalnim tkivima iz svake od skupina genskih kategorija korelirat će se s učestalosti primarnih tumora i učestalosti metastazi u pojedinim organima. Tako će se pronaći genske kategorije koje pozitivno ili negativno koreliraju s mjestima nastanka tumora i metastazi.

Sekundarni cilj ovog istraživanja je razlikovanje ranih i kasnih stadija tumora na temelju ekspresije diferencijalnih gena. Smatramo da bi se navedeni geni mogli koristiti kao biomarkeri za razlikovanje ranih i kasnih stadija. Budući da postoji razlika u liječenju ranih i kasnih stadija tumora, navedeni biomarkeri bi omogućili da se u kratkom razdoblju donese odluka o daljnjem liječenju, dok bi se manipulacijom stanične parabioze mogle liječiti ili spriječiti metastaze.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Tumori

Tumor je nakupina stanica koje su izgubile sposobnost regulacije rasta, te se nekontrolirano dijele i stvaraju besmrtnu potomku<sup>18</sup>. Sposobnost metastaziranja je svojstvo koje razlikuje maligne i benigne tumore. Metastaziranje je proces nastanka sekundarnih tumora na mjestima koja su udaljena od nastanka primarnog tumora<sup>19</sup>. Nastanak tumorske stanice je posljedica dugotrajnih genetskih i epigenetskih promjena, koje mogu biti stečene ili naslijeđene<sup>18</sup>. Radi se o aktivaciji onkogeni, inaktivaciji tumor supresora, te promjeni u genima koji su uključeni u popravak DNA. Jedna genetska promjena je rijetko dovoljna za nastanak malignog tumora, te su najčešće potrebne mnoge promjene, često u nekoliko onkogeni i/ili tumor supresorskih gena. Tumori se često sastoje od skupine heterogenih stanica koje nastaju tako da inicijalna tumorska stanica prođe kroz sekundarne ili tercijarne genetske promjene. Navedena heterogenost pridonosi razlici u kliničkom ponašanju i različitom odgovoru na liječenje iste vrste tumora budući da heterogene stanice mogu imati različitu osjetljivost na kemoterapiju, radioterapiju, te druge oblike liječenja<sup>20</sup>.

Onkogeni su geni koji kada su pretjerano aktivni mogu dovesti do stvaranja prevelikih količina proteina koji potiču nekontrolirano dijeljenje i rast. Tumor supresori su geni koji kontroliraju programiranu staničnu smrt i u normalnim uvjetima obuzdavaju rast stanica<sup>18</sup>. Deset kategorija signalnih puteva koji su najčešće promijenjeni u malignim tumorima su: stanični ciklus, Hippo signaliziranje, Myc signaliziranje, Notch signaliziranje, odgovor na oksidativni stres/Nrf2, PI-3-kinaza signaliziranje, receptor tirozin kinaza (RTK) / RAS / MAP-Kinaza signaliziranje, TGF $\beta$  signaliziranje, p53, Wnt signaliziranje<sup>21</sup>.

Povezanost između staničnog ciklusa i nastanka tumora je više nego očita. Naime, stanični ciklus kontrolira proliferaciju stanica, a tumori su bolesti koje nastaju zbog nekontrolirane stanične proliferacije. Budući da u tumorima dolazi do velikog povećanja broja stanica, navedeno povećanje broja stanica dovodi i do smanjenja signala koji dovode do diferencijacije, adherencije, i smrti stanica<sup>22</sup>.

Hippo signalni put ima jedinstveni kapacitet da dovodi do karcinogeneze. Mnogi geni uključeni u Hippo signalni put se smatraju tumor supresorima, dok je YAP/TAZ identificiran kao onkogen. Mutacija i promjena u ekspresiji ključnih komponenti Hippo signalnog puta



(MST1/2, LATS1/2, YAP i TAZ) promovira migraciju, invaziju, i malignost tumorskih stanica. Aktivacija Hippo signalnog puta dovodi do fosforilacije MST1/2 i aktivacije LATS1/2, što rezultira fosforilacijom YAP/TAZ te njihovom inhibicijom tako da se veže za 14-3-3 proteine u citoplazmi<sup>23</sup>. Fosfataze, kao što je protein fosfataza-1, mogu defosforilirati YAP, i tako povećati akumulaciju YAP transkripcijskog faktora u jezgri, kao i njegovu transkripcijsku aktivnost. Geni koji promoviraju rast (npr. Myc, CycE, E2F1), kao i inhibitori apoptoze (Diap1, BIRC3) mogu dovesti do aktivacije YAP transkripcijskog čimbenika, što je povezano sa rastom tkiva. Također, mnogi putevi na koje djeluje YAP su također povezani sa rastom tkiva, kao Wnt, Notch, EGFR, TGF $\beta$ , te JAK-STAT signalni put<sup>23</sup>. Poznato je i da prekomjerna ekspresija YAP može antagonizirati kontaktnu inhibiciju<sup>24</sup>. Kontaktna inhibicija je veoma često izgubljena u tumorskim stanicama, što im omogućuje da proliferiraju na nekontroliran način<sup>25</sup>.

MYC proto-onkogen je povezan s patogeneom mnogih vrsta tumora, te se smatra jednim od glavnih molekularnih svojstava inicijacije i održavanja karcinogeneze. MYC aktivacija dovodi do karcinogeneze tako što stopira apoptozu, senescenciju, te diferencijaciju. Iako sama MYC aktivacija u većini slučajeva nije dovoljna za nastanak tumora, kratka ili djelomična supresija MYC može značajno smanjiti tumorski rast<sup>26</sup>.

Jedna od najbolje okarakteriziranih onkogenih funkcija Notch gena u malignim tumorima je povećanje genske ekspresije koja podržava povećan stanični rast. Notch je povezan i s MYC proto-onkogenom, te Notch može dovesti do povećane ekspresije MYC gena, globalnog regulatora rasta. Osim što utječe na MYC, Notch signaliziranje je u interakciji i s brojnim drugim putevima koji mogu utjecati na rast tumora, kao što je PI3K-Akt signalni put<sup>27</sup>.

Nrf2 može spriječiti karcinogenezu povećavajući antioksidacijske i detoksikacijske sposobnosti, ali njegova aktivacija u tumorima može štititi tumorske stanice od oksidativnog stresa. Nrf2 aktivacija može spriječiti nastanak tumora, a Nrf2 inhibicija bi mogla dovesti do smrti tumorskih stanica ako je maligna transformacija već prisutna, te se zbog toga Nrf2 može smatrati i tumor supresorom i onkogenom<sup>28</sup>.

PI3K je također jedan od najčešće mutiranih gena u velikoj većini solidnih tumora, te njegova inhibicija može onemogućiti nastanak metastazi. Naime, PI3K ima važnu ulogu u staničnoj polarizaciji i epitelno-mezenhimskoj tranziciji, kao i u staničnoj migraciji aktivirajući

Rac1 i Cdc42. PI3K je veoma važna meta za liječenje tumora, te su se razvili mnogi lijekovi za liječenje malignih tumora koji djeluju kao PI3K inhibitori <sup>29</sup>.

Također su razvijeni mnogi inhibitori RAS-MAPK signalnog puta, koji je često promijenjen u mnogim tumorima. Aktivirajuće mutacije u RAS obitelji gena (N-RAS, K-RAS, H-RAS) nisu rijetke i čine 30 % svih malignih tumora. Također, RAS je jedan od ključnih efektora EGFR koji je mutacijski aktiviran i/ili prekomjerno eksprimiran u velikoj većini malignih tumora <sup>30</sup>. Wnt signalni put povezan je s EGFR, Hippo, NF-kappaB, Notch, te PI3K/Akt signalni putem, te ima važnu ulogu u kancerogenezi i odgovoru na terapiju <sup>31</sup>.

Članovi TGFβ obitelji kontroliraju brojne stanične funkcije uključujući proliferaciju, apoptozu, diferencijaciju, epitelno-mezenhimsku tranziciju, i migraciju. Osim s karcinogenezom, TGFβ je povezan i s nastankom autoimunih i vaskularnih bolesti. U ranim stadijima karcinogeneze, TGFβ ima tumor supresivnu ulogu tako što inhibira nastavak staničnog ciklusa i potiče apoptozu. U kasnijim stadijima, TGFβ ima suprotne učinke, te promovira invaziju tumorskih stanica i metastaziranje. Štoviše, povećana razina TGFβ je povezana sa lošim kliničkim ishodom <sup>32</sup>.

P53 protein je transkripcijski faktor koji je također poznat kao i „čuvar genoma“ zbog svoje važne uloge u očuvanju genoma. P53 je mutiran u gotovo polovici malignih tumora, a njegova je uloga da kada se DNA oštećenje dogodi, da zaustavi stanični ciklus. Kada je p53 mutiran, stanični ciklus se nastavlja i oštećena DNA se replicira, što rezultira u nekontroliranoj staničnoj proliferaciji, te nastanku malignih tumora <sup>33</sup>.

## 2.2. Metastaziranje

Proces migriranja metastatskih stanica s mjesta nastanka u ostale dijelove tijela se naziva metastaziranje. Sposobnost koloniziranja sekundarnih mjesta tj. metastaziranje je svojstvo tumorskih stanica koje uzrokuje najveću smrtnost. Veoma često se maligni tumor smatra neizlječivim ako se otkrije u kasnoj fazi kada je metastazirao <sup>34-36</sup>. Proces metastaziranja se može podijeliti u nekoliko koraka: invazija, intravazacija, transport, ekstravazacija i metastatska kolonizacija. Epitelno-mezenhimska tranzicija je odgovorna za sposobnost invazivnosti tumorskih stanica u tumorima koji su epitelnog podrijetla. Nemaju svi organi istu sposobnost da prime metastatske stanice, te su neki organi češća mjesta metastazi. Klinička

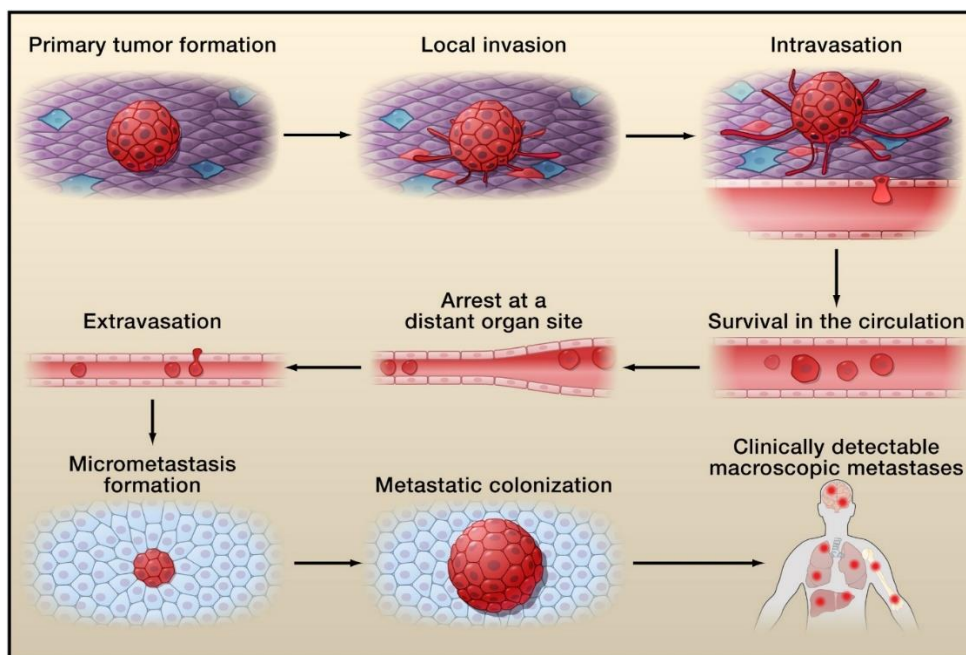
promatranja pokazuju da većina malignih tumora metastazira u specifične organe, te taj proces ne-slučajnog metastaziranja tumorskih stanica nazivamo „organotropizam“<sup>3</sup>. Prva osoba koja je primijetila ne-slučajnu raspodjelu metastaza je bio Stephen Paget 1889. godine, koji je predložio teoriju o klici i tlu (engl. *seed and soil*), po kojoj je potrebna određena mikroklima da bi došlo do uspješne metastatske kolonizacije. Paget je smatrao da ako najprikladnije "sjeme" (stanica tumora) padne na "neplodno tlo" (organ), neće doći do "klijanja" (metastaziranja). Dakle, prema Pagetu metastaze nisu slučajni događaji, već određene stanice tumora („sjeme“) rastu preferencijalno u okolini specifičnih organa („tlo“) <sup>6</sup>. Traženje objašnjenja zbog kojeg su određeni organi češća mjesta metastazi traje od kada je Paget predložio teoriju o klici i tlu, te bi razumijevanje organotropizma tumorskih stanica moglo dovesti do bolje terapije malignih tumora. Osim Pageta, i Ewing je u prvoj polovici 20. stoljeća predložio objašnjenje za metastatski organotropizam, te je izjavio da obrazac anatomske raspodjele krvotoka tj. krvožilni sustav ima veliku ulogu u metastatskom organotropizmu (mehanička teorija metastaziranja). Prema Ewingu, tumorske stanice slijede cirkulatorni put drenaže od primarnog tumora, te se nespecifično nastanu u prvom organu s kojim se susretnu <sup>37</sup>.

Mnogi tumori pokazuju metastatski organotropizam, te tako adenokarcinom debelog crijeva metastazira često u jetru i pluća, ali rijetko u kosti, kožu, mozak i bubrege. Naprotiv, karcinom dojke puno češće metastazira u većinu navedenih organa. Adenokarcinom prostate metastazira često u kosti, a nešto rjeđe u jetru i pluća. Dugo je postojala rasprava u znanstvenim krugovima je li obrazac metastaziranja slučajan proces koji je determiniran obrascem krvnog i limfnog toka, ili pak aktivna interakcija između tumorskih stanica i budućeg metastatskog organa ima ulogu u tome. Pagetova teorija i mehaničko-anatomska teorija ne moraju se međusobno isključivati, te stupanj važnosti navedenih teorija najvjerojatnije je tumor-specifičan te ovisi o vrsti tumora <sup>38</sup>.

### **2.2.1. Epitelno-mezenhimska tranzicija**

Proces metastaziranja se smatra neučinkovitim jer veoma mali broj cirkulirajućih tumorskih stanica dospije do ciljnih organa. Proces metastaziranja malignih solidnih tumora se može podijeliti u pet koraka: (1) invazija bazalne membrane od strane tumorske stanice i stanična migracija; (2) intravazacija u okolni krvožilni ili limfatički sustav; (3) preživljenje u

cirkulaciji; (4) ekstravazacija iz krvožilnog sustava u organ koji će biti mjesto metastaze; i na kraju, (5) kolonizacija na mjestu sekundarnog tumora (**Slika 1**). Sa svakim korakom metastaziranja broj tumorskih stanica se drastično smanjuje <sup>39</sup>. Za prvi korak metastaziranja, tj. za invaziju bazalne membrane potrebno je da tumorske stanice prođu kroz proces epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT). EMT je trans-diferencijacijski proces u kojem transformirane epitelne stanice razviju sposobnost invazije i diseminacije <sup>40</sup>. EMT omogućava polariziranoj epitelnoj stanici, koja s pomoću bazalne površine je u interakciji s bazalnom membranom, da stekne mezenhimski fenotip koji podrazumijeva povećanu sposobnost migracije, invazivnost, rezistenciju na apoptozu, i povećanu produkciju komponenata izvanstaničnog matriksa <sup>41, 42</sup>. EMT se može klasificirati u 3 tipa. Tip 1 EMT obuhvaća EMT tijekom implantacije, embriogeneze i razvitka organa, tip 2 obuhvaća EMT tijekom regeneracije tkiva i fibroze organa, dok tip 3 je povezan s razvitkom malignih tumora i metastazama <sup>42</sup>. Tumorske stanice tijekom EMT imaju morfološke i molekularne promjene, te imaju smanjenu ekspresiju epitelnih biljega (E-kadherin, ZO-1, i okludin) i povećanu ekspresiju mezenhimalnih biljega (N-kadherin, vimentin, fibronektin) <sup>43</sup>. EMT karakterizira smanjenje epitelnog genskog ekspresijskog profila, te aktivacija gena koji definiraju mezenhimalni fenotip <sup>44</sup>. Promjene u genskoj ekspresiji tijekom EMT rezultiraju u gubitku funkcije epitelne barijere <sup>45</sup>. Također, EMT dovodi do povećanog motiliteta, te sposobnosti da se razaraju proteini izvanstaničnog matriksa što omogućava invazivno ponašanje <sup>44</sup>. Aktivacija transkripcijskih čimbenika SNAIL, TWIST i ZEB se događa rano tijekom EMT, te zbog toga navedeni transkripcijski čimbenici imaju važnu ulogu u razvoju, nastanku fibroze i malignih tumora <sup>44, 45</sup>. I obrnuti proces od EMT, tj. mezenhimsko-epitelna tranzicija (MET) ima važnu ulogu u procesu metastaziranja, te inhibiranje MET procesa na mjestu metastaze bi moglo dovesti do inhibicije formiranja metastatskog tumora. EMT igra važnu ulogu u početnoj transformaciji iz benignih u invazivne tumore, dok MET ima važnu ulogu u kasnijim stadijima metastaziranja budući da diseminirane mezenhimske tumorske stanice na mjestu metastaziranja prelaze u epitelne tumorske stanice <sup>17</sup>. Naime, EMT bi mogla biti potrebna za iniciranje metastatskog procesa, dok obrnuti proces, MET je potreban za progresiju metastaza <sup>19</sup>.



**Slika 1. Proces metastaziranja malignih solidnih tumora**

Proces metastaziranja malignih solidnih tumora počinje invazijom bazalne membrane od strane tumorske stanice, zatim slijedi intravazacija u okolni krvožilni ili limfatički sustav i preživljenje u cirkulaciji, ekstravazacija iz krvožilnog sustava u organ koji će biti mjesto metastaze; te na kraju kolonizacija na mjestu sekundarnog tumora. Slika je preuzeta od Valastyan i sur (2011) <sup>46</sup>.

### 2.2.2. Intravazacija, preživljenje u cirkulaciji i ekstravazacija tumorskih stanica

Intravazacija je proces koji se odvija u normalnim uvjetima tijekom razvoja, te je potrebna za normalno funkcioniranje imunskog sustava. Međutim, osim stanica imunskog sustava i tumorske stanice mogu invadirati u normalna tkiva najčešće preko limfatičnih ili krvnih žila. Nakon što dođu do krvne žile, tumorske stanice moraju prijeći endotelnu barijeru i ući u cirkulaciju. Nakon što uđu u cirkulaciju, mnoge tumorske stanice budu napadnute od strane stanica imunskog sustava, dok neke zastanu u udaljenim kapilarama, gdje započnu proces ekstravazacije i iniciranja udaljenog tumora. Smatra se da je metastatski proces veoma neučinkovit te da samo 0.01 % cirkulirajućih tumorskih stanica dovodi do formiranja metastatskih tumora <sup>47</sup>. Osim što mnoge tumorske stanice u cirkulaciji budu napadnute od strane stanica imunskog sustava, u jednom dijelu cirkulirajućih tumorskih stanica zbog

gubitka adhezije za izvanstanični matriks može doći do programirane stanične smrti. Naime, integrinom-posredovana adhezija za izvanstanični matriks je potrebna za preživljenje stanica<sup>48</sup>. Također, i mehanički stres unutar cirkulacije može dovesti do smrti tumorskih stanica. Tumorske stanice koriste mnoge načine da bi preživjele u cirkulaciji, te se njihov metastatski potencijal svodi na to da brzo ekstravaziraju u okolno tkivo<sup>49</sup>. Tumorske stanice nakon što napuste cirkulaciju, počnu proces mezenhimsko-epitelne transformacije, te se nazivaju diseminirane tumorske stanice<sup>50</sup>.

### 2.2.3. Metastatska kolonizacija

Klinička opažanja sugeriraju da je metastatska kolonizacija veoma neučinkovit proces te da velika većina tumorskih stanica umre, dok samo mali dio preživi i formira makrometastaze<sup>51</sup>. Dakle, činjenica da tumorske stanice napuste krvnu žilu i nastane se u novoj okolini, ne znači da će nužno preživjeti i umnožiti se na udaljenoj lokaciji. Međutim, preživljenje i proliferacija diseminiranih tumorskih stanica su nužni za nastanak sekundarnih tumora na novoj lokaciji. Mnoge diseminirane tumorske stanice nakon ekstravazacije odu u staničnu latenciju, koja može trajati od nekoliko tjedana pa sve do nekoliko desetljeća. Trajanje metastatske latencije je varijabilno između različitih tipova malignih tumora, te je za najagresivnije tumore veoma kratko što uzrokuje visoku stopu relapsa i mortaliteta nakon dijagnoze. Primjer malignog tumora s kratkom metastatskom latencijom je karcinom pluća, za razliku od karcinoma prostate koji ima dugu metastatsku latenciju<sup>50</sup>. Udaljene metastatske lezije se primarno otkrivaju u selektiranim organima (jetra, kosti, mozak, pluća), dok se rijetko otkrivaju u ostalim organima (bubreg, srce, želudac)<sup>8</sup>. Čimbenici koji utječu na predispoziciju specifičnih organa na metastatsku diseminaciju su uglavnom nepoznati, te razumijevanje metastatskog organotropizma bi moglo dovesti do uspješnijeg liječenja malignih tumora<sup>18</sup>. Metastatska kolonizacija nije samo rast odbjeglih tumorskih stanica iz primarnog tumora, već je to kompleksna interakcija između diseminiranih tumorskih stanica i okoline tkiva preko cijelog organizma<sup>52</sup>.

### 2.2.4 Formiranje pre-metastatske niše

Hoće li se dogoditi metastatska kolonizacija nakon ekstravazacije cirkulatorne tumorske stanice u udaljeni organ ovisi o okolini u kojoj se nalazi cirkulatorna tumorska stanica. Međutim, primarni tumori mogu „pripremiti“ okolinu udaljenih organa za metastatsko koloniziranje mnogo prije tumorske stanice stignu u udaljeni organ. Pokazano je da organi koji su buduća mjesta metastazi nisu pasivni primaoci cirkulirajućih tumorskih stanica, već su selektivno modificirani od strane primarnog tumora prije nego što je došlo do metastaziranja. Maligni tumori induciraju formiranje okoline u udaljenim organima koja omogućuje preživljenje i rast tumorskih stanica prije nego što tumorske stanice stignu na ta mjesta. Ova unaprijed određena mjesta metastaziranja su nazvana pre-metastatske niše, te se smatra da je remodeliranje izvanstaničnog matriksa jedan od ključnih procesa potrebnih za formiranje pre-metastatske niše<sup>53</sup>. Molekularne komponente koje luči primarni tumor, stanice koje nastaju iz koštane srži (engl. *bone marrow derived cells*, BMDC) te lokalna stroma organa koje će biti buduće mjesto metastaze su tri glavna čimbenika ključna za formiranje pre-metastatske niše. Liu i suradnici (2016) su predložili da postoji šest karakteristika pre-metastatske niše koji omogućuju promoviranje metastatske kolonizacije. Karakteristike pre-metastatske niše koje odlučuju hoće li cirkulatorne tumorske stanice preživjeti u udaljenom organu su: upala, angiogeneza i krvožilna permeabilnost, limfangiogeneza, imunosupresija, organotropizam te reprogramiranje<sup>54</sup>. Struktura izvanstaničnog matriksa od organa je manje pogodna da podržava pričvršćivanje tumorske stanice, njen metabolizam i migraciju te je zbog toga remodeliranje izvanstaničnog matriksa ključan proces u formiranju pre-metastatske niše<sup>55</sup>. Međutim, neki organi, kao što su pluća već imaju okolinu pogodnu za nastanak metastaza<sup>56,57</sup>.

Formiranje pre-metastatske niše je jednim dijelom olakšano zbog prisutnosti suprimiranoga imunskog sustava. Primarni tumori novače mijeloidne stanice, od kojih kasnije nastaju imunosne stanice. Mijeloidne stanice onemogućavaju prepoznavanje tumorskih stanica od strane stanica imunskog sustava, te tako omogućavaju metastaziranje. Smatra se da mijeloidne stanice čine veliki i ključni dio pre-metastatske niše, budući da one štite diseminirane tumorske stanice od napada imunosnih stanica, te tako omogućuju promoviranje metastaze<sup>50</sup>.

### 2.2.5 Organ-specifične metastaze

Najčešća preferencijalna mjesta metastazi su jetra, pluća, kosti i mozak. Jetra je najčešće mjesto metastaze za karcinom debelog crijeva, te su metastaze u jetru češće nego primarni tumori jetre. Jetra je važan imunski organ, te ako je sposobnost prepoznavanja i stvaranja imunskog odgovora protiv tumorskih antigena oslabljena, može doći do povećanog preživljenja tumorskih stanica i povećanog rasta metastaza. Naime, tumor supresivni okoliš igra veliku ulogu u promoviranju jetrenih metastaza, te važnu ulogu imaju u njemu tumoru pridruženi makrofazi i regulatorne stanice T. Regulatorne stanice T inhibiraju protu-tumorski imunski odgovor, dok tumoru pridruženi makrofazi održavaju immunosupresivni okoliš izražavajući PDL1, PDL2, i ostale inhibitorne receptore, te aktiviraju regulatorne stanice T lučeći TGF $\beta$  i IL-10<sup>58</sup>.

Tumorske stanice koriste mnoge mehanizme da izbjegnu imunski sustav. Jedan od mehanizama je i smanjenje ekspresije HLA klase I, čija je uloga u prepoznavanju imunskih stanica i novačenju citotoksičnih stanica T i stanica NK. Naime, smanjena ekspresija HLA klase I je povezana s povećanom invazivnosti i metastatskim lezijama. Osim smanjenja ekspresije HLA klase I, tumori mogu dovesti do povećane invazivnosti tako što direktno smanje aktivnost imunskog sustava preko povećane produkcije immunosupresivnih citokina<sup>59</sup>.

Karcinom dojke, melanom, maligni tumori bubrega preferencijalno metastaziraju u pluća. Tumorske stanice imaju pet puta veći dijametar nego plućne kapilare, što dovodi do toga da tumorske stanice zapnu u plućima, te tumorske stanice počnu ekstravazaciju u pluća. Anatomija pluća tako je jedan od razloga zašto su pluća drugo najčešće mjesto metastaza<sup>60</sup>. Kostu su treće najčešće mjesto metastazi, nakon pluća i jetre. Karcinomi dojke i prostate često metastaziraju u kosti. Koštane metastaze su često osteolitične (značajna razgradnja kostiju), dok ponekad mogu biti sklerotične (povećana formacija kostiju) ili miješane<sup>18</sup>. Kada se karcinomi prošire u kosti, postoji veći rizik od hiperkalcijemije, koja je najčešća metabolička komplikacija. Koštane metastaze su veliki uzrok morbiditeta, te ih karakterizira izrazita bol, otežano pokretanje, te patološke frakture<sup>61</sup>. Kostu su imuno-privilegirano mjesto sa malim udjelom citotoksičnih stanica T i stanica NK, te velikim udjelom regulatornih stanica T (Treg) i supresorskih stanica mijeloidnog podrijetla MDSC (engl. *myeloid-derived suppressor cells*). Budući da su kosti imuno-privilegirano mjesto, ono može biti povoljno za smještaj tumorskih stanica i bijeg od imunskog sustava, što može objasniti zašto su kosti često mjesto u koje dolazi velik broj tumorskih stanica<sup>62</sup>.



Unatoč prirodnoj moždanoj barijeri, metastaze u mozak su relativno česte, te su čak deset puta češće od primarnih tumora. Karcinomi pluća i dojke, te melanom najčešće metastaziraju u mozak. Intra i inter-tumorska heterogenost je trenutno veliki problem u otkrivanju metastazi u mozak, jer pojedine biopsije ne moraju biti nužno reprezentativne metastatske lezije ako je u posrijedi drugačiji mutacijski profil <sup>63</sup>.

## **2.3. Molekularni mehanizam nastanka organ-specifičnih metastazi**

### **2.3.1. Egzosomi**

Mnoga istraživanja su pokazala da egzosomi igraju važnu ulogu u procesu metastaziranja, tako što formiraju pre-metastatsku nišu, utječu na tumorske stanice i okolinu tkiva, te određuju preferencijalna mjesta metastazi. Egzosomi su podvrsta izvanstaničnih vezikula koji su endosomnog podrijetla budući da nastaju fuzijom citoplazmatskih multivezikularnih tjelešaca s plazma membranom. Egzosomi su važan dio stanično-stanične komunikacije, koja ima važnu ulogu u formiranju tumora, te procesu metastaziranja <sup>64</sup>. Invazija tumorskih stanica je jedan od najranijih koraka metastatskog procesa. Tumorski egzosomi olakšavaju proces invazije tako što remodeliraju izvanstanični matriks, te tako povećavaju migratorni kapacitet tumorskih stanica. Tumorski egzosomi se vežu na komponente izvanstaničnog matriksa preko adhezijskih receptora i otpuštaju proteaze koje mogu razarati komponente izvanstaničnog matriksa kolagen, laminin i fibronektin <sup>65</sup>.

Tumorski egzosomi mogu dovesti i do povećanja angiogeneze, procesa koji omogućava tumorskim stanicama dobivanje potrebnih nutrijenata i kisika, te osigurava put kojim tumorske stanice mogu otići u cirkulaciju. Angiogeneza je jedan od ključnih čimbenika potrebnih za diseminaciju tumorskih stanica i formiranje metastaza. Angiogeneza je proces u kojem endotelne stanice iz postojećih krvnih žila migriraju i proliferiraju u nove krvne žile <sup>66, 67</sup>. Renalne karcinomske stanice otpuštaju vezikule s proangiogenetskom mRNA, što dovodi do promocije angiogeneze i plućnih metastaza <sup>68</sup>. Tumorski egzosomi utječu i na procese intravazacije i ekstravazacije tumorskih stanica. U miševa, egzosomi iz metastatskih staničnih linija karcinoma dojke prenose miR-181c u endotelne stanice mozga, što dovodi do smanjenja ekspresije aktinskog regulatora PDPK1 (engl. *3-phosphoinositide dependent protein kinase 1*).

Kao posljedica ove interakcije, stanično-stanična kontaktna komunikacija je kompromitirana, i krvno-moždana barijera je prekinuta, što dovodi do povećanog metastaziranja u mozak <sup>69</sup>. Egzosomi mogu utjecati i na metastaziranje u jetru. Naime, egzosomi od gušteračinog duktalnog adenokarcinoma nose makrofagni migratorni inhibitorni čimbenik koji onda dolazi u kontakt s Kupfferovim stanicama u jetri te dovodi do povećane TGF $\beta$  sekrecije. TGF $\beta$  dovodi do povećane ekspresije fibronektina od strane jetrenih stanica, što dovodi do novačenja BMDC stanica, te stvara povoljnu mikro-okolinu za jetrene metastaze <sup>70</sup>. I egzosomski integrini imaju važnu ulogu u preferencijalnom metastaziranju i kolonizaciji udaljenih mjesta od strane tumorskih stanica. Tumorski egzosomi koji sadrže integrine mogu odrediti mjesta metastaziranja primarnih tumorskih stanica: egzosomalni ITG $\alpha_6\beta_4$  i ITG $\alpha_6\beta_1$  su povezani s plućnim metastazama, dok ITG $\alpha_v\beta_5$  je povezan s jetrenim metastazama, a ITG $\beta_3$  s moždanim metastazama <sup>71</sup>.

### 2.3.2. Matriksne metaloproteinaze i remodeliranje izvanstaničnog matriksa

Matriksne metaloproteinaze su enzimi koji razaraju izvanstanični matriks i omogućuju invaziju tumorskih stanica, dok tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza mogu inhibirati invaziju tumorskih stanica. U ranoj fazi nastanka malignog tumora dolazi do poremećaja epitelnostromalne interakcije. Tumorske stanice sintetiziraju i luče matriksne metaloproteinaze MMP-1, MMP-2 i MMP-9, koje razaraju izvanstanični matriks. Također, i raku pridruženi fibroblasti sudjeluju u procesu remodeliranja izvanstaničnog matriksa, tako što proizvode kolagen i fibronektin, te matriksne metaloproteinaze. Matriksne metaloproteinaze mogu dovesti do oslobađanja čimbenika kao što je VEGF (engl. *Vascular endothelial growth factor*) iz izvanstaničnog matriksa, te tako dovode do kontrakcije izvanstaničnog matriksa i formiranja puta kojim tumorske stanice zajedno s rakom pridruženim fibroblastima migriraju. Matriksne metaloproteinaze imaju tako važnu ulogu i u procesu angiogeneze jer mogu dovesti do otpuštanja iz izvanstaničnog matriksa VEGF-a, najpotentnijeg pro-angiogenetskog čimbenika <sup>72</sup>. Osim VEGF, neke matriksne metaloproteinaze mogu aktivirati i druge angiogenetske čimbenike, te tako MMP-9 može aktivirati bFGF-2 <sup>73</sup>. Matriksne metaloproteinaze mogu direktno utjecati i na proces epitelnostromalne tranzicije. MMP-3 i MMP-7 mogu direktno rezati domen E-kadherina <sup>74</sup>, dok MMP-9 može inducirati ekspresiju vimentina, fibronektina i N-kadherina <sup>75</sup>.

Jedan od najvećih izazova s kojim se susreću tumorske stanice da bi razvile metastatsku koloniju je izbjegavanje imunosnog odgovora. Naime, i matriksne metaloproteinaze sudjeluju u mehanizmu koje su tumorske stanice razvile da bi izbjegle imunosni odgovor. Tumorske stanice koje luče MMP-9, i u manjoj mjeri one koje luče MMP-2 su sposobne izrezati interleukin 2 receptor  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$ ) s površine T-limfocita. IL-2R $\alpha$  receptor je potreban za proliferaciju stanica T<sup>76</sup>. Osim toga, i MMP-2 i MMP-9 mogu aktivirati TGF $\beta$ , čija aktivacija blokira proliferaciju i diferencijaciju stanica T u citotoksične i pomoćne stanice T, te inhibira stimulirajuće učinke stanica T na antigen predložnim stanicama<sup>77</sup>.

Tumorske stanice nakon što dođu u novo tkivo suočene su s novom okolinom u odnosu na primarni tumor. U ovim novim uvjetima, tumorske stanice mogu biti uništene od strane imunosnog sustava, te mogu izvršiti apoptozu (programiranu staničnu smrt), ostati u mirujućem (dormantnom) stanju ili pak početi proliferirati<sup>78</sup>. Stanice primarnog tumora luče tenascin C i lizil oksidazu, te tako organ-specifične stanice stvaraju pre-metastatsku nišu koja podupire inicijalni rast i proliferaciju tumorskih stanica<sup>46</sup>. Lizil oksidaza mijenja čvrstoću tkiva, i promovira dolazak stanica BMDC koji dovode do dolaska MMP-2 koja razgrađuje kolagen tip IV. Kolagen tipa IV djeluje kao kemoatraktant za metastatske i stanice BMDC<sup>79</sup>. Zanimljivo je da primarni tumori otpuštaju i egzosome s Hsp90, koji inducira ekspresiju matriksnih metaloproteinaza u pre-metastatskoj niši. Osim toga, i egzosomi mogu sadržavati i aktivni i latentni oblik matriksnih metaloproteinaza, te su u egzosomima od stanicama raka dojke i jajnika pronađene matriksne metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9<sup>79</sup>. Najvjerojatnija uloga egzosoma s matriksnim metaloproteinazama je da sudjeluju u remodeliraju pre-metastatske niše. Matriksne metaloproteinaze imaju važnu ulogu u procesu metastaziranja, te bolje razumijevanje njihove uloge u različitim stadijima tumora bi moglo dovesti do učinkovitije terapije malignih tumora<sup>72</sup>.

### 2.3.3. Imunosni sustav

Rudolph Virchow je u 19. stoljeću prvi primijetio povezanost između tumorskih i imunosnih stanica. Nakon što je primijetio da leukociti infiltriraju tumorska tkiva, postavio je hipotezu da tumori nastaju iz dijelova tkiva koji su izloženi kroničnoj upali<sup>80</sup>. Na kraju 19. stoljeća prva osoba koja je predložila da imunosni sustav ima protu-tumorski učinak bio je William Coley, koji je primijetio da se pacijent sa sarkomom kojeg nije bilo moguće operirati

potpuno izliječio nakon što je imao infekciju. Inspiriran navedenim slučajem, Coley je počeo liječiti pacijente koji su imali tumor s umrtvljenim bakterijama, poznatim kasnije kao Coleyev toksin. Coleyev toksin je bio prvi imunoterapijski pristup liječenja malignih tumora<sup>81</sup>. Ova rana opažanja pokazuju kako u odnosu malignih tumora, imunosni sustav ima dvojnu ulogu, te da sudbina tumora ovisi o ravnoteži između protu-tumorske imunosti i tumor-promovirajuće upale<sup>82</sup>.

Tumorske stanice mogu otpuštati antigene, koji onda dolaze do antigen-predočnih stanica, kao što su dendritične stanice. Nakon što su dendritične stanice aktivirane s lokalno imuno-stimulirajućim signalima, one migriraju u obližnje limfne čvorove, te predočavaju tumorske antigene stanicama T s pomoću molekula MHC-I ili MHC-II. Nakon što se stanice T aktiviraju, one otputuju u tumorsko tkivo te ubiju tumorske stanice koje sadrže navedene antigene<sup>82</sup>.

Jedan od mehanizama kojim tumorske stanice izbjegavaju imunosni odgovor je tako što uspostave imunosupresivnu okolinu koja inhibira razvoj i učinkovitost lokalnog i sustavnog protu-tumorskog odgovora<sup>82</sup>. Tumorske mijeloidne stanice, kao što su tumoru pridruženi makrofazi i neutrofili, mogu inhibirati protu-tumorski odgovor tako što proizvode imunosupresivne citokine, eksprimiranjem molekula koje inhibiraju stanice T, konzumiranjem aminokiselina koje su ključne za aktivnost stanica T, te proizvodnjom slobodnih radikala<sup>83</sup>.

Imunosne stanice moduliraju početne stadije metastaziranja tako što kontroliraju remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Tumoru pridruženi makrofazi i neutrofili, kao i mastociti, mogu direktno lučiti mnoge proteaze koje remodeliraju izvanstanični matriks, dok regulatorne stanice B mogu potaknuti tumorske stanice da luče matriksne metaloproteinaze<sup>82</sup>.

Imunosne stanice mogu regulirati i angiogenezu i limfangiogenezu<sup>84, 85</sup>. Jedan od promotora angiogeneze u tumorskoj mikro-okolini je hipoksija, koja je uzrokovana nekontroliranom proliferacijom i nedovoljnom opskrbom kisikom<sup>86</sup>. Hipoksija može utjecati i na novačenje i funkciju tumor-infiltrirajućih stanica, te promovirati njihove pro-angiogenetske funkcije<sup>87</sup>. Naime, tumoru pridruženi makrofazi, regulatorne stanice T i mastociti reagiraju na hipoksiju tako što proizvode VEGF, koji stimulira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica<sup>88</sup>. Osim toga, tumoru pridruženi makrofazi i neutrofili mogu proizvoditi matriksne metaloproteinaze koje remodeliraju izvanstanični matriks, te tako dovesti do oslobođenja pro-angiogenetskih čimbenika koji su zarobljeni u izvanstaničnom matriksu<sup>89</sup>.

90.

### 2.3.4. Kemokini i kemokinski receptori

Kemokini pripadaju grupi proteina s malom molekularnom težinom koji se vežu na kemokinske receptore. Kemokini imaju važnu ulogu u staničnoj migraciji, razvoju, upali i mnogim patološkim uvjetima. Približno 20 kemokinskih receptora, te 50 kemokina je dosad otkriveno u ljudi. Kemokini se mogu podijeliti na upalne i homeostatske kemokine. Homeostatski kemokini su konstantno eksprimirani, za razliku od upalnih koji se aktiviraju samo u upalnim uvjetima. Kemokini imaju važnu ulogu u rastu tumora, senescenciji, angiogenezi, epitelno-mezenhimskoj tranziciji, metastazama i izbjegavanju imunskog odgovora od strane tumorskih stanica. Do promjene u ekspresiji kemokina može doći zbog inaktivacije tumor supresora, i aktivacije onkogeni koji mogu regulirati aktivnost kemokina <sup>91</sup>. Osim toga, i transkripcijski čimbenici kao NF- $\kappa$ B imaju važnu ulogu u ekspresiji kemokina. Transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B je konstitutivno aktivan u mnogim tumorima, što dovodi do konstitutivne ekspresije kemokina reguliranih od njega i tako se promiče tumorogeneza <sup>92</sup>.

EMT je proces u kojem se epitelne stanice transformiraju u mezenhimske te tako steknu sposobnost stanične migracije i invazije okolnog tkiva. TGF $\beta$  može poticati epitelno-mezenhimsku tranziciju, te dovesti do povećanja ekspresije kemokina CXCL8. Kemokin CXCL8 se veže na kemokinski receptor CXCR1, koji je povećano eksprimiran tijekom EMT. Povećana ekspresija kemokina CXCL8 i njegovog receptora CXCR1 tijekom EMT pokazuje da kemokini i njihovi receptori mogu igrati važnu ulogu tijekom EMT. TGF $\beta$  povećava i ekspresiju CXCR4 te stanice s mezenhimskim fenotipom imaju veću ekspresiju CXCR4. Tretiranje transformiranih mezenhimskih stanica s CXCR4 antagonistom dovodi do smanjenja invazivnosti mezenhimskih stanica <sup>91</sup>.

Osim što citokini imaju važnu ulogu u migraciji tumorskih stanica, citokini su važni i u iniciranju i reguliranju metastaziranja. U normalnim fiziološkim uvjetima, homeostatski citokini reguliraju migraciju leukocita tako što novače specifične populacije limfoidnih stanica u određena tkiva. Ligand CXCL12 koji se nalazi u koštanoj srži može novačiti hematopoetične matične stanice koje eksprimiraju kemokinski receptor CXCR4. Iako kemokini u normalnim uvjetima reguliraju migraciju imunskih stanica, i druge stanice mogu koristiti ovaj put migracije ako eksprimiraju određeni kemokinski receptor. Nedavna istraživanja pokazuju da metastatske tumorske stanice koriste kemokine i njihove receptore da bi migrirale u udaljene organe <sup>93</sup>.

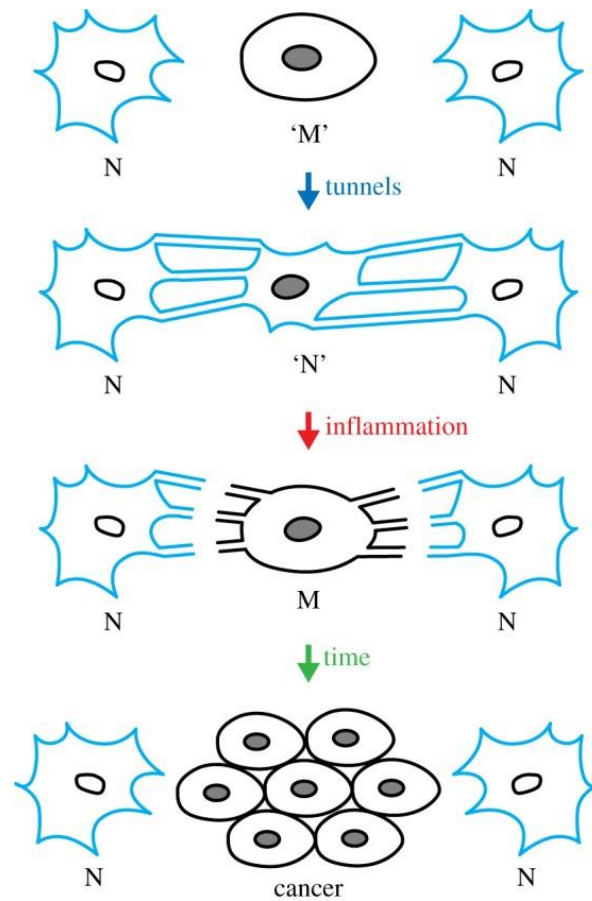
Upravo je CXCR4/CXCL12 interakcija jedna od najvažnijih interakcija između kemokina i kemokinskih receptora za nastanak metastazi. Pokazano je da je kemokinski receptor CXCR4 selektivno izražen u metastatskim stanicama tumora dojke, te da navedene stanice zbog toga migriraju do organa koji imaju visoku ekspresiju kemokinskog liganda CXCL12. Naime, organi s najvećom ekspresijom liganda CXCL12 su pluća, mozak, limfni čvorovi, jetra i koštana srž, te su navedeni organi najčešća mjesta metastazi za tumor dojke. Također, inhibicija *in vivo* interakcije između CXCR4 i CXCL12 značajno smanjuje metastaziranje u navedene organe <sup>94</sup>.

## 2.4. Stanična parabioza

Stanična parabioza je tkivna fenotipska supresija stanične disfunkcije međustaničnim molekularnim prometom zadržavajući inicirane bolesti i stanja povezana sa starenjem u dugoj latenciji. Prekid stanične parabioze (npr. kroničnom upalom) potiče nastanak započetih patologija. Naime, mnoge kronične bolesti povezane sa starenjem imaju dugi latentni period. Navedeni latentni period bi se moglo objasniti fenotipskom supresijom staničnih disfunkcija stanično-staničnom komunikacijom između susjednih stanica. Jedan od mogućih razloga zašto kronična upalna stanja mogu dovesti do mnogih kroničnih bolesti, je upravo gubitak stanične parabioze budući da se u upalnim stanjima povećano luče proteaze <sup>9</sup>.

Naime, već je pokazano da se maligni rast individualnih tumorskih stanica može suprimirati u dvo-dimenzionalnoj staničnoj kulturi nakon kontakta s normalnim fibroblastima, te je se RhoA signalni put pokazao ključnim za supresiju malignog fenotipa od strane normalnih fibroblasta <sup>95</sup>. RhoA je jedan od ključnih regulatora specifičnog i prirodnog imunskog odgovora, te je povezan sa svim stadijima progresije malignih tumora <sup>96,97</sup>.

Predloženo je da molekularna razmjena među stanicama održava stanice u metaboličkoj i razvojnoj sinkroniji, te da drži maligne i druge stanične defekte u stanju fenotipskog mirovanja <sup>9</sup>. Navedeno stanje fenotipskog mirovanja je moguće prekinuti upalom (**Slika 2**).



**Slika 2.** Prikaz fenotipske supresije malignosti od strane stanične parabioze, te fenotipske ekspresije nakon prekida stanične parabioze od strane upale (preuzeto od M. Radman, 2019).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Korišteni podaci

U ovom istraživanju koristile su se javno dostupne baze podataka: Tumor Cancer Genome Atlas (TCGA) koja sadrži podatke o ekspresiji gena u tumorima dobivene RNA sekvenciranjem<sup>98</sup>. Tumori uključeni u analizu su maligni tumori mokraćnog mjehura, debelog crijeva, dojke, vrata maternice, bubrega, želuca, jetre, prostate, štitnjače i pluća. Razlog za isključivanje malignih tumora vrata maternice i prostate iz analize razlikovanja ranih i kasnih stadija je to što se za klasifikaciju navedenih tumora ne koristi TNM-klasifikacija. Podaci iz TCGA baze podataka su dobiveni s pomoću R paketa *TCGAWorkflowData* v1.26.0<sup>99</sup> i *TCGABiolinks* v2.30.0<sup>100</sup>.

Za pronalazak smanjeno ili povećano eksprimiranih gena u pojedinom normalnom tkivu u odnosu na sva normalna tkiva koristila se GTEX, HPA i FANTOM5 konsenzusna baza podataka dostupna na službenoj stranici Human Protein Atlas baze (HPA, <https://www.proteinatlas.org/>). U ovoj konsenzusnoj bazi podataka, vrijednost normalizirane ekspresije (nTPM) konsenzusa za svaki gen i tkivo predstavlja maksimalnu vrijednost nTPM od tri izvora podataka<sup>101-103</sup>. Da bi se dobile navedene nTPM vrijednosti, sve su se TPM vrijednosti po uzorku skalirale na zbroj od 1 milijun TPM kako bi se nadoknadili nekodirani transkripti koji su prethodno uklonjeni. Zatim su sve TPM vrijednosti svih uzoraka unutar svakog izvora podataka zasebno normalizirane korištenjem skraćene srednje vrijednosti *M* (engl. *Trimmed Mean of M-values*, TMM) kako bi se omogućile usporedbe između uzoraka. Normalizirane vrijednosti ekspresije transkripta, označene kao nTPM, izračunate su za svaki gen u svakom uzorku te su korištene u daljnjoj analizi. GTEX i HPA baze podataka koristile su RNA sekvenciranje za određivanje ekspresije gena, a FANTOM5 baza koristi metodu CAGE sekvenciranja za određivanje genske ekspresije.

Za određivanje stvarnih mjesta metastazi koristili su se radovi u kojima je analizirana specifičnost metastaziranja tumora iz velikih autopsijskih studija<sup>4</sup>, te MSK-MetTropism studija koja sadrži podatke o mjestima metastazi za preko 25,000 pacijenata<sup>104</sup>. Za određivanje pojavnosti 36 primarnih tumora koristila se GLOBOCAN studija iz 2020<sup>1</sup>.

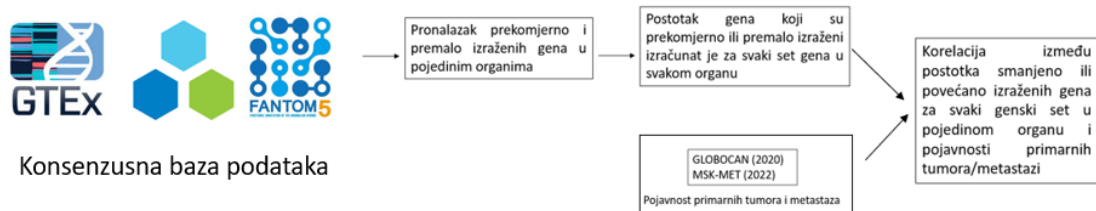


### 3.2. Identifikacija gena sa značajnom varijacijom u genskoj ekspresiji u normalnim tkivima

Cilj ovog dijela analize je pronalazak gena s povećanom ili smanjenom ekspresijom u pojedinom normalnom tkivu u odnosu na sva ostala normalna tkiva koja su prisutna u konsenzusnoj bazi podataka GTEx, HPA i FANTOM5. R paket *RNentropy* v1.2.2 korišten je za identifikaciju prekomjerno i premalo izraženih gena u različitim organima pri čemu je se HUGO genska nomenklatura koristila za anotaciju gena, iako konsenzusna baza podataka sadrži i Ensembl anotaciju gena<sup>105</sup>. Konsenzusna baza podataka sadrži podatke o ekspresiji 20162 gena, pri čemu je različit broj uzoraka korišten u svakoj bazi podataka. HPA baza podataka sadrži uzorke tkiva od 122 osoba, dok GTEx baza podataka sadrži za svako tkivo različit broj uzoraka. Najveći broj uzoraka u GTEx bazi podataka ima skeletno mišićno tkivo (803 uzorka, od čega za njih 706 postoje genomski podaci), dok najmanji broj uzoraka ima unutrašnji dio bubrega (samo 4 uzorka). FANTOM5 baza sadrži ukupno 96 različitih uzoraka. RNentropy metoda otkriva značajne varijacije u ekspresiji gena u bilo kojem broju uzoraka i uvjeta (u ovom slučaju različitih organa) uspoređujući je s prosječnom ekspresijom gena u svim proučavanim uzorcima. Rezultat ove analize je matrica gena koja pokazuje značajne varijacije u ekspresiji gena u različitim organima gdje je svakom paru gen-organ dodijeljen "-1" za smanjenu ekspresiju, "1" za prekomjernu ekspresiju ili "0" ako nema značajne promjene<sup>106</sup>. Dobivene *p*-vrijednosti korigirane su Benjamini-Hochbergovom metodom, a korigirane *p*-vrijednosti  $< 0,05$  smatrane su značajnima.

Dobiveni prekomjerno ili nedovoljno izraženi geni za svaki organ razvrstani su u genske kategorije. Baza podataka molekularnih potpisa (MSigDB; <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) koja sažima specifične biološke procese i smanjuje šum i redundanciju korištena je za dobivanje kolekcije od 1692 genska seta baze podataka Reactome te 50 genskih setova baze podataka staničnih obilježja (engl. *Cell hallmark*)<sup>107-109</sup>. Podacima iz ove baze pristupalo se i preuzimalo ih se s pomoću R paketa *msigdb* v7.5.1. Postotak gena koji su prekomjerno ili premalo izraženi izračunat je za svaki set gena u svakom organu. Navedeni postotak se korelirao s učestalosti primarnih tumora, te pojavnosti metastaza. Tako su dobivene genske kategorije koje su pozitivno ili negativno korelirane s nastankom primarnih i metastatskih tumora (**Slika 3**). Osim *p*-vrijednosti, izračunata je i stopa lažnih otkrića (FDR, od engl. *false discovery rate*) za svaku od korelacija, te su korelacije s FDR vrijednosti  $< 0,05$

smatrane značajnim. Stopa lažnih otkrića je izračunata s pomoću *FDR* funkcije unutar R paketa *fuzzySim* v.4.10.7<sup>110</sup>.



**Slika 3.** Grafički prikaz analize kojom su dobivene genske kategorije koje značajno koreliraju sa nastankom primarnih ili metastatskih tumora

### 3.3. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena između tumora i normalnog tkiva

Analiza diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) između malignih tumora i pripadajućeg normalnog tkiva je napravljena pomoću R paketa *DESeq2* v1.42.0<sup>111</sup>. Podaci za normalno tkivo su bili uzeti iz GTEx (engl. *Genotype Tissue Expression*) baze podataka koja sadrži podatke o genskoj ekspresiji u zdravih osoba<sup>101</sup>. Da bi se omogućila analiza između TCGA i GTEx uzoraka bez pristranosti pojedinoj studiji, koristila se baza RNASeqDB (dostupna na <https://github.com/mskcc/RNAseqDB>) koja sadrži normalizirane i uniformne podatke iz TCGA i GTEx baza podataka<sup>112</sup>. RNASeqDB sadrži i RSEM kvantificirane transkripte protein-kodirajućih gena, koji su korišteni u analizi diferencijalne ekspresije, pri čemu su se filtrirali geni s niskom ekspresijom (zadržani su samo oni geni čija je ekspresija u svim uzorcima kada se zbroje najmanje 10). Za DESeq2 analizu se ne mogu koristiti normalizirani FPKM podaci, dok je preporučeno korištenje očekivanih razina ekspresije (od engl. *expected counts*). Naime, RNASeqDB baza podataka i za GTEx podatke i TCGA podatke je izračunala koristeći RSEM (od engl. *RNA-Seq by Expectation-Maximization*) maksimalno očekivane razine genske ekspresije. HUGO genska nomenklatura korištena je za anotaciju gena pri čemu je korištena GRCh38.p14 verzija ljudskog genoma. Ukupan broj protein-kodirajućih gena koji je analiziran je 20242. Broj uzoraka koji su analizirani je prikazan u **Tablici 1**. Za daljnju analizu koristili su se samo oni diferencijalno eksprimirani geni koji zadovoljavaju

sljedeće uvjete: stopa lažnih otkrića manja od 0,05 te apsolutna vrijednost čimbenika promjene ekspresije gene (engl. *fold change*) veća od 2.

**Tablica 1.** Broj uzoraka iz GTEx i TCGA baze podataka analiziranih RNAseq metodom koji su korišteni za diferencijalno ekspresijsku analizu između tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva

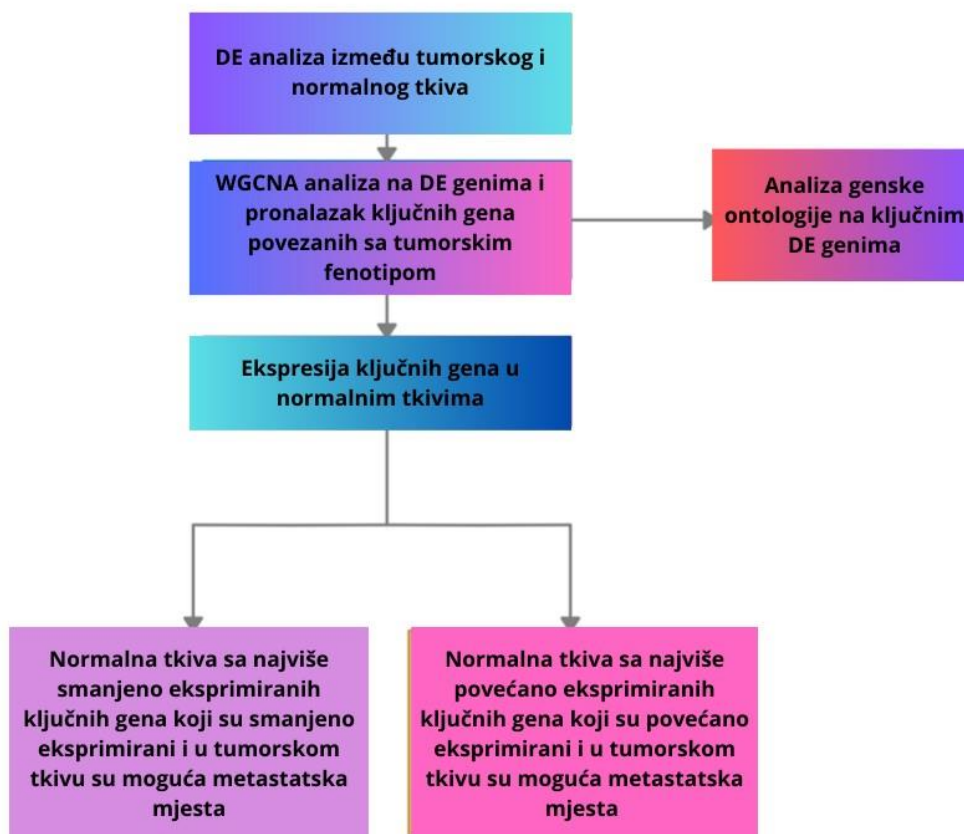
GTEx tkivo / TCGA vrsta tumora	GTEx	TCGA tumor
mokraćni mjehur / rak mokraćnog mjehura	11	411
dojka / karcinom dojke	218	1112
vrat maternice / rak vrata maternice	11	304
debelo crijevo / karcinom debelog crijeva	203	295
jetra / hepatocelularni karcinom jetre	136	371
prostata / rak prostate	119	497
želudac / rak želuca	204	415
štitnjača / rak štitnjače	355	505
pluća / adenokarcinom pluća	374	528
bubreg/ karcinom bubrega kromofobnog tipa	36	66
bubreg / karcinom bubrega svijetlih stanica	36	541
bubreg / papilarni karcinom bubrega	36	290

### 3.4. Pronalazak ključnih diferencijalno eksprimiranih gena te analiza puteva i genske ontologije ključnih gena

Kako bi se pronašli ključni geni koji su najviše povezani s fenotipom malignih tumora, koristio se R paket *WGCNA* v1.72-1<sup>113</sup>. DE geni između malignog tumora i odgovarajućeg normalnog tkiva iz GTEx baze su služili kao ulazni podaci za analizu ponderirane mreže koekspresije gena (eng. *weighted gene coexpression network analysis*, WGCNA). Ovom metodom su se dobiveni DE geni međusobno korelirali te se prema tome složili u gensku mrežu od nekoliko grupa visoko koreliranih gena. Posebnost ove metode je u tome što je moguće odrediti središnje i ključne gene u svakoj dobivenoj grupi s pomoću dva glavna parametra – značajnost gena (engl. *gene significance*, GS) i pripadnost modulu (engl. *module membership*, MM). GS predstavlja korelaciju između gena i kliničkih osobina (pripadnosti tumorskom ili normalnom tkivu), dok MM predstavlja korelaciju između gena i pripadnosti određenoj grupi gena. Za odabir ključnih gena koristile su se vrijednosti  $|GS| > 0,5$ , te  $|MM| > 0,8$ , kao i  $p$ -vrijednost manja od 0,05. Pojedini radovi koji koriste WGCNA analizu koriste blaže kriterije

za određivanje ključnih gena ( $|GS| > 0,2$ , te  $|MM| > 0,8$ ) <sup>114</sup>, ali da bi se dobila značajnija povezanost odlučeno je koristiti strože kriterije. Tako se ukupni broj DE gena smanjio na samo one ključne gene povezane s fenotipom malignih tumora, te su navedeni ključni geni korišteni u daljnjoj analizi <sup>115</sup>. Dodatno se napravila analiza puteva i genske ontologije ključnih gena s pomoću web aplikacije *Network analyst* (dostupna na <https://www.networkanalyst.ca/>) <sup>116</sup>. Za analizu puteva su se koristile KEGG i Reactome baze podataka, dok su se za analizu genske ontologije koristile sljedeće kategorije: molekularna funkcija, biološki procesi i stanični kompartment. Za određivanje obogaćenih puteva i kategorija genske ontologije korištena je ORA (engl. *over representation analysis*) analiza, koja uspoređuje preklap između dva genska seta s očekivanim slučajnim preklapom, dok su za pozadinske gene korišteni svi protein kodirajući geni. Sve genske kategorije s FDR vrijednosti manjom od 0,05 su smatrane obogaćenim.

U ovom radu su se usporedili smanjeno eksprimirani geni koji su ključni za nastanak tumora sa smanjeno eksprimiranim genima u pojedinim normalnim tkivima u odnosu na sva ostala normalna tkiva. Također su se usporedili i povećano eksprimirani geni ključni za nastanak tumora s povećano eksprimiranim genima u pojedinim normalnim tkivima u odnosu na sva ostala normalna tkiva. Predviđena preferencijalna mjesta metastaza za svaki od tumora u ovoj analizi su se odredila tako što su se normalna tkiva koja imaju najviše smanjeno eksprimiranih ključnih gena, a koji su smanjeno eksprimirani u tumoru, bila smatrana prediktivnim preferencijalnim mjestom metastaze. Osim toga, i normalna tkiva koja imaju najviše povećano eksprimiranih ključnih gena koji su povećano eksprimirani u pojedinom tumoru su bila smatrana prediktivnim preferencijalnim mjestom metastaze (**Slika 4**). Rezultati analize predviđanja mjesta metastaza su se usporedili sa stvarnim mjestima metastaze. Za izračun Spearmanove korelacije korištena je funkcija "rcorr" iz R paketa *Hmisc*. Statistički značajni rezultati bili su oni s  $p$ -vrijednošću  $< 0,05$ .



**Slika 4.** Grafički prikaz analize kojom su dobivena predviđena mjesta metastazi koristeći ekspresiju ključnih diferencijalno eksprimiranih gena u normalnim tkivima

### 3.5. Razlikovanje ranih i kasnih stadija malignih tumora pomoću strojnog učenja

S pomoću metode potpornih vektora (engl. *support vector machine*, SVM) se razlikovao rani i kasni stadija raka koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena između kasnijih (stadiji III i IV) i ranih stadija (stadiji I, II) (**Slika 5**). Broj uzoraka koji pripadaju ranim i kasnijim stadijima za svaki od analiziranih tumora prikazan je na **Tablici 2**. S pomoću R paketa *EDASeq* v2.36.0 napravila se analiza diferencijalne ekspresije između ranih i kasnijih stadija tumora. *EDASeq* R paket je se koristio za analizu budući da se preporučuje koristiti kada se radi s paketima *TCGABiolinks* i *TCGAWorkflowData*, koji su se koristili za preuzimanje TCGA podataka. *TCGABiolinks* koristi *EDASeq* za normalizaciju ekspresije koja uzima u obzir duljinu gena i GC-sadržaj. Međutim, iako postoji opcija korištenja *EDASeq*

rezultata normalizacije za *DESeq2* analizu, navedena opcija nije korištena, iako je *DESeq2* metoda korištena za pronalazak diferencijalno eksprimiranih gena između tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva. Jedna od razlika između *EDASeq* i *DESeq2* metode je u normalizaciji, *EDASeq* koristi gornju kvartilu za normalizaciju, a *DESeq2* koristi relativnu log ekspresiju za normalizaciju. Abbas-Aghababazadeh i sur. su koristili tri različite metode za normalizaciju (gornja kvartila, TMM metoda i relativna log ekspresija) gensko ekspresijskih podataka raka vrata maternice iz TCGA baze podataka, i pokazali su da sve tri metode daju slične rezultate <sup>117</sup>. Za daljnju analizu koristili su se samo oni diferencijalno eksprimirani geni koji zadovoljavaju sljedeće uvjete: stopa lažnih otkrića manja od 0,05 te apsolutna vrijednost čimbenika promjene ekspresije gene veća od 2. Koristeći *Oncolnc* server (dostupan na <https://www.oncolnc.org/>) <sup>118</sup> za svaki od analiziranih tumora pronašli su se diferencijalno eksprimirani geni koji su najviše povezani s preživljenjem, te se s pomoću ekspresije tih gena također pokušalo razlikovati rane i kasne stadije malignih tumora. Također, napravljen je izbor značajnih DE gena, koristeći korelacijsku analizu, pri čemu su se uklonili visoko korelirani geni ( $R > 0,75$ ) koji koreliraju jedni s drugim. Tako se reducirao broj DE gena koji su se koristili za razlikovanje ranih i kasnih stadija, s ciljem da se poboljša uspješnost razlikovanja ranih i kasnih stadija tumora. Za pronalaženje visoko koreliranih gena koji se mogu ukloniti iz analize korišten je *caret* v.6.0-94 R paket i funkcija *findCorrelation* <sup>119</sup>.

Budući da je postojao disbalans između broja uzoraka ranih i kasnih stadija za pojedine tumore u TCGA bazi, korištena je SMOTE (od engl. *Synthetic Minority Oversampling Technique*) metoda generiranja uzoraka. Navedena metoda rješava probleme neuravnotežene klasifikacije, te je napravljena koristeći funkciju SMOTE u R paketu *DMwR* v.0.4.1 <sup>120</sup>. S pomoću SMOTE metode se generira novi skup podataka koji rješava problem neravnoteže klasa. Metoda potpornih vektora je napravljena u R-u koristeći *MLSeq* v2.20.0 R paket. *MLSeq* paket omogućava primjenu metoda strojnog učenja u klasifikaciji RNA-Seq podataka <sup>121</sup>. Ulazni podatak za *MLSeq* analizu je matrica koja sadrži ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena i pripadnost određenoj klasi (rani/kasni stadij). Podaci su se podijelili na setove za treniranje i testiranje, gdje je set za treniranje sadržavao 70% podataka, a ostatak je bio test set. Optimalni parametri  $\sigma$  i  $C$  za SVM s radijalnim kernelom su se odredili s pomoću funkcije *classify* iz *MLSeq* R paketa. Model je treniran koristeći peterostruku križnu provjeru (od engl. *cross validation*) koja je ponovljena 10 puta. Na kraju je uspješnost modela u predikciji sažeta koristeći funkciju *confusionMatrix* iz *caret* R paketa <sup>119</sup>.

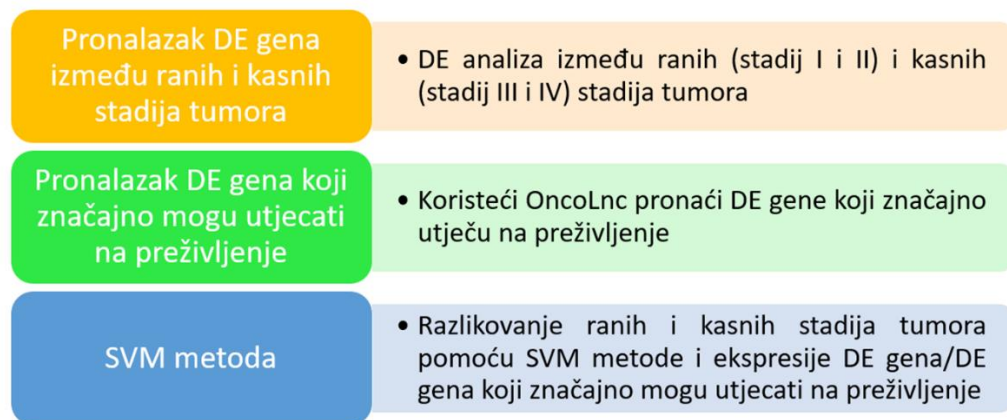
**Tablica 2.** Broj uzoraka iz TCGA baze podataka analiziranih RNAseq metodom koji su korišteni za diferencijalno ekspresijsku analizu između ranih i kasnih stadija tumora

TCGA tumor	kasni stadij (broj uzoraka)	rani stadij (broj uzoraka)
rak mokraćnog mjehura	277	133
rak dojke	271	815
rak debelog crijeva	200	268
rak bubrega kromofobnog tipa	20	46
rak bubrega svijetlih stanica	206	332
papilarni karcinom bubrega	67	193
rak jetre	90	257
adenokarcinom pluća	110	421
rak želuca	208	180
rak štitnjače	167	336

Također je izračunata specifičnost, osjetljivost, te Cohenova kappa za svaki od analiziranih tumora, čiji su se rani i kasni stadiji pokušali razlikovati metodom potpornih vektora. Specifičnost ili pozitivna vrijednost predikcije predstavlja količnik istinski pozitivnih vrijednosti i broja pozitivno predviđenih klasa. Osjetljivost predstavlja količnik istinski pozitivnih vrijednosti i ukupnog broja pozitivno klasificiranih klasa. Cohenova kappa mjera nam ukazuje na to kakve su performanse klasifikatora u odnosu na klasifikator koji slučajno pogađa predviđenu vrijednost prema frekvenciji svake klase. Kappa vrijednosti mogu biti u rasponu od 0 do 1, a klasifikator je bolji ako su vrijednosti bliže vrijednosti 1<sup>122</sup>. Točnost određenog modela se može odrediti iz osjetljivosti i specifičnosti, gdje poznata je prevalencija. Prevalencija je vjerojatnost bolesti u populaciji u određenom trenutku:

$$\text{Točnost} = (\text{osjetljivost}) (\text{prevalencija}) + (\text{specifičnost}) (1 - \text{prevalencija}).$$

Brojčana vrijednost točnosti predstavlja udio stvarno pozitivnih rezultata (i istinito pozitivnih i istinitih negativno) u odabranoj populaciji<sup>123</sup>.



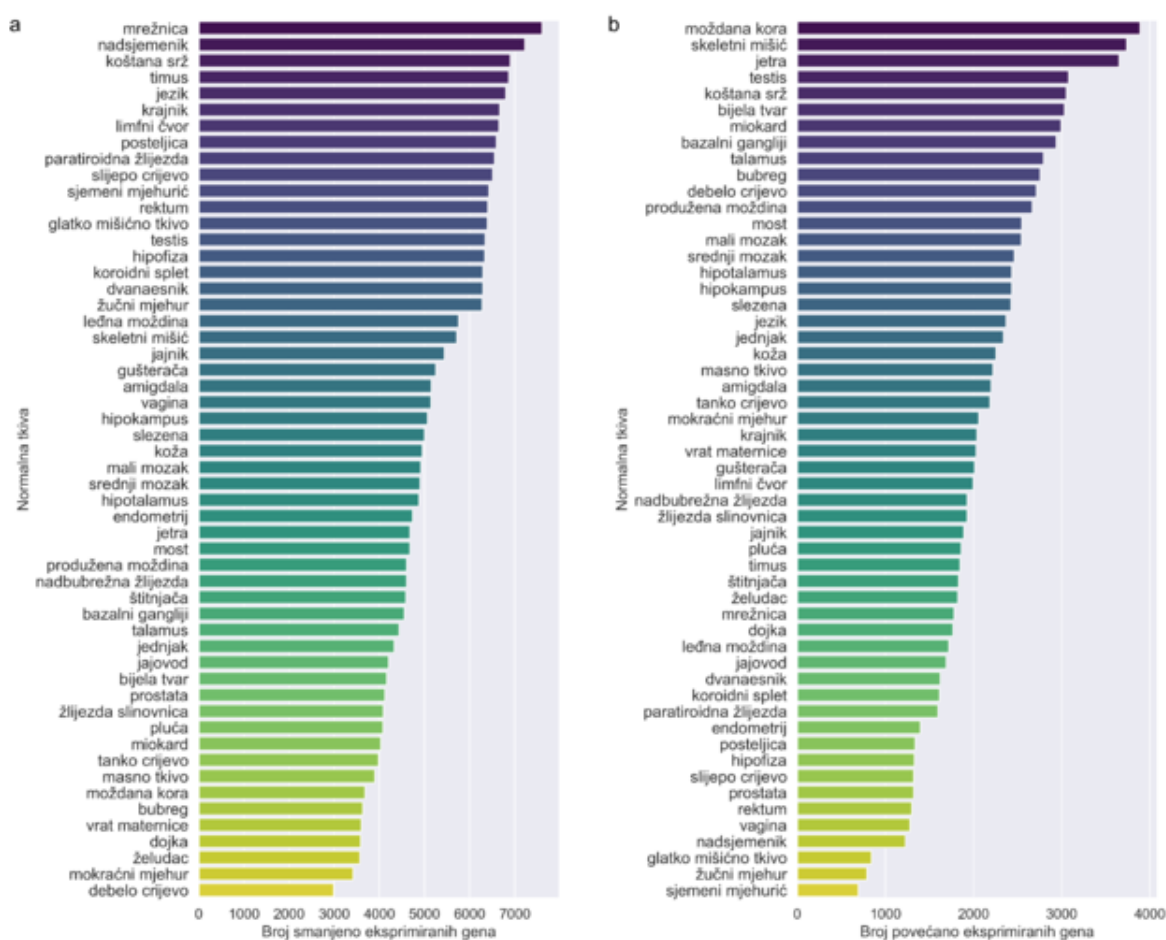
**Slika 5** Grafički prikaz analize razlikovanja ranih i kasnih stadija tumora koristeći gensko ekspresijske podatke i metodu potpornih vektora



## 4. REZULTATI

### 4.1. Povećano ili smanjeno eksprimirani geni u normalnim tkivima u odnosu na ostala normalna tkiva

S pomoću *RNentropy* R paketa<sup>106</sup> dobivena je lista gena koji su smanjeno ili povećano eksprimirani u normalnim tkivima u odnosu na prosječnu ekspresiju svih normalnih tkiva (Slika 6). Ukupno su analizirana 54 normalna tkiva prisutna u konsenzusnoj bazi podataka, te su dobiveni rezultati za 15719 statistički značajno povećano ili smanjeno eksprimirana gena u pojedinim normalnom tkivima u odnosu na prosječnu ekspresiju gena u svim organima.



**Slika 6. Prikaz rezultata analize broja povećano i smanjeno eksprimiranih gena u normalnim tkivima u odnosu na prosječnu ekspresiju pojedinih gena u svim normalnim tkivima.** Za svaki od analizirana 54 normalna tkiva prikazan je ukupan broj smanjeno eksprimiranih te ukupan broj povećano eksprimiranih gena po pojedinom normalnom tkivu u

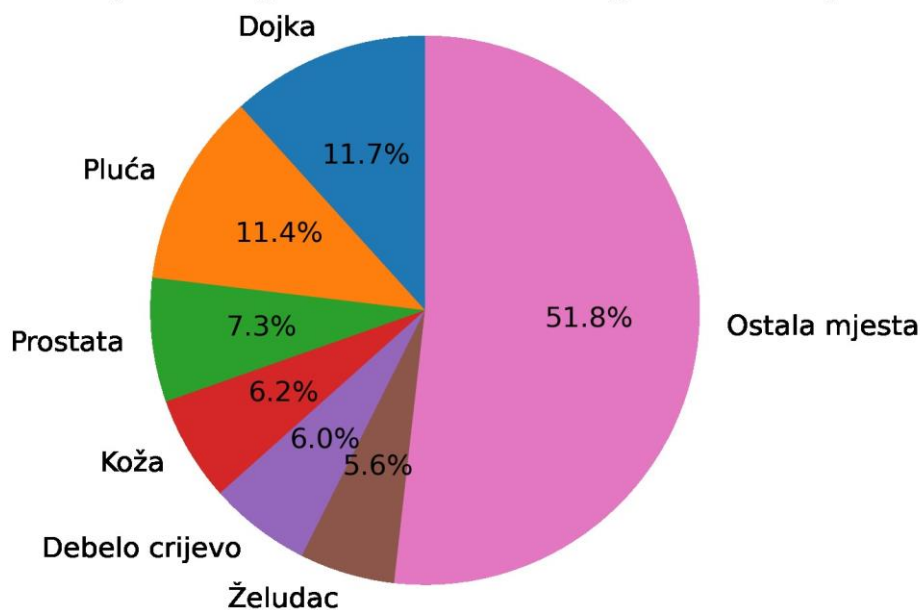
odnosu na prosječnu ekspresiju svih normalnih tkiva. (a) Broj smanjeno eksprimiranih gena u pojedinom normalnom tkivu u odnosu na sva normalna tkiva. Normalna tkiva koja imaju najveći broj smanjeno eksprimiranih gena u odnosu na sva ostala tkiva su: mrežnica, nadsjemenik, koštana srž, timus, jezik, krajnik, limfni čvor, posteljica, paratireoidna žlijezda, slijepo crijevo. (b) Broj povećano eksprimiranih gena u pojedinom normalnom tkivu u odnosu na sva normalna tkiva. Normalna tkiva s najvećim brojem povećano eksprimiranih gena su: moždana kora, skeletni mišić, jetra, testis, koštana srž, bijela tvar, miokard, bazalni gangliji, talamus, bubreg.

Što se tiče ekspresije gena u organima koji su česta mjesta nastanka metastaza, koštana srž, koja je dio kosti, organa u kojem često nastaju metastaze, se nalazi među organima koji imaju i najveći broj i smanjeno i povećano eksprimiranih gena u odnosu na sva tkiva. U odnosu na sva ostala tkiva, jetra je među organima koji imaju najveći broj povećano eksprimiranih gena, dok limfni čvorovi se nalaze među organima koji imaju najveći broj smanjeno eksprimiranih gena u odnosu na prosječnu ekspresiju svih normalnih tkiva.

## **4.2. Korelacija između postotka smanjeno ili povećano eksprimiranih gena u normalnim organima i pojavnosti primarnih tumora po organima**

Pojavnost primarnih tumora za oba spola dobivena je iz GLOBOCAN 2020 studije <sup>1</sup> te je prikazana na **Slici 7.** u obliku postotka od ukupnog broja novih slučajeva. Ukupan broj primarnih tumora u 2020. godini je bio približno 20 milijuna <sup>1</sup>. U ovom radu određena je korelacija između organ-specifičnog genskog ekspresijskog obrasca i podložnosti organa za nastanak primarnih tumora i metastazi. Postotak smanjeno i povećano eksprimiranih gena u odnosu na prosječnu gensku ekspresiju u svim organima je izračunat s pomoću R paketa *RNentropy* <sup>105</sup>. Napravljena je korelacija između pojavnosti primarnih tumora u pojedinim organima i postotka povećano ili smanjeno eksprimiranih gena u pojedinim genskim kategorijama. Genske kategorije koje su korištene su Reactome putevi i stanična obilježja.

### Novi slučajevi malignih tumora u 2020. godini (oba spola)



#### Slika 7. Pojavnost primarnih tumora u 2020. godini za oba spola u obliku postotka.

Ukupan broj novih slučajeva malignih bolesti u 2020. godini je bio približno 20 milijuna, te je za najčešće maligne tumore izračunat postotak novih slučajeva u odnosu na sve slučajeve. Maligni tumori dojke, pluća, prostate, kože, debelog crijeva i želuca su bili najčešći novodijagnosticirani maligni tumori. Slika je napravljena koristeći Python programski jezik.

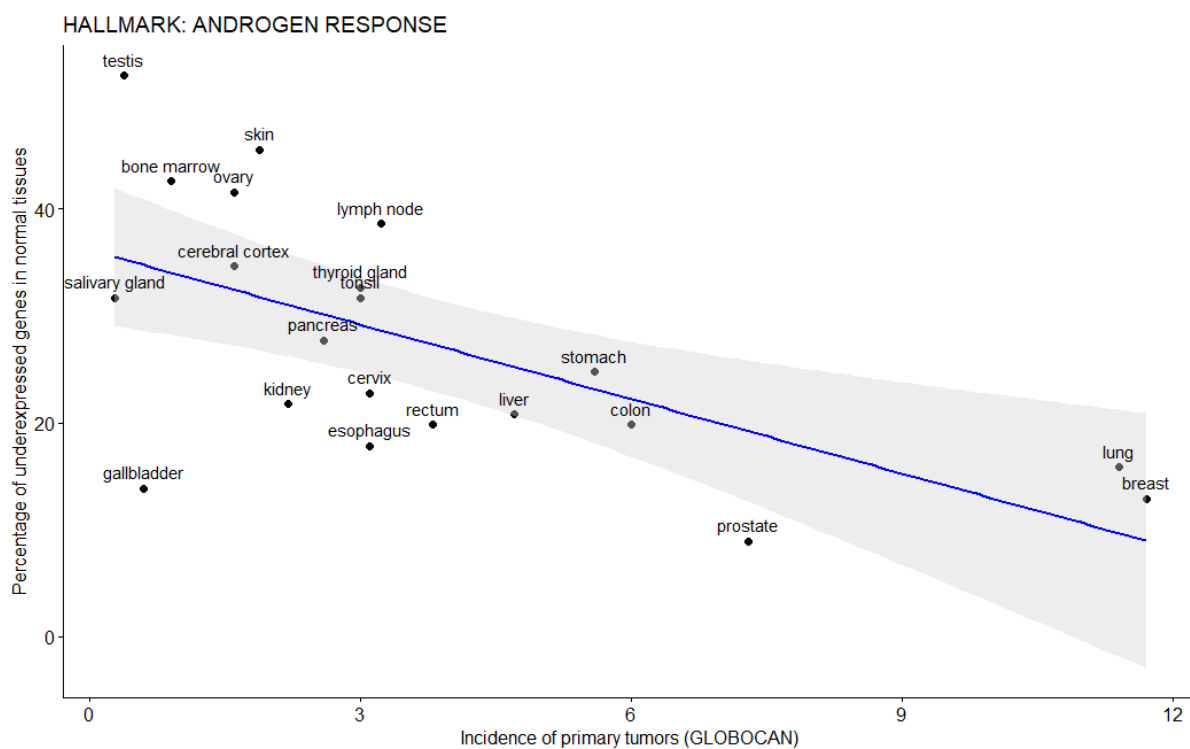
Statistički značajna korelacija nije dobivena između pojavnosti primarnih tumora u organima i postotka povećano eksprimiranih Reactome kategorija u normalnim organima. Također, nije dobivena statistički značajna korelacija ni između pojavnosti nastanka primarnih tumora u organima i postotka smanjeno eksprimiranih Reactome kategorija u normalnim organima.

Statistički značajna negativna korelacija je dobivena između pojavnosti primarnih tumora u organima i postotka smanjene ekspresije gena koji pripadaju kategoriji staničnih obilježja odgovor na androgen (**Tablica 3, Slika 8**). Iz navedenog rezultata proizlazi da bi organi koji u normalnim uvjetima imaju smanjenu ekspresiju gena koji pripadaju kategoriji staničnih obilježja odgovor na androgen mogli biti manje podložni nastanku primarnih tumora, u odnosu na ona normalna tkiva koja imaju povećanu ekspresiju navedenih gena.

Statistički značajna korelacija nije dobivena između pojavnosti primarnih tumora u pojedinim organima i postotka povećane ekspresije gena koji pripadaju kategoriji staničnih obilježja.

**Tablica 3.** Rezultati jedine statistički značajne korelacije ( $FDR < 0,05$ ) između broja smanjeno eksprimiranih gena koji pripadaju kategorijama staničnih obilježja u normalnim tkivima i pojavnosti primarnih tumora u normalnim tkivima.

Stanična obilježja	Spearmanov koeficijent korelacije	$p$ -vrijednost	FDR
Odgovor na androgen	-0,70	0,00045	0,022



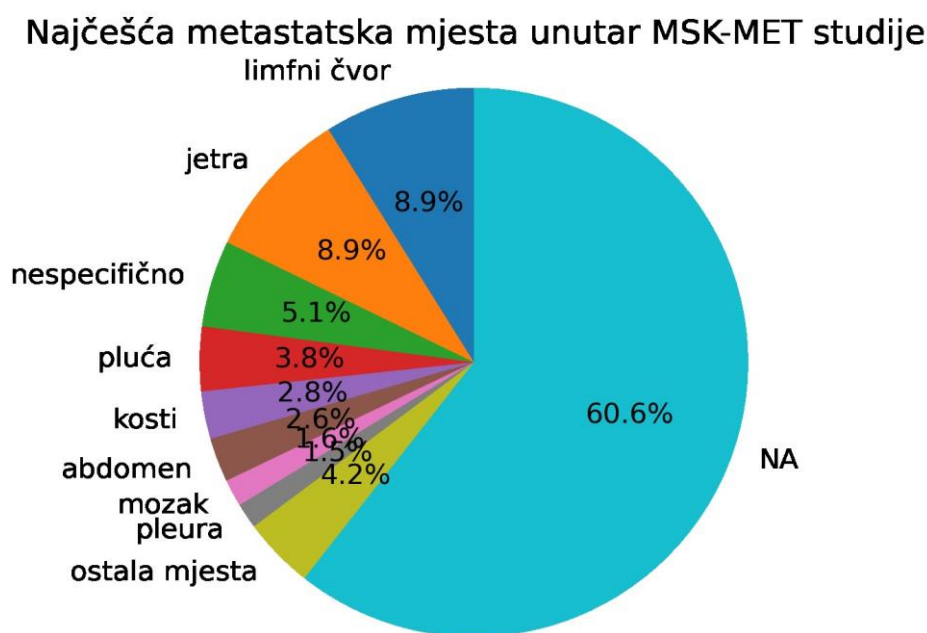
**Slika 8.** Prikaz jedine statistički značajne korelacije ( $FDR < 0,05$ ) između postotka smanjeno eksprimiranih gena koji pripadaju kategorijama staničnih obilježja u normalnim tkivima i pojavnosti primarnih tumora u normalnim tkivima.

Postotak smanjeno eksprimiranih gena koji pripadaju kategoriji staničnih obilježja odgovor na androgen izračunat je tako da je se broj smanjeno eksprimiranih gena u pojedinim normalnim

tkivima koji pripadaju navedenoj kategoriji podijelio s ukupnim brojem gena koji pripadaju kategoriji staničnih obilježja odgovor na androgen.

### 4.3. Korelacija između postotka smanjeno ili povećano eksprimiranih gena u normalnim organima i pojavnosti nastanka metastaza

Pojavnost metastaza je dobivena iz studije MSK-MetTropism, koja sadrži genomske i kliničke podatke od preko 25,000 pacijenata s metastatskom bolesti <sup>104</sup>. Postotak pojavnosti metastazi je izračunat za svaki organ tako da je ukupan broj metastatskih slučajeva u pojedinom organu podijeljen s ukupnim brojem pacijenata (**Slika 9**). Budući da maligni tumori mogu metastazirati u više organa u iste osobe, pojedini organi imali su sličnu učestalost nastanka metastazi, dok za neke slučajeve nisu poznata sva metastatska mjesta. Jetra, pluća, kosti, i limfni čvorovi su organi koji su imali najveću pojavnost metastazi.

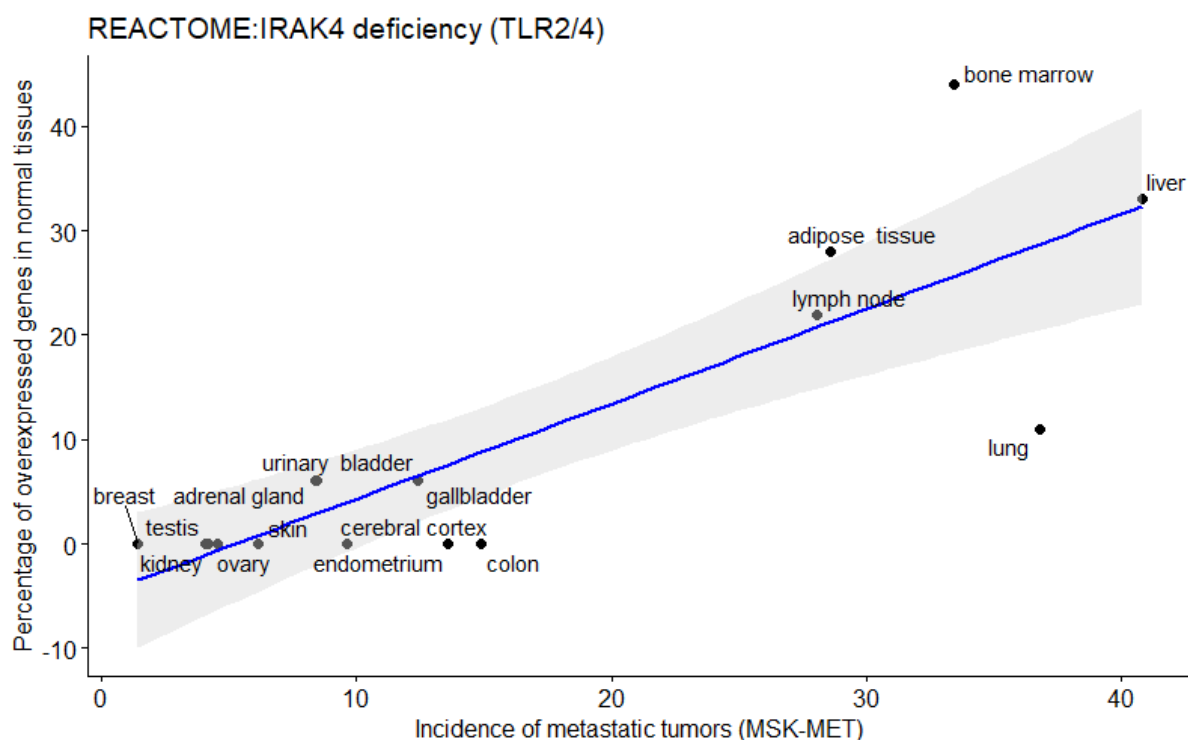


**Slika 9. Pojavnost metastazi u MSK MetTropism studiji.** Prikazan je ukupan broj metastatskih slučajeva, kao i postotak slučajeva metastazi u pojedinim organima. Podaci su preuzeti s MSK MetTropism studije koja je prikazana na CBioPortal-u <sup>124, 125</sup>. Slika je napravljena u Pythonu koristeći Seaborn paket.

Statistički značajna pozitivna korelacija je dobivena između pojavnosti metastaza u pojedinim organima i postotka povišene ekspresije gena koji pripadaju sljedećim Reactome kategorijama: nedostatak IRAK4 (TLR2/4) i MET aktivira Rap1 i Rac1 (**Tablica 4**, **Slika 10**, **Sika 11**). Korelacijskom analizom postotka smanjene ekspresije gena koji pripadaju Reactome kategorijama u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi nisu dobiveni statistički značajni rezultati ( $FDR < 0,05$ ). Statistički značajni rezultati nisu dobiveni ni korelacijskom analizom postotka smanjene ekspresije gena koji pripadaju kategorijama staničnih obilježja i pojavnosti metastazi, kao ni korelacijskom analizom postotka povišene ekspresije gena koji pripadaju kategorijama staničnih obilježja i pojavnosti metastazi.

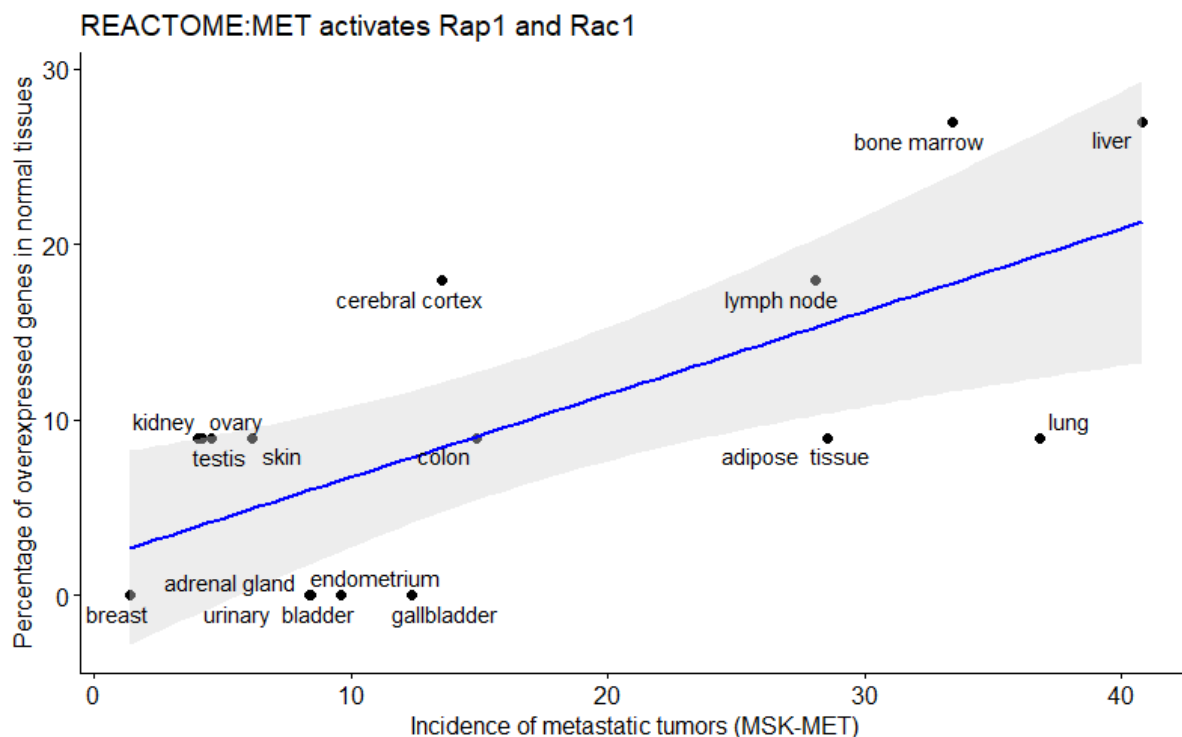
**Tablica 4.** Rezultati statistički značajnih korelacija ( $FDR < 0,05$ ) između postotka povišeno eksprimiranih gena u normalnim tkivima koji pripadaju Reactome kategorijama i pojavnosti metastatskih tumora u normalnim tkivima.

Reactome kategorija	Spearmanov koeficijent korelacije	$p$ -vrijednost	FDR
Nedostatak IRAK4 (TLR2/4)	0,85	3,38E-05	0,046
MET aktivira RAPI i RAC1	0,84	5,65E-05	0,046



**Slika 10.** Prikaz statistički značajne korelacije između postotka povišeno eksprimiranih gena Reactome kategorije nedostatak IRAK4 (TLR2/4) u normalnim tkivima i pojavnosti metastatskih tumora u normalnim tkivima.

Postotak povišeno eksprimiranih gena koji pripadaju kategoriji nedostatak IRAK4 (TLR2/4) izračunat je tako da je se broj povišeno eksprimiranih gena u pojedinim normalnim tkivima u odnosu na sva tkiva, koji pripadaju navedenoj kategoriji podijelio s ukupnim brojem gena koji pripadaju Reactome kategoriji nedostatak IRAK4 (TLR2/4).



**Slika 11.** Prikaz statistički značajne korelacije između postotka povišeno eksprimiranih gena Reactome kategorije: MET aktivira RAP1 i RAC1, u normalnim tkivima u odnosu na sva ostala tkiva i pojavnosti metastatskih tumora u normalnim tkivima.

Postotak povišeno eksprimiranih gena koji pripadaju kategoriji MET aktivira RAP1 i RAC1 izračunat je tako da je se broj povišeno eksprimiranih gena u pojedinim normalnim tkivima u odnosu na sva tkiva, koji pripadaju navedenoj kategoriji podijelio s ukupnim brojem gena koji pripadaju Reactome kategoriji nedostatak MET aktivira RAP1 i RAC1.

#### 4.4. Genska ontologija i analiza puteva diferencijalno eksprimiranih ključnih gena između malignih tumora i odgovarajućeg normalnog tkiva

Napravljena je DE analiza, kao i WGCNA analiza i analiza genske ontologije te Reactome i Kegg puteva na DE genima između malignih tumora iz TCGA baze podataka i

pripadajućih normalnih tkiva iz GTEx baze podataka. Analizirali su se sljedeći maligni tumori: rak mokraćnog mjehura, rak dojke, rak vrata maternice, adenokarcinom debelog crijeva, karcinom bubrega kromofobnog tipa, karcinom bubrega svijetlih stanica, papilarni karcinom bubrega, hepatocelularni karcinom jetre, adenokarcinom pluća, adenokarcinom prostate, adenokarcinom želuca, te karcinom štitnjače.

Rezultat DE analize između raka mokraćnog mjehura i pripadajućeg normalnog tkiva su 2372 smanjeno eksprimirana gena te 3207 povećano eksprimirana gena. Napravljena je i WGCNA analiza, te su dobivena 169 ključna gena povezana s tumorskim fenotipom ( $|GS| > 0,5$ ;  $|MM| > 0,8$ ) te su svi ključni geni bili smanjeno eksprimirani u raku mokraćnog mjehura u odnosu na normalno tkivo mokraćnog mjehura.

Analiza genske ontologije i molekularnih puteva pokazala je da smanjeno eksprimirani ključni geni u raku mokraćnog mjehura pripadaju sljedećim genskim kategorijama: cGMP -PKG signalni put, kontrakcije vaskularnih glatkih mišića, interakcije između stanice i izvanstaničnog matriksa, vezanje kalmodulina, signalni put kalcija, vezanje proteina citoskeleta, i vezanje aktina. Većina smanjeno eksprimiranih ključnih gena pripadala je staničnom kompartmentu aktinskog citoskeleta te fokalnih adhezija. Sve genske kategorije i puteve kojima pripadaju smanjeno eksprimirani ključni geni u raku mokraćnog mjehura su prikazani na **Tablici 5**.

**Tablica 5.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na smanjeno eksprimiranim ključnim genima između raka mokraćnog mjehura i normalnog tkiva mokraćnog mjehura. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [KEGG, Reactome, biološki proces (BP), stanični kompartment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	$p$ vrijednost	FDR	Termin
KEGG	132	13	5.48E-06	0.00174	Kontrakcija glatkih mišića krvnih žila
KEGG	188	13	0.000227	0.0279	Signalni put kalcija
KEGG	166	12	0.000263	0.0279	cGMP-PKG signalni put
Reactome	25	10	1.95E-10	2.66E-07	Kontrakcija glatkih mišića
Reactome	52	12	4.01E-09	2.73E-06	Kontrakcija mišića
Reactome	19	5	8.54E-05	0.0388	Interakcije stanica-izvanstanični matriks
Reactome	21	5	0.000143	0.0489	cGMP učinci
BP	89	12	5.47E-10	4.48E-07	Kontrakcija glatkih mišića
BP	127	13	3.30E-09	1.35E-06	Regulacija mišićne kontrakcije
BP	363	18	3.00E-07	8.20E-05	Diferencijacija mišićnih stanica



<b>BP</b>	389	18	8.23E-07	0.000169	<i>Razvoj mišićnih organa</i>
<b>BP</b>	354	15	2.02E-05	0.00331	<i>Razvoj poprečno-prugastog mišićnog tkiva</i>
<b>BP</b>	108	7	0.000293	0.04	<i>Kontrakcija poprečno-prugastih mišića</i>
<b>MF</b>	49	11	7.83E-12	1.92E-09	<i>Strukturni sastojak mišića</i>
<b>MF</b>	373	24	9.87E-12	1.92E-09	<i>Vežanje aktina</i>
<b>MF</b>	738	30	1.83E-09	2.36E-07	<i>Vežanje proteina citoskeleta</i>
<b>MF</b>	171	10	3.22E-05	0.00312	<i>Veživanje kalmodulina</i>
<b>CC</b>	214	26	7.92E-21	1.78E-18	<i>Kontraktilno vlakno</i>
<b>CC</b>	187	23	1.22E-18	1.37E-16	<i>Dio kontraktilnog vlakna</i>
<b>CC</b>	197	23	4.00E-18	3.00E-16	<i>miofibril</i>
<b>CC</b>	163	19	3.93E-15	2.21E-13	<i>sarkomera</i>
<b>CC</b>	430	23	7.16E-11	3.22E-09	<i>Aktinski citoskelet</i>
<b>CC</b>	147	12	3.27E-08	1.23E-06	<i>Spoj stanica supstrat</i>
<b>CC</b>	138	11	1.59E-07	5.11E-06	<i>Stanični supstrat međustanični spoj</i>
<b>CC</b>	132	10	9.46E-07	2.66E-05	<i>Fokalna adhezija</i>
<b>CC</b>	212	12	1.73E-06	4.33E-05	<i>Međustanični spoj</i>
<b>CC</b>	2200	44	5.21E-06	0.000117	<i>Citoskelet</i>
<b>CC</b>	847	22	4.71E-05	0.000964	<i>Spoj stanica</i>

Napravljena je i DE analiza između raka dojke i normalnog tkiva dojke te su dobivena 3720 smanjeno eksprimirana gena, i 3479 povećano eksprimirana gena. Rezultati WGCNA analize je 181 ključni gen koji je povezan s tumorskim fenotipom, te su svi navedeni ključni geni bili smanjeno eksprimirani u raku dojke u odnosu na normalno tkivo dojke.

Analiza puteva i genske ontologije pokazala je da su zajednički procesi smanjeno eksprimiranim ključnim genima: PPAR signalni put, regulacija metabolizma lipida, lipidna homeostaza, te angiogeneza. Svi statistički značajni procesi i genske kategorije prikazane su na **Tablici 6**.

**Tablica 6.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na smanjeno eksprimiranim ključnim genima između raka dojke i normalnog tkiva dojke. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [KEGG, biološki proces (BP), stanični kompartiment (CC)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

<b>Domena</b>	<b>Broj gena u terminu</b>	<b>Broj ključnih gena</b>	<b><math>p</math> vrijednost</b>	<b>FDR</b>	<b>Termin</b>
<b>KEGG</b>	55	10	4.50E-07	0.000143	<i>Regulacija lipolize u adipocitima</i>
<b>KEGG</b>	74	9	5.13E-05	0.00816	<i>PPAR signalni put</i>
<b>BP</b>	126	12	6.58E-08	5.40E-05	<i>Metabolički proces triglicerida</i>
<b>BP</b>	246	13	1.52E-05	0.00623	<i>Regulacija procesa metabolizma lipida</i>
<b>BP</b>	751	24	2.70E-05	0.00738	<i>Odgovor na hormonski podražaj</i>

<b>BP</b>	680	22	5.00E-05	0.0103	<i>Regulacija razine tjelesnih tekućina</i>
<b>BP</b>	700	22	7.67E-05	0.0109	<i>Zarastanje rana</i>
<b>BP</b>	652	21	7.99E-05	0.0109	<i>Razvoj vaskulature</i>
<b>BP</b>	426	16	0.000105	0.0123	<i>Angiogeneza</i>
<b>BP</b>	199	10	0.000225	0.023	<i>Metabolički proces pričuve energije</i>
<b>BP</b>	564	18	0.000296	0.023	<i>Zgrušavanje krvi</i>
<b>BP</b>	568	18	0.000322	0.023	<i>Zgrušavanje</i>
<b>BP</b>	103	7	0.000332	0.023	<i>Homeostaza lipida</i>
<b>BP</b>	570	18	0.000336	0.023	<i>Hemostaza</i>
<b>BP</b>	177	9	0.000425	0.0268	<i>Razvojno sazrijevanje</i>
<b>CC</b>	518	20	9.30E-07	0.000209	<i>Površina stanice</i>
<b>CC</b>	1320	32	1.41E-05	0.00159	<i>Svojstveno plazma membrani</i>
<b>CC</b>	1270	30	4.25E-05	0.00306	<i>Sastavni dio plazma membrane</i>
<b>CC</b>	2320	45	5.44E-05	0.00306	<i>Dio plazma membrane</i>
<b>CC</b>	204	10	7.95E-05	0.00358	<i>Vanjska strana plazma membrane</i>
<b>CC</b>	189	8	0.00109	0.0317	<i>Receptorski kompleks</i>
<b>CC</b>	189	8	0.00109	0.0317	<i>Membranski splav</i>
<b>CC</b>	147	7	0.00113	0.0317	<i>Spoj stanica supstrat</i>
<b>CC</b>	346	11	0.00144	0.0359	<i>Spoj stanica stanice</i>
<b>CC</b>	162	7	0.00197	0.0421	<i>Bazolateralna plazma membrana</i>
<b>CC</b>	847	19	0.00219	0.0421	<i>Spoj stanica</i>
<b>CC</b>	123	6	0.00225	0.0421	<i>Kompleks apikalnog spoja</i>

Također je dobiveno ukupno 6907 diferencijalno eksprimiranih gena između raka vrata maternice i pripadajućeg normalnog tkiva, a od toga je 3593 gena bilo smanjeno eksprimirano, a 3314 povećano eksprimirano u raku vrata maternice u odnosu na normalno tkivo vrata maternice. WGCNA analizom su dobivena 362 smanjeno eksprimirana ključna gena, te jedan povećano eksprimirani ključni gen.

Kategorije genske ontologije kojima pripadaju smanjeno eksprimirani ključni geni u raku vrata maternice su: adhezija između stanica i izvanstaničnog matriksa, negativna regulacija stanične migracije, vezanje heparina, kalcijevih iona i glikozaminoglikana, dok su rezultati genske ontologije staničnog kompartmenta pokazali da većina gena pripada kompartmentu izvanstaničnog matriksa (**Tablica 7**).

Napravljena je i DE analiza između adenokarcinoma debelog crijeva i normalnog tkiva debelog crijeva. Kao rezultat DE analize dobivena su 5023 smanjeno eksprimirana gena, te 3423 povećano eksprimirana gena u raku debelog crijeva u odnosu na pripadajuće normalno tkivo. Napravljena je i WGCNA analiza analizirajući samo gene koji su diferencijalno eksprimirani, te su dobivena 441 ključna gena, od kojih je 298 smanjeno eksprimirano u adenokarcinomu debelog crijeva u odnosu na pripadajuće normalno tkivo.

Analizom Reactome puteva i genske ontologije dobiveno je da su obogaćene sljedeće genske kategorije u smanjeno eksprimiranim ključnim genima: cGMP učinci, regulacija mišićne kontrakcije, te aktinski citoskelet (**Tablica 8**).

**Tablica 7.** Analiza genske ontologije (GO) na smanjeno eksprimiranim ključnim genima između raka vrata maternice i pripadajućeg normalnog tkiva. Za svaki GO pojam prikazana je domena [biološki proces (BP), stanični kompartment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	$p$ vrijednost	FDR	Termin
BP	133	13	3.29E-05	0.0163	Negativna regulacija migracije stanica
BP	456	27	3.97E-05	0.0163	Regulacija migracije stanica
BP	444	25	0.000169	0.0337	Regulacija neurogeneze
BP	1840	71	0.000175	0.0337	Razvoj stanica
BP	159	13	0.000206	0.0337	Adhezija matrice stanica
BP	461	25	3.00E-04	0.041	Stanica: stanična adhezija
MF	130	13	2.25E-05	0.00534	Vezivanje heparina
MF	673	35	3.39E-05	0.00534	Vezanje iona kalcija
MF	178	15	4.13E-05	0.00534	Vezanje glikozaminoglikana
CC	1320	60	3.22E-08	5.67E-06	Dio izvanstanične regije
CC	398	28	5.04E-08	5.67E-06	Proteinski izvanstanični matriks
CC	570	33	3.19E-07	2.39E-05	Izvanstanični matriks
CC	901	41	6.05E-06	0.000341	Izvanstanični prostor
CC	518	25	0.000175	0.00786	Površina stanice
CC	1270	46	0.000423	0.0159	Sastavni dio plazma membrane
CC	1320	47	0.000558	0.0179	Svojstveno plazma membrani
CC	2860	86	0.000736	0.0207	Izvanstanična regija
CC	10	3	0.00109	0.0272	Apiko-lateralna plazma membrana

**Tablica 8.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na smanjeno eksprimiranim ključnim genima između adenokarcinoma debelog crijeva i pripadajućeg normalnog tkiva. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [Reactome, biološki proces (BP), stanični kompartment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	$p$ vrijednost	FDR	Termin
Reactome	21	8	1.75E-06	0.00239	<i>cGMP učinci</i>
Reactome	27	8	1.51E-05	0.0103	<i>Dušikov monoksid stimulira gvanilat ciklazu</i>
BP	127	15	6.19E-08	5.07E-05	<i>Regulacija mišićne kontrakcije</i>
MF	49	9	5.85E-07	0.000227	<i>Strukturni sastojak mišića</i>
CC	187	15	1.39E-06	0.000177	<i>Dio kontraktilnog vlakna</i>
CC	214	16	1.58E-06	0.000177	<i>Kontraktilno vlakno</i>
CC	197	15	2.67E-06	2.00E-04	<i>miofibril</i>
CC	163	13	7.53E-06	0.000424	<i>sarkomera</i>
CC	685	27	0.000106	0.00464	<i>Projekcija neurona</i>
CC	28	5	0.000124	0.00464	<i>Glikoproteinski kompleks povezan s distrofinom</i>
CC	847	29	0.000624	0.0201	<i>Spoj stanica</i>
CC	558	21	0.00112	0.0315	<i>Sinapsa</i>
CC	342	15	0.00131	0.0328	<i>dendrit</i>
CC	430	17	0.00196	0.0442	<i>Aktinski citoskelet</i>

Analiza genske ontologije, Reactome i KEGG puteva je pokazala da su zajedničke genske kategorije povećano eksprimiranim ključnim genima u raku debelog crijeva povezane s DNA replikacijom, staničnim ciklusom, produženjem i održavanjem telomera, sintezom DNA, održavanjem kromosoma, te odgovorom na podražaj koji oštećuje DNA. Sve značajne genske kategorije su prikazane na **Tablici 9**.

**Tablica 9.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na povećano eksprimiranim ključnim genima između adenokarcinoma debelog crijeva i pripadajućeg normalnog tkiva. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [KEGG, Reactome, biološki proces (BP), stanični kompartment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	$p$ vrijednost	FDR	Termin
KEGG	36	13	2.48E-14	7.89E-12	<i>replikacija DNK</i>
KEGG	105	13	5.08E-08	8.08E-06	<i>Biogeneza ribosoma u eukariota</i>
KEGG	23	5	5.00E-05	0.0053	<i>Popravak neusklađenosti</i>

<b>KEGG</b>	124	10	8.67E-05	0.00689	<i>Stanični ciklus</i>
<b>Reactome</b>	31	12	5.36E-13	7.30E-10	<i>Produljenje DNA lanca</i>
<b>Reactome</b>	41	10	8.80E-09	6.00E-06	<i>Aktivacija ATR-a kao odgovor na replikacijski stres</i>
<b>Reactome</b>	24	8	1.90E-08	8.31E-06	<i>Proširenje telomera</i>
<b>Reactome</b>	102	14	2.44E-08	8.31E-06	<i>Replikacija DNK</i>
<b>Reactome</b>	48	10	4.52E-08	1.23E-05	<i>Kontrolne točke G2/M</i>
<b>Reactome</b>	95	13	8.23E-08	1.87E-05	<i>Sinteza DNA</i>
<b>Reactome</b>	20	7	1.04E-07	2.03E-05	<i>Sinteza zaostalog lanca</i>
<b>Reactome</b>	22	7	2.22E-07	3.69E-05	<i>Sinteza C-lanca telomera (lagging Strand).</i>
<b>Reactome</b>	122	14	2.44E-07	3.69E-05	<i>S faza</i>
<b>Reactome</b>	411	25	1.40E-06	0.00019	<i>Stanični ciklus, mitotički</i>
<b>Reactome</b>	11	5	1.69E-06	0.000209	<i>Odmotavanje DNK</i>
<b>Reactome</b>	508	28	2.13E-06	0.000242	<i>Stanični ciklus</i>
<b>Reactome</b>	32	7	3.66E-06	0.000384	<i>Aktivacija pred-replikativnog kompleksa</i>
<b>Reactome</b>	14	5	6.96E-06	0.000593	<i>Vodeća sinteza niti</i>
<b>Reactome</b>	14	5	6.96E-06	0.000593	<i>Prebacivanje polimeraze</i>
<b>Reactome</b>	14	5	6.96E-06	0.000593	<i>Prebacivanje polimeraze na C-lanac telomera</i>
<b>Reactome</b>	266	18	1.17E-05	0.00094	<i>Mitotske M-M/G1 faze</i>
<b>Reactome</b>	131	12	1.95E-05	0.00148	<i>Kontrolne točke staničnog ciklusa</i>
<b>Reactome</b>	9	4	2.27E-05	0.00163	<i>Savijanje aktina s pomoću CCT/TriC</i>
<b>Reactome</b>	11	4	5.76E-05	0.00393	<i>Biosinteza purin ribonukleozid monofosfata</i>
<b>Reactome</b>	72	8	0.00013	0.00846	<i>Održavanje telomera</i>
<b>Reactome</b>	14	4	0.000166	0.0103	<i>Uklanjanje intermedijera režnja</i>
<b>Reactome</b>	15	4	0.000223	0.0122	<i>Sinteza na zaostaloj niti</i>
<b>Reactome</b>	15	4	0.000223	0.0122	<i>Sinteza popravka patcha dugačkog ~27-30 baza pomoću DNA polimeraze</i>
<b>Reactome</b>	15	4	0.000223	0.0122	<i>Sinteza popravka za popunjavanje praznina pomoću DNA polimeraze u TC-NER</i>
<b>Reactome</b>	80	8	0.000274	0.0137	<i>Pre-inicijacija replikacije DNA</i>
<b>Reactome</b>	80	8	0.000274	0.0137	<i>Prijelaz M/G1</i>
<b>Reactome</b>	16	4	0.000293	0.0137	<i>Sinteza popravka DNA za popunjavanje praznina i ligacija u GG-NER</i>
<b>Reactome</b>	16	4	0.000293	0.0137	<i>Sinteza popravka DNA za popunjavanje praznina i ligacija u TC-NER</i>
<b>Reactome</b>	113	9	0.000631	0.0287	<i>G1/S Prijelaz</i>
<b>Reactome</b>	140	10	0.00075	0.033	<i>Mitotske G1-G1/S faze</i>
<b>Reactome</b>	117	9	0.000813	0.0346	<i>Popravak DNK</i>
<b>Reactome</b>	10	3	0.00101	0.0418	<i>Uklanjanje režnja intermedijera iz C-lanca</i>
<b>Reactome</b>	124	9	0.00123	0.0494	<i>Održavanje kromosoma</i>
<b>Reactome</b>	23	4	0.00127	0.0494	<i>Formiranje intermedijera savijanja tubulina pomoću CCT/TriC</i>
<b>BP</b>	166	19	3.25E-15	2.67E-12	<i>Biogeneza ribosoma</i>
<b>BP</b>	968	39	1.88E-14	4.60E-12	<i>Mitotski stanični ciklus</i>
<b>BP</b>	1070	41	2.00E-14	4.60E-12	<i>Faza staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	269	22	2.25E-14	4.60E-12	<i>Biogeneza ribonukleoproteinskog kompleksa</i>
<b>BP</b>	153	17	1.67E-13	2.73E-11	<i>S faza</i>
<b>BP</b>	1420	44	2.36E-12	3.23E-10	<i>Proces staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	144	15	1.23E-11	1.44E-09	<i>S faza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	121	14	1.46E-11	1.50E-09	<i>DNA ovisna replikacija DNA</i>

<b>BP</b>	109	13	5.48E-11	4.99E-09	<i>Obrada RRNA</i>
<b>BP</b>	1860	48	1.36E-10	1.11E-08	<i>Stanični ciklus</i>
<b>BP</b>	118	13	1.51E-10	1.13E-08	<i>RRNA metabolički proces</i>
<b>BP</b>	346	20	2.13E-10	1.45E-08	<i>replikacija DNK</i>
<b>BP</b>	443	22	4.47E-10	2.82E-08	<i>Interfaza</i>
<b>BP</b>	435	21	1.93E-09	1.13E-07	<i>Interfaza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	420	20	6.14E-09	3.36E-07	<i>Mitoza</i>
<b>BP</b>	886	29	9.84E-09	5.04E-07	<i>Regulacija staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	30	7	1.39E-08	6.70E-07	<i>Inicijacija replikacije DNA</i>
<b>BP</b>	447	20	1.75E-08	7.99E-07	<i>M faza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	281	15	1.28E-07	5.53E-06	<i>Kontrolna točka staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	507	20	1.39E-07	5.70E-06	<i>Dijeljenje stanica</i>
<b>BP</b>	247	14	1.66E-07	6.47E-06	<i>rekombinacija DNA</i>
<b>BP</b>	671	23	1.85E-07	6.90E-06	<i>M faza</i>
<b>BP</b>	428	18	2.43E-07	8.67E-06	<i>Zaustavljanje staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	890	26	5.99E-07	2.05E-05	<i>obrada RNA</i>
<b>BP</b>	520	19	9.39E-07	3.08E-05	<i>Negativna regulacija staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	1240	30	4.01E-06	0.000127	<i>DNA metabolički proces</i>
<b>BP</b>	209	11	7.54E-06	0.000229	<i>G1/S prijelaz mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	862	23	1.31E-05	0.000382	<i>Odgovor na podražaj oštećenja DNK</i>
<b>BP</b>	54	6	1.51E-05	0.000428	<i>Mitotička sestrinska segregacija kromatida</i>
<b>BP</b>	57	6	2.07E-05	0.000567	<i>Segregacija sestrinskih kromatida</i>
<b>BP</b>	538	17	2.45E-05	0.000649	<i>popravak DNK</i>
<b>BP</b>	92	7	3.58E-05	0.000917	<i>Organizacija vretena</i>
<b>BP</b>	878	22	5.34E-05	0.00133	<i>Organizacija kromosoma</i>
<b>BP</b>	174	9	5.98E-05	0.00144	<i>Odvajanje kromosoma</i>
<b>BP</b>	337	12	0.000136	0.00319	<i>Organizacija citoskeleta mikrotubula</i>
<b>BP</b>	84	6	0.000186	0.00425	<i>TRNA obrada</i>
<b>BP</b>	173	7	0.00171	0.0379	<i>TRNA metabolički proces</i>
<b>MF</b>	1490	33	5.35E-06	0.000937	<i>vezanje ATP-a</i>
<b>MF</b>	176	10	9.08E-06	0.000937	<i>Aktivnost helikaze</i>
<b>MF</b>	1530	33	9.14E-06	0.000937	<i>Vezanje adenil ribonukleotida</i>
<b>MF</b>	1530	33	9.66E-06	0.000937	<i>Vezanje adenil nukleotida</i>
<b>MF</b>	1890	36	5.46E-05	0.00377	<i>Vezanje purinskih ribonukleotida</i>
<b>MF</b>	1900	36	5.83E-05	0.00377	<i>Vezanje purinskih nukleotida</i>
<b>MF</b>	976	23	7.40E-05	0.0041	<i>vezanje RNA</i>
<b>MF</b>	80	6	0.000132	0.00642	<i>DNA ovisna aktivnost ATPaze</i>
<b>MF</b>	54	5	0.000182	0.00783	<i>Aktivnost DNA helikaze</i>
<b>MF</b>	135	7	0.000366	0.0142	<i>Aktivnost nukleotidiltransferaze</i>
<b>MF</b>	44	4	0.000887	0.0313	<i>Aktivnost RNA polimeraze</i>
<b>MF</b>	888	19	0.00108	0.0348	<i>Aktivnost nukleozid-trifosfataze</i>
<b>MF</b>	2470	39	0.00125	0.0372	<i>Vezanje nukleotida</i>
<b>MF</b>	86	5	0.00156	0.0431	<i>Aktivnost ribonukleaze</i>
<b>CC</b>	2690	72	1.11E-21	2.49E-19	<i>Nuklearni lumen</i>
<b>CC</b>	652	37	1.16E-20	1.30E-18	<i>Jezgrica</i>
<b>CC</b>	3330	77	1.33E-19	9.99E-18	<i>Nuklearni dio</i>

CC	3440	76	4.69E-18	2.64E-16	<i>Membrana zatvoreni lumen</i>
CC	3380	75	7.57E-18	3.41E-16	<i>Lumen organela</i>
CC	3940	81	1.12E-17	3.59E-16	<i>Organela ne omeđena membranom</i>
CC	3940	81	1.12E-17	3.59E-16	<i>Intracelularna organela koja nije ograničena membranom</i>
CC	1820	43	2.61E-10	7.34E-09	<i>Nukleoplazma</i>
CC	784	27	4.52E-10	1.13E-08	<i>Kromosom</i>
CC	670	24	2.23E-09	5.02E-08	<i>Kromosomski dio</i>
CC	30	7	4.85E-09	9.15E-08	<i>Nukleolarni dio</i>
CC	7600	99	4.88E-09	9.15E-08	<i>Jezgra</i>
CC	4800	72	2.77E-08	4.79E-07	<i>Makromolekulski kompleks</i>
CC	193	12	9.65E-08	1.55E-06	<i>Kondenzirani kromosom</i>
CC	50	7	2.06E-07	3.10E-06	<i>Replikacijska vilica</i>
CC	8620	103	2.81E-07	3.95E-06	<i>Dio unutarstaničnih organela</i>
CC	681	21	3.14E-07	4.16E-06	<i>Ribonukleoproteinski kompleks</i>
CC	8790	103	9.89E-07	1.24E-05	<i>Dio organela</i>
CC	261	10	8.09E-05	0.000958	<i>Vreteno</i>
CC	4050	55	9.02E-05	0.000989	<i>Proteinski kompleks</i>
CC	86	6	9.23E-05	0.000989	<i>Nuklearna pora</i>
CC	103	6	0.000249	0.00255	<i>Kompleks pora</i>
CC	198	8	0.000297	0.0029	<i>Kromosom, centromerna regija</i>
CC	387	11	0.000483	0.00453	<i>Nuklearni omotač</i>
CC	1120	21	0.000508	0.00457	<i>Citoskelet mikrotubula</i>
CC	320	9	0.0017	0.014	<i>Nuklearni kromosom</i>
CC	101	5	0.00172	0.014	<i>Vretenasti stup</i>
CC	149	6	0.00174	0.014	<i>Kinetohora</i>
CC	326	9	0.00193	0.0149	<i>Kromatin</i>
CC	40	3	0.00475	0.0356	<i>Mali nuklearni ribonukleoproteinski kompleks</i>

Diferencijalno ekspresijska genska analiza napravljena je i između karcinoma bubrega kromofobnog tipa i normalnog tkiva bubrega. DE analizom dobivena su 4830 smanjeno eksprimirana gena i 2693 povećano eksprimirana gena u karcinomu bubrega kromofobnog tipa u odnosu na pripadajuće normalno tkivo. WGCNA analizom dobivena su 633 ključna gena povezana s malignim fenotipom, od kojih je 581 gen smanjeno eksprimiran u karcinomu bubrega kromofobnog tipa u odnosu na pripadajuće normalno tkivo.

Analizom KEGG i Reactome puteva, te genske ontologije smanjeno eksprimiranih ključnih gena nisu dobivene statistički značajne genske kategorije.

Jedna od zajedničkih genskih kategorija povećano eksprimiranim ključnim genima je oksidativna fosforilacija, te je se većina povećano eksprimiranih ključnih gena nalazila u mitohondrijskom staničnom kompartmentu (**Tablica 10**).

**Tablica 10.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na povećano eksprimiranim ključnim genima između karcinoma bubrega kromofobnog tipa i normalnog tkiva bubrega. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [KEGG, stanični kompartment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	$p$ vrijednost	FDR	Termin
KEGG	133	9	1.97E-07	6.25E-05	Oksidativne fosforilacije
KEGG	142	6	0.000349	0.0479	Parkinsonova bolest
KEGG	149	6	0.000452	0.0479	Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD)
MF	109	6	2.43E-06	0.000944	Aktivnost transmembranskog transportera vodikovih iona
CC	504	8	0.000154	0.017	Unutarnja membrana mitohondrija
CC	684	9	0.000236	0.017	Mitohondrijska membrana
CC	537	8	0.000238	0.017	Unutarnja membrana organela
CC	2060	16	0.000357	0.017	Mitohondrij
CC	729	9	0.000378	0.017	Mitohondrijska ovojnica
CC	116	4	0.000466	0.0175	Mitohondrijski respiratorni lanac
CC	217	5	0.000564	0.0181	Dio mitohondrijske membrane
CC	1040	10	0.0012	0.0337	Mitohondrijski dio
CC	80	3	0.00199	0.0433	Protonski transportni dvosektorski kompleks ATPaze
CC	1110	10	0.00205	0.0433	Membrana organela
CC	1130	10	0.00225	0.0433	Membrana
CC	89	3	0.00269	0.0433	Kompleks dišnog lanca mitohondrija I
CC	89	3	0.00269	0.0433	kompleks NADH dehidrogenaze
CC	89	3	0.00269	0.0433	Kompleks dišnog lanca I

Napravljena je i DE analiza između karcinoma bubrega svijetlih stanica i normalnog tkiva bubrega. Kao rezultat dobiveno je 5863 diferencijalno eksprimiranih gena, od kojih je 3393 smanjeno eksprimirano. Napravljena je i WGCNA analiza, gdje su DE geni služili kao ulazni podaci, te su dobivena 148 ključna gena povezana s malignim fenotipom, od kojih su svi geni bili smanjeno eksprimirani u karcinomu bubrega svijetlih stanica u odnosu na normalno tkivo bubrega. Napravljena su i analize genske ontologije te Reactome i KEGG puteva za smanjeno eksprimirane ključne gene i nisu dobiveni statistički značajni rezultati ni za jednu od kategorija.

DE analiza je napravljena između papilarnog karcinoma bubrega i normalnog tkiva bubrega, te su dobivena 5443 diferencijalno eksprimirana gena, od kojih je 3589 gena bilo smanjeno eksprimirano u tumorskom tkivu u odnosu na normalno tkivo. WGCNA analiza je



napravljena na svim diferencijalno eksprimiranim genima, te su dobivena 204 ključna gena povezana s malignim fenotipom, te su svi ključni geni bili smanjeno eksprimirani u papilarnom karcinomu bubrega u odnosu na normalno tkivo bubrega. Napravljene su i analize genske ontologije za smanjeno eksprimirane ključne gene te nisu dobiveni statistički značajni rezultati.

Napravljena je DE analiza između hepatocelularnog karcinoma jetre i normalnog tkiva jetre iz GTEX baze podataka. Ukupno je 5515 gena bilo diferencijalno eksprimirano, od čega je 2441 gen bio smanjeno eksprimiran u hepatocelularnom karcinomu jetre u odnosu na pripadajuće normalno tkivo. WGCNA analizom diferencijalno eksprimiranih gena dobivena su 74 ključna gena povezana s malignim fenotipom, od kojih je 61 gen bio smanjeno eksprimiran u hepatocelularnom karcinomu jetre u odnosu na normalno tkivo jetre.

Neke od genskih kategorija koje su zajedničke smanjeno eksprimiranim ključnim genima u hepatocelularnom karcinomu jetre su PPAR signalni put, razgradnja masnih kiselina, vezanje koenzima, dok je analiza staničnog kompartimenta pokazala da većina tih gena se nalazi u izvanstaničnom prostoru. Analizom genske ontologije na povećano eksprimiranim ključnim genima nisu dobiveni značajni rezultati (**Tablica 11**).

**Tablica 11.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na smanjeno eksprimiranim ključnim genima između hepatocelularnog karcinoma jetre i normalnog tkiva jetre. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [KEGG, biološki proces (BP), stanični kompartment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	$p$ vrijednost	FDR	Termin
KEGG	44	5	2.21E-05	0.00703	Razgradnja masnih kiselina
KEGG	74	5	0.000274	0.0435	PPAR signalni put
BP	166	7	6.48E-06	0.00532	Stanični katabolički proces aminokiselina
BP	567	11	2.40E-05	0.00984	Metabolički proces monokarboksilne kiseline
BP	1270	16	6.19E-05	0.0169	Proces metabolizma karboksilne kiseline
BP	1430	16	0.000237	0.0487	Metabolički proces organske kiseline
MF	271	9	1.83E-06	0.000708	Kofaktorsko vezanje
MF	188	7	1.34E-05	0.00176	Vezanje koenzima
MF	1010	15	1.36E-05	0.00176	Aktivnost oksidoreduktaze
MF	193	6	0.000157	0.0152	Aktivnost transferaze, prijenos acilnih skupina osim amino-acilnih skupina
CC	271	9	1.83E-06	0.000708	Kofaktorsko vezanje
CC	188	7	1.34E-05	0.00176	Vezanje koenzima
CC	1010	15	1.36E-05	0.00176	Aktivnost oksidoreduktaze

CC	193	6	0.000157	0.0152	Aktivnost transferaze, prijenos acilnih skupina osim amino-acilnih skupina
----	-----	---	----------	--------	--

Diferencijalno ekspresijska genska analiza napravljena je između adenokarcinoma pluća i normalnih uzoraka pluća iz GTEx baze podataka, te su dobivena 7283 DE gena od kojih je 3817 gena bilo smanjeno eksprimirano. Na DE genima je napravljena WGCNA analiza, te su dobivena 174 ključna gena povezana s malignim fenotipom, od kojih je 117 bilo smanjeno eksprimirano. Analizom genske ontologije na smanjeno eksprimiranim ključnim genima nisu dobiveni značajni rezultati. Analiza genske ontologije na povećano eksprimiranim ključnim genima pokazala je da su sljedeće kategorije i procesi obogaćeni: DNA replikacija, faze staničnog ciklusa, dijeljenje stanica, vezanje ATP-a i tubulina, organizacija kromatina, citoskeleta, diobenog vretena i kromosoma. Sve značajne kategorije su prikazane na **Tablici 12**.

**Tablica 12.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na povećano eksprimiranim ključnim genima između adenokarcinoma pluća i pripadajućeg normalnog tkiva. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [KEGG, Reactome, biološki proces (BP), stanični kompartiment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam,  $p$  vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	$p$ vrijednost	FDR	Termin
KEGG	124	9	0.000000245	0.000078	Stanični ciklus
Reactome	508	21	3.44E-10	0.000000325	Stanični ciklus
Reactome	411	19	4.77E-10	0.000000325	Stanični ciklus, mitotički
Reactome	266	15	3.35E-09	0.00000152	Mitotske M-M/G1 faze
Reactome	127	11	6.7E-09	0.00000228	Mitotička Prometafaža
Reactome	118	10	4.35E-08	0.0000116	Rezolucija kohezije sestrinskih kromatida
Reactome	233	13	0.000000051	0.0000116	M faza
Reactome	186	10	0.00000306	0.000596	Odvajanje sestrinskih kromatida
Reactome	14	4	0.00000448	0.000722	Događaji povezani s ciklinom A/B1 tijekom prijelaza G2/M
Reactome	198	10	0.00000537	0.000722	Mitotička anafaza
Reactome	199	10	0.00000562	0.000722	Mitotička metafaza i anafaza
Reactome	5	3	0.00000583	0.000722	Chk1/Chk2(Cds1) posredovana inaktivacija kompleksa ciklin B:Cdk1
Reactome	89	7	0.00000907	0.000951	APC/C-posredovana razgradnja proteina staničnog ciklusa
Reactome	89	7	0.00000907	0.000951	Regulacija mitotskog staničnog ciklusa
Reactome	6	3	0.0000116	0.00113	Fosforilacija Emi1

<b>Reactome</b>	131	8	0.0000131	0.00119	<i>Kontrolne točke staničnog ciklusa</i>
<b>Reactome</b>	48	5	0.0000491	0.00418	<i>Kontrolne točke G2/M</i>
<b>Reactome</b>	84	6	0.0000719	0.00577	<i>Regulacija APC/C aktivatora između G1/S i rane anafaze</i>
<b>Reactome</b>	12	3	0.000123	0.00931	<i>G2/M Kontrolna točka oštećenja DNK</i>
<b>Reactome</b>	41	4	0.000382	0.026	<i>Aktivacija ATR-a kao odgovor na replikacijski stres</i>
<b>Reactome</b>	41	4	0.000382	0.026	<i>Kinezini</i>
<b>Reactome</b>	4	2	0.000425	0.0276	<i>Polo-slični događaji posredovani kinazom</i>
<b>Reactome</b>	77	5	0.000469	0.0291	<i>Aktivacija APC/C i APC/C:Cdc20 posredovane razgradnje mitotičkih proteina</i>
<b>BP</b>	1070	39	6.12E-31	5.02E-28	<i>Faza staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	968	37	9.4E-30	3.85E-27	<i>Mitotski stanični ciklus</i>
<b>BP</b>	671	32	5E-28	1.37E-25	<i>M faza</i>
<b>BP</b>	1420	40	1.07E-27	2.19E-25	<i>Proces staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	447	27	6.43E-26	9.55E-24	<i>M faza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	507	28	6.99E-26	9.55E-24	<i>Dijeljenje stanica</i>
<b>BP</b>	420	26	3.68E-25	4.31E-23	<i>Mitoza</i>
<b>BP</b>	1860	41	2.32E-24	2.38E-22	<i>Stanični ciklus</i>
<b>BP</b>	2820	39	1.78E-15	1.62E-13	<i>Organizacija organela</i>
<b>BP</b>	516	20	3.46E-15	2.84E-13	<i>Proces temeljen na mikrotubulama</i>
<b>BP</b>	174	13	1.27E-13	9.45E-12	<i>Odvajanje kromosoma</i>
<b>BP</b>	443	17	7.45E-13	5.09E-11	<i>Interfaza</i>
<b>BP</b>	337	15	2.57E-12	1.62E-10	<i>Organizacija citoskeleta mikrotubula</i>
<b>BP</b>	281	14	3.38E-12	1.98E-10	<i>Kontrolna točka staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	435	16	7.64E-12	4.17E-10	<i>Interfaza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	351	14	6.67E-11	3.42E-09	<i>Regulacija mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	428	15	7.67E-11	3.53E-09	<i>Zaustavljanje staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	886	20	7.74E-11	3.53E-09	<i>Regulacija staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	878	19	5.44E-10	2.35E-08	<i>Organizacija kromosoma</i>
<b>BP</b>	520	15	1.15E-09	0.000000047	<i>Negativna regulacija staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	57	7	2.49E-09	9.72E-08	<i>Segregacija sestrinskih kromatida</i>
<b>BP</b>	92	8	2.77E-09	0.000000103	<i>Organizacija vretena</i>
<b>BP</b>	99	8	4.98E-09	0.000000178	<i>Regulacija mitoze</i>
<b>BP</b>	149	9	6.72E-09	0.000000023	<i>Kontrolna točka mitotičkog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	150	9	7.13E-09	0.000000234	<i>G2/M prijelaz mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	54	6	6.85E-08	0.00000216	<i>Mitotička sestrinska segregacija kromatida</i>
<b>BP</b>	120	7	0.000000462	0.000014	<i>Citokineza</i>
<b>BP</b>	40	5	0.0000005	0.0000146	<i>Organizacija mitotskog vretena</i>
<b>BP</b>	153	7	0.00000238	0.0000672	<i>S faza</i>
<b>BP</b>	589	12	0.00000278	0.000076	<i>Regulacija organizacije organela</i>
<b>BP</b>	1240	17	0.00000417	0.00011	<i>DNA metabolički proces</i>
<b>BP</b>	980	15	0.00000452	0.000116	<i>Organizacija citoskeleta</i>
<b>BP</b>	172	7	0.00000516	0.000128	<i>DNK pakiranje</i>
<b>BP</b>	112	6	0.00000531	0.000128	<i>Održavanje lokacije u ćeliji</i>
<b>BP</b>	34	4	0.00000965	0.000226	<i>Kondenzacija kromosoma</i>
<b>BP</b>	101	5	0.00005	0.00114	<i>Održavanje položaja proteina u stanici</i>
<b>BP</b>	179	6	0.000076	0.00168	<i>Kretanje temeljeno na mikrotubulama</i>

<b>BP</b>	111	5	0.0000785	0.00169	<i>Remodeliranje kromatina</i>
<b>BP</b>	116	5	0.0000967	0.00203	<i>Održavanje lokacije proteina</i>
<b>BP</b>	192	6	0.000112	0.00229	<i>Održavanje lokacije</i>
<b>BP</b>	70	4	0.000172	0.00343	<i>Organizacija centrosoma</i>
<b>BP</b>	512	9	0.000176	0.00344	<i>Modifikacija kromatina</i>
<b>BP</b>	74	4	0.000213	0.00406	<i>Organizacija centra za organiziranje mikrotubula</i>
<b>BP</b>	143	5	0.000258	0.00481	<i>Kontrolna točka oštećenja DNK</i>
<b>BP</b>	144	5	0.000266	0.00486	<i>S faza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	148	5	0.000303	0.00539	<i>Signalizacija posredovana fosfatidilinozitolom</i>
<b>BP</b>	152	5	0.000342	0.00597	<i>Kontrolna točka integriteta DNK</i>
<b>BP</b>	346	7	0.000429	0.00715	<i>replikacija DNK</i>
<b>BP</b>	89	4	0.000432	0.00715	<i>Regulacija aktivnosti protein kinaze ovisne o ciklinu</i>
<b>BP</b>	247	6	0.000436	0.00715	<i>rekombinacija DNA</i>
<b>BP</b>	183	5	0.000797	0.0128	<i>Mejotički stanični ciklus</i>
<b>BP</b>	47	3	0.000862	0.0134	<i>Centrosomski ciklus</i>
<b>BP</b>	637	9	0.000869	0.0134	<i>Organizacija kromatina</i>
<b>BP</b>	306	6	0.00133	0.0202	<i>Regulacija organizacije citoskeleta</i>
<b>BP</b>	121	4	0.00137	0.0204	<i>DNA ovisna replikacija DNA</i>
<b>BP</b>	59	3	0.00167	0.0245	<i>Polimerizacija ili depolimerizacija mikrotubula</i>
<b>BP</b>	862	10	0.00197	0.0283	<i>Odgovor na podražaj oštećenja DNK</i>
<b>BP</b>	143	4	0.00252	0.0356	<i>Sklop kompleksa protein DNA</i>
<b>BP</b>	152	4	0.00314	0.0436	<i>Sastavljanje ili rastavljanje kromatina</i>
<b>MF</b>	75	6	0.000000464	0.00018	<i>Motorna aktivnost mikrotubula</i>
<b>MF</b>	1490	19	0.00000207	0.000305	<i>vezanje ATP-a</i>
<b>MF</b>	1530	19	0.00000302	0.000305	<i>Vezanje adenil ribonukleotida</i>
<b>MF</b>	1530	19	0.00000315	0.000305	<i>Vezanje adenil nukleotida</i>
<b>MF</b>	143	6	0.00002	0.00155	<i>Motorna aktivnost</i>
<b>MF</b>	1890	19	0.0000672	0.00389	<i>Vezanje purinskih ribonukleotida</i>
<b>MF</b>	1900	19	0.0000702	0.00389	<i>Vezanje purinskih nukleotida</i>
<b>MF</b>	115	5	0.0000872	0.00423	<i>Vezivanje mikrotubula</i>
<b>MF</b>	376	8	0.000104	0.00449	<i>Vezanje protein kinaze</i>
<b>MF</b>	418	8	0.000216	0.00837	<i>Vezanje kinaze</i>
<b>MF</b>	888	11	0.000593	0.0203	<i>Aktivnost nukleozid-trifosfataze</i>
<b>MF</b>	1200	13	0.000629	0.0203	<i>Vezanje enzima</i>
<b>MF</b>	180	5	0.000697	0.0208	<i>Vezanje tubulina</i>
<b>MF</b>	938	11	0.000935	0.0255	<i>Aktivnost pirofosfataze</i>
<b>MF</b>	944	11	0.000985	0.0255	<i>Aktivnost hidrolaze, djelovanje na anhidride kiselina</i>
<b>MF</b>	338	6	0.00206	0.0478	<i>Vezanje kromatina</i>
<b>MF</b>	2470	19	0.0021	0.0478	<i>Vezanje nukleotida</i>
<b>CC</b>	261	18	3.19E-19	7.18E-17	<i>Vreteno</i>
<b>CC</b>	198	16	3.21E-18	3.62E-16	<i>Kromosom, centromerna regija</i>
<b>CC</b>	1120	27	3.05E-17	2.29E-15	<i>Citoskelet mikrotubula</i>
<b>CC</b>	193	15	7.49E-17	4.21E-15	<i>Kondenzirani kromosom</i>
<b>CC</b>	784	23	2.48E-16	1.11E-14	<i>Kromosom</i>

CC	670	21	1.96E-15	7.33E-14	<i>Kromosomski dio</i>
CC	149	12	8.31E-14	2.67E-12	<i>Kinetohora</i>
CC	1570	26	1.25E-12	3.51E-11	<i>Citoskeletni dio</i>
CC	101	10	1.44E-12	3.6E-11	<i>Vretenasti stup</i>
CC	3940	38	6.49E-12	1.33E-10	<i>Organela ne-omeđena membranom</i>
CC	3940	38	6.49E-12	1.33E-10	<i>Intracelularna organela koja nije ograničena membranom</i>
CC	352	13	1.41E-10	2.64E-09	<i>mikrotubula</i>
CC	2200	27	3.82E-10	6.6E-09	<i>Citoskelet</i>
CC	73	7	5.11E-09	8.21E-08	<i>Kondenzirani nuklearni kromosom</i>
CC	43	6	6.74E-09	9.76E-08	<i>Vretenasta mikrotubula</i>
CC	2690	28	6.94E-09	9.76E-08	<i>Nuklearni lumen</i>
CC	141	8	0.00000025	0.000000331	<i>Kompleks povezan s mikrotubulama</i>
CC	320	10	0.000000115	0.00000143	<i>Nuklearni kromosom</i>
CC	4050	32	0.000000258	0.00000302	<i>Proteinski kompleks</i>
CC	3380	29	0.000000269	0.00000302	<i>Lumen organela</i>
CC	3440	29	0.000000395	0.00000423	<i>Membrana zatvoreni lumen</i>
CC	3330	28	0.000000776	0.00000794	<i>Nuklearni dio</i>
CC	4800	34	0.00000113	0.000011	<i>Makromolekulski kompleks</i>
CC	8620	47	0.00000124	0.0000116	<i>Dio unutarstaničnih organela</i>
CC	543	11	0.00000188	0.0000169	<i>Centar za organiziranje mikrotubula</i>
CC	8790	47	0.0000026	0.0000225	<i>Dio organela</i>
CC	273	8	0.00000385	0.0000321	<i>Nuklearni dio kromosoma</i>
CC	412	9	0.00000992	0.0000797	<i>Centrosom</i>
CC	2660	22	0.0000319	0.000247	<i>Cytosol</i>
CC	1820	17	0.0000824	0.000618	<i>Nukleoplazma</i>
CC	7600	40	0.000152	0.0011	<i>Jezgra</i>
CC	100	4	0.000377	0.00265	<i>Središnji dio za organiziranje mikrotubula</i>
CC	652	8	0.00159	0.0109	<i>Jezgrica</i>
CC	24	2	0.00302	0.02	<i>Kinezinski kompleks</i>
CC	26	2	0.00354	0.0228	<i>Kompleks nuklearne ubikvitin ligaze</i>
CC	326	5	0.00506	0.0316	<i>Kromatin</i>

Diferencijalno ekspresijska analiza napravljena je i između adenokarcinoma prostate i normalnog tkiva prostate iz GTEx baze podataka. Dobiveno je 6970 diferencijalno eksprimiranih gena, od kojih je 4728 bilo smanjeno eksprimirano u adenokarcinomu prostate u odnosu na normalno tkivo prostate. WGCNA analizom na diferencijalno eksprimiranim genima dobivena su 104 ključna gena povezana s malignim fenotipom, te su svi ključni geni bili smanjeno eksprimirani u adenokarcinomu prostate u odnosu na pripadajuće normalno tkivo. Napravljena je i analiza genske ontologije te nisu dobiveni značajni rezultati.

Diferencijalno ekspresijska analiza napravljena je između adenokarcinoma želuca i uzoraka normalnog tkiva želuca iz GTEx baze podataka. Dobiveno je ukupno 6464

diferencijalno eksprimiranih gena od kojih je 2663 bilo smanjeno eksprimirano. WGCNA analizom na diferencijalno eksprimiranim genima dobivena su 72 ključna gena povezana s malignim fenotipom, od kojih je 11 bilo smanjeno eksprimirano. Analiza genske ontologije te Reactome i KEGG puteva pokazala je da povećano eksprimirani ključni geni pripadaju kategorijama staničnog ciklusa, DNA replikacije i rekombinacije, organizaciji diobenog vretena i kromosoma. Svi statistički značajni putevi prikazani su na **Tablici 13**.

**Tablica 13.** Analiza puteva i genske ontologije (GO) na povećano eksprimiranim ključnim genima između adenokarcinoma želuca i normalnog tkiva želuca. Za svaku kategoriju i GO pojam prikazana je domena [KEGG, Reactome, biološki proces (BP), stanični kompartment (CC), molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u pojam, broj ključnih gena uključenih u pojam, p vrijednost, te FDR.

Domena	Broj gena u terminu	Broj ključnih gena	p vrijednost	FDR	Termin
KEGG	124	10	2.97E-08	9.46E-06	<i>Stanični ciklus</i>
Reactome	266	20	5.01E-14	6.82E-11	<i>Mitotske M-M/G1 faze</i>
Reactome	127	15	1.72E-13	8.67E-11	<i>Mitotička Prometafaza</i>
Reactome	411	23	2.20E-13	8.67E-11	<i>Stanični ciklus, mitotički</i>
Reactome	508	25	2.54E-13	8.67E-11	<i>Stanični ciklus</i>
Reactome	233	16	1.10E-10	3.01E-08	<i>M faza</i>
Reactome	118	12	3.61E-10	8.21E-08	<i>Rezolucija kohezije sestrinskih kromatida</i>
Reactome	199	12	1.41E-07	2.74E-05	<i>Mitotička metafaza i anafaza</i>
Reactome	48	7	1.83E-07	3.11E-05	<i>Kontrolne točke G2/M</i>
Reactome	186	11	6.08E-07	9.21E-05	<i>Odvajanje sestrinskih kromatida</i>
Reactome	198	11	1.13E-06	1.55E-04	<i>Mitotička anafaza</i>
Reactome	41	6	1.44E-06	1.78E-04	<i>Aktivacija ATR-a kao odgovor na replikacijski stres</i>
Reactome	131	9	2.07E-06	2.36E-04	<i>Kontrolne točke staničnog ciklusa</i>
Reactome	12	4	2.76E-06	2.90E-04	<i>Kondenzacija kromosoma Prometafaze</i>
Reactome	32	4	1.76E-04	1.71E-02	<i>Aktivacija predreplikativnog kompleksa</i>
Reactome	102	6	2.82E-04	2.56E-02	<i>Replikacija DNK</i>
Reactome	71	5	4.09E-04	3.28E-02	<i>Uklanjanje faktora licenciranja iz izvora</i>
Reactome	71	5	4.09E-04	3.28E-02	<i>Regulacija replikacije DNA</i>
Reactome	41	4	4.66E-04	3.51E-02	<i>Kinezini</i>
Reactome	113	6	4.89E-04	3.51E-02	<i>G1/S Prijelaz</i>
BP	1070	43	2.27E-35	1.86E-32	<i>Faza staničnog ciklusa</i>
BP	671	36	7.62E-33	3.12E-30	<i>M faza</i>
BP	420	31	5.74E-32	1.57E-29	<i>Mitoza</i>
BP	1420	44	1.09E-31	2.24E-29	<i>Proces staničnog ciklusa</i>
BP	968	39	2.48E-31	4.06E-29	<i>Mitotski stanični ciklus</i>
BP	447	31	4.02E-31	5.50E-29	<i>M faza mitotskog staničnog ciklusa</i>
BP	1860	46	3.06E-29	3.59E-27	<i>Stanični ciklus</i>

<b>BP</b>	507	25	5.15E-21	5.28E-19	<i>Dijeljenje stanica</i>
<b>BP</b>	2820	40	3.07E-15	2.80E-13	<i>Organizacija organela</i>
<b>BP</b>	174	14	9.92E-15	8.14E-13	<i>Odvajanje kromosoma</i>
<b>BP</b>	886	23	3.31E-13	2.46E-11	<i>Regulacija staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	516	18	1.84E-12	1.26E-10	<i>Proces temeljen na mikrotubulama</i>
<b>BP</b>	281	14	7.24E-12	4.57E-10	<i>Kontrolna točka staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	428	16	1.42E-11	8.33E-10	<i>Zaustavljanje staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	520	17	2.42E-11	1.32E-09	<i>Negativna regulacija staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	1240	24	4.95E-11	2.54E-09	<i>DNA metabolički proces</i>
<b>BP</b>	54	8	5.33E-11	2.57E-09	<i>Mitotička sestrinska segregacija kromatida</i>
<b>BP</b>	57	8	8.39E-11	3.82E-09	<i>Segregacija sestrinskih kromatida</i>
<b>BP</b>	99	9	2.81E-10	1.21E-08	<i>Regulacija mitoze</i>
<b>BP</b>	878	19	1.47E-09	6.01E-08	<i>Organizacija kromosoma</i>
<b>BP</b>	337	12	1.24E-08	4.82E-07	<i>Organizacija citoskeleta mikrotubula</i>
<b>BP</b>	351	12	1.94E-08	7.24E-07	<i>Regulacija mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	443	13	2.81E-08	1.00E-06	<i>Interfaza</i>
<b>BP</b>	247	10	7.02E-08	2.40E-06	<i>rekombinacija DNA</i>
<b>BP</b>	589	14	1.05E-07	3.36E-06	<i>Regulacija organizacije organela</i>
<b>BP</b>	92	7	1.07E-07	3.36E-06	<i>Organizacija vretena</i>
<b>BP</b>	435	12	2.03E-07	6.16E-06	<i>Interfaza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	34	5	2.79E-07	8.18E-06	<i>Kondenzacija kromosoma</i>
<b>BP</b>	172	8	5.63E-07	1.59E-05	<i>DNK pakiranje</i>
<b>BP</b>	862	15	1.86E-06	5.09E-05	<i>Odgovor na podražaj oštećenja DNK</i>
<b>BP</b>	538	12	1.93E-06	5.10E-05	<i>popravak DNK</i>
<b>BP</b>	153	7	3.38E-06	8.66E-05	<i>S faza</i>
<b>BP</b>	179	7	9.50E-06	0.000236	<i>Kretanje temeljeno na mikrotubulama</i>
<b>BP</b>	346	9	1.28E-05	0.00031	<i>replikacija DNK</i>
<b>BP</b>	40	4	2.29E-05	0.000537	<i>Organizacija mitotskog vretena</i>
<b>BP</b>	139	6	2.47E-05	0.000563	<i>Popravak prekida dvostruke niti</i>
<b>BP</b>	149	6	3.66E-05	0.000811	<i>Kontrolna točka mitotičkog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	47	4	4.38E-05	0.000945	<i>Centrosomski ciklus</i>
<b>BP</b>	183	6	0.000115	0.00241	<i>Mejotički stanični ciklus</i>
<b>BP</b>	121	5	0.000151	0.00309	<i>DNA ovisna replikacija DNA</i>
<b>BP</b>	70	4	0.000209	0.00419	<i>Organizacija centrosoma</i>
<b>BP</b>	74	4	0.00026	0.00507	<i>Organizacija centra za organiziranje mikrotubula</i>
<b>BP</b>	144	5	0.000339	0.00647	<i>S faza mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	980	12	0.000659	0.0123	<i>Organizacija citoskeleta</i>
<b>BP</b>	370	7	0.000875	0.0159	<i>Negativna regulacija organizacije staničnih komponenti</i>
<b>BP</b>	1520	15	0.00126	0.0225	<i>Regulacija organizacije staničnih komponenti</i>
<b>BP</b>	209	5	0.00182	0.0317	<i>G1/S prijelaz mitotskog staničnog ciklusa</i>
<b>BP</b>	1620	15	0.0024	0.041	<i>Stanični odgovor na stres</i>
<b>BP</b>	235	5	0.00302	0.0498	<i>Regulacija metaboličkih procesa DNA</i>
<b>BP</b>	143	4	0.00304	0.0498	<i>Sklop kompleksa protein DNA</i>
<b>MF</b>	1490	22	4.69E-08	1.00E-05	<i>vezanje ATP-a</i>

MF	1530	22	7.39E-08	1.00E-05	<i>Vežanje adenil ribonukleotida</i>
MF	1530	22	7.74E-08	1.00E-05	<i>Vežanje adenil nukleotida</i>
MF	75	6	6.32E-07	6.13E-05	<i>Motorna aktivnost mikrotubula</i>
MF	888	15	2.28E-06	0.000177	<i>Aktivnost nukleozid-trifosfataze</i>
MF	1890	22	3.12E-06	0.000182	<i>Vežanje purinskih ribonukleotida</i>
MF	1900	22	3.29E-06	0.000182	<i>Vežanje purinskih nukleotida</i>
MF	938	15	4.48E-06	0.000209	<i>Aktivnost pirofosfataze</i>
MF	944	15	4.85E-06	0.000209	<i>Aktivnost hidrolaze, djelovanje na anhidride kiselina</i>
MF	143	6	2.70E-05	0.00105	<i>Motorna aktivnost</i>
MF	2470	23	6.98E-05	0.00246	<i>Vežanje nukleotida</i>
CC	784	28	1.04E-21	2.34E-19	<i>Kromosom</i>
CC	670	26	6.11E-21	6.88E-19	<i>Kromosomski dio</i>
CC	193	16	5.32E-18	3.99E-16	<i>Kondenzirani kromosom</i>
CC	198	15	2.58E-16	1.45E-14	<i>Kromosom, centromerna regija</i>
CC	261	16	6.65E-16	2.99E-14	<i>Vreteno</i>
CC	3940	43	4.66E-15	1.50E-13	<i>Organela ne-omeđena membranom</i>
CC	3940	43	4.66E-15	1.50E-13	<i>Intracelularna organela koja nije ograničena membranom</i>
CC	1120	25	1.90E-14	5.33E-13	<i>Citoskelet mikrotubula</i>
CC	149	11	4.72E-12	1.18E-10	<i>Kinetohora</i>
CC	1570	24	2.68E-10	6.03E-09	<i>Citoskeletni dio</i>
CC	7600	50	1.74E-09	3.55E-08	<i>Jezgra</i>
CC	2200	25	4.30E-08	8.07E-07	<i>Citoskelet</i>
CC	101	7	7.21E-08	1.25E-06	<i>Vretenasti stup</i>
CC	4050	34	8.02E-08	1.29E-06	<i>Proteinski kompleks</i>
CC	2690	27	1.31E-07	1.97E-06	<i>Nuklearni lumen</i>
CC	320	10	1.90E-07	2.54E-06	<i>Nuklearni kromosom</i>
CC	3330	30	1.92E-07	2.54E-06	<i>Nuklearni dio</i>
CC	543	12	4.25E-07	5.31E-06	<i>Centar za organiziranje mikrotubula</i>
CC	352	10	4.58E-07	5.42E-06	<i>mikrotubula</i>
CC	141	7	7.09E-07	7.97E-06	<i>Kompleks povezan s mikrotubulama</i>
CC	8620	49	1.28E-06	1.38E-05	<i>Dio unutarstaničnih organela</i>
CC	412	10	1.91E-06	1.95E-05	<i>Centrosom</i>
CC	8790	49	2.75E-06	2.69E-05	<i>Dio organela</i>
CC	4800	34	5.63E-06	5.15E-05	<i>Makromolekulski kompleks</i>
CC	273	8	5.72E-06	5.15E-05	<i>Nuklearni dio kromosoma</i>
CC	73	5	6.35E-06	5.49E-05	<i>Kondenzirani nuklearni kromosom</i>
CC	3380	27	1.35E-05	0.000113	<i>Lumen organela</i>
CC	3440	27	1.88E-05	0.000151	<i>Membrana zatvoreni lumen</i>
CC	1820	18	4.71E-05	0.000365	<i>Nukleoplazma</i>
CC	24	3	8.50E-05	0.000638	<i>Kinezinski kompleks</i>
CC	2660	21	0.000244	0.00177	<i>Cytosol</i>
CC	43	3	0.000494	0.00347	<i>Vretenasta mikrotubula</i>
CC	326	6	0.0011	0.0075	<i>Kromatin</i>
CC	100	3	0.0056	0.037	<i>Središnji dio za organiziranje mikrotubula</i>



Diferencijalno ekspresijska genska analiza napravljena je i između karcinoma štitnjače i normalnog tkiva štitnjače iz GTEx baze podataka. Kao rezultat analize dobivena su 6070 diferencijalno eksprimirana gena, od kojih je 3942 smanjeno eksprimirano. Napravljena je i WGCNA analiza na diferencijalno eksprimiranim genima, te su dobivena 62 smanjeno eksprimirana ključna gena, te 111 povećano eksprimiranih ključnih gena u karcinomu štitnjače u odnosu na normalno tkivo štitnjače iz GTEx baze podataka. Analiza genske ontologije, te Reactome i KEGG puteva smanjeno i povećano eksprimiranih ključnih gena nije dala statistički značajne rezultate.

**Tablica 14** i **Tablica 15** sažeto prikazuje broj preklapanja između genskih kategorija koje su zajedničke smanjeno/povećano eksprimiranim ključnim genima između tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva. Najveći broj preklapanja genskih kategorija za povećano eksprimirane ključne gene, je između adenokarcinoma debelog crijeva i plućnog adenokarcinoma, te adenokarcinoma debelog crijeva i adenokarcinoma želuca. Najveći broj preklapanja za smanjeno eksprimirane ključne gene, je između raka mokraćnog mjehura i adenokarcinoma želuca.

Termini spoj stanica i aktinski citoskelet iz kategorije staničnog kompartimenta su pojmovi koji su zajednički smanjeno eksprimiranim ključnim genima između raka mokraćnog mjehura i pripadajućeg normalnog tkiva, kao i između adenokarcinoma debelog crijeva i pripadajućeg normalnog tkiva. Termin spoj stanica je obogaćeni u analizi genske ontologije između smanjeno eksprimiranih ključnih gena raka dojke i normalnog tkiva dojke. Jedine Reactome i KEGG kategorije koje su zajedničke smanjeno eksprimiranim ključnim genima između tumorskog i pripadajućeg normalnog tkiva su cGMP učinci i PPAR signalni put.

**Tablica 14.** Broj preklapanja između pojmova genskih kategorija koje su zajedničke smanjeno eksprimiranim ključnim genima između tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva.

**Kratice:** BLCA: rak mokraćnog mjehura, BRCA: rak dojke, COAD: adenokarcinom debelog crijeva, CESC: rak vrata maternice, LIHC: hepatocelularni karcinom jetre

Domena	Termin	Broj preklapanja	Vrste tumora
CC	<i>Spoj stanica</i>	3	BLCA , BRCA, COAD
BP	<i>Regulacija mišićne kontrakcije</i>	2	BLCA , COAD
CC	<i>Aktinski citoskelet</i>	2	BLCA , COAD
CC	<i>Površina stanice</i>	2	BRCA, CESC
CC	<i>Stanica</i>	2	BLCA , BRCA
CC	<i>Kontraktilno vlakno</i>	2	BLCA , COAD

CC	<i>Dio kontraktilnog vlakna</i>	2	BLCA , COAD
CC	<i>Sastavni dio plazma membrane</i>	2	BRCA, CESC
CC	<i>Svojstveno plazma membrani</i>	2	BRCA, CESC
CC	<i>miofibril</i>	2	BLCA , COAD
CC	<i>sarkomera</i>	2	BLCA , COAD
KEGG	<i>PPAR signalni put</i>	2	BRCA, LIHC
MF	<i>Strukturni sastojak mišića</i>	2	BLCA , COAD
Reactome	<i>cGMP učinci</i>	2	BLCA , COAD

Većina genskih kategorija koje su zajedničke povećano eksprimiranim ključnim genima između tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva su povezane sa staničnim ciklusom, kao i kontrolnim točkama staničnog ciklusa.

**Tablica 15.** Broj preklapanja između pojmova genskih kategorija koje su zajedničke povećano eksprimiranim ključnim genima između tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva.  
**Kratice:** COAD: adenokarcinom debelog crijeva, LUAD: adenokarcinom pluća, STAD: adenokarcinom želuca

Domena	Termin	Broj preklapanja	vrste tumora
BP	<i>Stanični ciklus</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Zaustavljanje staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Kontrolna točka staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Faza staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Proces staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Dijeljenje stanica</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Organizacija kromosoma</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Odvajanje kromosoma</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>DNA metabolički proces</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>rekombinacija DNA</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>replikacija DNK</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>DNK</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Interfaza</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Interfaza mitotskog staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>M faza</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>M faza mitotskog staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Organizacija citoskeleta mikrotubula</i>	3	COAD, LUAD, STAD

<b>BP</b>	<i>Mitoza</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>Mitotski stanični ciklus</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>Mitotička sestrinska segregacija kromatida</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>Negativna regulacija staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>Regulacija staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>Odgovor na podražaj oštećenja DNK</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>S faza</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>S faza mitotskog staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>Segregacija sestrinskih kromatida</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>BP</b>	<i>Organizacija vretena</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Kromatin</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Kromosomski dio</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Kromosom</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Kondenzirani kromosom</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Intracelularno</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Dio unutarstaničnih organela</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Kinetohora</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Makromolekulski kompleks</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Membrana</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Citoskelet mikrotubula</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Nuklearni kromosom</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Nuklearni lumen</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Nuklearni dio</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Nukleoplazma</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Jezgra</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Lumen organela</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Dio organela</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Proteinski kompleks</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Vreteno</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>CC</b>	<i>Vretenasti stup</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>KEGG</b>	<i>Stanični ciklus</i>	3	COAD, LUAD, STAD
<b>MF</b>	<i>vezanje ATP-a</i>	3	COAD, LUAD, STAD

MF	<i>Vežanje adenil nukleotida</i>	3	COAD, LUAD, STAD
MF	<i>Vežanje adenil ribonukleotida</i>	3	COAD, LUAD, STAD
MF	<i>Nukleozid</i>	3	COAD, LUAD, STAD
MF	<i>Vežanje nukleotida</i>	3	COAD, LUAD, STAD
MF	<i>Vežanje purinskih nukleotida</i>	3	COAD, LUAD, STAD
MF	<i>Vežanje purinskih ribonukleotida</i>	3	COAD, LUAD, STAD
Reactome	<i>Aktivacija ATR-a kao odgovor na replikacijski stres</i>	3	COAD, LUAD, STAD
Reactome	<i>Stanični ciklus</i>	3	COAD, LUAD, STAD
Reactome	<i>Kontrolne točke staničnog ciklusa</i>	3	COAD, LUAD, STAD
Reactome	<i>Kontrolne točke G2/M</i>	3	COAD, LUAD, STAD
Reactome	<i>Mitotske M-M/G1 faze</i>	3	COAD, LUAD, STAD
BP	<i>Centrosomski ciklus</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Organizacija centrosoma</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Kondenzacija kromosoma</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Organizacija citoskeleta</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>DNK pakiranje</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>popravlak DNK</i>	2	COAD, STAD
BP	<i>G1/S prijelaz mitotskog staničnog ciklusa</i>	2	COAD, STAD
BP	<i>Mejotički stanični ciklus</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Organizacija centra za organiziranje mikrotubula</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>mikrotubula</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>mikrotubula</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Kontrolna točka mitotičkog staničnog ciklusa</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Organizacija mitotskog vretena</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Organizacija organela</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Protein</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Regulacija mitoze</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Regulacija mitotskog staničnog ciklusa</i>	2	LUAD, STAD
BP	<i>Regulacija organizacije organela</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Centrosom</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Kondenzirani nuklearni kromosom</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Citoskeletni dio</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Citoskelet</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Citosol</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Kinezinski kompleks</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>mikrotubula</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Kompleks povezan s mikrotubulama</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Centar za organiziranje mikrotubula</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Središnji dio za organiziranje mikrotubula</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Nuklearni dio kromosoma</i>	2	LUAD, STAD
CC	<i>Jezgrica</i>	2	COAD, LUAD
CC	<i>Vretenasta mikrotubula</i>	2	LUAD, STAD

MF	Aktivnost hidrolaze	2	LUAD, STAD
MF	Motorna aktivnost mikrotubula	2	LUAD, STAD
MF	Motorna aktivnost	2	LUAD, STAD
MF	Aktivnost pirofosfataze	2	LUAD, STAD
Reactome	Aktivacija predreplikativnog kompleksa	2	COAD, STAD
Reactome	Replikacija DNK	2	COAD, STAD
Reactome	G1/S Prijelaz	2	COAD, STAD
Reactome	Kinezini	2	LUAD, STAD
Reactome	M faza	2	LUAD, STAD
Reactome	Mitotička anafaza	2	LUAD, STAD
Reactome	Mitotička metafaza i anafaza	2	LUAD, STAD
Reactome	Mitotička Prometafaza	2	LUAD, STAD
Reactome	Rezolucija kohezije sestrinskih kromatida	2	LUAD, STAD
Reactome	Odvajanje sestrinskih kromatida	2	LUAD, STAD

#### 4.5. Ekspresija diferencijalno eksprimiranih ključnih gena povezanih sa malignim fenotipom u normalnim tkivima

Rezultati autopsijske studije iz 2008. godine koja je analizirala metastatski organotropizam više od 40 tumora <sup>4</sup> prikazani su na **Slici 12**. Navedeni rezultati su služili za izračun korelacije između pojavnosti metastazi pojedinih tumora i broja smanjeno (povećano) eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima. Koristeći *RNentropy* R paket <sup>105</sup> dobiveni su povećano i smanjeno eksprimirani geni u normalnim tkivima u odnosu na sva normalna tkiva. Smanjeno eksprimirani ključni geni za svaki od tumora, su se usporedili sa smanjeno eksprimiranim ključnim genima u normalnim tkivima te se za svaki organ dobio broj ključnih gena koji je smanjeno eksprimiran i u tumoru i u pojedinom normalnom tkivu. Također su se i povećano eksprimirani ključni geni za svaki od tumora usporedili s povećano eksprimiranim ključnim genima u normalnim tkivima te se za svaki organ dobio broj ključnih gena koji je povećano eksprimiran i u tumoru i u pojedinom normalnom tkivu. Broj smanjeno eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom, kao i broj povećano eksprimiranih ključnih gena u pojedinim normalnim tkivima prikazan je na **Slikama 13 i 14**. Rezultati korelacije između min-max normaliziranog broja smanjeno (povećano) eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi pojedinih tumora u navedenim tkivima su prikazani na **Tablici 16**. Min-max normalizacija od svake vrijednosti oduzima minimalnu, a zatim dobiveni broj dijeli s rasponom između maksimalne i minimalne vrijednosti. Ovaj postupak sužava raspon vrijednosti na segment [0,1].

Koštana srž, timus, limfni čvor, te krajnik imaju u odnosu na sve ostale organe najviše smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u raku mokraćnog mjehura.

Krajnik, koštana srž, timus, retina i limfni čvor su organi koji u odnosu na sve ostale organe imaju najviše smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u raku dojke. Najmanje smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u raku dojke imaju masno tkivo, dojka, miokard, i mokraćni mjehur.

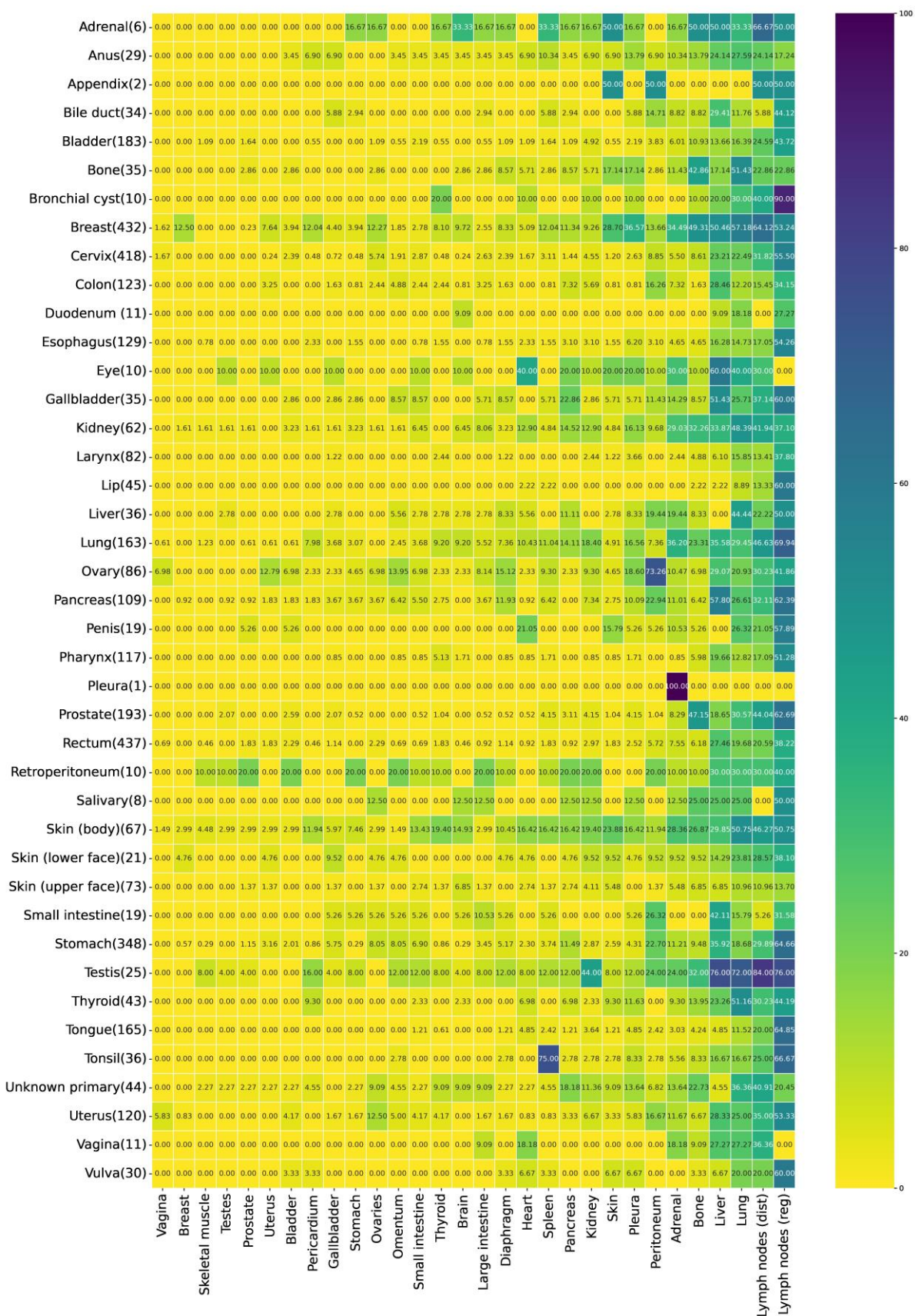
Koštana srž, krajnik, timus i limfni čvor u odnosu na sve organe imaju najviše smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u raku vrata maternice. Vrat maternice, endometrijski, jajovodi, miokard i masno tkivo imaju najmanje smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u raku vratu maternice.

U odnosu na sva ostale organe koštana srž, limfni čvor, dvanaesnik i krajnik imaju najviše smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u raku debelog crijeva, dok krajnik, koštana srž, timus i limfni čvor imaju najviše povećano ekspimiranih ključnih gena koji su povećano ekspimirani u raku debelog crijeva. Debelo crijevo, endometrijski i srčani mišić imaju najmanje smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u raku debelog crijeva, dok žučni mjehur i želudac imaju najmanje povećano ekspimiranih ključnih gena koji su povećano ekspimirani u raku debelog crijeva.

U odnosu na sve organe koštana srž, krajnik, timus i limfni čvor su organi koji imaju najviše smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u karcinomu bubrega kromofobnog tipa, dok skeletni mišić i miokard imaju najviše povećano ekspimiranih ključnih gena koji su povećano ekspimirani u karcinomu bubrega kromofobnog tipa. Bubrež, masno tkivo, tanko i debelo crijevo imaju najmanje smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u karcinomu bubrega kromofobnog tipa, dok sjemeni mjehurić, žučni mjehur i posteljica imaju najmanje povećano ekspimiranih ključnih gena koji su povećano ekspimirani u karcinomu bubrega kromofobnog tipa.

Koštana srž i limfni čvor imaju najviše smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u karcinomu bubrega svijetlih stanica, dok bubrež i moždana kora imaju najmanje smanjeno ekspimiranih ključnih gena koji su smanjeno ekspimirani u karcinomu bubrega svijetlih stanica.

Koštana srž, timus, i limfni čvor imaju najviše smanjeno eksprimiranih ključnih gena koji su smanjeno eksprimirani u papilarnom karcinomu bubrega. Moždana kora i bubreg imaju najmanje smanjeno eksprimiranih ključnih gena koji su smanjeno eksprimirani u papilarnom karcinomu bubrega.





x osi nalaze organi koji su mjesta metastazi, a na y osi primarni tumori (u zagradama je prikazan broj analiziranih slučajeva za svaki od tumora), dok su prikazani postoci dobiveni dijeljenjem broja metastaza u svakom organu s ukupnim brojem analiziranih slučajeva za svaki pojedini tumor.

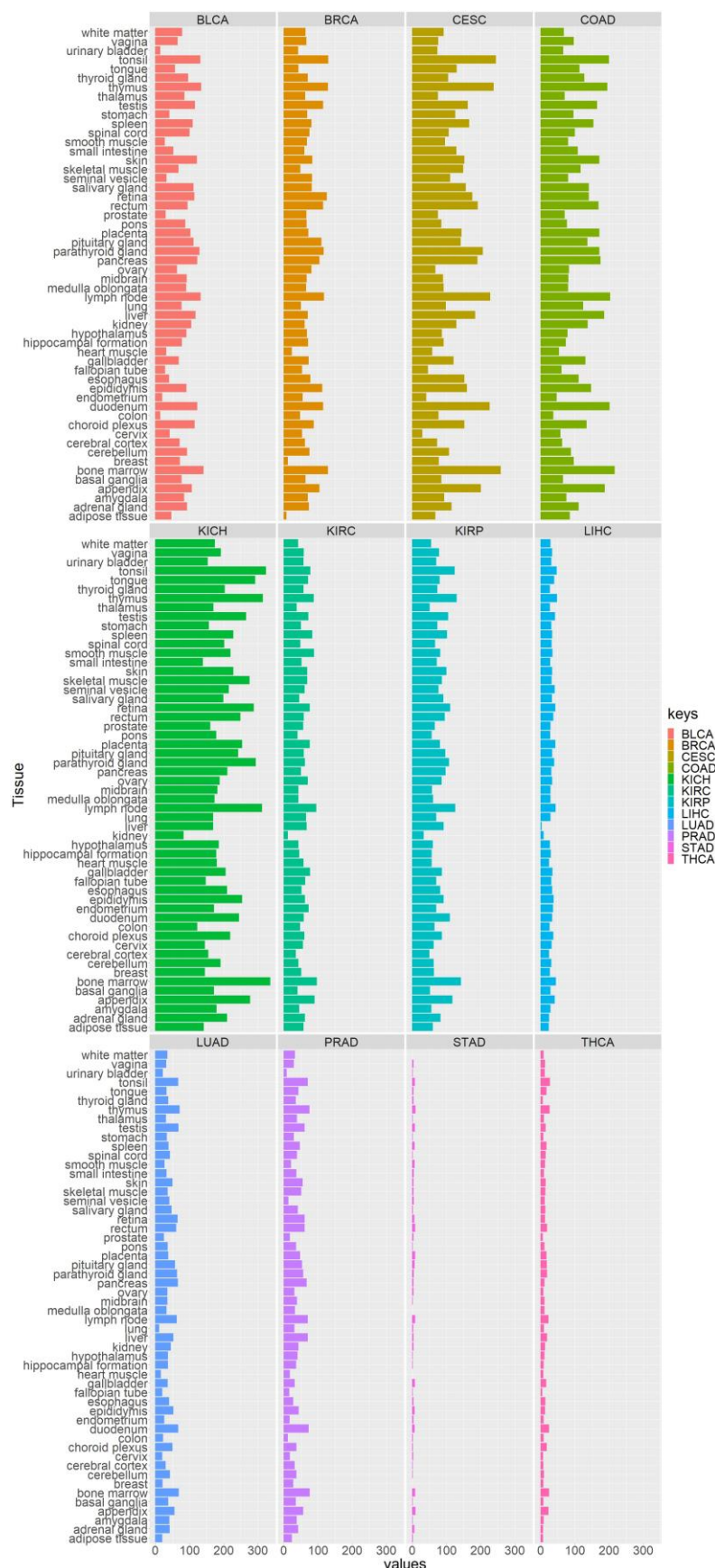
Timus, krajnik, i koštana srž imaju najviše smanjeno eksprimiranih ključnih gena, dok bubreg, jetra, i masno tkivo imaju najmanje smanjeno eksprimiranih ključnih gena koji su smanjeno eksprimirani u hepatocelularnom karcinomu jetre. U odnosu na sva tkiva timus, krajnik, i limfni čvor imaju najviše povećano eksprimiranih ključnih gena koji su povećano eksprimirani u hepatocelularnom karcinomu jetre.

Timus i koštana srž imaju najviše smanjeno eksprimiranih ključnih gena, dok pluća, masno tkivo i miokard imaju najmanje smanjeno eksprimiranih ključnih gena koji su smanjeno eksprimirani u adenokarcinomu pluća. Timus, krajnik, koštana srž, limfni čvor imaju najviše povećano eksprimiranih ključnih gena, dok žučni mjehur i jajnik imaju najmanje povećano eksprimiranih ključnih gena koji su povećano eksprimirani u adenokarcinomu pluća.

Koštana srž i timus imaju najviše smanjeno eksprimiranih ključnih gena, dok mokraćni mjehur, debelo crijevo i sjemeni mjehurić imaju najmanje smanjeno eksprimiranih ključnih gena koji su smanjeno eksprimirani u adenokarcinomu prostate.

Timus, slijepo crijevo, koštana srž, i limfni čvor imaju najviše smanjeno eksprimiranih ključnih gena, dok dojka i miokard imaju najviše smanjeno eksprimiranih ključnih gena koji su smanjeno eksprimirani u adenokarcinomu želuca. Timus, koštana srž, krajnik, i limfni čvor imaju najviše, a žučni mjehur i jajnik najmanje povećano eksprimiranih ključnih gena koji su povećano eksprimirani u adenokarcinomu želuca.

Krajnik, koštana srž, i timus imaju najviše, a prostata, jajovodi, i štitnjača najmanje smanjeno eksprimiranih ključnih gena koji su smanjeno eksprimirani u karcinomu štitnjače. Jednjak, koža, debelo crijevo, žlijezde slinovnice, pluća, i moždana kora imaju najveći broj, a jezik, štitnjača, i glatki mišić imaju najmanji broj povećano eksprimiranih ključnih gena koji su povećano eksprimirani u karcinomu štitnjače.



Slika 13. Ekspresija smanjeno eksprimiranih ključnih gena povezanih sa malignim fenotipom u normalnim tkivima.

Smanjeno eksprimirani ključni geni za svaki od tumora su se usporedili sa smanjeno eksprimiranim ključnim genima u normalnim tkivima te se za svaki organ dobio broj ključnih gena koji je smanjeno eksprimiran i u tumoru i u pojedinom normalnom tkivu. Na x osi je prikazan broj smanjeno eksprimiranih ključnih gena, a na y osi su prikazana normalna tkiva. **Kratice:** BLCA-rak mokraćnog mjehura, BRCA-rak dojke, CESC-rak vrata maternice, COAD-adenokarcinom debelog crijeva, KICH-karcinom bubrega kromofobnog tipa, KIRC-karcinom bubrega svijetlih stanica, KIRP-papilarni karcinom bubrega, LIHC-hepatocelularni karcinom jetre, LUAD-adenokarcinom pluća, PRAD-adenokarcinom prostate, STAD-adenokarcinom želuca, THCA-rak štitnjače.

Značajni rezultati korelacije između broja smanjeno eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi dobiveni su za rak mokraćnog mjehura i adenokarcinom prostate (**Tablica 16**).

Značajni rezultati korelacije između broja povećano eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi dobiveni su za karcinom bubrega kromofobnog tipa, adenokarcinom pluća, i rak štitnjače (**Tablica 17**).

Korelacijski koeficijenti između broja smanjeno ili povećano eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi su korišteni za točnost predviđanja metastazi. Korelacijski koeficijent veći od 0.5 je dobiven za korelaciju smanjeno eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi za karcinom prostate, dok je za adenokarcinom pluća dobiven korelacijski koeficijent veći od 0.5 između povećano eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi (**Tablice 16 i 17**). U dodatnom materijalu (**Prilozi 1-18**), prikazani su korelacijski plotovi između smanjeno ili povećano eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom i pojavnosti metastazi.



**Slika 14. Ekspresija povećano eksprimiranih ključnih gena povezanih sa malignim fenotipom u normalnim tkivima.** Povećano eksprimirani ključni geni za svaki od tumora, su se usporedili s povećano eksprimiranim ključnim genima u normalnim tkivima te se za svaki organ dobio broj ključnih gena koji je povećano eksprimiran i u tumoru i u pojedinom

normalnom tkivu. Na x osi je prikazan broj povećano eksprimiranih ključnih gena, a na y osi su prikazana normalna tkiva. **Kratice:** COAD-adenokarcinom debelog crijeva, KICH-karcinom bubrega kromofobnog tipa, LIHC-hepatocelularni karcinom jetre, LUAD-adenokarcinom pluća, STAD-adenokarcinom želuca, THCA-rak štitnjače.

**Tablica 16.** Rezultati korelacije (R) između normaliziranog broja smanjeno eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom i pojavnosti metastazi u pojedinim normalnim tkivima za svaki od analiziranih tumora.

Tumor	R	p vrijednost
rak mokraćnog mjehura	0,45	0,025
rak dojke	0,38	0,06
rak vrata maternice	0,28	0,18
rak debelog crijeva	0,33	0,11
rak bubrega kromofobnog tipa	0,054	0,8
rak bubrega svijetlih stanica	-0,031	0,88
papilarni karcinom bubrega	0,0041	0,98
rak jetre	0,0037	0,99
adenokarcinom pluća	0,37	0,069
Adenokarcinom prostate	0,6	0,0015
Adenokarcinom želuca	0,35	0,082
rak štitnjače	0,33	0,11

**Tablica 17.** Rezultati korelacije (R) između normaliziranog broja povećano eksprimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom i pojavnosti metastazi u pojedinim normalnim tkivima za svaki od analiziranih tumora.

Tumor	R	P vrijednost
rak debelog crijeva	0,1	0,62
rak bubrega kromofobnog tipa	0,44	0,027
rak jetre	0,32	0,12
adenokarcinom pluća	0,54	0,0053
rak želuca	0,23	0,27
rak štitnjače	0,49	0,013

#### 4.6. Razlikovanje ranijih i kasnijih stadija tumora pomoću metode potpornih vektora

Napravljena je DE analiza između kasnijih (stadiji III i IV) i ranijih (stadiji I i II) stadija sljedećih tumora: rak mokraćnog mjehura, rak dojke, adenokarcinom debelog crijeva,

karcinom bubrega kromofobnog tipa, karcinom bubrega svijetlih stanica, papilarni karcinom bubrega, hepatocelularni karcinom jetre, adenokarcinom pluća, adenokarcinom želuca, te karcinom štitnjače. Adenokarcinom prostate i rak vrata maternice nisu analizirani jer ne koriste TNM klasifikaciju za određivanje stadija tumora.

Napravljena je i WGCNA analiza na DE genima, te nisu dobiveni ključni geni povezani s kasnijim tumorskim fenotipom ni za jedan od analiziranih tumora iako su korišteni blaži kriteriji za pronalazak ključnih gena ( $|GS| > 0,2$ ,  $|MM| > 0,8$ ,  $p$ -vrijednost  $< 0,05$ ).

Budući da nisu dobiveni ključni geni povezani s kasnim tumorskim fenotipom, rane i kasne stadije pokušalo se razlikovati s pomoću ekspresije diferencijalno eksprimiranih gena metodom potpornih vektora (**Slika 15**). Koristeći *Oncolnc* server <sup>118</sup> za svaki od analiziranih tumora pronašli su se diferencijalno eksprimirani geni koji su najviše povezani s preživljenjem, te se s pomoću ekspresije tih gena također pokušalo razlikovati rane i kasne stadije malignih tumora (**Slika 16**). Osim toga, i s pomoću ekspresije diferencijalno eksprimiranih gena koji značajno međusobno ne koreliraju ( $R < 0,75$ ) pokušalo se razlikovati rane i kasne stadije tumora s pomoću metode potpornih vektora. **Tablica 18** prikazuje broj DE gena između ranih i kasnih stadija tumora, broj DE gena povezanih s preživljenjem i broj DE gena koji međusobno značajno ne koreliraju.

Napravljena je analiza genske ontologije na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnijih i ranijih stadija, i nisu dobiveni značajni rezultati sa FDR vrijednosti manjom od 0,05, te su u dodatnom materijalu (**Prilozi 19-27**) prikazane kategorije genske ontologije koje imaju  $p$ -vrijednost manju od 0,05, te je naveden ukupan broj DE gena koji pripada svakoj od navedenih kategorija. Kategorije koje su bile zajedničke DE genima u najvećem broju tumora su strukturna organizacija izvanstaničnog prostora, izvanstanična regija, te kolagen.

Napravljena je i analiza genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima povezanim sa preživljenjem, te su u dodatnom materijalu (**Prilozi 28-33**) navedene i kategorije genske ontologije koje imaju  $p$ -vrijednost manju od 0,05, te je naveden ukupan broj DE gena povezanih s preživljenjem koji pripada svakoj od navedenih kategorija. Termin izvanstanični prostor je bio i dalje zajednički najvećem broju tumora.

Odlični rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija dobiveni su za kromofobni karcinom bubrega koristeći diferencijalno eksprimirane gene koji međusobno značajno ne koreliraju ( $\kappa = 0,875$ ). Za rak mokraćnog mjehura, adenokarcinom debelog crijeva,

karcinom bubrega kromofobnog tipa, te rak štitnjače dobiveni su donekle zadovoljavajući rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena. Također su dobiveni donekle zadovoljavajući rezultati razlikovanja kasnijih i ranijih stadija raka mokraćnog mjehura koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena povezanih s preživljenjem. Osim već spomenutog kromofobnog karcinoma bubrega, dobiveni su i zadovoljavajući rezultati razlikovanja kasnijih i ranih stadija raka mokraćnog mjehura i papilarnog karcinoma bubrega s pomoću ekspresije diferencijalno eksprimiranih gena koji međusobno značajno ne koreliraju.

Zbog disbalansa u broju uzoraka, klasificirajući većinu uzoraka da pripadaju ranom tumorskom stadiju moguće je dobiti visoku preciznost. Mala vrijednost Cohenove kappe pokazuje nam da diferencijalno eksprimirani geni između ranijih i kasnijih stadija raka dojke, karcinoma bubrega svijetlih stanica, hepatocelularnog karcinoma jetre, adenokarcinoma pluća, i karcinoma želuca nisu dobri prediktori razlikovanja ranijih i kasnijih stadija. Također nisu dobiveni zadovoljavajući rezultati razlikovanja ranih i kasnih stadija koristeći DE gene povezane s preživljenjem za rak dojke, karcinom bubrega svijetlih stanica, adenokarcinom pluća, i hepatocelularni karcinom jetre. Mala vrijednost Cohenove kappe dobivena je i za rak dojke, adenokarcinom debelog crijeva, karcinom bubrega svijetlih stanica, hepatocelularni karcinom jetre, adenokarcinom pluća, adenokarcinom želuca i rak štitnjače koristeći diferencijalno eksprimirane geni koji međusobno značajno ne koreliraju.

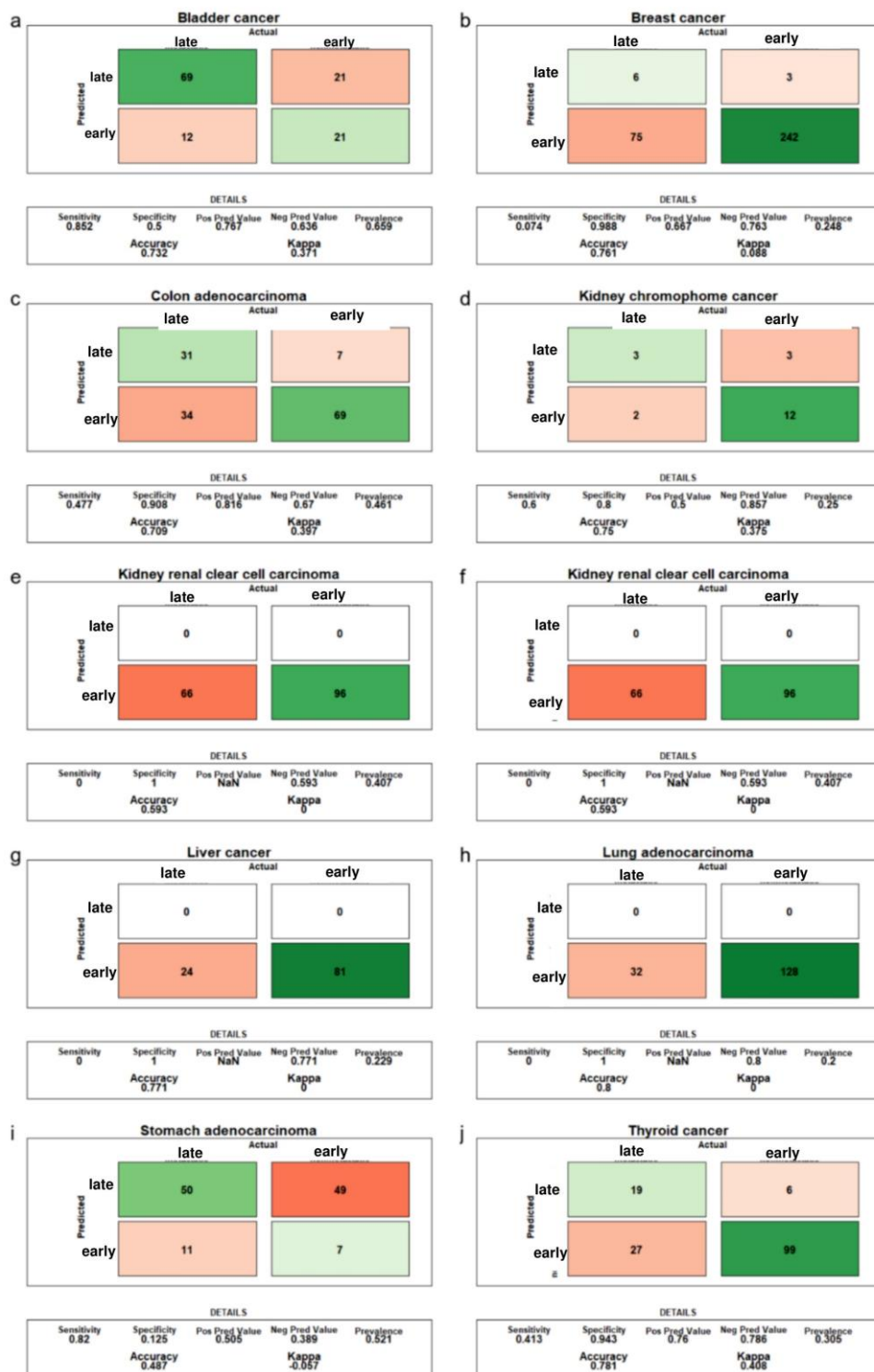
Zbog neuravnoteženosti klasa pojedinih tumora napravljena je analiza preuzorkovanja zasnovana na SMOTE metode, te su se tako uravnotežili uzorci ranih i kasnih stadija. Metoda potpornih vektora koristeći diferencijalne eksprimirane gene je napravljena na novom setu podataka, te su dobiveni puno bolji rezultati razlikovanja ranih i kasnih stadija (**Slika 18**). Najslabiji rezultat je dobiven za karcinom bubrega svijetlih stanica ( $\kappa = 0,635$ ), dok su najbolji rezultati dobiveni koristeći uzorke generirane SMOTE metodom za papilarni karcinom bubrega ( $\kappa = 0,95$ ).

Također je napravljena metoda potpornih vektora koristeći diferencijalno eksprimirane gene povezane s preživljenjem na novom setu podataka generiranom SMOTE metodom (**Slika 19**), te su najbolji rezultati razlikovanja dobiveni za papilarni karcinom bubrega ( $\kappa = 0,967$ ), dok su najslabiji rezultati razlikovanja dobiveni za rak mokraćnog mjehura ( $\kappa = 0,417$ ).

**Tablica 18.** Tablica prikazuje broj diferencijalno eksprimiranih gena između kasnih i ranih stadija tumora za svaki od analiziranih tumora, broj DE gena koji međusobno značajno ne koreliraju ( $R < 0,75$ ) te broj DE gena između ranih i kasnih stadija tumora koji su povezani s preživljenjem pacijenata.

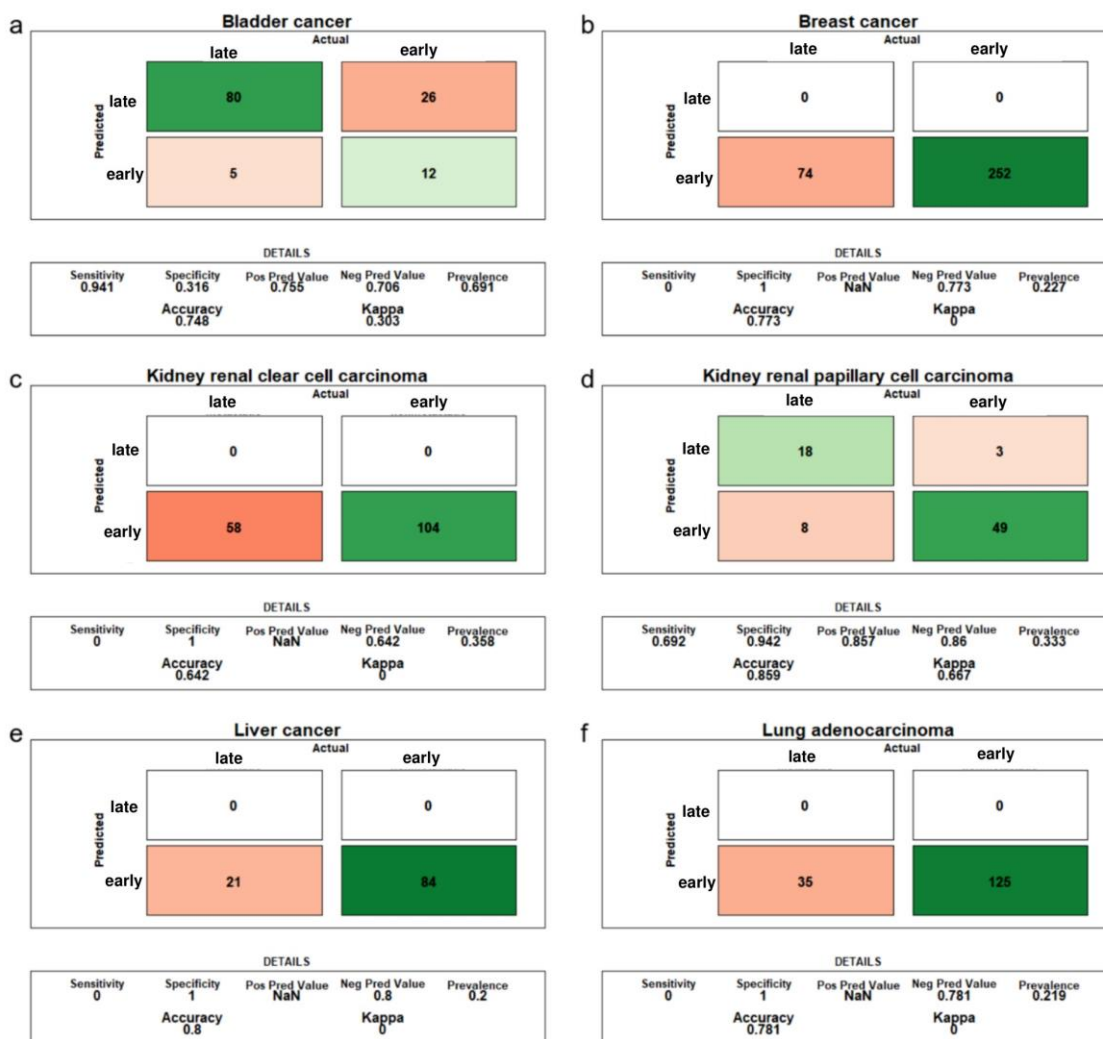
TCGA tumor	Broj DE gena između ranih i kasnih stadija tumora	Broj DE gena koji međusobno značajno ne koreliraju	Broj DE gena povezanih sa preživljenjem
rak mokraćnog mjehura	1327	594	18
rak dojke	1104	605	81
rak debelog crijeva	430	218	-
rak bubrega kromofobnog tipa	2182	376	-
rak bubrega svijetlih stanica	1085	442	148
papilarni karcinom bubrega	1796	931	437
rak jetre	1072	498	18
adenokarcinom pluća	2168	666	31
rak želuca	698	294	-
rak štitnjače	431	217	-



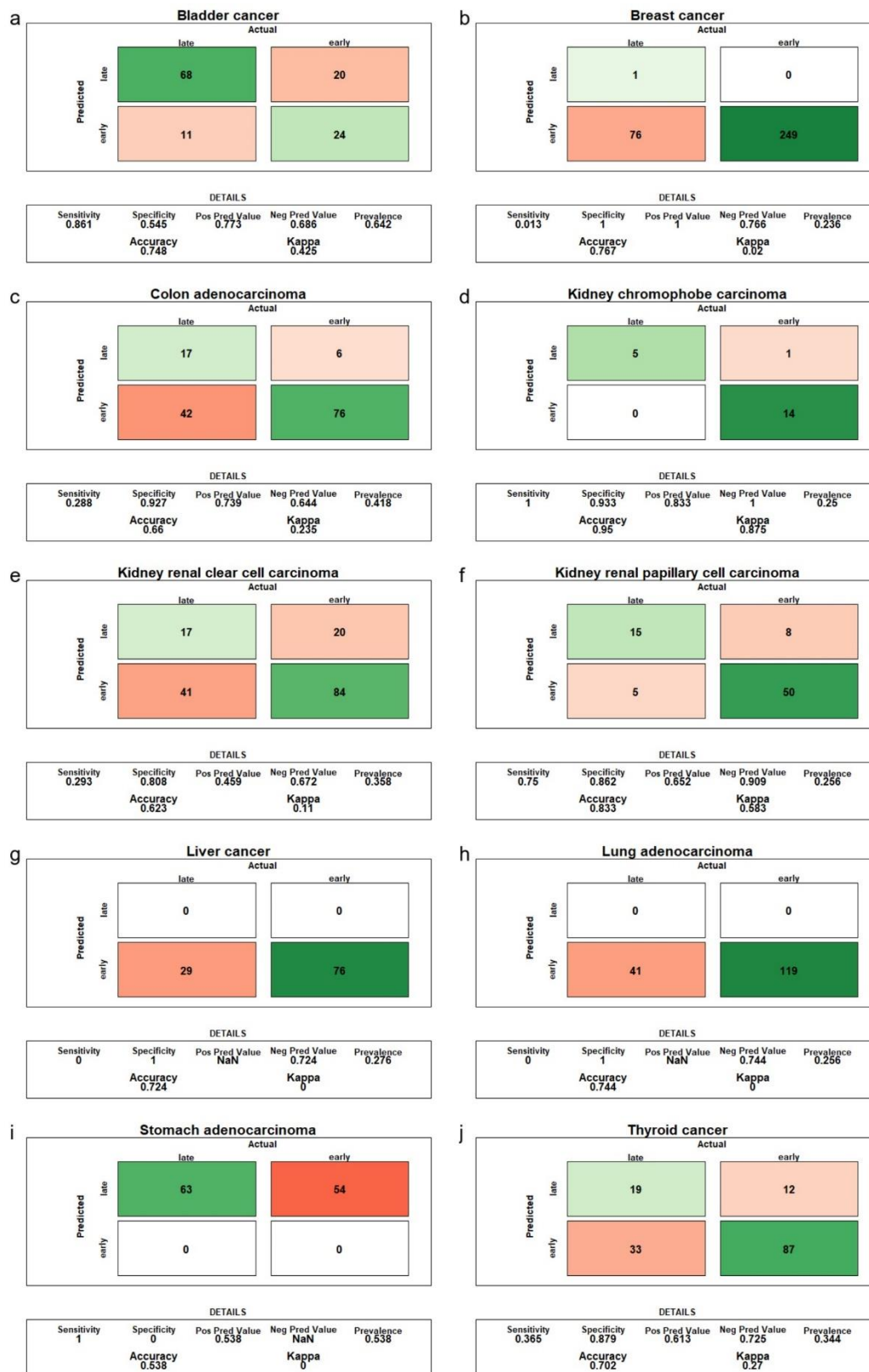


**Slika 15. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena.**

Prikazani su rezultati osjetljivosti, specifičnosti, kao i pozitivna i negativna prediktivna vrijednost, te točnost, prevalencija i Cohenova kappa za svaki od analiziranih tumora.

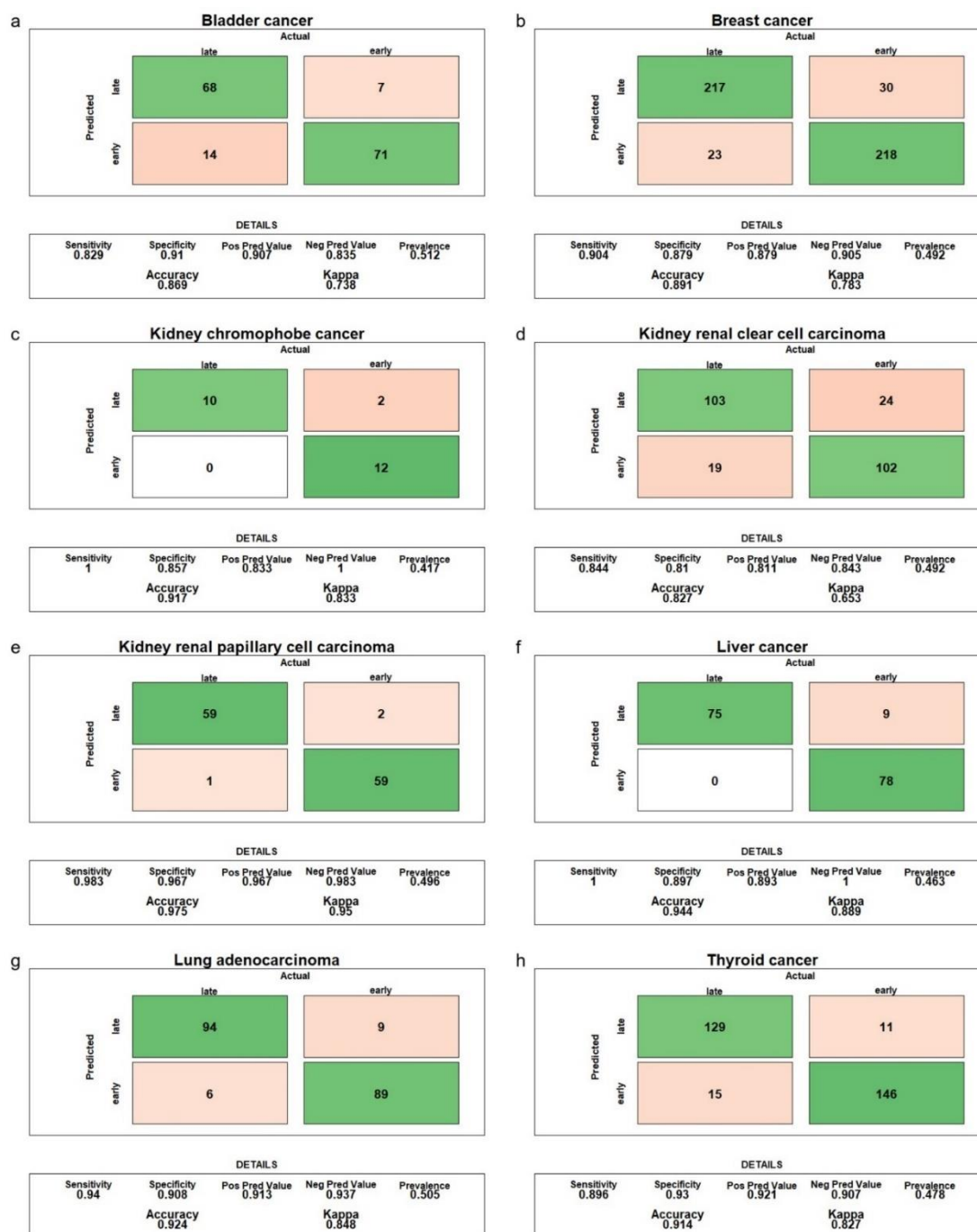


**Slika 16. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem. Prikazani su rezultati osjetljivosti, specifičnosti, kao i pozitivna i negativna prediktivna vrijednost, te točnost, prevalencija i Cohenova kappa za svaki od analiziranih tumora.**



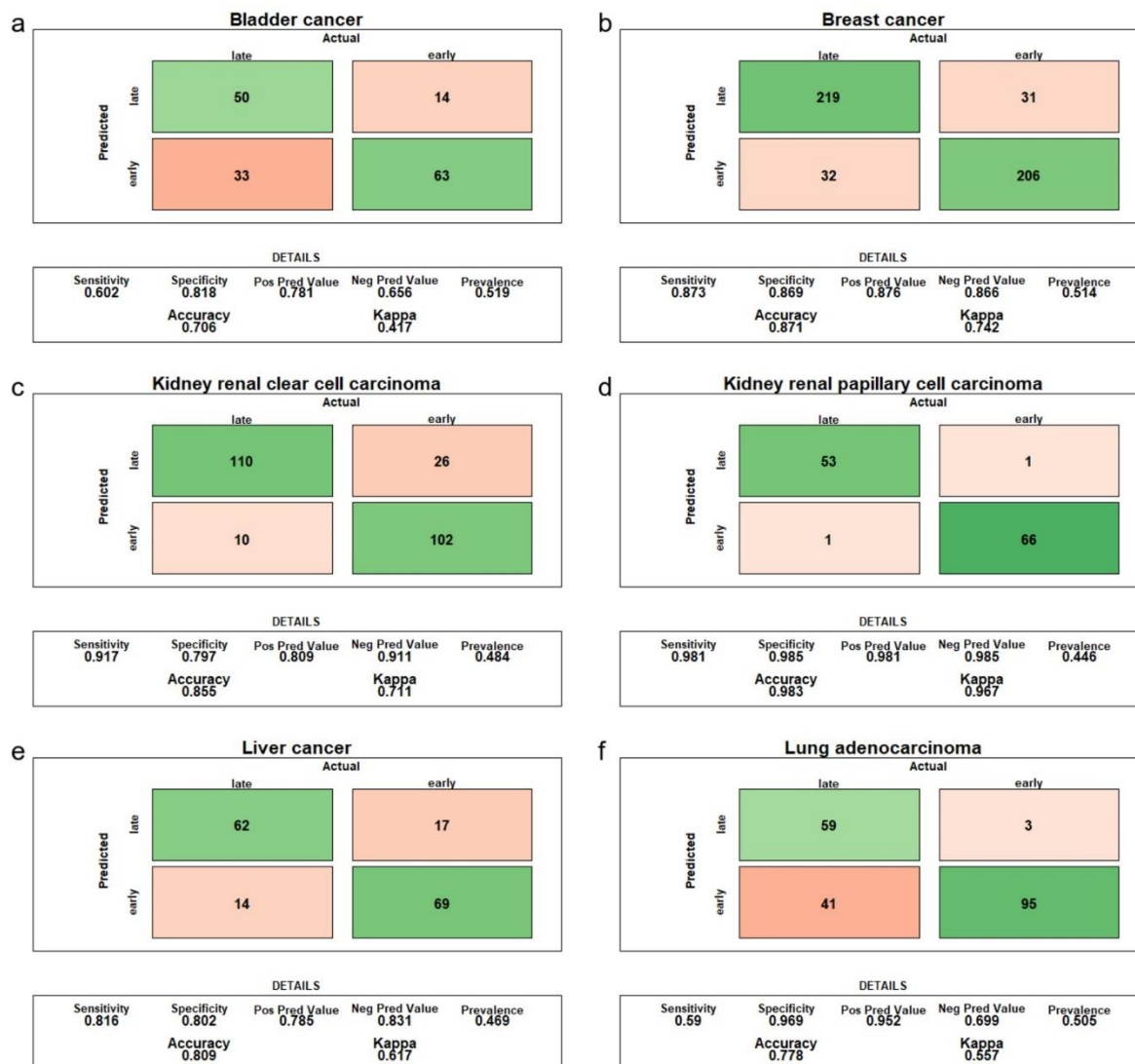
Slika 17. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena koji međusobno ne koreliraju značajno.

Prikazani su rezultati osjetljivosti, specifičnosti, kao i pozitivna i negativna prediktivna vrijednost, te točnost, prevalencija i Cohenova kappa za svaki od analiziranih tumora.



**Slika 18. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena i metodu poduzorkovanja SMOTE.**

Prikazani su rezultati osjetljivosti, specifičnosti, kao i pozitivna i negativna prediktivna vrijednost, te točnost, prevalencija i Cohenova kappa za svaki od analiziranih tumora.



**Slika 19. Rezultati razlikovanja ranijih i kasnijih stadija malignih tumora koristeći ekspresiju diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem i metodu poduzorkovanja SMOTE.**

Prikazani su rezultati osjetljivosti, specifičnosti, kao i pozitivna i negativna prediktivna vrijednost, te točnost, prevalencija i Cohenova kappa za svaki od analiziranih tumora.

## 5. RASPRAVA

U ovom radu istražen je utjecaj genske ekspresije u normalnim tkivima na nastanak primarnih tumora i metastazi, u svrhu pronalaska gena i/ili genskih kategorija čija prekomjerna ili smanjena ekspresija u normalnim tkivima može dovesti ili do nastanka ili suprimiranja primarnih i metastatskih tumora. Također su pronađeni ključni geni povezani s tumorskim fenotipom, te na osnovu ekspresije tih gena u normalnim tkivima pokušalo se predvidjeti metastatski organotropizam. Na kraju su se odredili diferencijalno eksprimirani geni između ranih i kasnih stadija pojedinih malignih tumora, diferencijalno eksprimirani geni povezani s preživljenjem, kao i diferencijalno eksprimirani geni koji značajno ne koreliraju, te se na osnovu njihove ekspresije u tumorima, pokušalo razlikovati navedene stadije s pomoću metode potpornih vektora.

Učinak genetskih ili okolišnih čimbenika ne može objasniti različitu pojavnost primarnih tumora i metastazi u pojedinim organima <sup>126-128</sup>, što upućuje da dodatni čimbenici, kao organ-specifična svojstva mogu predstavljati rizik da pojedini organ bude podložan nastanku primarnog ili metastatskog tumora. Dok mnoge studije istražuju tumore i njihovo okruženje u dijagnosticiranim slučajevima raka, postoji jako mali broj studija koji koriste gensko ekspresiju normalnih tkiva za istraživanje tkivno-specifične predispozicije za nastanak malignih tumora i metastazi. Naime, postoji nekoliko studija koji su koristeći podatke o primarnim tumorima predložili rizične čimbenike organ-specifičnog nastanka primarnih tumora. Predloženo je i da velika veličina pojedinih organa može dovesti do povećane predispozicije nastanka tumora zbog većeg broja stanica koje potencijalno mogu postati tumorske stanice <sup>9</sup>. Međutim, dodatni radovi su pokazali da nema korelacije između veličine organa i pojavnosti primarnih tumora <sup>129</sup>, što je u skladu s Petovim paradoksom i manjkom korelacije između broja stanica u organizmu i pojavnosti primarnih tumora na razini vrsta <sup>130</sup>.

Postoje mnoge studije koje uspoređuju varijacije u podložnosti pojedinih organa za nastanak primarnih tumora. Naime, sugerirano je da razlike u varijaciji podložnosti organa za nastanak primarnih tumora potječu iz razlika u broju dioba matičnih stanica koje se nalaze ispod svakog tkiva, što dovodi do različitih mutacijskih opterećenja <sup>131</sup>. Također je predloženo da i epigenetski mehanizmi mogu utjecati na podložnost nastanka primarnih tumora. Varijacija u podložnosti nastanku primarnih tumora također je u korelaciji sa stupnjem metilacije DNA CpG otoka u normalnim stanicama. Metilacija se mijenja tijekom starenja, što sugerira da

epigenetski krajolik može pridonijeti nastanku primarnog tumora. Spearmanova korelacija između rizika razvoja raka za životnog vijeka i metilacije DNA tkiva iznosi 0.70 ( $p = 0.002$ )<sup>132</sup>.

U ovom istraživanju pokazana je negativna Spearmanova korelacija od - 0,70 ( $p = 0,00045$ , FDR = 0,022) između smanjene ekspresije gena koji pripadaju kategoriji staničnih obilježja odgovor na androgen i pojavnosti primarnih tumora, dok je dobivena pozitivna korelacija između povećano ekspimiranih gena koji pripadaju Reactome kategorijama: nedostatak IRAK4 (TLR2/4) te MET aktivira Rap1 i Rac1, i pojavnosti metastatskih tumora. Navedeni rezultati ukazuju na mogućnost da se normalni organi razlikuju u ekspresiji gena koji pripadaju kategoriji odgovor na androgen, te da oni organi koji imaju povećanu ekspresiju gena koji pripadaju kategoriji staničnih obilježja odgovor na androgen, imaju veću pojavnost nastanka primarnih tumora u odnosu na ona tkiva koja imaju smanjenu ekspresiju.

Odgovor na androgen i androgen signalizacija je povezana za sada samo s povećanim rizikom od raka prostate<sup>133</sup>. Međutim, androgeni receptori mogu se naći u širokom rasponu tkiva u cijelom tijelu<sup>134</sup>, što može implicirati da je signalizacija androgena povezana s nastankom i inicijacijom i ostalih primarnih tumora. Navedenu hipotezu je još potrebno eksperimentalno dokazati, s obzirom na to da naša bioinformatička studija nije dovoljna za potvrdu. Iako uključenost ovog puta barem u tumorigenezi raka prostate nije novost, novost podataka iz ove studije je da razina gena koji pripadaju kategoriji odgovor na androgen u zdravim organima mogla bi utjecati na budućnost razvoj tumora

Također su dobiveni rezultati koji pokazuju da povećana ekspresija Reactome kategorija nedostatak IRAK4 (TLR2/4) te MET aktivira Rap1 i Rac1, pozitivno korelira s mjestima nastanka metastatskih tumora. Dakle, možemo zaključiti da postoji mogućnost da su tkiva koja u normalnim uvjetima imaju povećanu ekspresiju gena koji pripadaju navedenim kategorijama podložnija za nastanak metastatskih tumora.

Kinaza IRAK4 potiče endosomalni TLR i signaliziranje imunološkog kompleksa u B stanicama i plazmacitoidnim dendritskim stanicama. Kao rezultat nedostatka IRAK4, pacijenti pate od rekurentnih infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim piogenim bakterijama kao što je *Streptococcus pneumoniae* jer krvne stanice ovih pacijenata ne uspijevaju generirati proupalne citokine nakon stimulacije s IL1 $\beta$ , IL18 i TLR agonistima. Nije iznenađujuće da su mnogi okolišni čimbenici rizika od raka povezani s kroničnom upalom. Na primjer, izazivanje upale bakterijskim i virusnim infekcijama povećava rizik od raka. Stoga, kao nužni posrednici

proupalne signalizacije IL1 $\beta$  i TLR, kinaze iz obitelji IRAK predstavljaju racionalne mete za lijekove protiv raka <sup>135</sup>.

Rap1 GTPaza jedna je od glavnih komponenti signalnih kaskada iznutra prema van koja igra ključnu ulogu u aktiviranju integrina, te je disregulacija Rap1 dokazana u invaziji tumora i metastaza <sup>136</sup>. I druge Rho GTP-aze imaju važnu ulogu i u procesu karcinogeneze i metastaziranja. Najbolje karakterizirani članovi Rho porodice GTPaza su Rac1, RhoA i Cdc42. Tijekom procesa karcinogeneze, genetske promjene u tumor supresorima i onkogenima dovode do početne transformacije normalnih stanica u maligne stanice. Transformirane stanice pokazuju povećanu staničnu proliferaciju, izbjegavanje apoptoze i nekontroliran rast. Nakon što se transformirane stanice injiciraju u miša dolazi do nastanka tumora. Transformirane stanice imaju i promijenjen aktinski citoskelet, te veliku ulogu u promjeni i kontroli aktinskog citoskeleta imaju RhoGTP-aze. Kao regulatori aktinskog citoskeleta, RhoGTP-aze reguliraju mnoge stanične procese, uključujući staničnu polarnost, staničnu migraciju, kao i stanični ciklus. Dobivanje pro-migratornog fenotipa omogućuje tumorskim stanicama da invadiraju stromu koja okružuje primarni tumor i da prodru u krvožilni ili limfatični sustav. Dakle, mnoge GTPaze i njeni efektori su potrebni za staničnu transformaciju induciranu s onkogenim signaliziranjem ili tumor supresorskom inaktivacijom. Štoviše, inhibiranje RhoGTP-aza i ranih događaja koji omogućuju ulaz tumorskih stanica u cirkulaciju bi dovelo do smanjenja progresije metastatske bolesti, glavnog uzroka smrtnosti od malignih bolesti <sup>97, 137, 138</sup>.

Mnogo prije cijele metastatske kaskade, formira se pre-metastatska niša na udaljenom mjestu gdje će se razviti metastaza potaknuta čimbenicima koji promiču tumorigenezu, koji su oslobođeni iz primarnog tumora. Ti čimbenici uključuju izvanstanične vezikule koje nose mRNA gene relevantne za migraciju stanica, miRNA kao čimbenike koji potiču invaziju, ligande receptora epidermalnog faktora rasta, induktore prijelaza EMT i remodelatore izvanstaničnog matriksa <sup>19</sup>.

Tumorski egzosomi mogu potaknuti epitelno-mezenhimalnu tranziciju, angiogenezu, izbjegavanje imunskog sustava, stvaranje pred-metastatskog mikrokruženja i prijenos molekula otpornih na lijekove, čime se potiče rast tumora, invazija i metastaze. Integrini su važne regulacijske molekule na egzosomima koje mogu locirati metastatske stanice u početnom stadiju metastaza i pokazuju dobar organotropizam. Ova činjenica sugerira da će jasno razumijevanje uloga egzosomalnih integrina biti korisno za buduće kliničke primjene <sup>139</sup>.



Mnoge metastaze pokazuju različite metaboličke osobine u usporedbi s tumorima iz kojih potječu, omogućujući preživljavanje i rast u novom okruženju. Posljedično, metaboličke značajke ovisne o stadiju mogu pružiti terapijske prozore za prevenciju ili smanjenje metastaza, a ciljanje novih metaboličkih svojstava koja se javljaju u utvrđenim metastazama može omogućiti njihovo iskorjenjivanje <sup>140</sup>.

U ovom radu napravljena je i diferencijalno ekspresijska analiza između malignih tumora i odgovarajućeg normalnog tkiva, te su pronađeni ključni geni povezani s malignim fenotipom. Zanimljivo je da je PPAR signalni put bio obogaćen i u smanjeno ekspimiranim ključnim genima raka dojke, kao i u smanjeno ekspimiranim ključnim genima hepatocelularnog karcinoma jetre. PPAR transkripcijski čimbenici su povezani s metaboličkim bolestima te su zanimljiva meta za pronalazak novih lijekova. Mnogi radovi su pokazali da aktivacija PPAR $\gamma$  s ligandima dovodi do smanjene stanične proliferacije ili do poticanja apoptoze <sup>141, 142</sup>.

U ovom radu dobiveni su i rezultati korelacije između broja smanjeno i povećano ekspimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi za svaki od analiziranih tumora. Tako se pokušalo razumjeti metastatski organotropizam, budući da primarni tumori nisu jednako skloni metastaziranju (npr. primarni maligni tumori mozga rijetko metastaziraju).

Za neka tkiva koja su bila predviđena mjesta metastazi, kao što je timus, ne postoje podaci u autopsijskoj studiji koja je se koristila za dobivanje podataka o incidenciji metastatskih tumora za svaki tip primarnog tumora. Također, za neka tkiva kao što su kosti, koje je jedno od najčešćih mjesta metastazi, ne postoje podatke o genskoj ekspresiji u normalnim tkivima, dok su za koštanu srž navedeni ti podatci. Budući da je koštana srž dio kosti, prilikom izračuna korelacije između postotka pojavnosti metastazi u pojedinom organu i min-max normalizirane vrijednosti smanjeno/povećanih ključnih gena u karcinomu i u pojedinim normalnim tkivima, pojavnost metastazi u koštanoj srži se izjednačila s pojavnosti metastazi u kostima za koje postoje podaci.

Značajni rezultati korelacije između broja smanjeno ekspimiranih ključnih gena povezanih s malignim fenotipom u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi dobiveni su za rak mokraćnog mjehura i adenokarcinom prostate. Značajni rezultati korelacije između broja povećano ekspimiranih ključnih gena povezanih sa malignim fenotipom u normalnim tkivima

i pojavnosti metastazi dobiveni su za karcinom bubrega kromofobnog tipa, adenokarcinom pluća i rak štitnjače.

Neke od genskih kategorija kojima pripadaju smanjeno eksprimirani ključni geni u karcinomu mokraćnog mjehura su PPAR signalni put i angiogeneza. Doista, PPAR signalni put se već pokazao kao jedan od mogućih terapijskih targeta za liječenje karcinoma mokraćnog mjehura. Pokazalo se da aktivacija PPAR s roziglitazonom i pioglitazonom, inducira arest staničnog ciklusa u G2 fazi i apoptozu stanica karcinoma mokraćnog mjehura, koja dovodi do inhibicije stanične proliferacije *in vitro* i supresije tumorskog rasta *in vivo*<sup>143</sup>. I angiogeneza ima ključnu ulogu ne samo u nastanku raka mokraćnog mjehura, već i mnogih drugih neoplazmi. Štoviše, u karcinomu mokraćnog mjehura ekspresija gena povezanih s angiogenezom ima i prognostičku ulogu, te na osnovu ekspresije navedenih gena mogu se razlikovati podgrupe raka mokraćnog mjehura s boljom i lošijom prognozom<sup>144</sup>. Napravljena je i analiza genske ontologije na smanjeno eksprimiranim ključnim genima u adenokarcinomu prostate, te navedenom analizom nisu dobivene značajno obogaćene kategorije.

Povećano eksprimirani ključni geni u kromofobnom karcinomu bubrega većinom pripadaju genskim kategorijama povezanim s oksidativnom fosforilacijom. Normalne bubrežne stanice imaju visoku aktivnost lanca transporta elektrona ili oksidativne fosforilacije jer su filtracija krvi i reapsorpcija hranjivih tvari jako ovisni o ATP-u, te je oštećenje mitohondrija povećano od manje agresivnog do najagresivnijeg oblika karcinoma bubrega<sup>145</sup>.

Većina povećano eksprimiranih ključnih gena u adenokarcinomu pluća pripada kategoriji staničnog ciklusa, dok za povećano eksprimirane ključne gene u raku štitnjače nisu pronađene statistički značajne obogaćene kategorije. Progresija kroz stanični ciklus temelji se na aktivaciji različitih CDK-ciklin kompleksa koji sprječavaju stanice da uđu u novu fazu dok one uspješno ne završe prethodnu. Osim toga, niz kontrolnih točaka staničnog ciklusa dizajniran je za očuvanje integriteta genoma i kromosomske stabilnosti. Neoplastične plućne stanice razvijaju sposobnost zaobilazanja nekoliko od ovih kontrolnih točaka, a proliferacija tumorskih stanica često je povezana s genetskim ili epigenetskim promjenama u ključnim regulatorima staničnog ciklusa<sup>147</sup>.

Termini spoj stanica i aktinski citoskelet su pojmovi koji su zajednički smanjeno eksprimiranim ključnim genima između raka mokraćnog mjehura i pripadajućeg normalnog tkiva, kao i između adenokarcinoma debelog crijeva i pripadajućeg normalnog tkiva. Termin

spoj stanica je obogaćen i u analizi genske ontologije između smanjeno ekprimiranih ključnih gena raka dojke i normalnog tkiva dojke. Većina zajedničkih kategorija koje su zajedničke povećano ekprimiranim ključnim genima između tumora i pripadajućeg normalnog tkiva su povezane s kontrolom staničnog ciklusa.

Navedeni rezultat da spojevi među stanicama su zajednički smanjeno ekprimiranim ključnim genima između pojedinih tumora i normalnog tkiva, nam govori da dolazi do gubitka stanično-stanične komunikacije u malignim tumorima, što moguće dovodi do lakšeg odvajanja malignih stanica i njihovog ulaska u krvotok, što je prvi korak metastaziranja. Doista, navedeni rezultati su u skladu s početnom hipotezom da se manipulacijom staničnom parabiozom mogu spriječiti i liječiti maligni tumori. Naime, predloženo je od strane M. Radmana da je latencija u početku starenja i bolesti povezanih sa starenjem uglavnom posljedica fenotipske supresije staničnih disfunkcija putem molekularnog prometa među susjednim stanicama. Međustanični promet kreće se od prijenosa iona i metabolita (putem pukotinskih spojeva) do cijelih organela (putem tunelskih nanocijevi). M. Radman je bilo koji mehanizam komunikacije između stanica koji rezultira funkcionalnom unakrsnom komplementacijom među stanicama nazvao stanična parabioza. Takva 'stanična solidarnost' stvara homeostazu tkiva puferiranjem defekata i usrednjavanjem staničnih funkcija unutar tkiva <sup>9</sup>. Također, postoji mogućnost da bi se manipulacijom stanične parabioze mogle spriječiti metastaze, jer što su stanice tkiva čvršće povezane, teže ih je odvojiti jedna od druge, a navedeni proces odvajanja tumorskih stanica od primarnog organa je upravo proces koji omogućava prvi i glavni korak metastaziranja, bez kojeg nema ni ostalih koraka metastaziranja.

Manipulacija parabiozom je moguća korištenjem molekula koje inhibiraju ili povećavaju komunikaciju između stanica, ali budući da je kao za svaku terapiju potrebno provesti klinička ispitivanja, navedena terapija se ne može koristiti jer je još u eksperimentalnoj fazi, te navedena istraživanja o njenoj efikasnosti i sigurnosti nisu provedena. Ovaj rad nije koristio eksperimentalne metode, tako da je to jedno od ograničenja ovog rada. U budućnosti se nadamo da će se provesti klinička ispitivanja utjecaja manipulacije aktinskog citoskeleta i staničnih spojeva malim molekulama na nastanak metastatskih i primarnih tumora.

Također, potrebno je napomenuti da iako je dobivena statistički značajna korelacija između ekspresije ključnih gena u normalnim tkivima i pojavnosti metastazi za rak štitnjače i mokraćnog mjehura, adenokarcinom prostate i pluća, te karcinom bubrega kromofobnog tipa navedene rezultate treba oprezno tumačiti. Naime, ovo istraživanje pronalazi samo korelacije

između organ-specifične genske ekspresije i podložnosti organa za nastanak primarnih i metastatskih tumora, te kao takvo ne uspostavlja uzročnu vezu između to dvoje. Dodatni *in vitro* i *in vivo* eksperimenti su potrebni za potvrdu ove eksploratorne bioinformatičke analize.

Što se tiče ekspresije gena u organima koji su česta mjesta nastanka metastaza, koštana srž, koja je dio kosti, organa u kojem često nastaju metastaze, se nalazi među organima koji imaju i najveći broj i smanjeno i povećano eksprimiranih gena u odnosu na sva tkiva. U odnosu na sva ostala tkiva, jetra je među organima koji imaju najveći broj povećano eksprimiranih gena, dok limfni čvorovi se nalaze među organima koji imaju najveći broj smanjeno eksprimiranih gena u odnosu na prosječnu ekspresiju svih normalnih tkiva. Neki od organa koji imaju najveći broj zajedničkih smanjeno eksprimiranih ključnih gena u pojedinom karcinomu i u tom pojedinom tkivu u odnosu na sva ostala tkiva su upravo neka od mjesta koja su najčešća mjesta metastazi (kosti/koštana srž, te limfni čvorovi).

Postoje i drugi radovi koji koristeći gensku ekspresiju predviđaju mjesta metastazi za svaki pojedini uzorak. Naime, Albaradei i suradnici koriste metode dubokog učenja i gensko ekspresijske podatke tumorskih uzoraka da bi predvidjeli mjesta metastaziranja u kosti, mozak, pluća, i jetru <sup>148</sup>. Ovaj rad se razlikuje od navedene studije po tome što ne predviđa mjesto metastaziranja za svaki pojedini uzorak, već pokušava razumjeti metastatski organotropizam tj. predispoziciju normalnih organa za nastanak sekundarnih tumora.

Na kraju ovog rada pronađeni su i diferencijalno eksprimirani geni povezani s preživljenjem između ranih i kasnih stadija, te se na osnovu ekspresije navedenih gena i metodom potpornih vektora pokušalo razlikovati navedene stadije. Iako je napravljena i WGCNA analiza na diferencijalno eksprimiranim genima između ranih i kasnih stadija, za niti jedan od analiziranih malignih tumora nisu dobiveni značajni rezultati iako su se koristili blaži kriteriji za određivanje ključnih gena ( $|GS| > 0,2$ ,  $|MM| > 0,8$ ,  $p$ -vrijednost  $< 0,05$ ). Obogaćene genske kategorije koje su zajedničke diferencijalno eksprimiranim genima između ranih i kasnih stadija većine tumora su izvanstanični prostor i organizacija izvanstaničnog prostora. Otprije je poznato da promjene u interakciji između stanica i izvanstaničnog matriksa, kao i remodeliranje izvanstaničnog matriksa imaju ključne posljedice na stanične i tkivne funkcije. Remodeliranje izvanstaničnog matriksa ima ključnu fazu u svim stadijima metastaziranja, od preživljenja u cirkulaciji do formiranja metastatskih niša <sup>149</sup>.

Najbolji rezultati razlikovanja ranih i kasnih stadija s pomoću diferencijalno eksprimiranih gena koji značajno ne koreliraju dobiveni su za kromofobni karcinom bubrega.

Međutim, generiranje više uzoraka koji pripadaju metastatskim stadijima s pomoću SMOTE (engl. *synthetic minority oversampling technique*)<sup>150</sup> metode, koja je jedna od najkorištenijih metoda za ispravljanje disbalansa među podacima, moglo se mnogo uspješnije razlikovati rane i kasne stadije budući da je postojao disbalans između broja uzoraka ranih i kasnih stadija u TCGA bazi podataka za veliku većinu tumora.

Biomarkeri se koriste većinom za dijagnozu bolesti, a ako bi se biomarkerima pokazalo da je tumor u ranoj fazi, liječnici bi mnogo prije mogli donijeti odluku o provođenju kirurškog liječenja jer bi postojala mogućnost da maligni tumor nije metastazirao u udaljene organe. Dakle, navedeni biomarkeri bi ubrzali donošenje odluke o liječenju te tako povećali šanse preživljenja pacijentima oboljelih od malignih bolesti, jer brzina donošenja odluke o daljnjem liječenju je jako bitna, budući da neki od tumora mogu jako brzo napredovati. Navedeni biomarkeri, tj. DE geni između ranih i kasnih stadija tumora bi služili samo za dijagnozu stadija bolesti, a na osnovu stadija se donosi odluka o liječenju.

DE geni između ranih i kasnih stadija bi pomogli tako u donošenju odluke o liječenju, budući da se bez saznanja o napredovanju tumora ne može ni donijeti ni odluka o daljnjem liječenju. Naime, pacijenti s ranim stadijima tumora zahtijevaju kirurško liječenje, koje u velikoj većini malignih tumora dovodi do remisije bolesti dok pacijenti s tumorima u kasnim stadijima nisu kandidati za kirurško liječenje već su kandidati za liječenje kemo- i radioterapijom. Osim korištenja navedenih gena kao biomarkera za donošenje odluke o daljnjem liječenju, navedeni geni bi se mogli koristiti i za razvoj novih oblika liječenja, ako se pokaže uzročno-posljedična veza između navedenih gena i nastanka tumora.

Postoje i druge studije koje su koristile gensko ekspresijske podatke za razlikovanje pojedinih stadija tumora, te su neke od tih studija također koristile i metodu potpornih vektora, ali su koristeći metodu pojačanog učenja kernelima (od engl. *multiple kernel learning*, MKL) dobili statistički značajnije rezultate s mnogo manje korištenih gensko ekspresijskih svojstava u analizi<sup>151</sup>. U navedenoj studiji korišteni su TCGA podaci za 20 primarnih tumora. Prvi su stadij I smatrali ranim rakom, a stadije II, III i IV kasnim stadijima. Također su radili analizu kada se ranim stadijem smatra stadij I i II, a kasnim stadijem III i IV. Koristili su tri algoritma strojnog učenja za razlikovanje ranih i kasnih stadija tumora, SVM, MKL i RF (od engl. *Random Forest*) te na kraju uspoređuju te algoritme<sup>151</sup>. U studiji koju su proveli Bhalla i sur. analizira se samo karcinom bubrega svijetlih stanica, te su autori s pomoću DE gena pokušali razlikovati rane i kasne stadije karcinoma bubrega svijetlih stanica. Konačna točnost njihovog

modela strojnog učenja bila je oko 70 % <sup>152</sup>. Singh i sur. studija je slična studiji koju su proveli Bhalla i suradnici, a razlika je u tome što koriste različitu vrstu tumora, kao i algoritam za izdvajanje značajki iz različitih faza papilarnog karcinoma bubrega <sup>153</sup>. Isto vrijedi i za studiju Jia i sur. koji su napravili model razlikovanje različitih stadija raka dojke na osnovu gensko ekspresijskih podataka iz TCGA baze podataka <sup>154</sup>.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata donose se sljedeći zaključci:

1. Organ-specifična genska ekspresija, tj. intrinzična svojstva normalnih organa su mogući uzrok različite pojavnosti primarnih i metastatskih tumora u pojedinim organima. Navedeni zaključak temeljimo na statistički značajnoj korelaciji između pojavnosti primarnih tumora te pojavnosti metastatskih tumora i povećane ili smanjene ekspresije pojedinih genskih kategorija u normalnim organima. Ovaj rad pokazuje da tkiva koja u normalnim uvjetima povećavano izražavaju Reactome genske kategorije nedostatak IRAK4 (TLR2/4) te MET aktivira Rap1 i Rac1 su podložnija nastanku sekundarnih metastatskih tumora. Navedeni rezultati su u skladu s početnom hipotezom da se manipulacijom staničnom parabiozom mogu spriječiti i liječiti maligni tumori budući da Rho-GTPaze su regulatori aktinskog citoskeleta, koji je jedan od glavnih regulatora stanične migracije. Jedina genska kategorija koja je značajno korelirala s pojavnosti primarnih tumora je odgovor na androgen. Navedena kategorija je dosad najviše povezana s nastankom adenokarcinoma prostate, gdje se hormonska terapija ili terapija deprivacije androgena koristi za smanjenje razina testosterona i liječenje malignog tumora prostate. Do sad nije pronađena povezanost između ekspresije androgena u ostalim tkivima i nastanka primarnih tumora, te je navedenu hipotezu da povećani androgeni odgovor može dovesti do nastanka primarnih tumora, je potrebno eksperimentalno potvrditi.

2. Korelacije između organ-specifične genske ekspresije i pojavnosti metastatskih tumora koristile su se za predviđanje mjesta metastazi. Statistički značajna umjereno pozitivna korelacija i donekle zadovoljavajući rezultati dobiveni su za adenokarcinom prostate, te adenokarcinom pluća i rak štitnjače. Budući da postoje i potkategorije mnogih malignih tumora koje se razlikuju u genskoj ekspresiji, postoji mogućnost da bi se dobili bolji rezultati predviđanja kada bi se koristile potkategorije pojedinih malignih tumora. Također je pokazano da su spojevi među stanicama zajednički smanjeno eksprimiranim ključnim genima između pojedinih tumora i normalnog tkiva. Navedenu opservaciju možemo objasniti tako što najvjerojatnije dolazi do gubitka stanično-stanične komunikacije u malignim tumorima, i to omogućuje lakše odvajanje malignih stanica i ulaska malignih stanica u krvotok, što je prvi korak metastaziranja. Doista, navedeni rezultati su u skladu s početnom hipotezom da se manipulacijom staničnom parabiozom mogu spriječiti i liječiti maligni tumori.

3. U ovom radu je pokazano da postoji mogućnost da bi se manipulacijom stanične parabloze mogle spriječiti metastaze, jer što su stanice tkiva čvršće povezane, teže ih je odvojiti jedna od druge, a navedeni proces odvajanja tumorskih stanica od primarnog organa je upravo proces koji omogućava prvi i glavni korak metastaziranja, bez kojeg nema ni ostalih koraka metastaziranja. U budućnosti se nadamo da će se provesti pretklinička i klinička ispitivanja utjecaja manipulacije aktinskog citoskeleta i staničnih spojeva malim molekulama na nastanak metastatskih i primarnih tumora.

4. Razlikovanjem ranih i kasnih stadija malignih tumora na osnovu ekspresije diferencijalno eksprimiranih gena metodom potpornih vektora dobiveni su zadovoljavajući rezultati za maligne tumore mokraćnog mjehura, bubrega, debelog crijeva, te štitnjače. Navedeni zaključak temeljimo na vrijednosti Cohenove kappe od 0,3-0,6. Odlični rezultati razlikovanja ranog i kasnog stadija kromofobnog karcinoma bubrega (Cohenova kapa 0,875) dobiveni su koristeći diferencijalno eksprimirane gene koji međusobno ne koreliraju. Međutim, generiranjem više uzoraka koji pripadaju metastatskim stadijima pomoću SMOTE metode, koja je jedna od najkorištenijih metoda za ispravljanje disbalansa među podacima, puno bolji rezultati razlikovanja ranih i kasnih stadija pomoću diferencijalno eksprimiranih gena su dobiveni (vrijednost Cohenove kappe od 0,635-0,95), budući da je postojao disbalans između broja uzoraka ranih i kasnih stadija u TCGA bazi podataka za veliku većinu tumora. Također su odlični rezultati razlikovanja ranih i kasnih stadija tumora dobiveni koristeći diferencijalno eksprimirane gene povezane s preživljenjem na novom gensko ekspresijskom setu koji je sadržavao i nove uzorke generirane SMOTE metodom (vrijednost Cohenove kappe od 0,417-0,967). Dakle, jedan od zaključaka ovog rada je da bi se diferencijalno eksprimirani geni između ranih i kasnih stadija malignih tumora mogli koristiti za razlikovanje navedenih stadija, što bi omogućilo da se u kratkom razdoblju donese odluka o liječenju kirurškim putem ili kemo- i radioterapijom. Naime, kada se otkrije maligni tumor u velikoj većini slučajeva ne zna se je li postolje udaljene metastaze bez daljnje dijagnostike.



---

## 7. LITERATURA

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209-249 (2021).
2. Smith, H.A. & Kang, Y. Determinants of Organotropic Metastasis. *Annual Review of Cancer Biology* **1**, 403-423 (2017).
3. Gao, Y. *et al.* Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil. *Dev Cell* **49**, 375-391 (2019).
4. Disibio, G. & French, S.W. Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med* **132**, 931-939 (2008).
5. Guan, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* **5**, 402-418 (2015).
6. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 98-101 (1989).
7. Hart, I.R. & Fidler, I.J. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* **40**, 2281-2287 (1980).
8. Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**, 453-458 (2003).
9. Radman, M. Cellular parabiosis and the latency of age-related diseases. *Open Biol* **9**, 180250 (2019).
10. Conese, M., Carbone, A., Beccia, E. & Angiolillo, A. The Fountain of Youth: A Tale of Parabiosis, Stem Cells, and Rejuvenation. *Open Med (Wars)* **12**, 376-383 (2017).
11. Ratajczak, M.Z. & Ratajczak, J. Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med* **5**, 7 (2016).
12. Gerdes, H.H., Bukoreshtliev, N.V. & Barroso, J.F. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* **581**, 2194-2201 (2007).
13. Stoker, M.G., Shearer, M. & O'Neill, C. Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblasts. *J Cell Sci* **1**, 297-310 (1966).
14. Alkasalias, T. *et al.* Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 17188-17193 (2014).

15. Berenblum, I. A speculative review; the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res* **14**, 471-477 (1954).
16. Gloushankova, N.A., Zhitnyak, I.Y. & Rubtsova, S.N. Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Biochemistry (Mosc)* **83**, 1469-1476 (2018).
17. Yao, D., Dai, C. & Peng, S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res* **9**, 1608-1620 (2011).
18. Jiang, W.G. *et al.* Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol* **35 Suppl**, S244-S275 (2015).
19. Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A. & Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 28 (2020).
20. Croce, C.M. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* **358**, 502-511 (2008).
21. Sanchez-Vega, F. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **173**, 321-337 e310 (2018).
22. Collins, K., Jacks, T. & Pavletich, N.P. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2776-2778 (1997).
23. Han, Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med* **17**, 116 (2019).
24. Zhao, B. *et al.* Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* **21**, 2747-2761 (2007).
25. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
26. Gabay, M., Li, Y. & Felsher, D.W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **4** (2014).
27. Aster, J.C., Pear, W.S. & Blacklow, S.C. The varied roles of notch in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **12**, 245-275 (2017).
28. Sporn, M.B. & Liby, K.T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature Reviews Cancer* **12**, 564-571 (2012).
29. Yuan, T. & Cantley, L. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497-5510 (2008).
30. Santarpia, L., Lippman, S.M. & El-Naggar, A.K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* **16**, 103-119 (2012).

31. Zhang, Y. & Wang, X. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of hematology & oncology* **13**, 1-16 (2020).
32. Syed, V. TGF- $\beta$  signaling in cancer. *Journal of cellular biochemistry* **117**, 1279-1287 (2016).
33. Marei, H.E. *et al.* p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer cell international* **21**, 1-15 (2021).
34. Eccles, S.A. & Welch, D.R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* **369**, 1742-1757 (2007).
35. Steeg, P.S. & Theodorescu, D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **5**, 206-219 (2008).
36. Klein, C.A. Framework models of tumor dormancy from patient-derived observations. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 42-49 (2011).
37. Ewing, J. *Neoplastic diseases; a treatise on tumors*, Edn. 3d ed rev. and enl., with 546 illustrations. (W.B. Saunders, Philadelphia, London,; 1928).
38. Langley, R.R. & Fidler, I.J. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* **128**, 2527-2535 (2011).
39. Hapach, L.A., Mosier, J.A., Wang, W. & Reinhart-King, C.A. Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *NPJ Precis Oncol* **3**, 20 (2019).
40. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
41. Kalluri, R. & Neilson, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**, 1776-1784 (2003).
42. Kalluri, R. & Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428 (2009).
43. Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol* **13**, 395-412 (2018).
44. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-196 (2014).
45. Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7**, 415-428 (2007).
46. Valastyan, S. & Weinberg, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275-292 (2011).

47. Chiang, S.P., Cabrera, R.M. & Segall, J.E. Tumor cell intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol* **311**, C1-C14 (2016).
48. Guo, W. & Giancotti, F.G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 816-826 (2004).
49. Strilic, B. & Offermanns, S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell* **32**, 282-293 (2017).
50. Akhtar, M., Haider, A., Rashid, S. & Al-Nabet, A. Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol* **26**, 69-74 (2019).
51. Massague, J. & Obenauf, A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**, 298-306 (2016).
52. Suhail, Y. *et al.* Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst* **9**, 109-127 (2019).
53. Peinado, H. *et al.* Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer* **17**, 302-317 (2017).
54. Liu, Y. & Cao, X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* **30**, 668-681 (2016).
55. Doglioni, G., Parik, S. & Fendt, S.M. Interactions in the (Pre)metastatic Niche Support Metastasis Formation. *Front Oncol* **9**, 219 (2019).
56. Christen, S. *et al.* Breast Cancer-Derived Lung Metastases Show Increased Pyruvate Carboxylase-Dependent Anaplerosis. *Cell Rep* **17**, 837-848 (2016).
57. Shinde, A., Wilmanski, T., Chen, H., Teegarden, D. & Wendt, M.K. Pyruvate carboxylase supports the pulmonary tropism of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* **20**, 76 (2018).
58. Zhou, H. *et al.* Colorectal liver metastasis: molecular mechanism and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 70 (2022).
59. Krishnan, K., Khanna, C. & Helman, L.J. The molecular biology of pulmonary metastasis. *Thorac Surg Clin* **16**, 115-124 (2006).
60. Weidle, U.H., Birzele, F., Kollmorgen, G. & Ruger, R. Molecular Basis of Lung Tropism of Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* **13**, 129-139 (2016).
61. Macedo, F. *et al.* Bone Metastases: An Overview. *Oncol Rev* **11**, 321 (2017).
62. Fornetti, J., Welm, A.L. & Stewart, S.A. Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *J Bone Miner Res* **33**, 2099-2113 (2018).
63. Ali, S., Gorska, Z., Duchnowska, R. & Jassem, J. Molecular Profiles of Brain Metastases: A Focus on Heterogeneity. *Cancers (Basel)* **13** (2021).

64. Adem, B., Vieira, P.F. & Melo, S.A. Decoding the Biology of Exosomes in Metastasis. *Trends Cancer* **6**, 20-30 (2020).
65. Mu, W., Rana, S. & Zoller, M. Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness. *Neoplasia* **15**, 875-887 (2013).
66. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* **2**, 213-219 (2006).
67. Bielenberg, D.R. & Zetter, B.R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J* **21**, 267-273 (2015).
68. Grange, C. *et al.* Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* **71**, 5346-5356 (2011).
69. Tominaga, N. *et al.* Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun* **6**, 6716 (2015).
70. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* **17**, 816-826 (2015).
71. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329-335 (2015).
72. Gonzalez-Avila, G. *et al.* Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **137**, 57-83 (2019).
73. Ardi, V.C. *et al.* Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway. *J Biol Chem* **284**, 25854-25866 (2009).
74. Noe, V. *et al.* Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* **114**, 111-118 (2001).
75. Lin, C.Y. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Sci* **102**, 815-827 (2011).
76. Sheu, B.C. *et al.* A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* **61**, 237-242 (2001).
77. Jenkins, G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1068-1078 (2008).
78. Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E. & Hall, D.M. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* **112**, 3-25 (2010).

79. Shay, G., Lynch, C.C. & Fingleton, B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol* **44-46**, 200-206 (2015).
80. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-545 (2001).
81. Coley, W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11 (1991).
82. Blomberg, O.S., Spagnuolo, L. & de Visser, K.E. Immune regulation of metastasis: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Dis Model Mech* **11** (2018).
83. Fleming, V. *et al.* Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front Immunol* **9**, 398 (2018).
84. Alitalo, K., Tammela, T. & Petrova, T.V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* **438**, 946-953 (2005).
85. Ribatti, D. & Crivellato, E. Immune cells and angiogenesis. *J Cell Mol Med* **13**, 2822-2833 (2009).
86. Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* **9**, 677-684 (2003).
87. Kumar, V. & Gabrilovich, D.I. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology* **143**, 512-519 (2014).
88. Ramanathan, M., Giladi, A. & Leibovich, S.J. Regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in murine macrophages by nitric oxide and hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 697-705 (2003).
89. Takanami, I., Takeuchi, K. & Naruke, M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* **88**, 2686-2692 (2000).
90. Facciabene, A. *et al.* Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* **475**, 226-230 (2011).
91. Sarvaiya, P.J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P. & Lesniak, M.S. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* **4**, 2171-2185 (2013).
92. Richmond, A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* **2**, 664-674 (2002).
93. Zlotnik, A., Burkhardt, A.M. & Homey, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* **11**, 597-606 (2011).
94. Muller, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-56 (2001).

95. Alkasalias, T. *et al.* RhoA knockout fibroblasts lose tumor-inhibitory capacity in vitro and promote tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E1413-E1421 (2017).
96. Bros, M., Haas, K., Moll, L. & Grabbe, S. RhoA as a key regulator of innate and adaptive immunity. *Cells* **8**, 733 (2019).
97. Haga, R.B. & Ridley, A.J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* **7**, 207-221 (2016).
98. Cancer Genome Atlas Research, N. *et al.* The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* **45**, 1113-1120 (2013).
99. Silva, T.C. *et al.* TCGA Workflow: Analyze cancer genomics and epigenomics data using Bioconductor packages. *F1000Res* **5**, 1542 (2016).
100. Colaprico, A. *et al.* TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* **44**, e71 (2016).
101. Consortium, G.T. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* **348**, 648-660 (2015).
102. Uhlen, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
103. Lizio, M. *et al.* Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol* **16**, 22 (2015).
104. Nguyen, B. *et al.* Genomic characterization of metastatic patterns from prospective clinical sequencing of 25,000 patients. *Cell* **185**, 563-575 e511 (2022).
105. Zambelli, F. *et al.* RNentropy: an entropy-based tool for the detection of significant variation of gene expression across multiple RNA-Seq experiments. *Nucleic Acids Res* **46**, e46 (2018).
106. Zambelli, F. & Pavesi, G. Using RNentropy to Detect Significant Variation in Gene Expression Across Multiple RNA-Seq or Single-Cell RNA-Seq Samples. *Methods Mol Biol* **2284**, 77-96 (2021).
107. Liberzon, A. A description of the Molecular Signatures Database (MSigDB) Web site. *Methods Mol Biol* **1150**, 153-160 (2014).
108. Liberzon, A. *et al.* The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* **1**, 417-425 (2015).
109. Liberzon, A. *et al.* Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* **27**, 1739-1740 (2011).

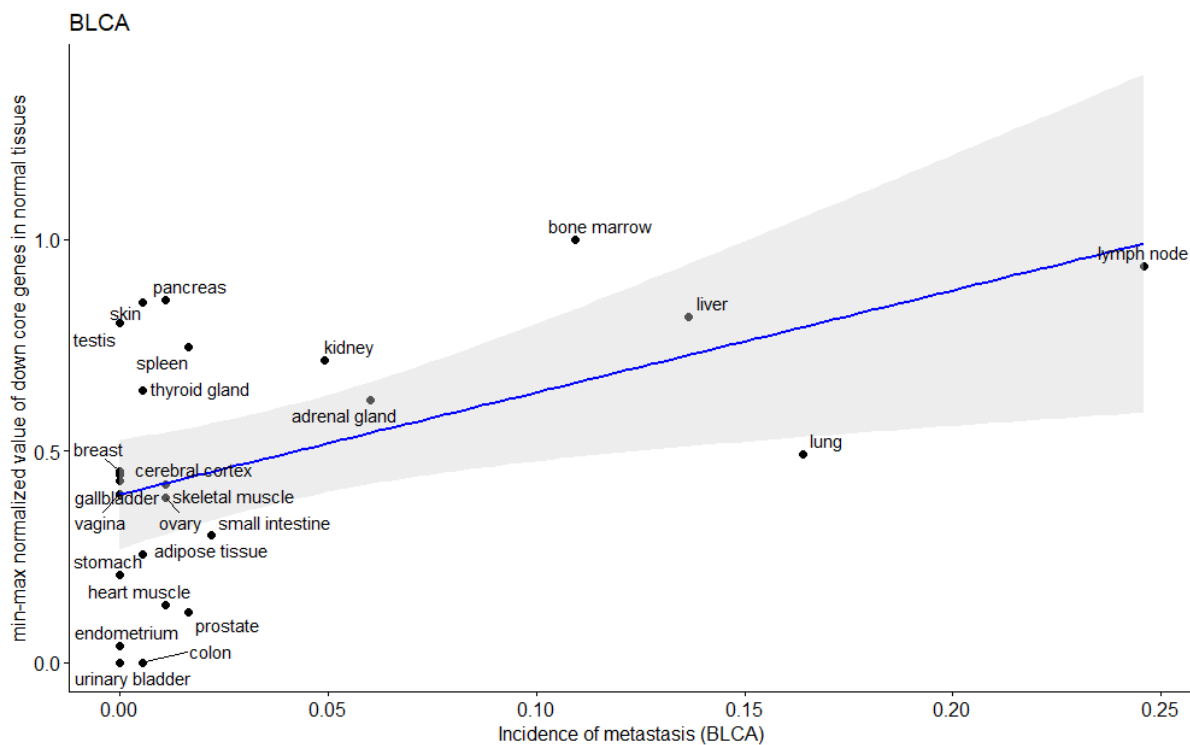
110. Barbosa, A.M. FuzzySim: applying fuzzy logic to binary similarity indices in ecology. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 853-858 (2015).
111. Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
112. Wang, Q. *et al.* Unifying cancer and normal RNA sequencing data from different sources. *Sci Data* **5**, 180061 (2018).
113. Langfelder, P. & Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**, 559 (2008).
114. Wang, W. *et al.* Weighted gene co-expression network analysis of expression data of monozygotic twins identifies specific modules and hub genes related to BMI. *BMC Genomics* **18**, 872 (2017).
115. Zhang, B. & Horvath, S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol* **4**, Article17 (2005).
116. Zhou, G. *et al.* NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res* **47**, W234-W241 (2019).
117. Abbas-Aghababazadeh, F., Li, Q. & Fridley, B.L. Comparison of normalization approaches for gene expression studies completed with high-throughput sequencing. *PLoS One* **13**, e0206312 (2018).
118. Anaya, J. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. *PeerJ Computer Science* **2**, e67 (2016).
119. Kuhn, M. Building Predictive Models in R Using the caret Package. *Journal of Statistical Software* **28**, 1 - 26 (2008).
120. Torgo, L. Data Mining with R, learning with case studie. (2010).
121. Goksuluk, D. *et al.* MLSeq: Machine learning interface for RNA-sequencing data. *Comput Methods Programs Biomed* **175**, 223-231 (2019).
122. Landis, J.R. & Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159-174 (1977).
123. Monaghan, T.F. *et al.* Foundational Statistical Principles in Medical Research: Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, and Negative Predictive Value. *Medicina (Kaunas)* **57** (2021).
124. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* **2**, 401-404 (2012).
125. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, pl1 (2013).



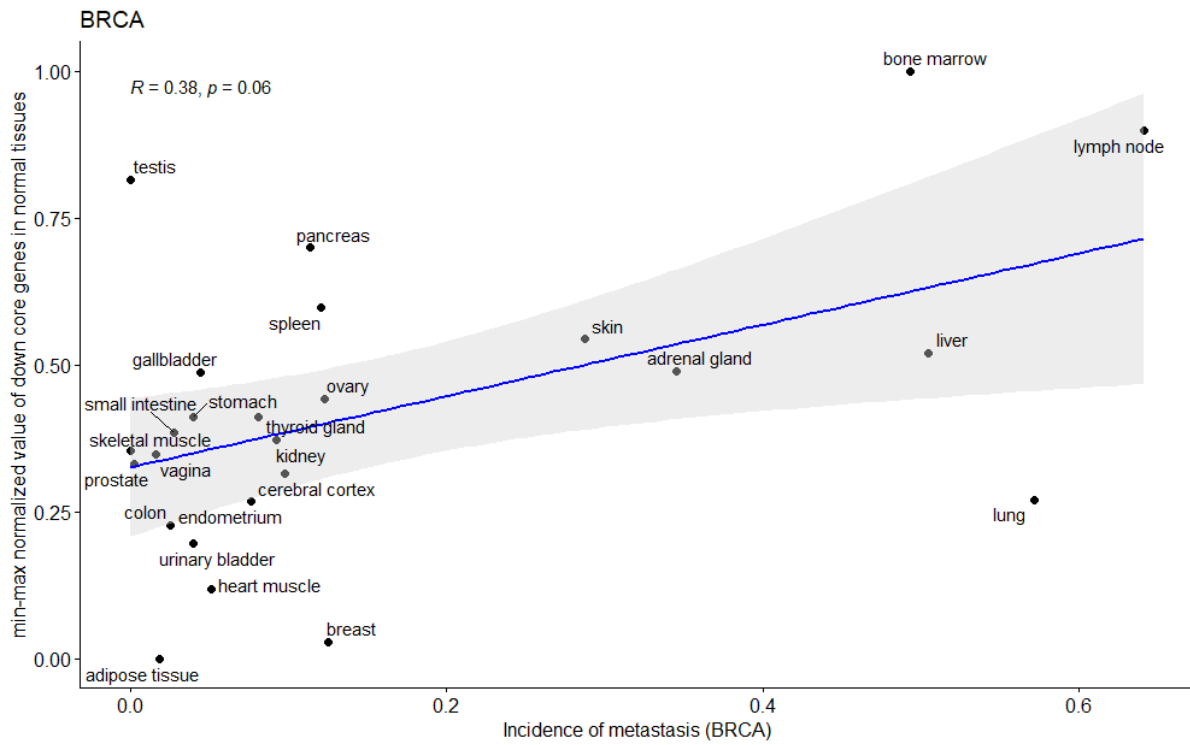
126. Wu, S., Powers, S., Zhu, W. & Hannun, Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature* **529**, 43-47 (2016).
127. Wu, S., Zhu, W., Thompson, P. & Hannun, Y.A. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun* **9**, 3490 (2018).
128. Thomas, F., Roche, B. & Ujvari, B. Intrinsic versus Extrinsic Cancer Risks: The Debate Continues. *Trends Cancer* **2**, 68-69 (2016).
129. Silva, A.S. *et al.* Gathering insights on disease etiology from gene expression profiles of healthy tissues. *Bioinformatics* **27**, 3300-3305 (2011).
130. Nunney, L. & Muir, B. Peto's paradox and the hallmarks of cancer: constructing an evolutionary framework for understanding the incidence of cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370** (2015).
131. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347**, 78-81 (2015).
132. Klutstein, M., Moss, J., Kaplan, T. & Cedar, H. Contribution of epigenetic mechanisms to variation in cancer risk among tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 2230-2234 (2017).
133. He, Y. *et al.* Androgen signaling is essential for development of prostate cancer initiated from prostatic basal cells. *Oncogene* **38**, 2337-2350 (2019).
134. Davey, R.A. & Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* **37**, 3-15 (2016).
135. Rhyasen, G.W. & Starczynowski, D.T. IRAK signalling in cancer. *Br J Cancer* **112**, 232-237 (2015).
136. Looi, C.K., Hii, L.W., Ngai, S.C., Leong, C.O. & Mai, C.W. The Role of Ras-Associated Protein 1 (Rap1) in Cancer: Bad Actor or Good Player? *Biomedicines* **8** (2020).
137. Clayton, N.S. & Ridley, A.J. Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Front Cell Dev Biol* **8**, 222 (2020).
138. Crosas-Molist, E. *et al.* Rho GTPase signaling in cancer progression and dissemination. *Physiol Rev* **102**, 455-510 (2022).
139. Zhao, L., Ma, X. & Yu, J. Exosomes and organ-specific metastasis. *Mol Ther Methods Clin Dev* **22**, 133-147 (2021).
140. Bergers, G. & Fendt, S.M. The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nat Rev Cancer* **21**, 162-180 (2021).

141. Huang, R. *et al.* The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Pan-Cancer. *PPAR Res* **2020**, 6527564 (2020).
142. Tachibana, K., Yamasaki, D., Ishimoto, K. & Doi, T. The Role of PPARs in Cancer. *PPAR Res* **2008**, 102737 (2008).
143. Lv, S., Wang, W., Wang, H., Zhu, Y. & Lei, C. PPARgamma activation serves as therapeutic strategy against bladder cancer via inhibiting PI3K-Akt signaling pathway. *BMC Cancer* **19**, 204 (2019).
144. Wang, J. *et al.* Angiogenesis related gene expression significantly associated with the prognostic role of an urothelial bladder carcinoma. *Transl Androl Urol* **9**, 2200-2210 (2020).
145. Xiao, Y. *et al.* Decreased Mitochondrial DNA Content Drives OXPHOS Dysregulation in Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* **80**, 3830-3840 (2020).
146. Chakraborty, S., Balan, M., Sabarwal, A., Choueiri, T.K. & Pal, S. Metabolic reprogramming in renal cancer: Events of a metabolic disease. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1876**, 188559 (2021).
147. Eymin, B. & Gazzeri, S. Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis. *Cell Adh Migr* **4**, 114-123 (2010).
148. Albaradei, S. *et al.* MetastaSite: Predicting metastasis to different sites using deep learning with gene expression data. *Front Mol Biosci* **9**, 913602 (2022).
149. Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K.J. & Werb, Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun* **11**, 5120 (2020).
150. Nakamura, M., Kajiwara, Y., Otsuka, A. & Kimura, H. LVQ-SMOTE - Learning Vector Quantization based Synthetic Minority Over-sampling Technique for biomedical data. *BioData Min* **6**, 16 (2013).
151. Rahimi, A. & Gonen, M. Discriminating early- and late-stage cancers using multiple kernel learning on gene sets. *Bioinformatics* **34**, i412-i421 (2018).
152. Bhalla, S. *et al.* Gene expression-based biomarkers for discriminating early and late stage of clear cell renal cancer. *Sci Rep* **7**, 44997 (2017).
153. Singh, N.P., Bapi, R.S. & Vinod, P.K. Machine learning models to predict the progression from early to late stages of papillary renal cell carcinoma. *Comput Biol Med* **100**, 92-99 (2018).
154. Jia, R., Zhao, H. & Jia, M. Identification of co-expression modules and potential biomarkers of breast cancer by WGCNA. *Gene* **750**, 144757 (2020).

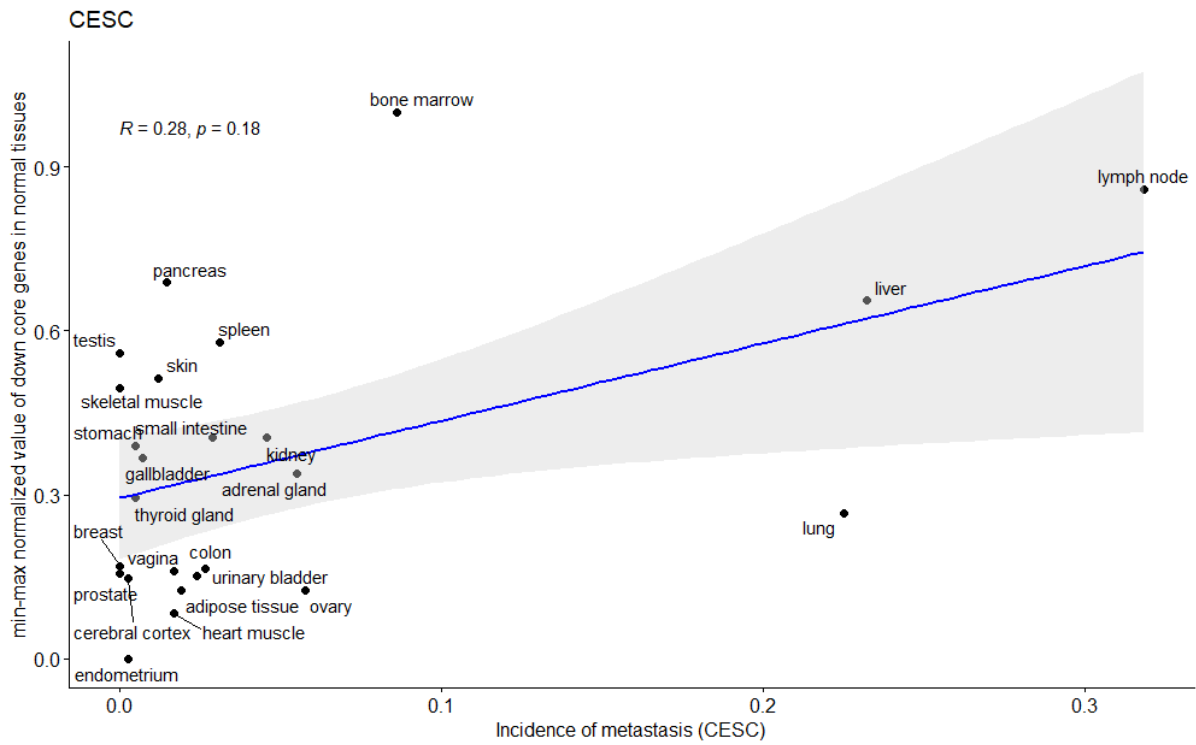
## 8. PRILOZI



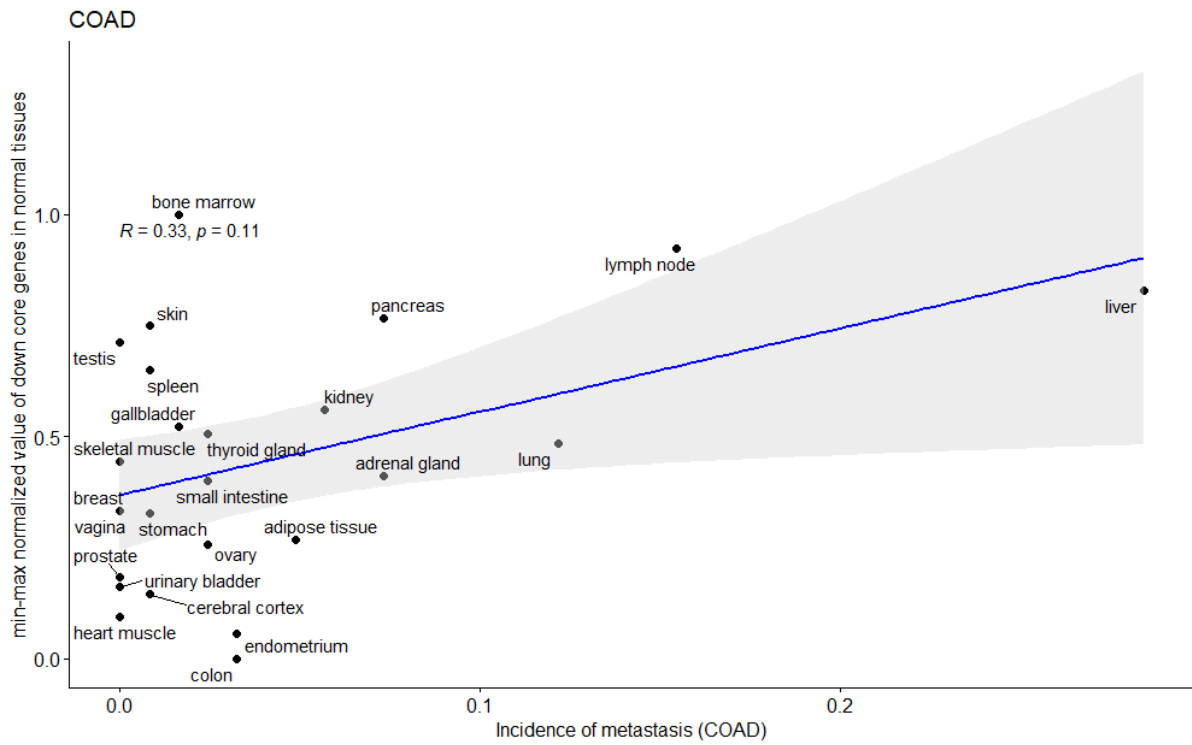
**Prilog 1.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u raku mokraćnog mjehura i normalizirane vrijednost smanjenih ključnih gena u raku mokraćnog mjehura i u pojedinim normalnim tkivima.



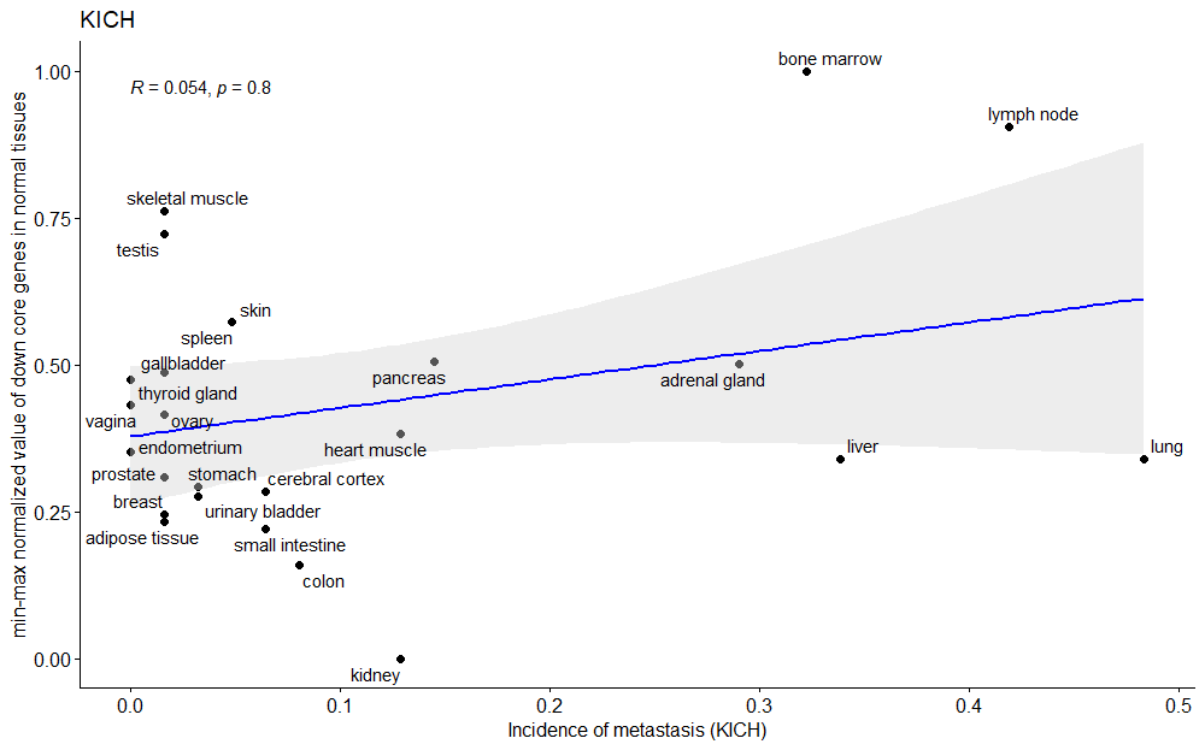
**Prilog 2.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u karcinomu dojke i normalizirane vrijednosti smanjenih ključnih gena u karcinomu dojke i u pojedinim normalnim tkivima.



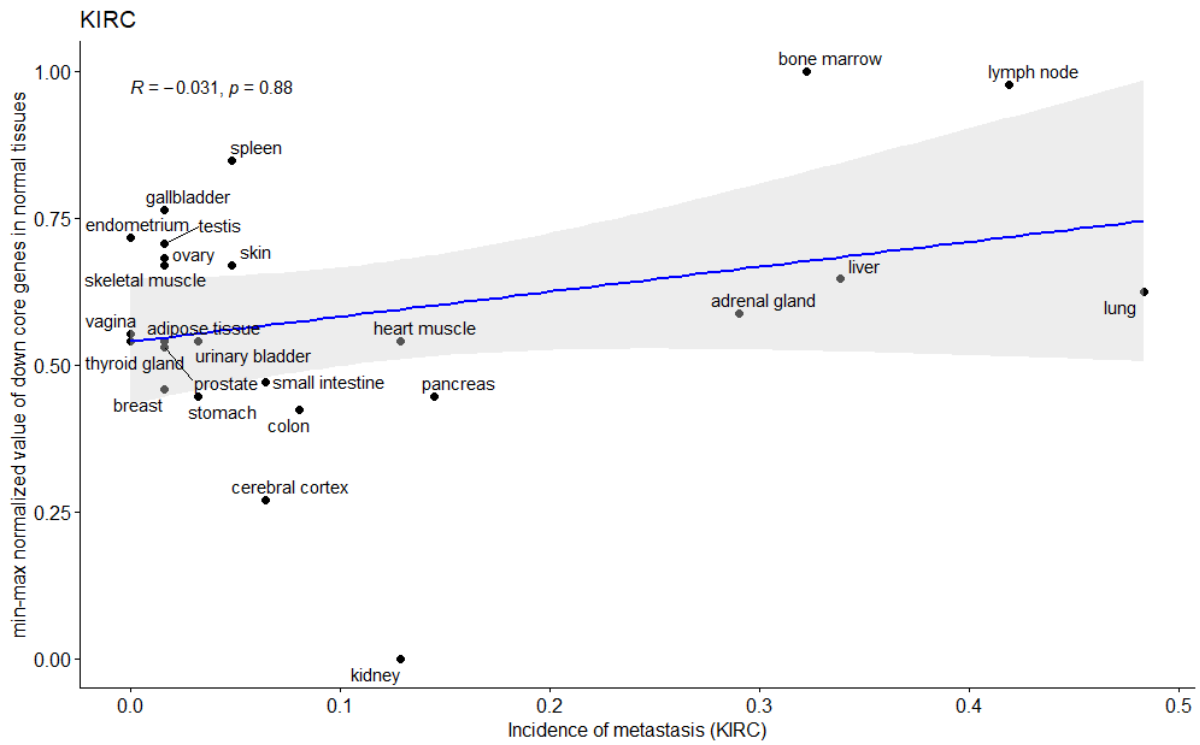
**Prilog 3.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u karcinomu vrata maternice i normalizirane vrijednost smanjenih ključnih gena u karcinomu vrata maternice i u pojedinim normalnim tkivima.



**Prilog 4.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u adenokarcinomu debelog crijeva i normalizirane vrijednost smanjenih ključnih gena u adenokarcinomu debelog crijeva i u pojedinim normalnim tkivima.

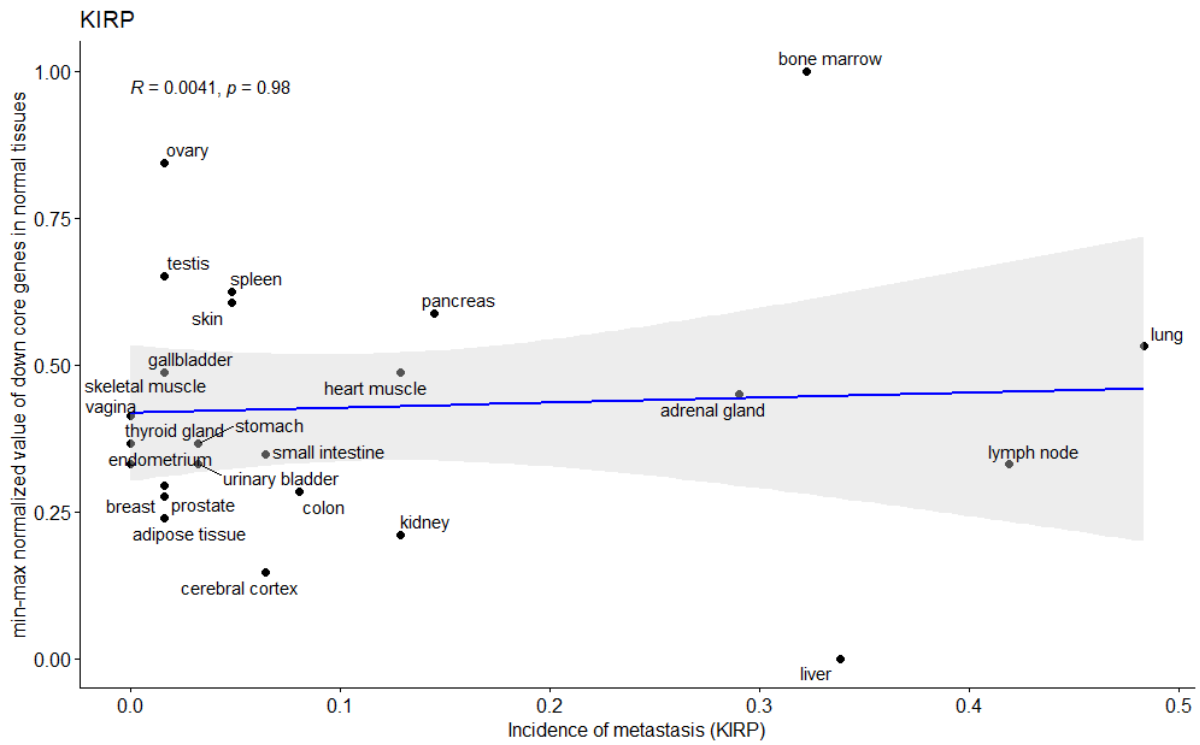


**Prilog 5.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u karcinomu bubrega kromofobnog tipa i normalizirane vrijednost smanjenih ključnih gena u karcinomu bubrega kromofobnog tipa i u pojedinim normalnim tkivima.

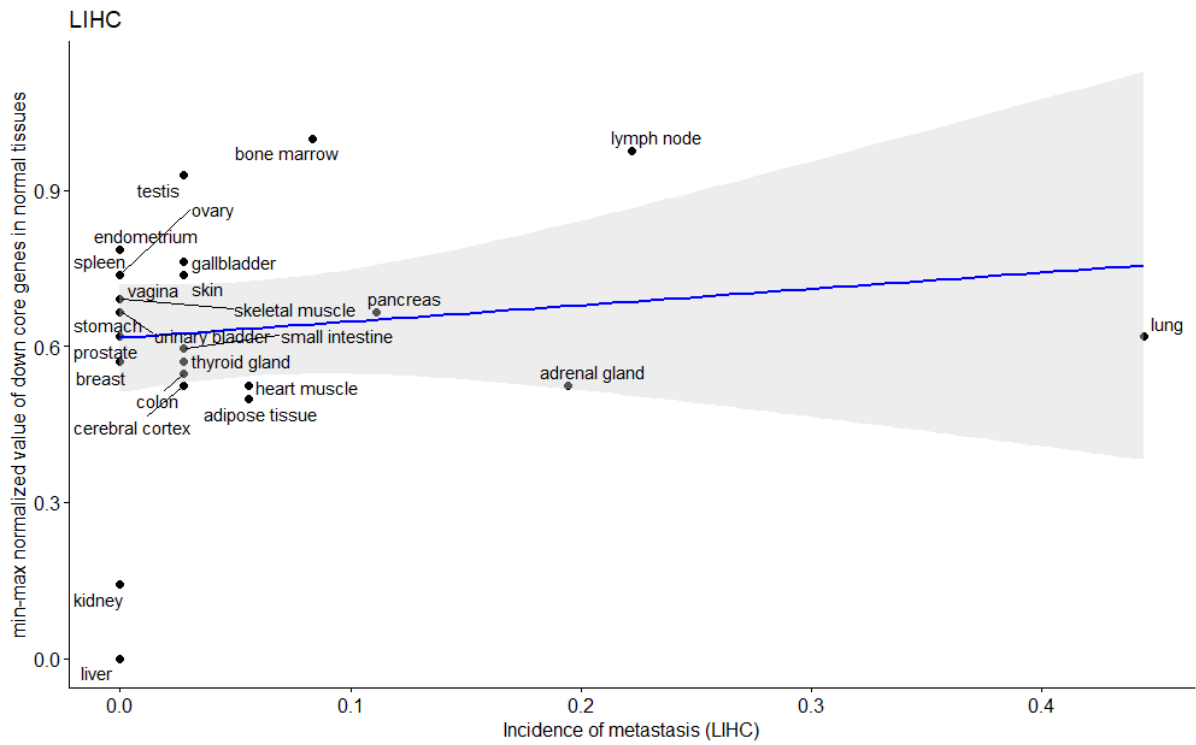


**Prilog 6.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u karcinomu bubrega svijetlih stanica i normalizirane vrijednost smanjenih ključnih gena u karcinomu bubrega svijetlih stanica i u pojedinim normalnim tkivima.

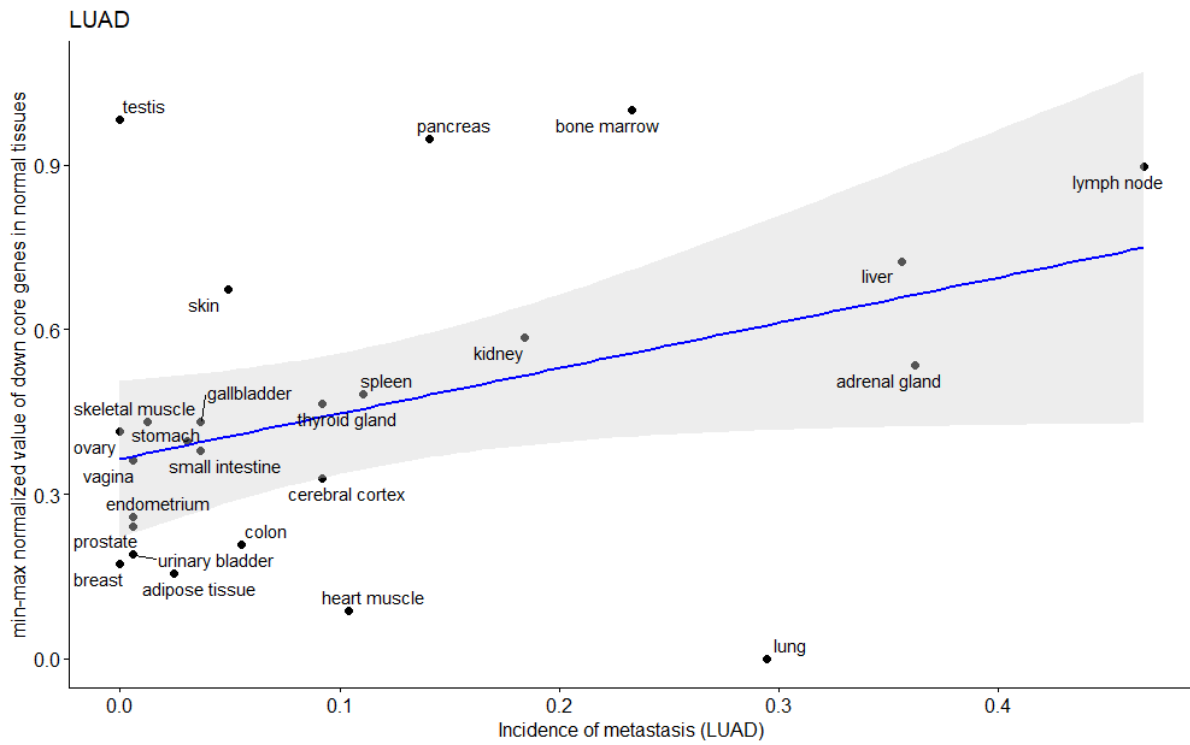




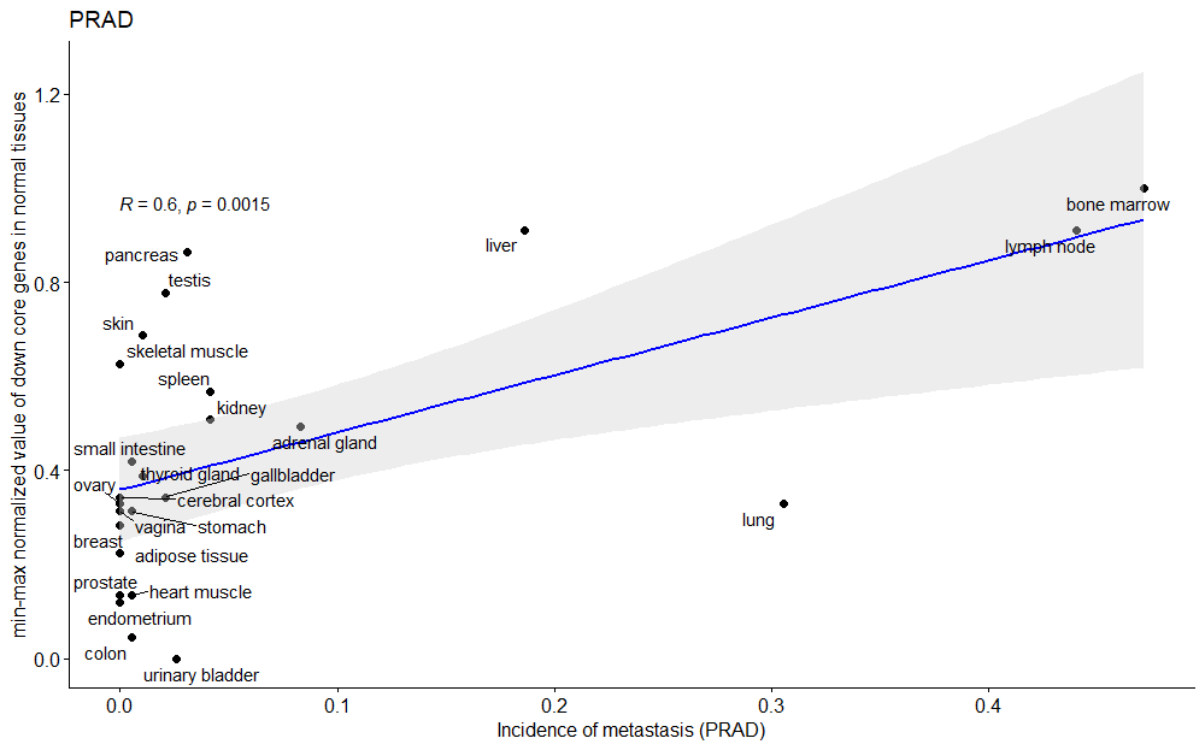
**Prilog 7.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u papilarnom karcinomu bubrega i normalizirane vrijednosti smanjenih ključnih gena u papilarnom karcinomu bubrega i u pojedinim normalnim tkivima.



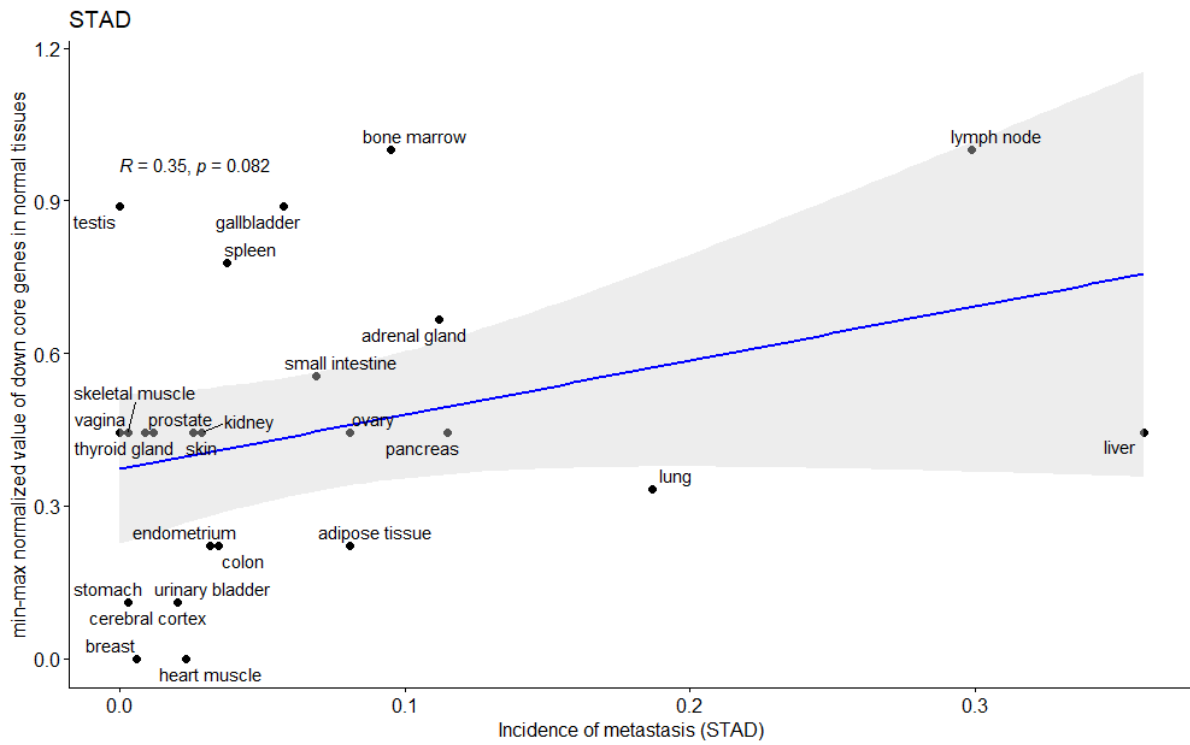
**Prilog 8.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u hepatocelularnom karcinomu jetre i normalizirane vrijednosti smanjenih ključnih gena u hepatocelularnom karcinomu jetre i u pojedinim normalnim tkivima.



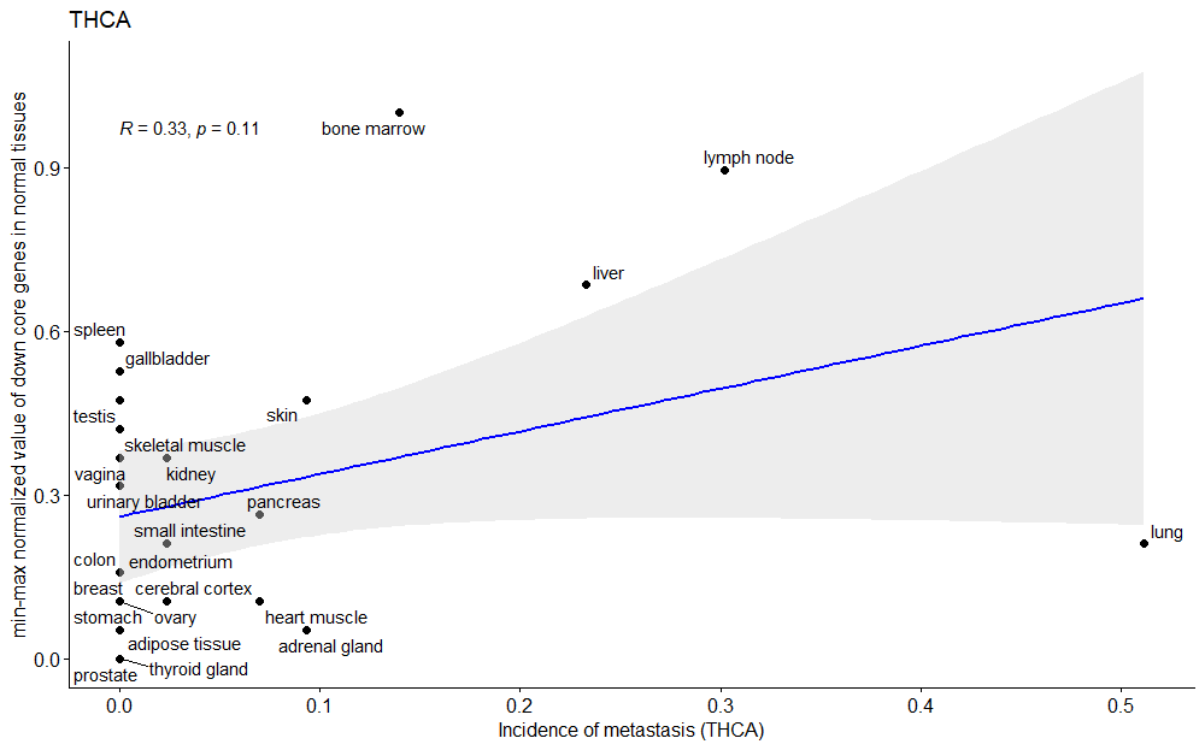
**Prilog 9.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u adenokarcinomu pluća i normalizirane vrijednosti smanjenih ključnih gena u adenokarcinomu pluća i u pojedinim normalnim tkivima.



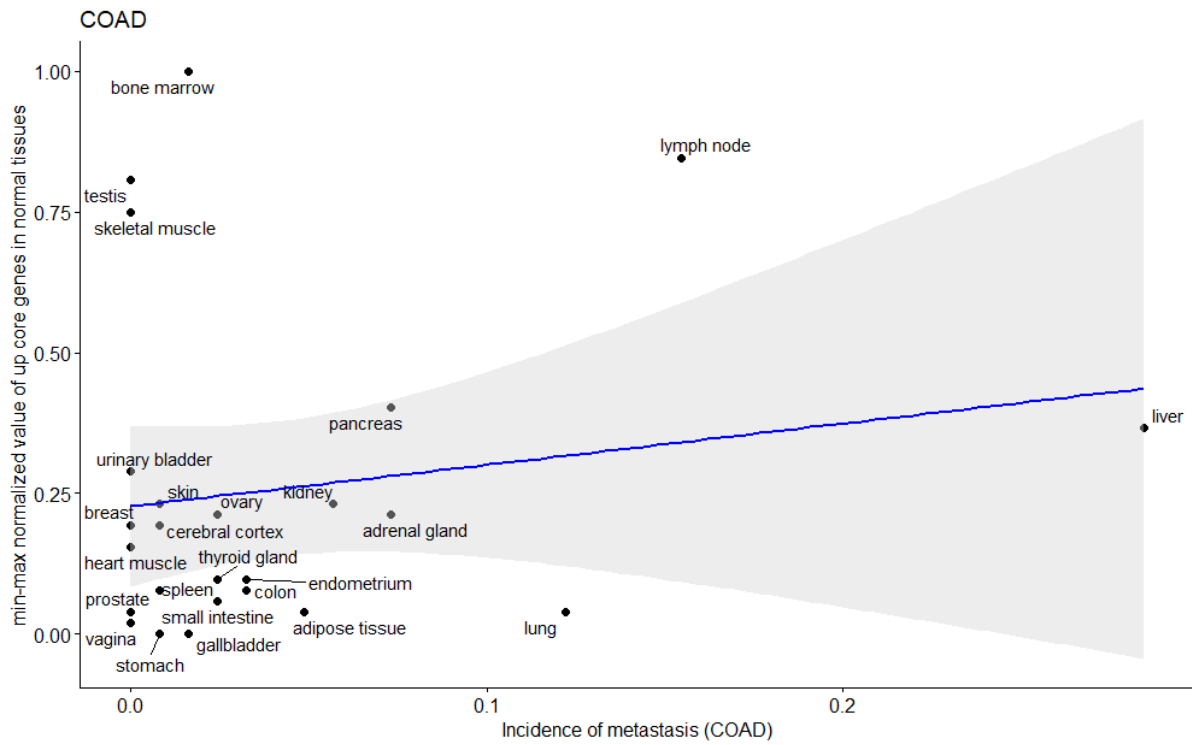
**Prilog 10.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u adenokarcinomu prostate i normalizirane vrijednosti smanjenih ključnih gena u adenokarcinomu prostate i u pojedinim normalnim tkivima.



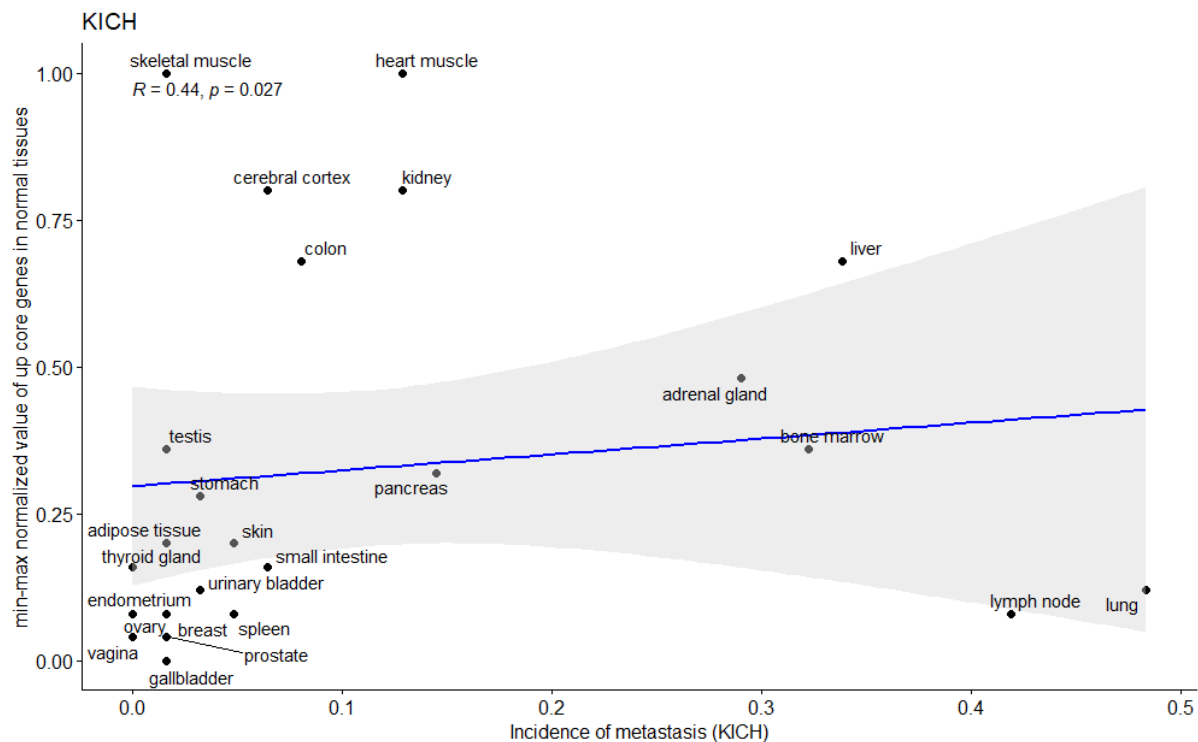
**Prilog 11.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u adenokarcinomu želuca i normalizirane vrijednosti smanjenih ključnih gena u adenokarcinomu želuca i u pojedinim normalnim tkivima.



**Prilog 12.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u karcinomu štitnjače i normalizirane vrijednosti smanjenih ključnih gena u karcinomu štitnjače i u pojedinim normalnim tkivima.

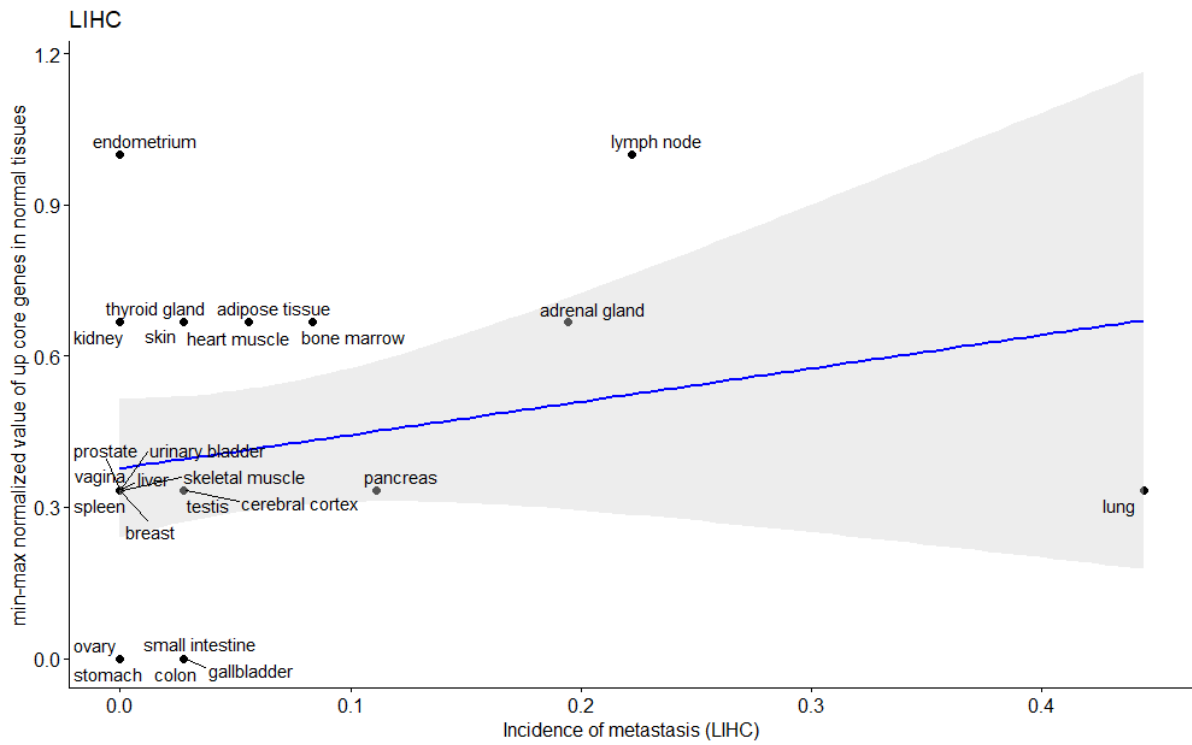


**Prilog 13.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u adenokarcinomu debelog crijeva i normalizirane vrijednosti povećanih ključnih gena u adenokarcinomu debelog crijeva i u pojedinim normalnim tkivima.

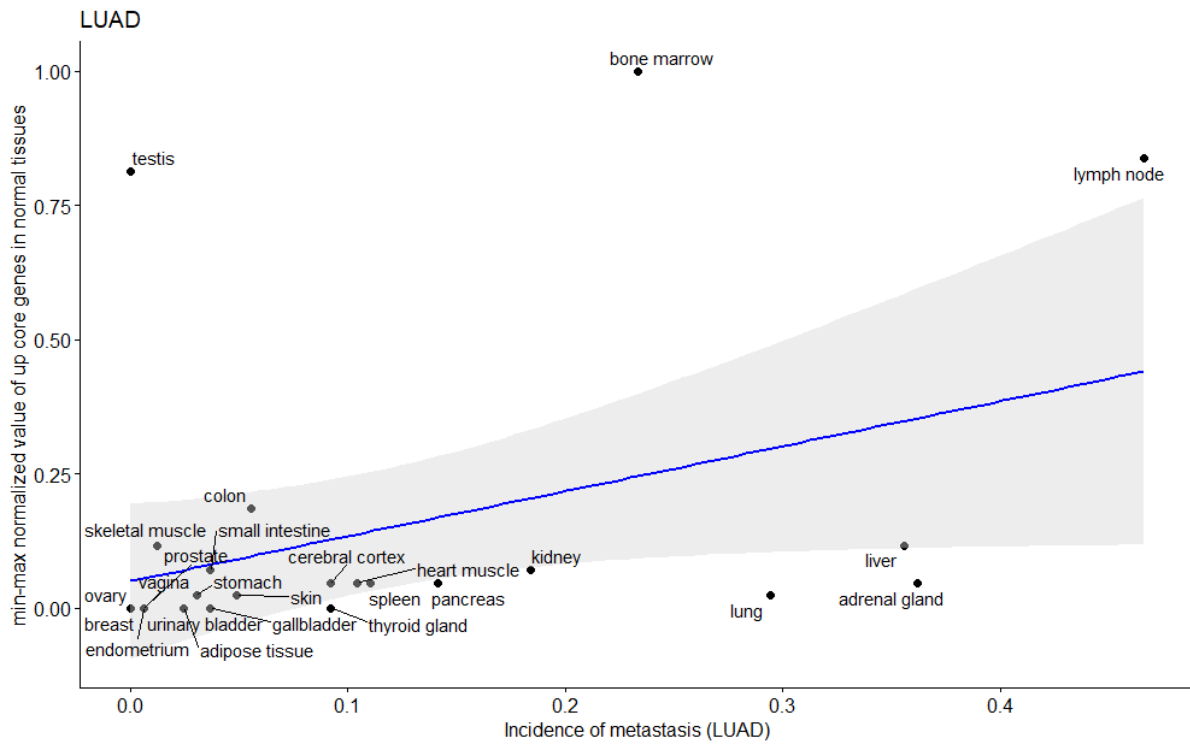


**Prilog 14.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u karcinomu bubrega kromofobnog tipa i normalizirane vrijednosti povećanih ključnih gena u karcinomu bubrega kromofobnog tipa i u pojedinim normalnim tkivima.

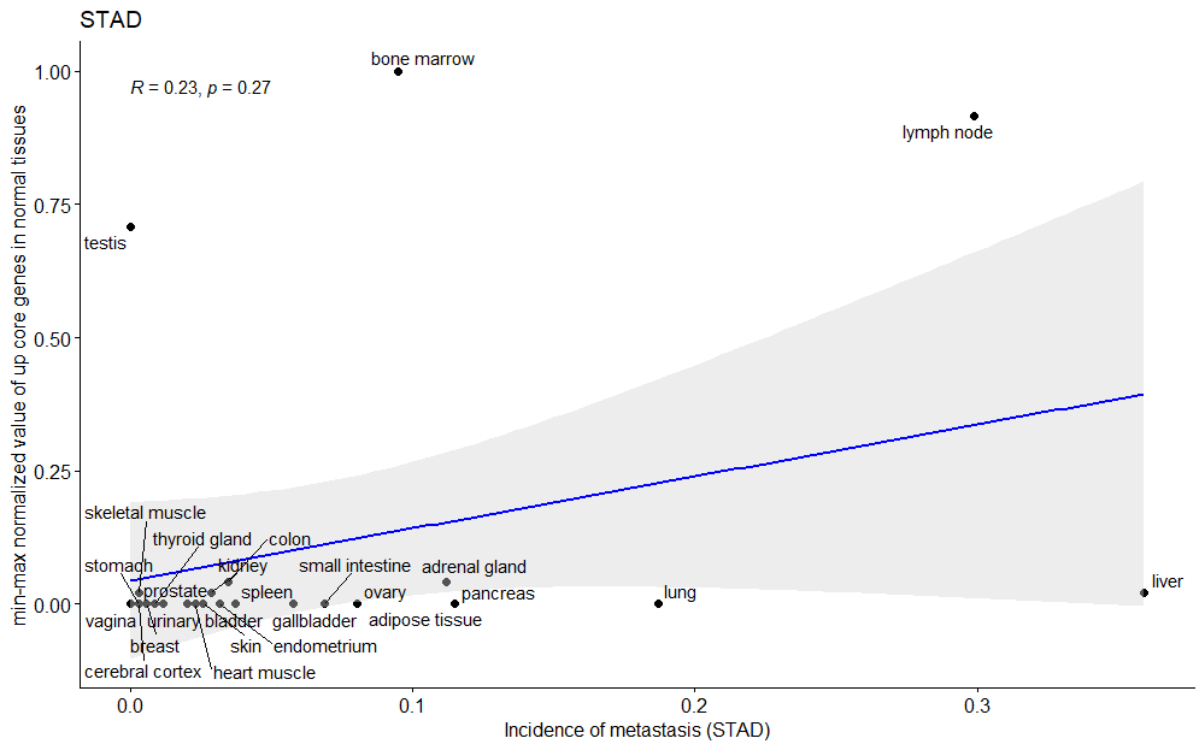




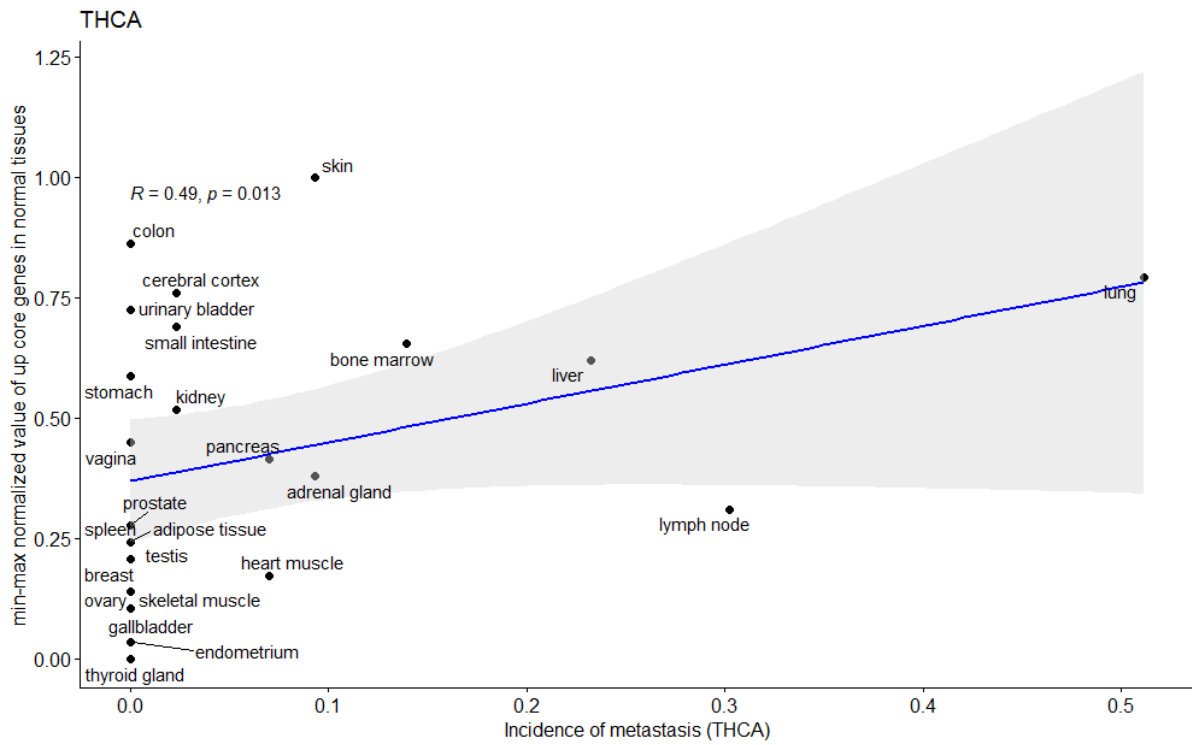
**Prilog 15.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u hepatocelularnom karcinomu jetre i normalizirane vrijednosti povećanih ključnih gena u hepatocelularnom karcinomu jetre i u pojedinim normalnim tkivima.



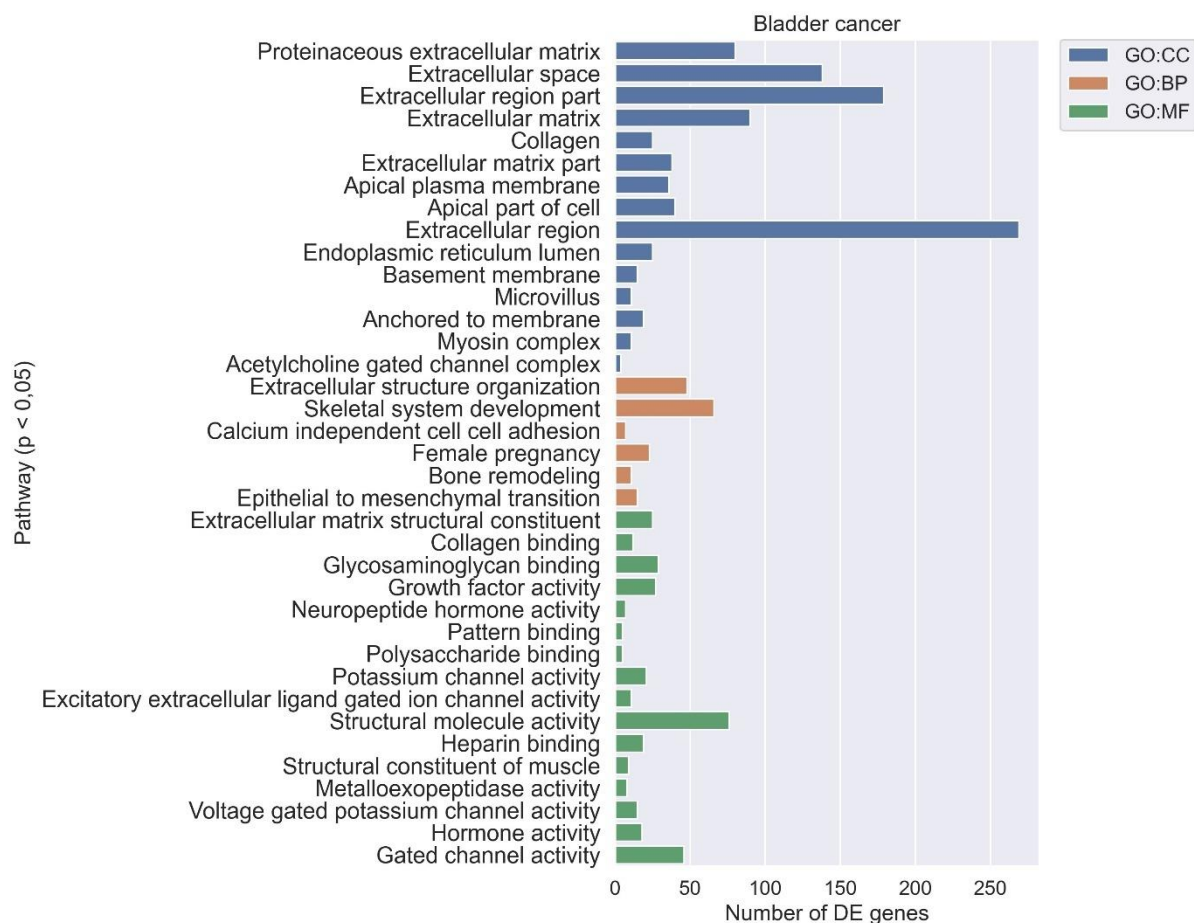
**Prilog 16.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u adenokarcinomu pluća i normalizirane vrijednosti povećanih ključnih gena u adenokarcinomu pluća i u pojedinim normalnim tkivima.



**Prilog 17.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u adenokarcinomu želuca i normalizirane vrijednosti povećanih ključnih gena u adenokarcinomu želuca i u pojedinim normalnim tkivima.

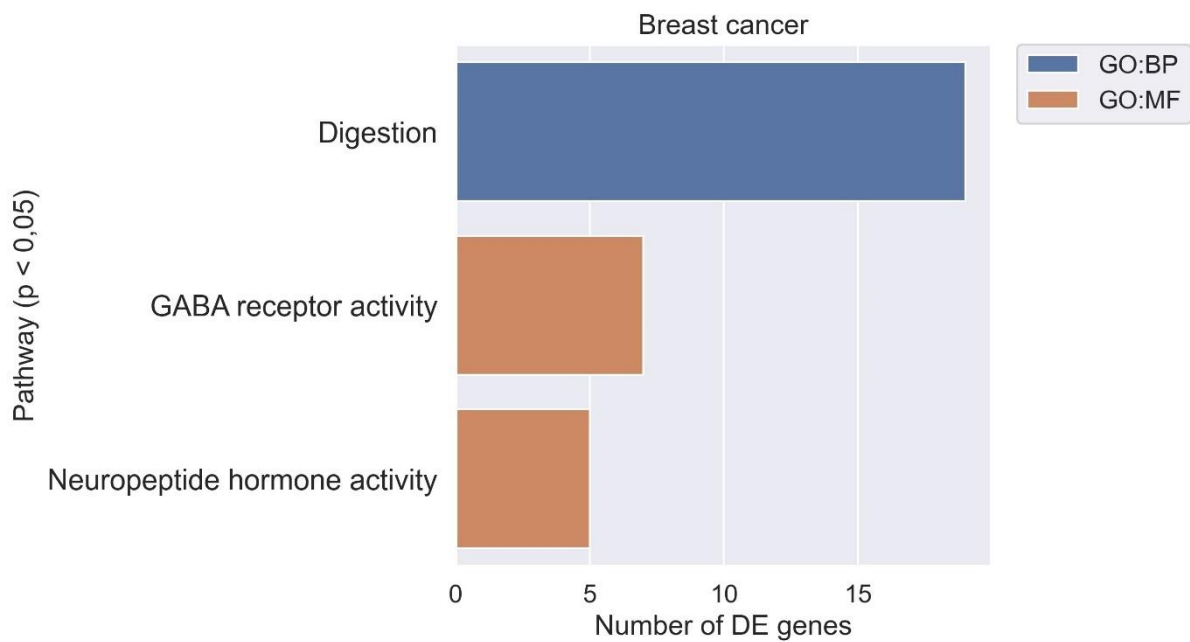


**Prilog 18.** Korelacijski plot između postotka pojavnosti metastazi u raku štitnjače i normalizirane vrijednosti povećanih ključnih gena u raku štitnjače i u pojedinim normalnim tkivima.



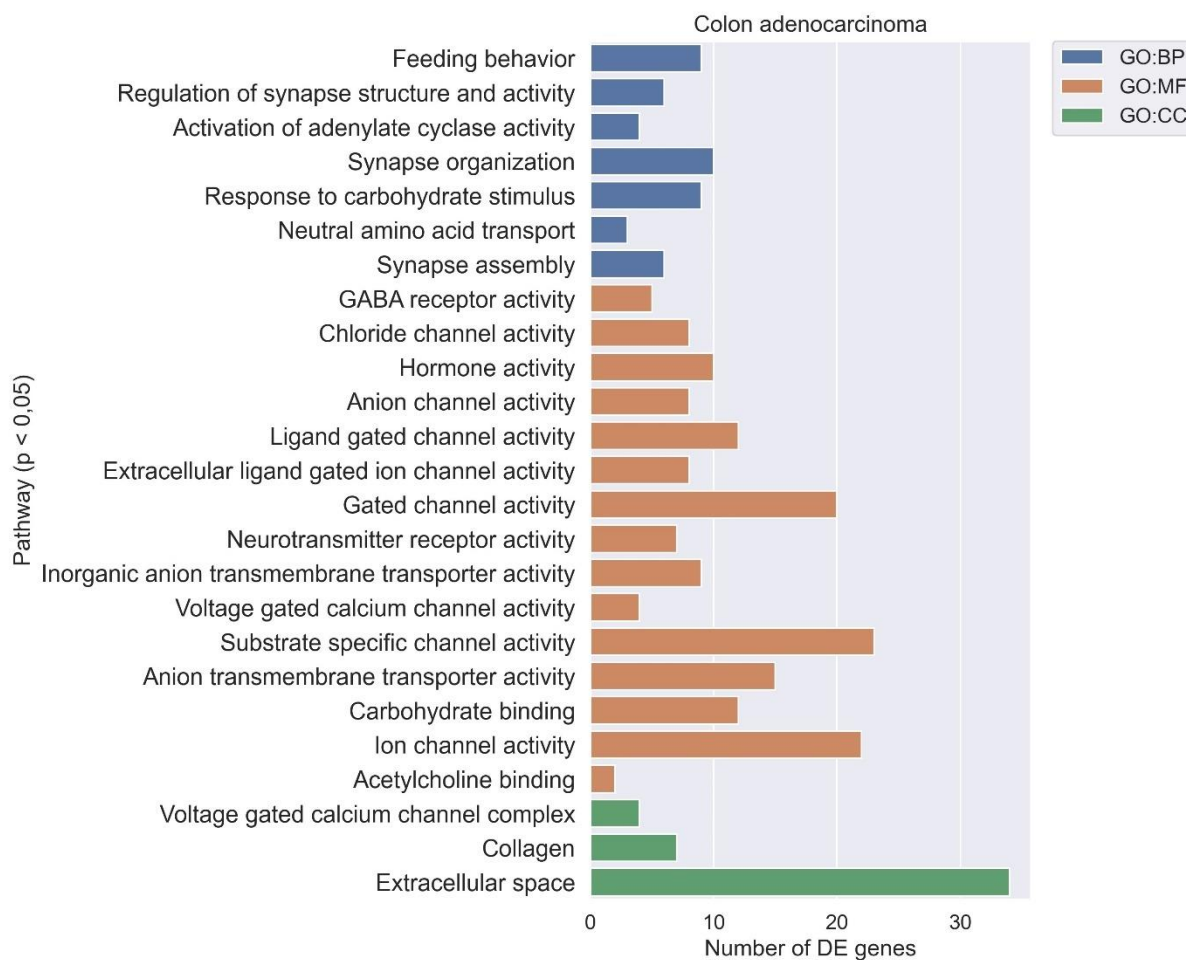
**Prilog 19.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija tumora mokraćnog mjehura.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



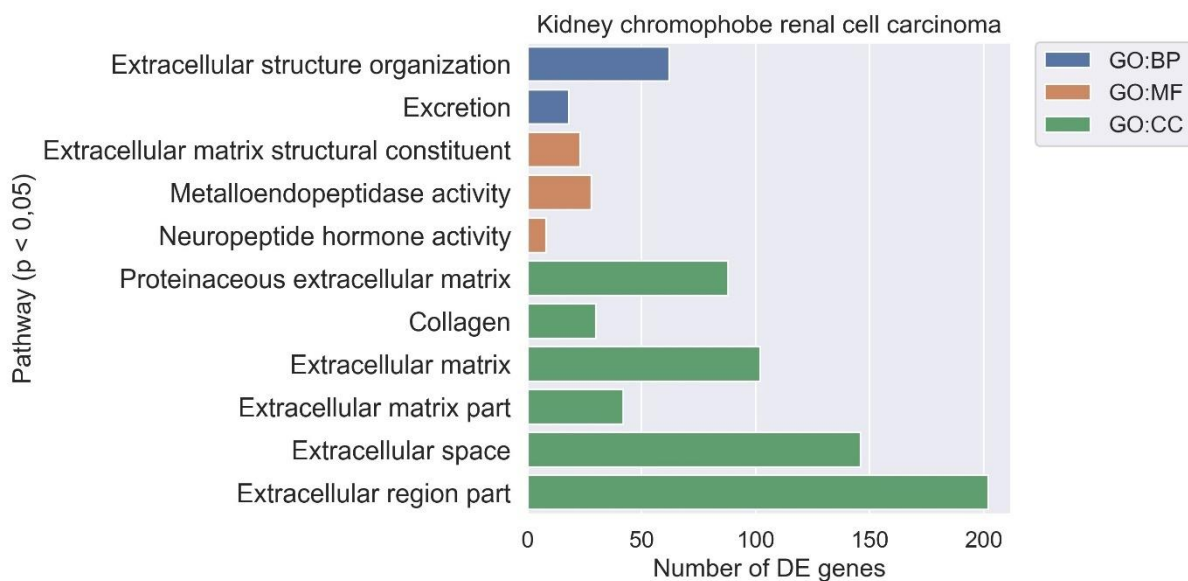
**Prilog 20.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija raka dojke.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



**Prilog 21.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartiment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija raka debelog crijeva.

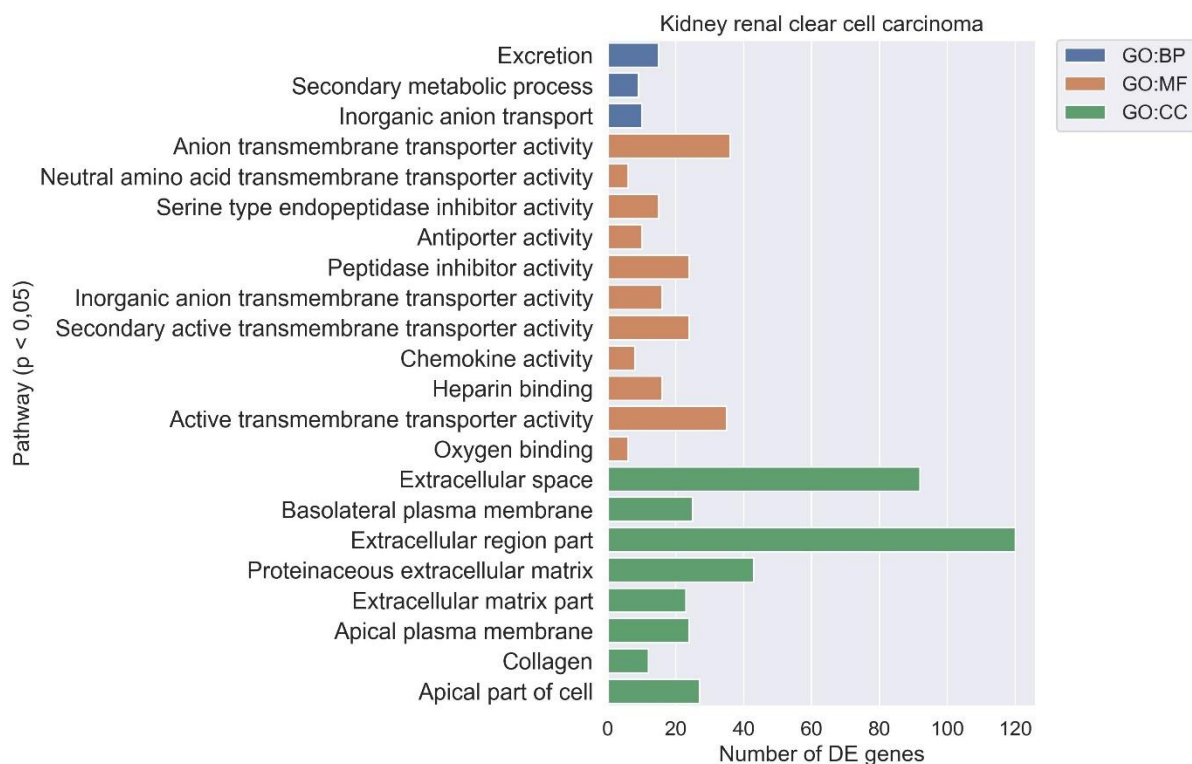
Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



**Prilog 22.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija kromofobnog karcinoma bubrega.

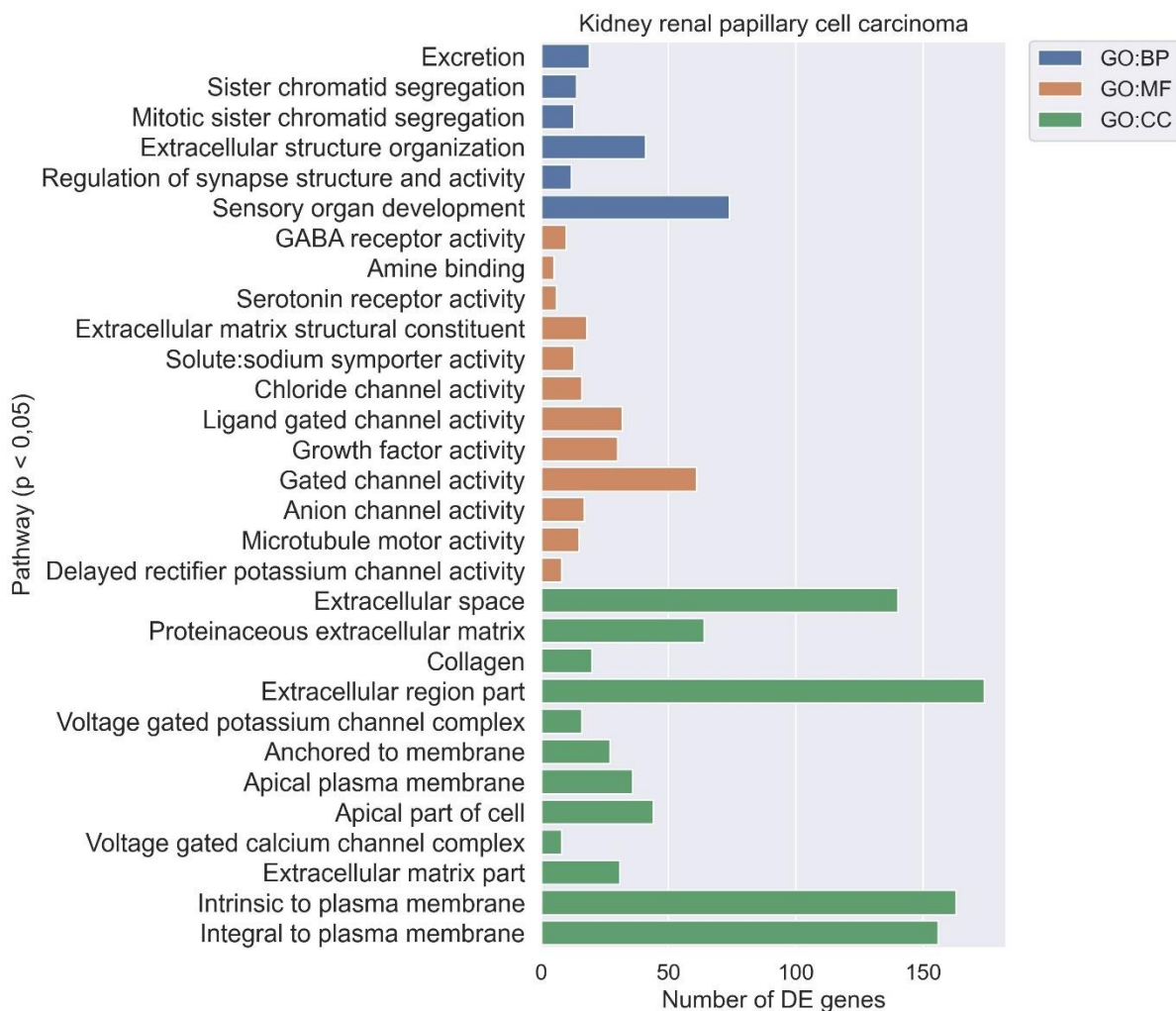
Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.





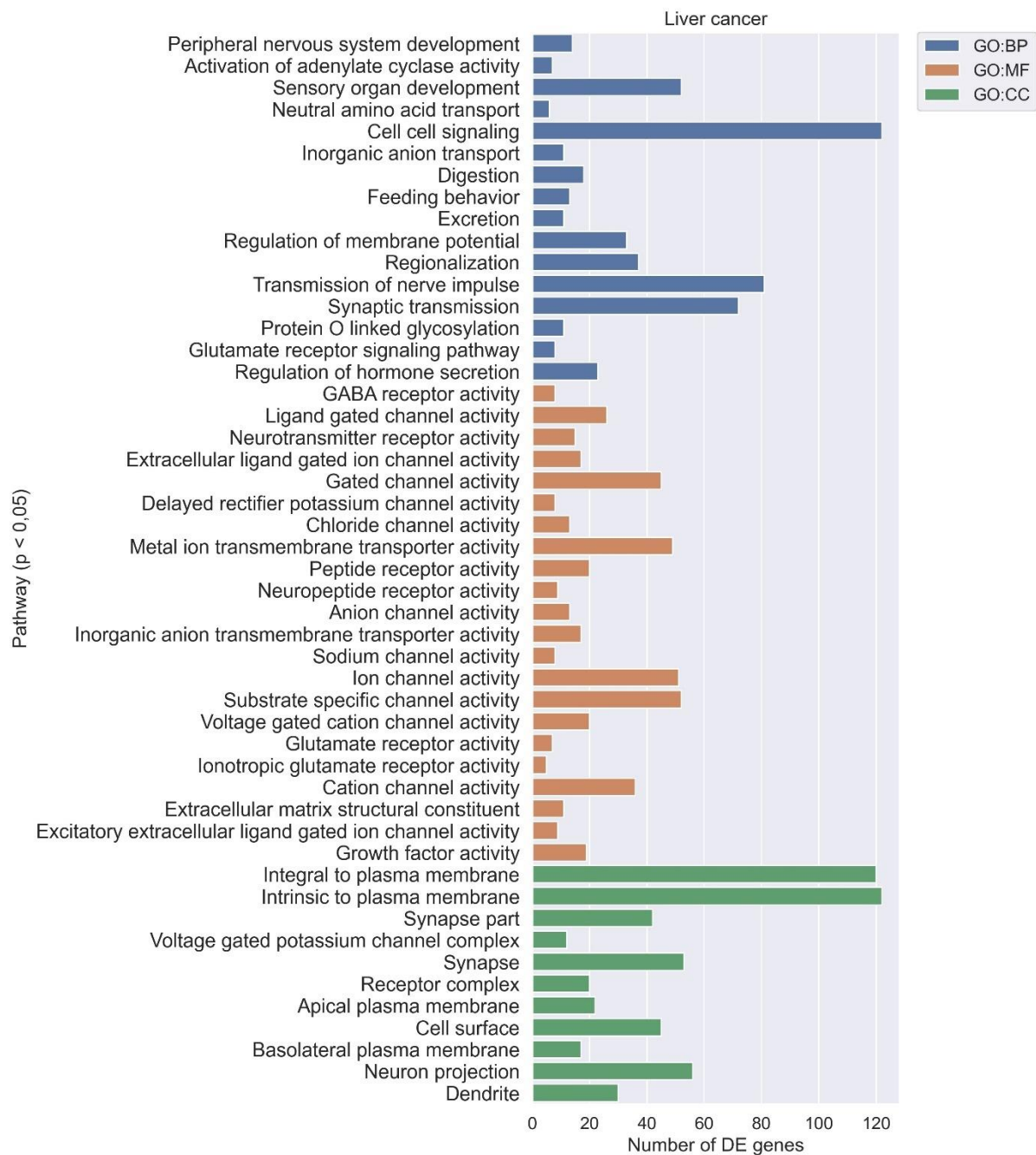
**Prilog 23.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartiment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija karcinoma bubrega svijetlih stanica.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



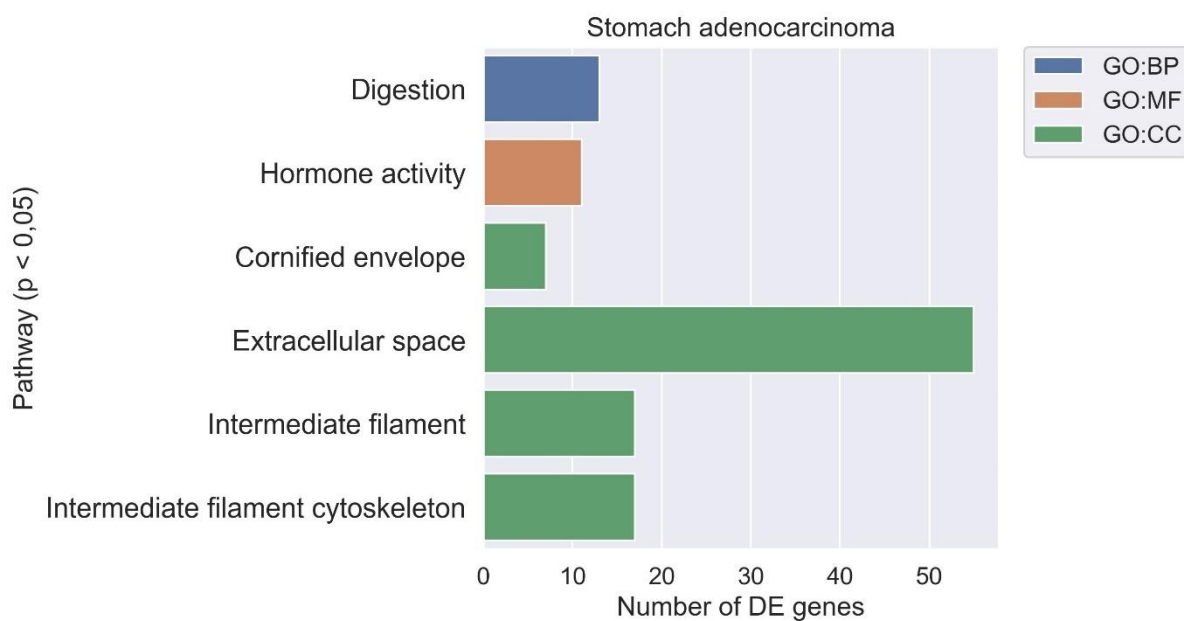
**Prilog 24.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartiment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija papilarnog karcinoma bubrega.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



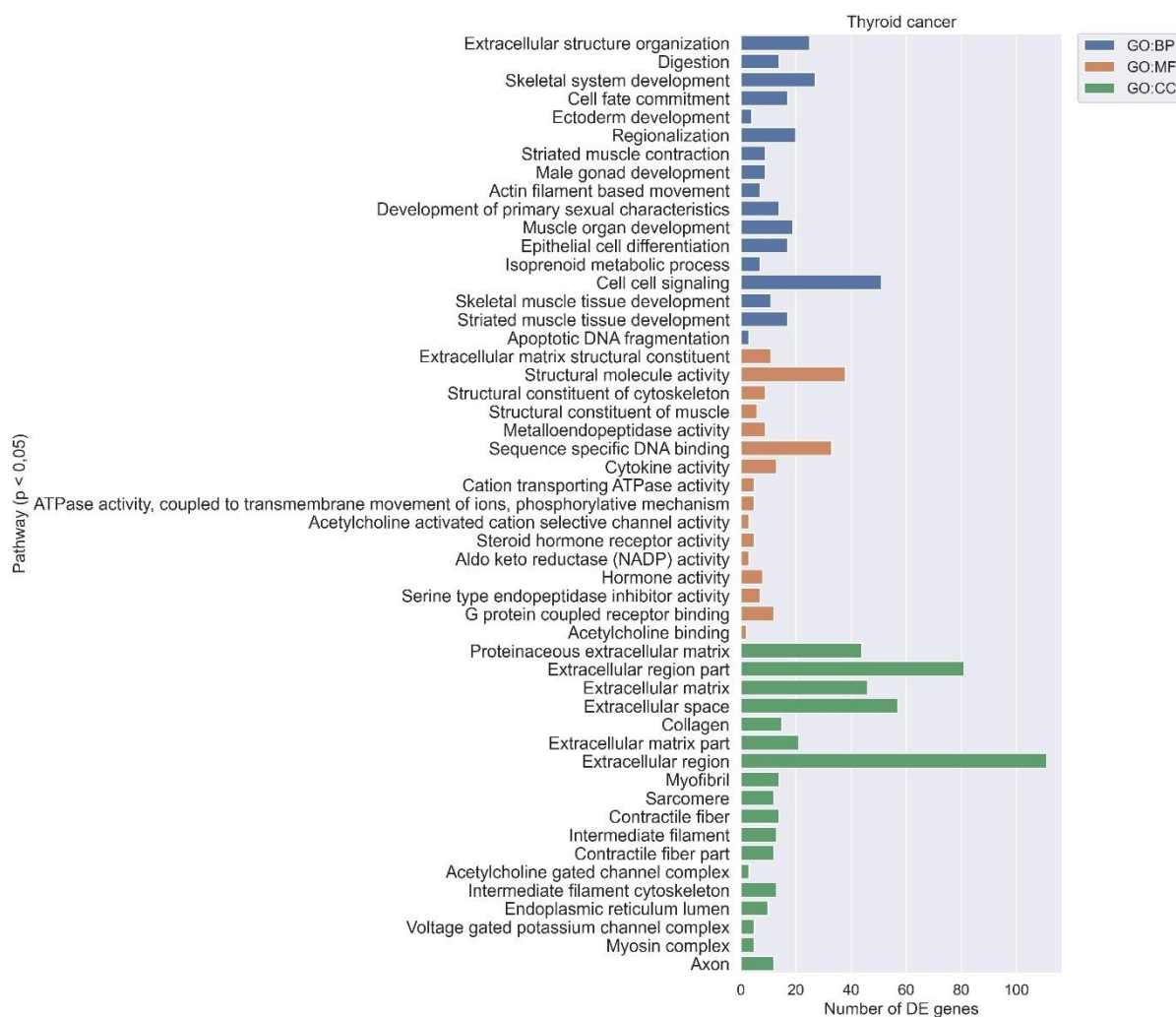
**Prilog 25.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija hepatocelularnog karcinoma jetre.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



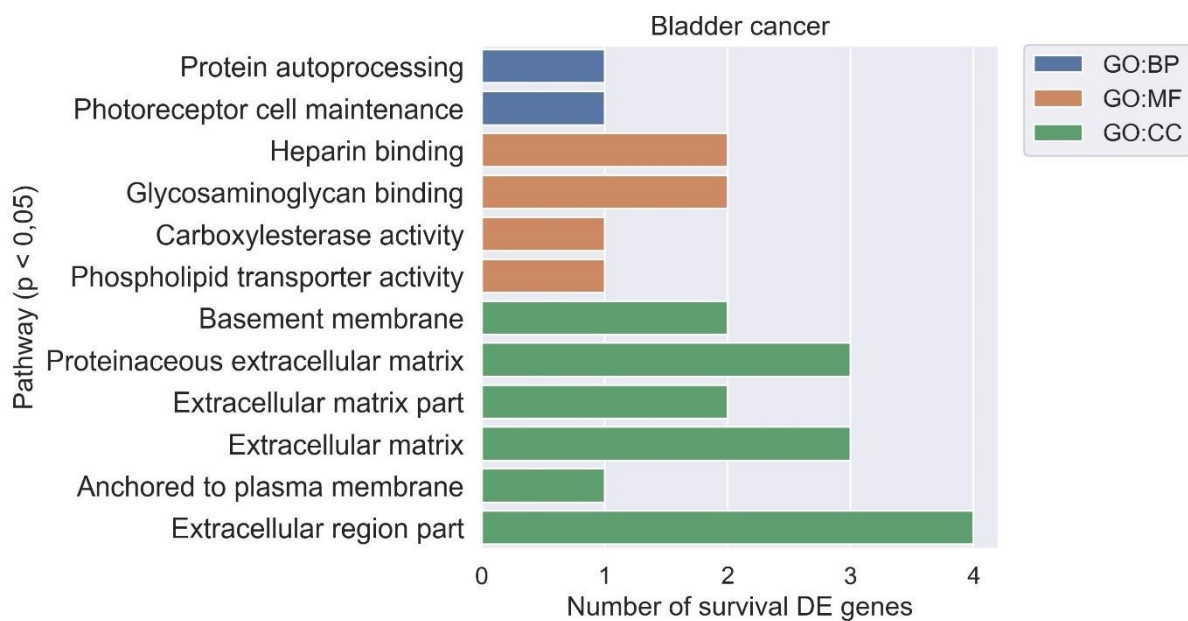
**Prilog 26.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija adenokarcinoma želuca.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



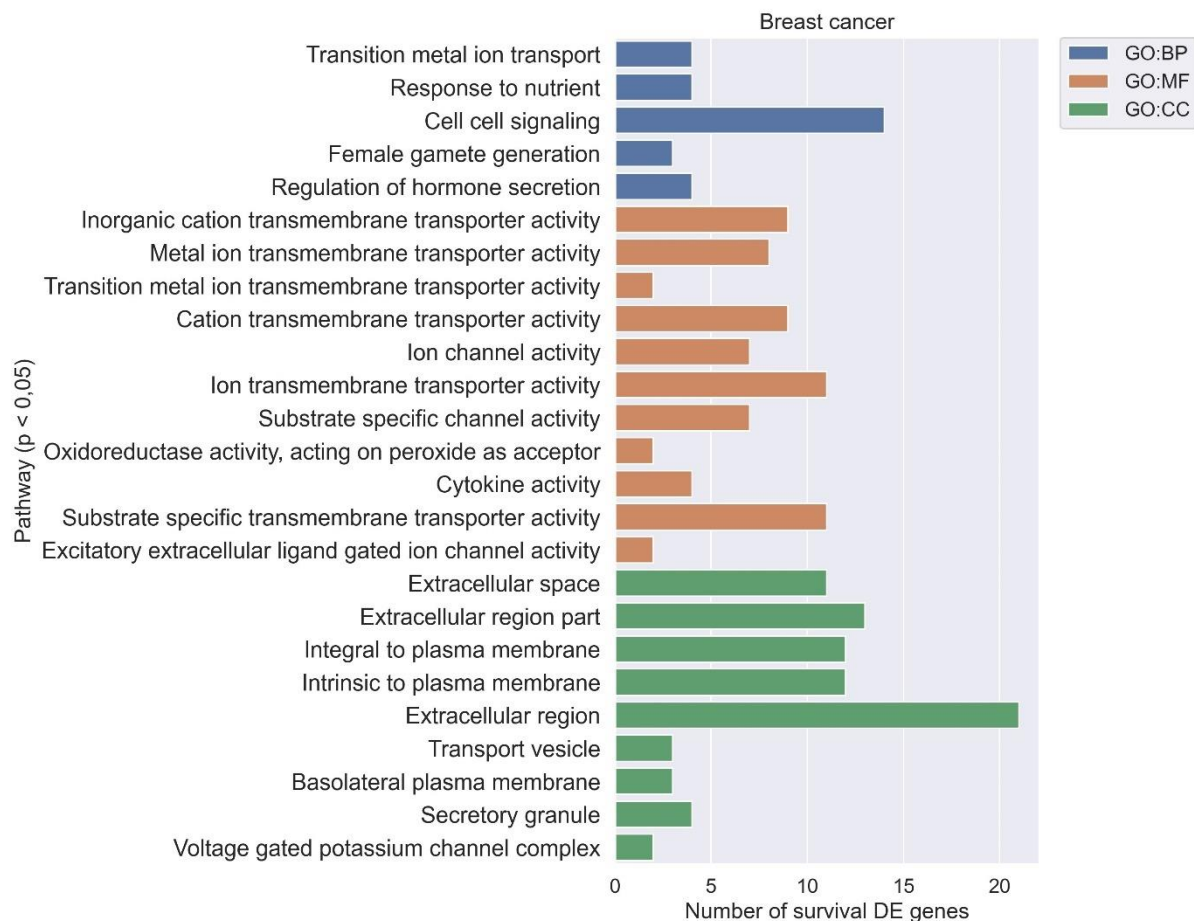
**Prilog 27.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartiment) na diferencijalno eksprimiranim genima između kasnih i ranih stadija raka štitnjače.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



**Prilog 28.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima povezanim sa preživljenjem između kasnih i ranih stadija raka mokraćnog mjehura.

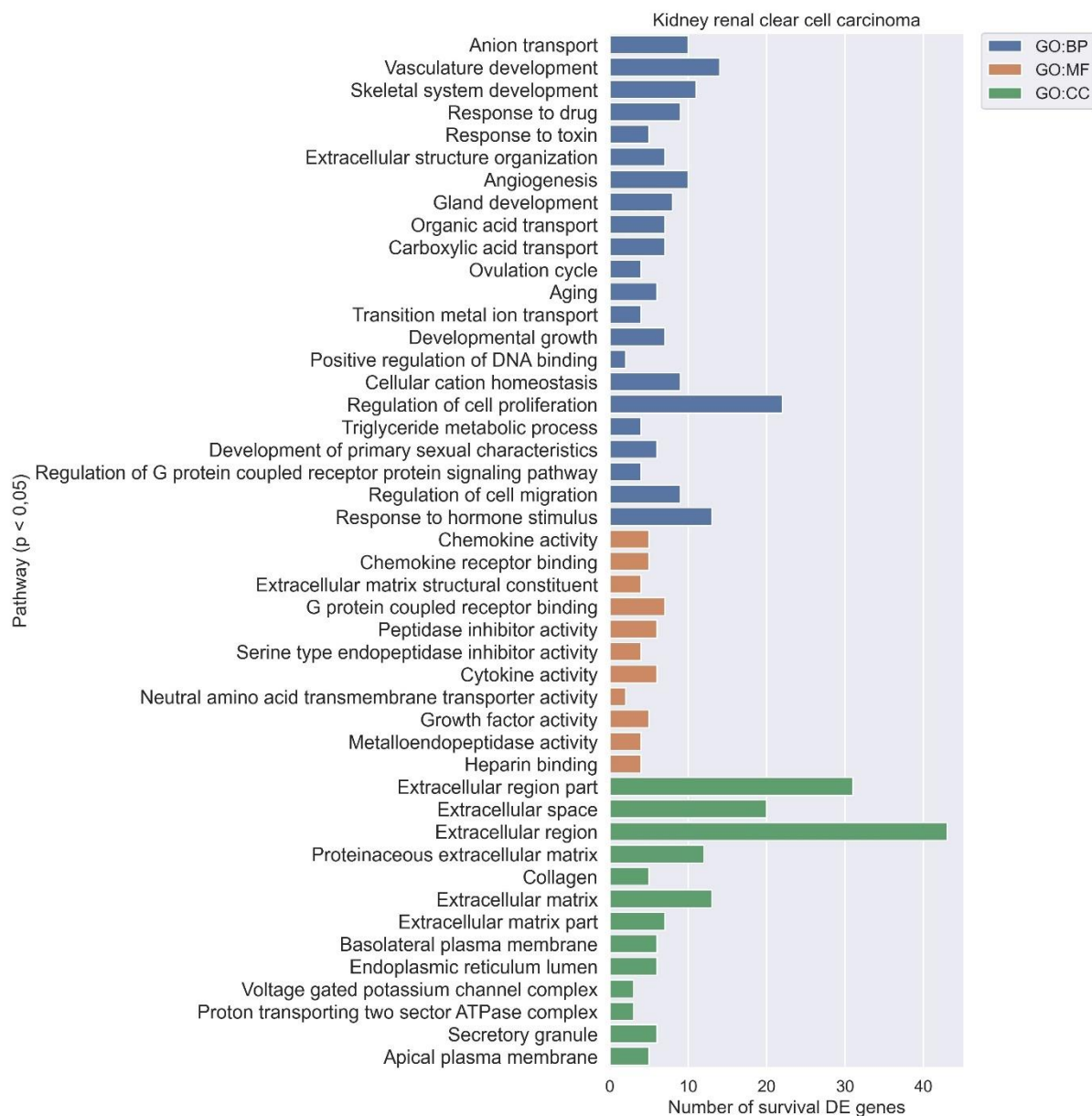
Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena povezanim sa preživljenjem koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



**Prilog 29.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima povezanim sa preživljenjem između kasnih i ranih stadija raka dojke.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.

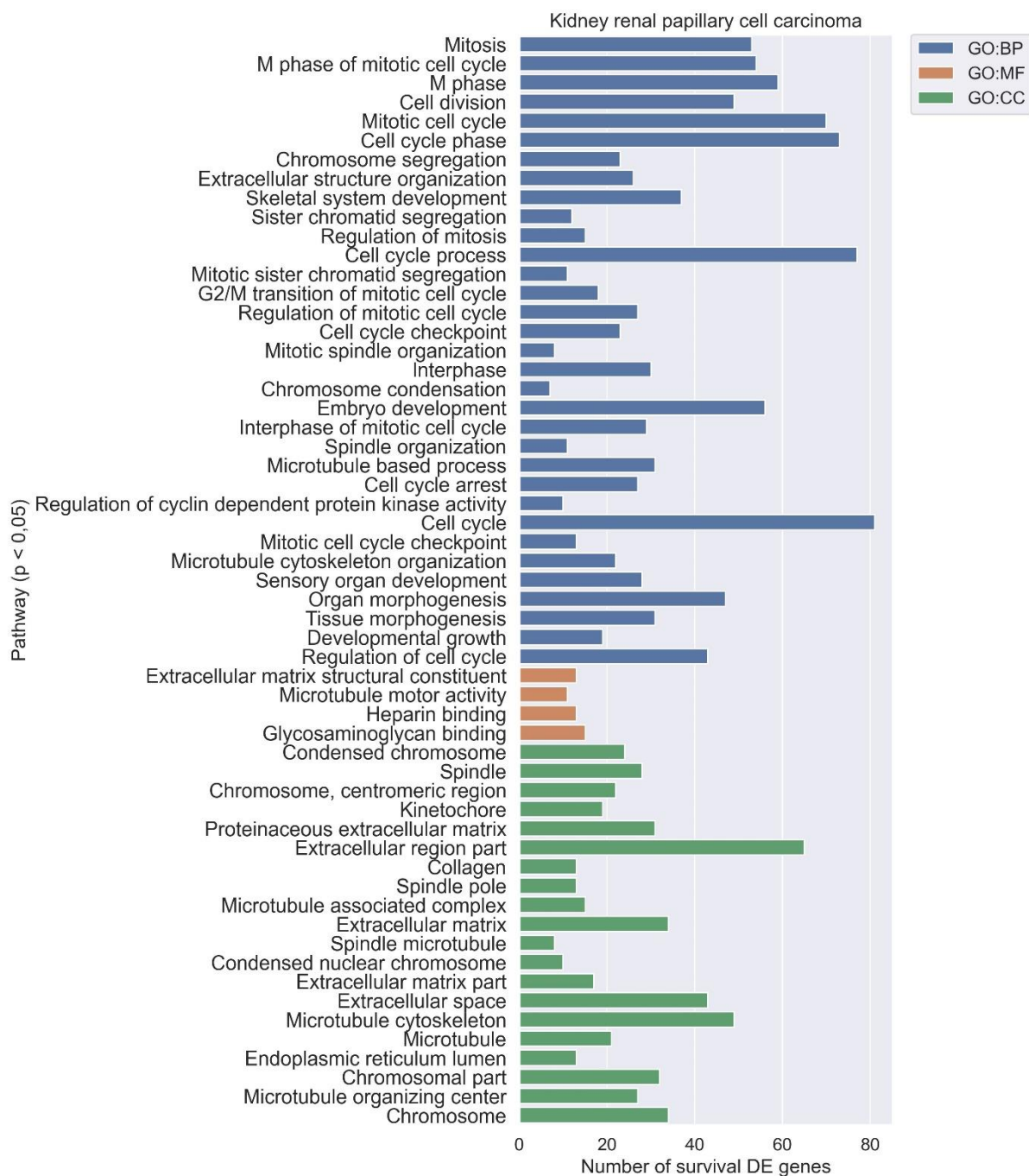




**Prilog 30.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima povezanim sa preživljenjem između kasnih i ranih stadija karcinoma bubrega sitnih stanica.

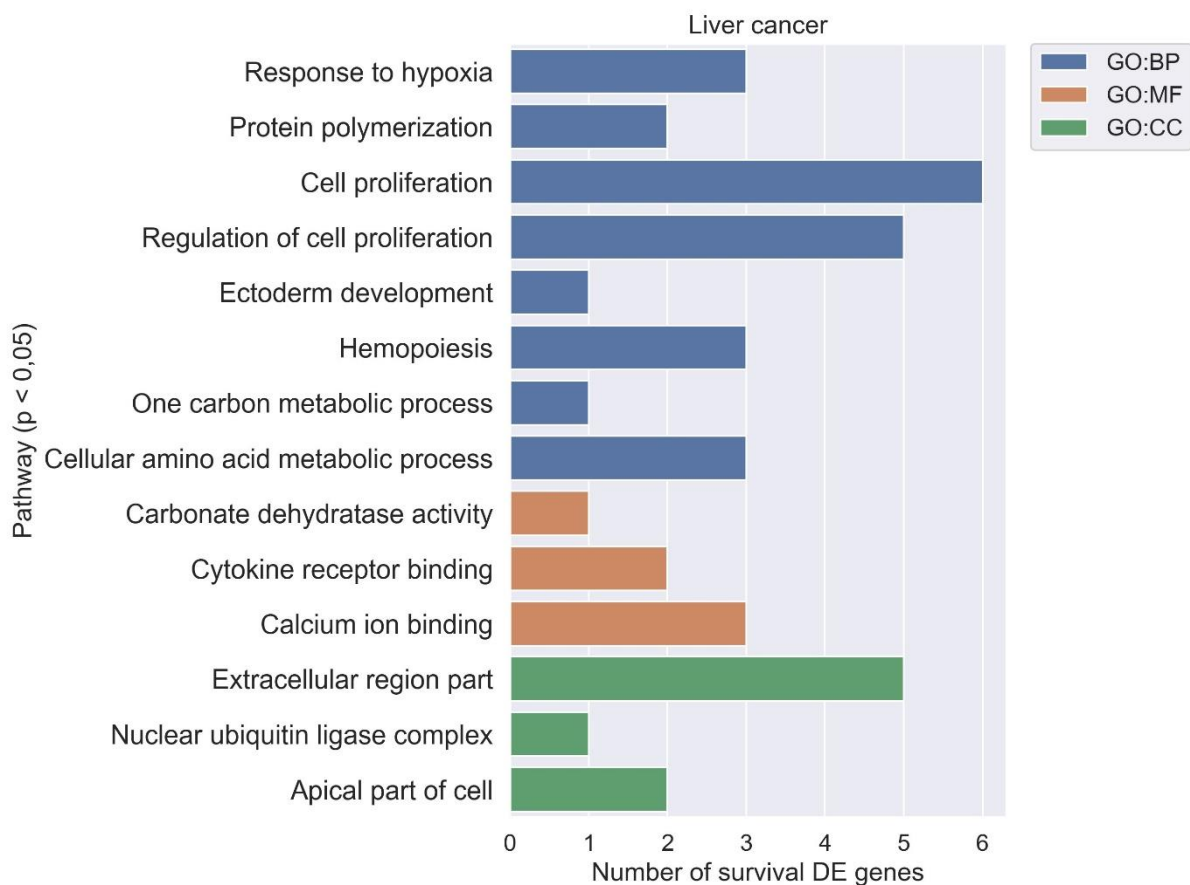
Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.





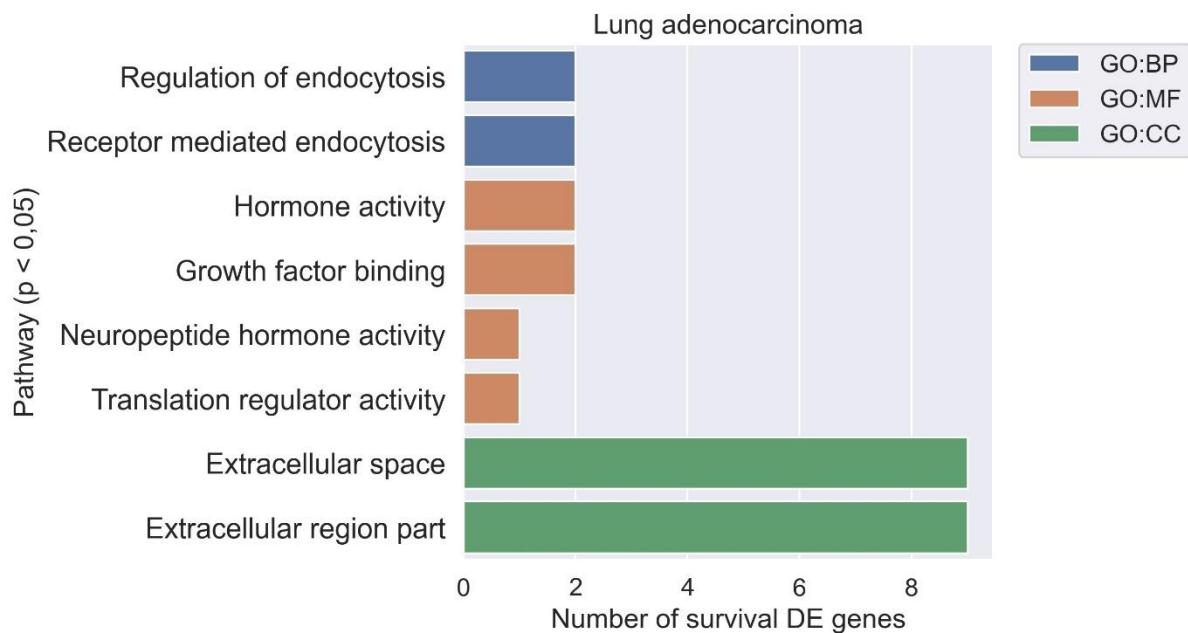
**Prilog 31.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima povezanim sa preživljenjem između kasnih i ranih stadija papilarnog karcinoma bubrega.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



**Prilog 32.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima povezanim sa preživljenjem između kasnih i ranih stadija hepatocelularnog karcinoma jetre.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.



**Prilog 33.** Rezultati analize genske ontologije (biološki procesi, molekularna funkcija, stanični kompartment) na diferencijalno eksprimiranim genima povezanim sa preživljenjem između kasnih i ranih stadija adenokarcinoma pluća.

Prikazane su samo kategorije sa  $p$ -vrijednosti manjom od 0,05, te je naveden broj diferencijalno eksprimiranih gena povezanih sa preživljenjem koji pripadaju svakoj od značajnih kategorija na y-osi.

## 9. ŽIVOTOPIS

Tinka Vidović rođena je 1990. godine u Splitu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila je u Vrgorcu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2016. godine. Započela je pripravništvo u Kliničkoj bolnici Merkur 2016. godine te je iste godine upisala doktorski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon završenog pripravništva i položenog stručnog ispita, zapošljava se na Mediteranskom institutu za istraživanje života. Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima i tečajevima. Autorica je više od deset znanstvenih članaka objavljenih u međunarodno indeksiranim časopisima. Članica je Hrvatske liječničke komore i stipendistica Foresight instituta za 2022. godinu.

### **Izabrani znanstveni radovi:**

Doleckova, I\*., **Vidovic, T.\***, Jandova, L., Gretzmeier, C., Navarini, A.A., MacArthur, M.R., Goksel, O., Nyström, A. and Ewald, C.Y., 2024. Calpain inhibition protects against UVB-induced degradation of dermal-epidermal junction-associated proteins. *The Journal of investigative dermatology*, pp.S0022-202X.

**Vidovic, T.**; Dakhovnik, A.; Hrabovskyi, O.; MacArthur, M.R.; Ewald, C.Y. AI-Predicted mTOR Inhibitor Reduces Cancer Cell Proliferation and Extends the Lifespan of *C. elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7850.

**Vidović T.**; Ewald C. Y. Longevity-promoting pathways and transcription factors respond to and control extracellular matrix dynamics during aging and disease. *Frontiers in Aging*. 2022;3.

Gelemanović, A.\*; **Vidović, T.\***; Stepanić, V.; Trajković, K. Identification of 37 Heterogeneous Drug Candidates for Treatment of COVID-19 via a Rational Transcriptomics-Based Drug Repurposing Approach. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 87.

(\* autori koji su jednako doprinijeli radu)