

Karakterizacija adhesoma u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 nakon de novo ekspresije integrina $\alpha\beta3$

Čuljak, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:212111>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Kristina Čuljak

**Karakterizacija adhesoma u stanicama
karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 nakon
de novo ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala pod mentorstvom dr.sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice i neposrednim voditeljstvom mag. mol. biol. Ane Dekanić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Zahvale

Najveća zahvala ide mojim roditeljima koji su me podržavali sve ove godine studiranja i poticali da nikad ne odustajem od svojih ciljeva.

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Andreji Ambriović-Ristov na ogromnom trudu, svakoj pohvali, savjetima i naravno prenešenom znanju.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Morani Dulić na susretljivosti i pomoći u pisanju diplomskog rada.

Hvala Ani Dekanić, mojoj neposrednoj voditeljici ☺ na prijateljstvu, razumijevanju i velikoj pomoći kad god mi je trebala.

Hvala Dragomiri, Mladenu, Anamariji, Davoru, Nikolini, Marini na svakoj pomoći i savjetima. Cijelom labosu LSBPS hvala na svim veselim neformalnim i formalnim druženjima. ☺

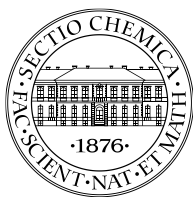
Mojim dragim curama, Tajani i Marini veliko hvala za tolike godine druženja, veselja i podrške za svaki položen ispit! ☺

Ingrid, Ani i Toniju na divnom prijateljstvu, svim izlascima, zajedničkim učenjima i slavljima položenih ispita ;)

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Izvanstanični matriks	3
2.2. Integrini	4
2.2.1. <i>Uloga integrina u tumorskim stanicama</i>	<i>6</i>
2.2.2. <i>Mehanizam otpornosti tumora na protutumorske lijekove posredovan integrinima u stanicama glave i vrata.....</i>	<i>9</i>
2.3. Kompleksi adhezije integrina (fokalne adhezije).....	10
2.3.1. <i>Sastav fokalnih adhezija.....</i>	<i>12</i>
2.3.2. <i>Fokalne adhezije u tumorskim stanicama</i>	<i>14</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. <i>Stanična linija</i>	<i>16</i>
3.1.2. <i>Osnovne kemikalije</i>	<i>16</i>
3.1.3. <i>Priprema otopina i pufera.....</i>	<i>18</i>
3.1.4. <i>Ostali materijali i uređaji</i>	<i>20</i>
3.1.5. <i>Protutijela</i>	<i>22</i>
3.2. Metode.....	23
3.2.1. <i>Uzgoj stanica u kulturi.....</i>	<i>23</i>
3.2.2. <i>Presadivanje stanica</i>	<i>24</i>
3.2.3. <i>Brojanje stanica.....</i>	<i>24</i>
3.2.4. <i>Zamrzavanje stanica</i>	<i>24</i>
3.2.5. <i>Odmrzavanje stanica.....</i>	<i>24</i>
3.2.6. <i>Određivanje preživljenja stanica MTT testom</i>	<i>24</i>
3.2.7. <i>Analiza proteina kompleksa adhezije integrina(engl. integrin adhesion complex, IAC).....</i>	<i>25</i>
3.2.7.1. <i>Izdvajanje IAC.....</i>	<i>25</i>
3.2.7.2. <i>Određivanje koncentracije proteina BCA metodom</i>	<i>26</i>
3.2.7.3. <i>Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE i western blot.....</i>	<i>27</i>
3.2.7.4. <i>Analiza IAC proteina metodom spektrometrije masa</i>	<i>29</i>

3.2.7.5. Određivanje ekspresije proteina metodom protočne citometrije	29
3.2.7.6. Određivanje lokalizacije proteina paksilina (Y113) metodom imunofluorescencije	30
3.2.7.7. Mikroskopija refleksijskog interferencijskog kontrasta	30
§ 4. REZULTATI	32
4.1. Eksperimentalni model stanica karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 sa različitim ekspresijom integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$.....	32
4.2. Integrin β_3-stabilno transficirani klon Cal27-2B1 pokazuje povećanu otpornost na protutumorski lijek cisplatinu u odnosu na Cal27 stanice	33
4.3. Utvrđivanje uvjeta izolacije fokalnih adhezija iz stanica Cal27	33
4.4. Identifikacija proteina adhesoma metodom spektrometrije masa	36
4.5. Lokalizacija proteina paksilina (Y113) i aktina u stanicama Cal27 i klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3.....	51
§ 5. RASPRAVA	54
§ 6. ZAKLJUČAK	63
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	64
§ 8. DODATAK	XX
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Karakterizacija adhesoma u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 nakon *de novo* ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$

Kristina Čuljak

Vežanjem na izvanstanični matriks, integrini regrutiraju raznovrsne proteine oko citoplazmatskog repa stvarajući strukture poznate kao fokalne adhezije. Skup svih molekula povezanih s adhezijom integrina naziva se adhesom integrina. U ovom smo radu okarakterizirali adhesome stanica pločastog epitela jezika Cal27 i klona Cal27-2B1, dobivenog transfekcijom stanica Cal27 plazmidom koji sadrži cDNA za podjedinicu integrina β_3 i za kojeg je pokazana otpornost na nekoliko protutumorskih lijekova i povećana pokretljivost. Izolirani su kompleksi adhezije integrina stanica Cal27 i Cal27-2B1 i analizirani pomoću spektrometrije masa. Otkriveno je 639 različitih proteina od kojih je 19 dio konsenzus adhesoma. U Cal27-2B1 otkriveno je 17 proteina koji se nalaze u većim količinama nego u stanicama Cal27. Ovaj rad pruža vrijedan izvor informacija o sastavu adhesoma karcinoma pločastog epitela jezika i promjenama u signalnim putevima integrina koje su potencijalno uključene u fenotip povećane otpornosti na protutumorske lijekove i povećanu pokretljivost čime bi se mogle otkriti nove mogućnosti za terapiju tumora.

(68 stranica, 13 slika, 7 tablica, 90 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: adhesom, fokalne adhezije, integrin $\alpha_v\beta_3$, karcinom pločastog epitela jezika

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

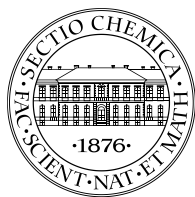
Neposredni voditelj: mag. mol. biol. Ana Dekanić

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

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić, PMF, Zagreb
 2. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin, PMF, Zagreb
 3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, PMF, Zagreb
- Zamjena: prof. dr. sc. Biserka Prugovečki, PMF, Zagreb

Datum diplomskog ispita: 26. rujna 2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Characterisation of adhesome in tongue squamous carcinoma cells Cal27 upon *de novo* expression of integrin $\alpha_v\beta_3$

Kristina Čuljak

Upon ligation to the extracellular matrix, integrins recruit various proteins to form structures known as focal adhesions. The entire collective of molecules associated with integrin adhesions was termed the integrin adhesome. In the present study we characterised adhesomes of tongue squamous carcinoma cells Cal27 and Cal27-derived clone Cal27-2B1, obtained by transfection of plasmid containing integrin subunit β_3 cDNA and showing resistance to several antitumor drugs, increased migration and invasion. The integrin adhesion complexes from Cal27 and Cal27-2B1 were isolated and analysed using mass spectrometry identifying 639 different proteins with 19 out of 60 consensus adhesome proteins. In clone Cal27-2B1, 17 proteins were detected at much higher levels compared with Cal27 cells providing a valuable resource of information that might reveal novel opportunities for therapeutic intervention in tumors.

(68 pages, 13 figures, 7 tables, 90 references, original in Croatian)

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

Keywords: adhesom, focal adhesion, integrin $\alpha_v\beta_3$, tongue squamos carcinoma cells Cal27

Mentor: Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Scientist

Assistant mentor: M. Sc. Ana Dekanić

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. dr. Morana Dulić, Assistant Professor, Faculty of Science, University of Zagreb
2. dr. Željka Soldin, Associate Professor, Faculty of Science, University of Zagreb
3. dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor, Faculty of Science, University of Zagreb

Substitute: dr. Biserka Prugovečki, Assistant Professor, Faculty of Science, University of Zagreb

Date of exam: 26 September 2018

§ 1. UVOD

Tema ovog diplomskog rada temelji se na objavljenom radu grupe u kojoj je diplomski rad i izrađen, a u kojem je pokazan mehanizam otpornosti stanica karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 na četiri protutumorska lijeka: cisplatinu, doksorubicin, mitomicin C i 5-fluorouracil nakon *de novo* ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$. Pokazano je da klonovi stanica, 2B1 i 2B3 dobiveni stabilnom transfekcijom stanica Cal27 plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β_3 , ekspimiraju integrin $\alpha_v\beta_3$ te povećano ekspimiraju integrin $\alpha_v\beta_5$, a putem smanjene ekspresije nerekceptorske tirozin kinaze Src i njezinog fosforiliranog oblika pSrc(Y418) osiguravaju otpornost na protutumorske lijekove. Osim toga, ove stanice imaju povećani metastatski potencijal što proizlazi iz povećane migratorne i invazivne sposobnosti klonova 2B1 i 2B3 u odnosu na stanice Cal27.¹

Integrini su heterodimerni transmembranski receptori koji se vežu za ligande izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM). Vezanjem liganada za integrine potiče se niz unutarstaničnih signala koji reguliraju migraciju, preživljenje, proliferaciju i diferencijaciju. Integrini se sastoje od α i β podjedinica, a do sada je otkriveno 18 α i 8 β podjedinica koje tvore 24 različita heterodimera.² Podjedinica integrina α_v može vezati pet različitih β podjedinica (β_1 , β_3 , β_5 , β_6 i β_8), a heterodimeri važni za ovo istraživanje su $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$. Njihova povećana ekspresija u tumorskim stanicama potaknula je istraživanja u kojima su ova dva heterodimera potencijalne mete liječenja tumora. Heterodimer $\alpha_v\beta_3$ povećano je ekspimiran u tumorima dojke, prostate i melanomu dok je $\alpha_v\beta_5$ integrin povećano ekspimiran u glioblastomu te tumorima dojke ali je također ekspimiran i u velikom broju normalnih stanica.³

Vezanjem integrina na proteine izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) dolazi do nakupljanja integrina (engl. *clustering*) i stvaranja dinamičnog makromolekularnog kompleksa adhezije integrina ili fokalne adhezije. Osim strukturne uloge, proteini fokalnih adhezija imaju ulogu prenošenja signala u ECM i obrnuto kako bi kontrolirali stanične funkcije.⁴ Do sada je poznato više od 180 proteina koji se nalaze u fokalnim adhezijama, ali samo njih 60 je dio tzv. konsenzusnog adhesoma. Adhesom predstavlja skup svih molekula koje su uključene u adheziju posredovanu integrinima. Proteini konsenzus adhesoma mogu se podijeliti u četiri modula ovisno o interakcijama koje

stvaraju s ostalim proteinima. Prvi modul sadrži proteine koji ostvaruju interakcije s α -aktininom i ziksinom, drugi modul vinkulin i talin te proteine koji vežu vinkulin (vineksin i ponsin). Proteini trećeg modula su kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*, FAK) i paksilin koji ostvaruju interakcije i s vinkulinom, i zadnji modul koji uključuje proteine koji ostvaruju interakcije s kinazom vezanom za integrine (engl. *integrin linked kinase*, ILK) i kindlinom.⁵

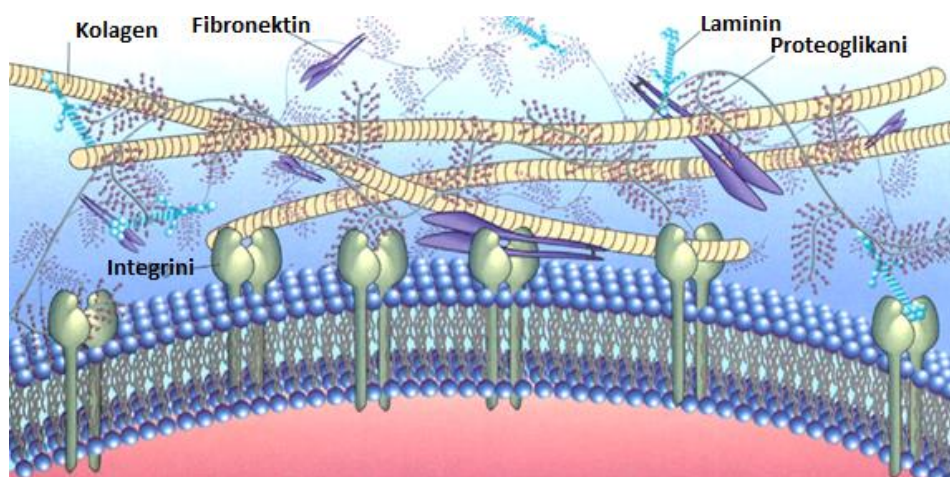
Cilj ovog diplomskog rada je analiza sastava adhesoma stanica Cal27 i usporedba s adhesomom klona Cal27-2B1 dobivenog stabilnom transfekcijom plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β_3 u svrhu boljeg razumijevanja mehanizma otpornosti stanica na protutumorske lijekove te njihove povećane migratorne i invazivne sposobnosti. Korištena je metoda protočne citometrije kako bi se provjerio identitet klona 2B1 nakon odmrzavanja, a u svrhu utvrđivanja otpornosti na cisplatinu klona Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 mjereno je preživljenje stanica MTT testom. Izolacija adhesoma provedena je da bi se odredili optimalni uvjeti izolacije što je potvrđeno metodom “western blot”. Uzorci su nakon izolacije analizirani spektrometrom masa laboratoriju Martina J. Humphriesa u Manchesteru, (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK). Metodom imunofluorescencije je vizualiziran protein paksilin (Y113), marker fokalnih adhezija, a metoda mikroskopije refleksijskog interferencijskog kontrasta korištena je kako bi se pokazalo na kojim se mjestima stanica čvrsto veže za podlogu.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) je tvar koju izlučuju stanice u izvanstanični okoliš koja se sastoji od različitih proteina, a neki od osnovnih su laminin, kolagen i fibronektin.⁶ Osim što ima ulogu strukturne potpore stanicama, utječe na procese koji su nužni za diferencijaciju, migraciju i proliferaciju stanice.⁷ ECM je iznimno tkivno specifičan te se konstatno mijenja, a njegove komponente su podložne različitim posttranslacijskim modifikacijama. Vezanjem faktora rasta i interakcijom s receptorima na površini stanice, ECM potiče okidanje signala važnih za adheziju, migraciju i diferencijaciju tkiva.⁸

Izvanstanični matriks sastoji se od dvije osnovne skupine makromolekula: proteoglikana i vlaknastih proteina (slika 1). Proteoglikani čine većinu izvanstaničnog matriksa, a sastavljeni su od lanaca glikozaminoglikana kovalentno vezanih za glavni protein. Glavni vlaknasti proteini su kolagen, elastin, fibronektin i laminin.⁹



Slika 1. Komponente izvanstaničnog matriksa. Preuzeto i prilagođeno iz Karp¹⁰

Kolagen je protein koji je najviše prisutan u ECM, osigurava čvrstoću tkiva, regulira adheziju stanica i razvitak tkiva.¹¹ Građen je od trostrukih uzvojnica od kojih su dvije identične ($\alpha 1$ lanci), a treća se razlikuje u kemijskoj strukturi ($\alpha 2$ lanac).¹² Kolagen izlučuju

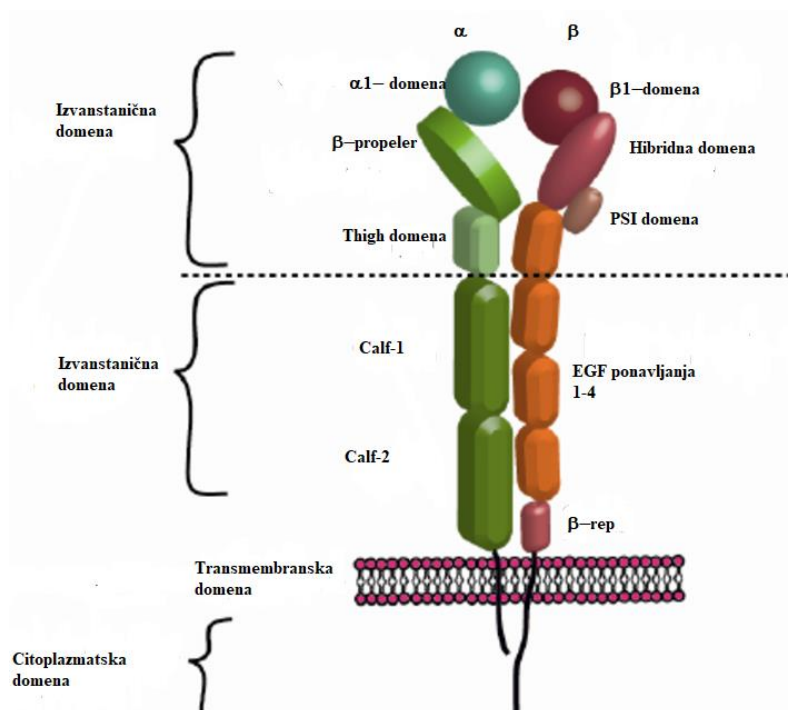
fibroblasti¹³ koji imaju mogućnost organizirati kolagenske uzvojnice u veće supramolekularne strukture kao što su vlakna. Kolagen se veže na elastin, još jedan od proteina ECM koji omogućuje tkivima koja se rastežu da se vrate u prvotno stanje.¹⁴ Elastin je građen od molekula tropoelastina koje stvaraju vlakna pomoću enzima lizil-oksidaze.¹⁵

Sljedeći vlaknasti protein, fibronektin, ima ulogu organizacije ECM te regulacije adhezije i migracije stanica. Izlučuje se kao dimer te sadrži nekoliko veznih mjesta za druge dimere fibronektina, kolagen, heparin i druge receptore na površini stanica.¹⁶

Vlaknasti protein vitronektin je glikoprotein najviše prisutan u krvi, ECM i kostima.¹⁷ Veže se na različite ligande poput integrina, urokinaznih receptora (engl. *urokinase receptor*, uPAR) i plazminogen.¹⁸ Integrini su važan ligand za vitronektin, posebice heterodimeri $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$, od kojih $\alpha_v\beta_3$, zajedno s uPAR receptorima potiče progresiju tumora.¹⁹

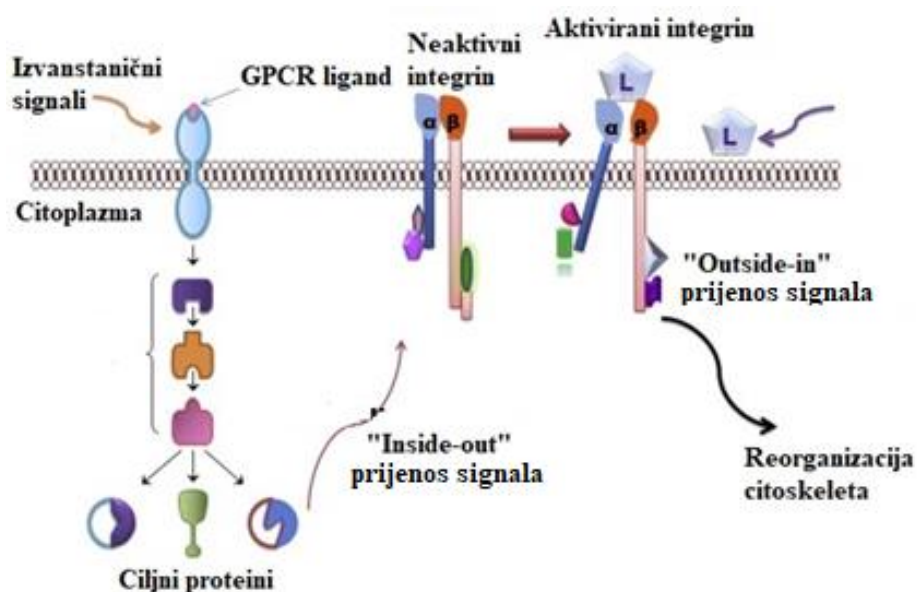
2.2. Integrini

Receptori na površini stanice uključeni u adheziju (engl. *cell adhesion molecules*, CAMs) mogu se podijeliti u četiri skupine: kadherini, selektini, integrini i imunoglobulini.²⁰ Integrini su centralne molekule koje određuju ponašanje stanica. Njima stanica detektira mikrookoliš i time prikuplja informacije za ekspresiju tkivno-specifičnih gena. Ovi signali su važni za preživljenje, proliferaciju i migraciju, upućujući na činjenicu da je komunikacija s ECM potrebna za određivanje sudbine stanice.²¹ Integrini su transmembranski glikoproteini građeni od nekovalentno povezanih α i β podjedinica. Podjedinice su građene od dugačke izvanstanične domene i kratkog citoplazmatskog repa.²² Podjedinica α građena je od domene oblika β -propelera (*thigh* domena) te *calf-1* i *calf-2* domena dok je podjedinica β građena od β_1 -domene, hibridne domene i PSI domene (engl. *plexin-semaphorin-integrin*) (Slika 2). Do danas je identificirano 18 α i 8 β podjedinica koje mogu tvoriti 24 različita heterodimera. Prema načinu udruživanja podjedinica, integrini se mogu svrstati u četiri skupine: RGD receptori ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$ i $\alpha_{IIb}\beta_3$), receptori za laminin ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$ i $\alpha_6\beta_4$), receptori za kolagen ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ i $\alpha_{11}\beta_1$) i receptori specifični za leukocite ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_E\beta_7$, $\alpha_4\beta_1$ i $\alpha_9\beta_1$).



Slika 2. Struktura integrina. Podjedinice α i β sastoje se od izvanstanične domene, transmembranske domene i citoplazmatskog repa. Preuzeto i prilagođeno iz Gahmberg i sur.²³

Nakon vezanja liganda, konformacijska promjena integrina dovodi do promjene iz neaktivnog stanja u aktivno, a glavno svojstvo aktivnog stanja je stvaranje poveznice između ECM i unutrašnjosti stanice (aktinski citoskelet). Aktivacija integrina postiže se signalima koji dolaze iz unutrašnjosti stanice u izvanstanični okoliš (engl. *inside-out signaling*) ili signalima iz izvanstaničnog okoliša u unutrašnjost stanice (engl. *outside-in signaling*)²² (Slika 3). Integrini djeluju kao mehanosenzori, adhezijske molekule, a njihova interakcija s ECM utječe na reorganizaciju citoskeleta, migraciju, diferencijaciju, preživljenje i proliferaciju stanica tijekom velikog broja procesa, te su posebno bitni kod procesa metastaziranja tumora.²⁴



Slika 3. Prijenos signala posredovan integrinima. Signali se provode dvosmjerno: iz stanice u izvanstaničnu okolinu i obratno. Vezanjem liganda na GPCR proteine (engl. *G protein-coupled receptors*) dovodi do aktivacije GPCR nakon čega dolazi do aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva koji mijenjaju aktivnost integrina iz unutrašnjosti stanice („inside-out“ signalizacija). Vezanjem liganda na izvanstaničnu domenu integrina dovodi do njegove aktivacije što rezultira reorganizacijom citoskeleta („outside-in“ signalizacija). Preuzeto i prilagođeno iz Das i sur.²⁵

2.2.1. Uloga integrina u tumorskim stanicama

Tumori nastaju kao posljedica nekontroliranog rasta stanica. Mogu nastati zbog nasljednih mutacija ili djelovanjem karcinogena iz okoliša. Tumori preživljavaju izbjegavanjem stanične smrti (apoptoze) koja služi kao prirodna barijera nastanku tumora.²⁶

Klasične metode liječenja tumora podrazumijevaju tri pristupa: kirurški zahvat, radioterapiju (zračenje) i kemoterapiju koji se mogu primjenjivati zasebno ili u kombinaciji. Danas je sve više u upotrebi i ciljana terapija koja cilja određene molekule u tumorskim stanicama za koje je pokazano da su ključne za razvoj tumora²⁷. Glavni problem liječenja ciljanom terapijom je postojanje velikog broja tumora u kojima je ciljna molekula nepoznata, pa su klasične metode liječenja jedina opcija. Krajnji cilj svake terapije tumora je uništiti sve tumorske stanice uz minimalno oštećenje zdravog tkiva. Kirurški zahvati su najčešće korištene metode terapije tumora, a uspješni su kod uklanjanja primarnih tumora. Radioterapija se koristi u kombinaciji s kirurškim zahvatom, primjenjuje se lokalizirano čime se smanjuje oštećenje zdravog tkiva. Kemoterapija uključuje primjenu lijekova (citostatici ili protutumorski lijekovi) koji ciljaju tumorske stanice, a osim liječenja primarnih tumora, sve češće se primjenjuje u kontroli širenja bolesti. Protutumorski lijekovi djeluju na sve stanice,

tumorske i normalne, koje se dijele. Razlikujemo više vrsta protutumorskih lijekova s obzirom na mehanizam djelovanja: DNA alkilirajuće agense, antimetabolite, mitotske inhibitore i interkalirajuće agense. Osnovni problem prilikom liječenja tumora je razvoj otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove što vrijedi i za ciljanu terapiju kod koje se također brzo razvija otpornost. Nekoliko je mehanizama koji uzrokuju otpornost: 1) smanjeno nakupljanje protutumorskog lijeka kao posljedica smanjenog ulaska u stanicu (npr. pojačano izbacivanje pomoću membranskih pumpi (P-glikoprotein)), 2) smanjeno vezanje protutumorskih lijekova na ciljne molekule u stanici (npr. povećana proizvodnja glutationa i ubikvitina dovodi do inaktivacije protutumorskog lijeka i izlučivanja nastalih konjugata), 3) povećana sposobnost popravka i/ili tolerancije oštećenja DNA te inhibicija apoptoze.²⁸

Upravo su integrini molekule koje bi, prema sadašnjim saznanjima, mogli modulirati osjetljivost tumora na kemoterapiju. U staničnim linijama tumora dojke MDA-MB-231 i melanoma MDA-MB-435 vezanje β_1 integrina inhibira apoptozu potaknutu vinkristinom i paklitakselom, protutumorskim lijekovima koji djeluju na mikrotubule.²⁹ Adhezija karcinoma malih stanica pluća na fibronektin, kolagen IV i laminin osigurava otpornost na etopozid, cisplatinu i daunorubicin ali i na zračenje. Ovaj učinak je posredovan β_1 podjedinicom integrina uključenoj u integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ i $\alpha_v\beta_1$ koji su eksprimirani na stanicama karcinoma pluća.³⁰ Ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ osigurava otpornost stanica karcinoma grkljana čovjeka na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C,³¹ ali i stanica karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka na cisplatinu, doksorubicin, mitomicin C i 5-fluorouracil.¹

Drugi problem u liječenju tumora je metastaziranje koje je, osim u tumora koji svojim smještajem ugrožavaju život, primarni uzrok smrti pacijenata. Metastaziranje je proces koji zahtjeva širenje tumora s primarnog na sekundarno mjesto u organizmu, preživljenje u novoj okolini te proliferaciju. Prilikom metastaziranja tumorskih stanica (invazija i migracija novog tkiva) dolazi do prodiranja i adhezije na ciljno mjesto u organizmu, što omogućava lakše invadiranje tumora u tkivo. Primjerice, galektini (skupina proteina koja se veže na β -galaktozidne šećere) utječu na ponašanje tumora vežući se na ugljikohidrate na izvastaničnoj domeni integrina te reguliraju njihovo nakupljanje. Pokazano je da galektin-1 potiče metastaziranje tumora pluća utječući na $\alpha_6\beta_4$ integrin te aktivira Notch1/Jagged2 signalni put.³² Sklonost metastaziranju povezana je i s nakupljanjem određenih ECM proteina. L1-CAM ligand (engl. *L1-cell adhesion molecule*) koji se veže na $\alpha_v\beta_3$ integrin, eskprimiran na stanicama tumora dojke, uzrokuje metastaziranje tumorskih stanica u pluća.³³ Povećana

ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ u stanica karcinoma grkljana čovjeka HEp2 (engl. *human laryngeal carcinoma cells*) i stanicama karcinoma pločastog epitela jezika (engl. *tongue squamous carcinoma cells*) Cal27, osim otpornosti na više protutumorskih lijekova, povećava migraciju i invaziju.^{31,1} Prema tome integrini su molekule čijom bi modulacijom mogli istovremeno utjecati na osjetljivost tumora na protutumorske lijekove i metastatski potencijal.

Kada tumorske stanice postanu metastatske, tada se povećava njihov afinitet za ECM proteine, što se očituje u promjeni sastava ECM te profilu ekspresije receptora za ECM, posebno integrina. Dolazi do aktivacije signalnih puteva koji reguliraju adheziju, preživljenje stanica te reorganizaciju citoskeleta, tumorske stanice postaju pokretljivije i invazivnije te su sposobne preživjeti u različitoj okolini. Novi pristupi terapije tumora imaju za cilj blokirati metastatski potencijal tumorskih stanica, a potencijalne mete su integrini.³⁴

Kliničke studije su pokazale da kočenje prijenosa signala potaknutih integrinima inhibira rast tumora utječući direktno na tumorske stanice ali i okolno tkivo. Ekspresija integrina može se značajno razlikovati u normalnim i tumorskim stanicama, a ekspresija heterodimera $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ i $\alpha_v\beta_6$, ujedno najviše istraženih integrina, povezana je s progresijom tumora kao što su melanom, tumori dojke, glioblastom i drugi.²⁴ Jedni od zanimljivijih meta terapije tumora su integrini $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$, koji se vežu na različite proteine izvanstaničnog matriksa koji sadrže RGD domenu.³⁵ Integrini $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ su povećano eksprimirani u endotelnim stanicama u angiogenezi, procesu rasta krvnih žila iz već postojećih koji ima ključnu ulogu u rastu i metastaziranju tumora. Desgrosellier i suradnici pokazali su da povećana ekspresija $\alpha_v\beta_3$ integrina utječe na rast tumora, a utišavanjem $\alpha_v\beta_3$ smanjuje se rast i širenje tumora gušterače.³⁶ Za razliku od $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ integrin je eksprimiran u velikom broju normalnih stanica ali i pojačano eksprimiran u tumorima kao što je tumor dojke.³⁷

Integrini se mogu ciljati molekulama koje se vežu na ciljne integrine i sprječavaju okidanje signala, kao što su monoklonska protutijela ili ciklički RGD oponašajući (engl. *mimetic*) peptidi.³⁸ Blokirajuće monoklonsko protutijelo CNTO 95 je razvijeno na podjedinicu integrina α_v čime se ciljaju integrini $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$, a u prvoj fazi kliničkih ispitivanja pokazano je njegovo protutumorsko djelovanje na stanicama tumora jajnika i debelog crijeva.³⁹ Razvijeno je i drugo monoklonsko protutijelo etaracizumab koji cilja $\alpha_v\beta_3$ integrin, a pokazano je da direktno zaustavlja rast metastatskog melanoma i/ili inhibira angiogenezu. Cilengitid je ciklički pentapeptid koji sadrži RGD slijed i koristi se kao inhibitor $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$

integrina. Korišten je u prvoj i drugoj fazi kliničkih ispitivanja za liječenje glioblastoma u kombinaciji s temozolomidom i radioterapijom, pri čemu nisu dobiveni ohrabrujući rezultati. Nekoliko istraživanja je provedeno i na razvoju inhibitora integrina $\alpha_v\beta_6$, monoklonskog protutijela STX-100, ali rezultati nisu objavljeni. Ispitivanje inhibitora integrina $\alpha_v\beta_8$ provedeno je samo u predkliničkim studijama, dok je $\alpha_v\beta_1$ integrin još uvijek nepoznanica s obzirom da ga nije lako identificirati u tkivu, ali smatra se da bi oba integrina mogla imati kritičnu ulogu u prekomjernom stvaranju vezivnog tkiva u tumorima.³⁸ Još jedan od načina kojima se može spriječiti prijenos signala potaknut integrinima je unos integrin specifične siRNA čime se postiže utišavanje njihove ekspresije. Pokazano je da utišavanje podjedinice integrina β_3 inhibira invaziju trostruko negativnog tumora dojke posredovanom citokinom TGF- β .⁴⁰

2.2.2. Mehanizam otpornosti tumora na protutumorske lijekove posredovan integrinima u stanicama glave i vrata

Usprokos napretku u liječenju tumora, sve je veći broj tumora koji su otporni na djelovanje protutumorskih lijekova, što je posljedica različitih faktora kao što su aktivacija puteva preživljenja tumorskih stanica, neučinkovita indukcija stanične smrti (apoptoze) te promjene u ciljnim molekulama. Otpornost na protutumorske lijekove može se podijeliti u dvije kategorije: (i) urođena otpornost nastala utjecajem genetičkih i okolišnih faktora i (ii) stečena koja nastaje kao rezultat prilagodbe tumorskih stanica na primjenu lijekova.⁴¹

Otpornost poredovana adhezijom novije je područje istraživanja, a kao dio tog područja posebno se istražuje otpornost poredovana integrinima. Signali koje okidaju integrini nakon vezanja na komponente ECM osiguravaju preživljenje raznih tipova tumora pa tako i tumora glave i vrata. Ambriović-Ristov i suradnici pokazali su da u stanicama karcinoma grkljana čovjeka HEP2 tijekom razvoja otpornosti na cisplatinu dolazi do povećane ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$.⁴² Kasnije je dokazano da je za otpornost na cisplatinu, ali i na mitomicin C i doksorubicin, usitinu odgovorna *de novo* ekspresija ovog integrina i to mehanizmom povećanja ukupne količine glutationa koji djelotvornije uklanja reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koje nastaju djelovanjem ovih protutumorskih lijekova. U stanicama HEP2 koje ekspimiraju integrin $\alpha_v\beta_3$ pronađena je povećana ekspresija Bcl-2 proteina i glutationa. Bcl-2 je član veće skupine regulatornih proteina koji ili izazivaju ili inhibiraju apoptozu stanice. Kako je utvrđeno da se razina

ekspresije Bcl-2 proteina nije promijenila (nakon što su stanice HEp2 transficirane plazmidom koji sadrži gen za Bcl-2), pretpostavlja se da Bcl-2 nije ključan faktor odgovoran za otpornost HEp2 klonova na protutumorske lijekove. S obzirom da je u literaturi pokazano da povećana ekspresija Bcl-2 u stabilno transficiranim klonovima utječe na povećanje razine glutationa, pa je s tim ciljem mjerena i ekspresija glutationa u HEp2 klonovima. HEp2- $\alpha_v\beta_3$ stanice pokazale su povećanu ekspresiju glutationa i pretpostavlja se da je mehanizam otpornosti ovih stanica djelomično posljedica povećanja ekspresije glutationa, s obzirom da se izlaganjem HEp2 klonova inhibitoru glutationa nije promijenila osjetljivost ovih stanica na protutumorske lijekove.³¹ Još jedna potvrda da je uloga integrina $\alpha_v\beta_3$ ključna za otpornost tumorskih stanica na protutumorske lijekove potvrđena je na staničnoj liniji Cal27 gdje je pokazano da *de novo* ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ osigurava otpornost na četiri protutumorska lijeka cisplatinu, mitomicin C, doksorubicin i 5-fluorouracil putem gubitka pSrc(Y418).¹

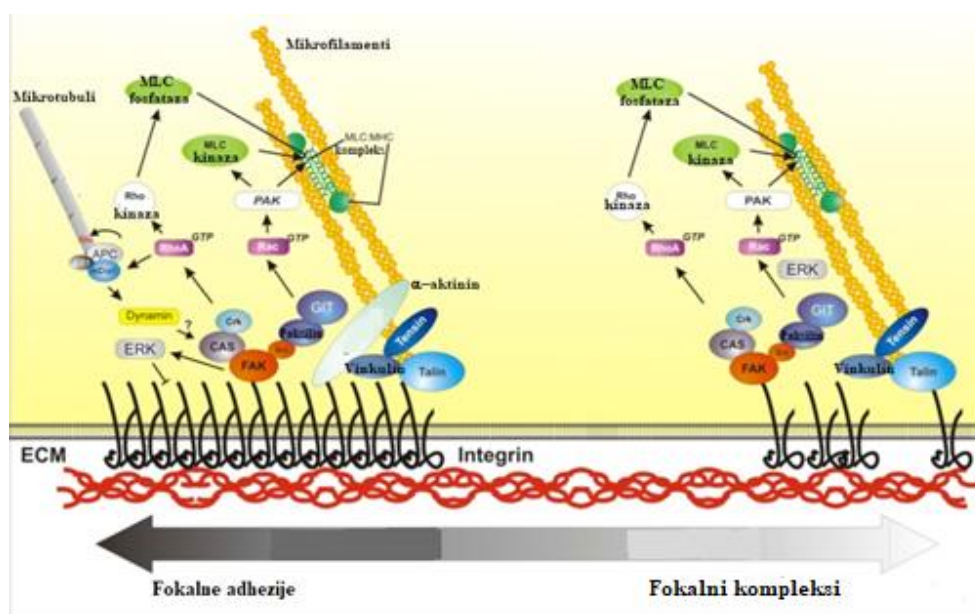
Upravo suprotni pristup u istraživanju i potencijalno u terapiji tumora je utišavanje integrina koje bi moglo učiniti stanice osjetljivima na protutumorske lijekove. Utišavanjem podjedinica integrina β_3 , β_5 , α_v , α_3 i α_4 tumorske stanice glioma postaju osjetljive na temozolomid. Od četiri stanične linije, najveći efekt primjećen je u LN229 stanicama pri čemu je utišavanje β_3 podjedinice integrina (pomoću siRNA) dovelo do inhibicije FAK/Src/Akt/NF κ B signalnih puteva.⁴³ Prema ovim rezultatima, integrini imaju bitnu ulogu u razvoju otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove i mogli bi služiti kao meta u kombinaciji s protutumorskim lijekovima s ciljem veće učinkovitosti takve kombinirane terapije.

2.3. Kompleksi adhezije integrina (fokalne adhezije)

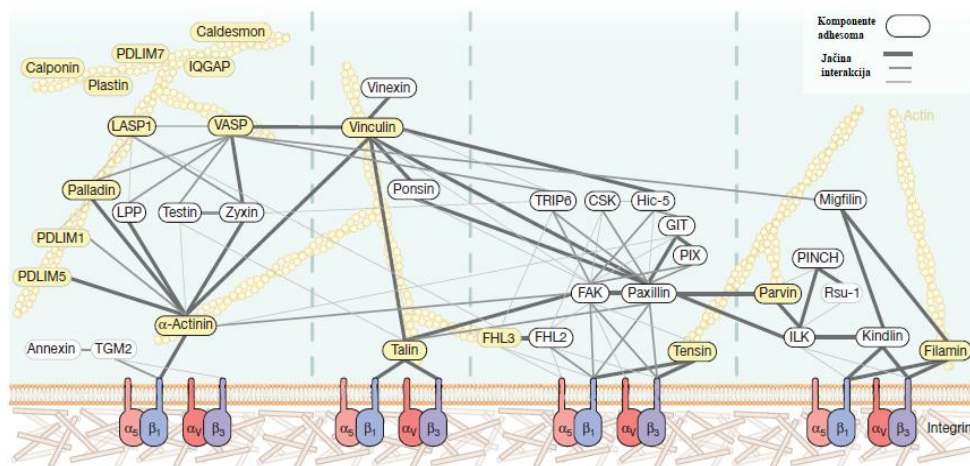
Vežanjem integrina na komponente ECM dolazi do nakupljanja integrina (engl. *clustering*) i nastanka dinamičnog makromolekularnog kompleksa adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complex*, IAC) odnosno fokalnih adhezija. Komponente fokalnih adhezija osim strukturne, imaju ulogu prenošenja signala u ECM i obrnuto kako bi kontrolirali razne funkcije u stanici. Integrini imaju ključnu ulogu u nastajanju fokalnih adhezija i njihovoj dinamici koja je u tumorskim stanicama često promijenjena.⁴⁴

Fokalne adhezije su dinamični makromolekularni kompleksi koji povezuju ECM i unutrašnjost stanice (aktinski citoskelet) preko integrina. Prvotno nastaju novostvorene adhezije ili fokalni kompleksi (vežanjem nekoliko integrina na komponente ECM) da bi se

nakon nakupljanja integrina formirale fokalne adhezije (Slika 4). Skup svih molekula uključenih u adhezije posredovane integrinima naziva se adhesom integrina. Do sada je poznato više od 180 komponenti koje se nalaze u fokalnim adhezijama⁴⁵ dok je samo 60 proteina uvršteno u konsenzus adhesom koji sadrži najučestalije komponente IAC tj. one proteine koji su pronađeni u pet ili više setova podataka.⁴ Od 60 proteina, njih 31 pronađeno je u adhesomu konstruiranom *in silico* („*literature-curated integrin adhesome*“) koji predstavlja teoretsku mrežu s više od 200 komponenti koja sadrži sve proteine za koje je potvrđeno da se nalaze u adhesomu. Proteini konsenzus adhesoma su ugrubo podijeljeni na četiri modula temeljenih na poznatim interakcijama među proteinima iz literature.⁴⁶ Prvi modul sadrži proteine koji stvaraju interakcije s α -aktininom i ziksinom, drugi modul sadrži vinkulin, talin i proteine koji vežu vinkulin (vineksin i ponsin). Vinkulin ostvaruje najviše dosad zabilježenih interakcija s proteinima, čak sedam, a veže se i na proteine trećeg modula, FAK i paksilin. Zadnji modul uključuje proteine koji ostvaruju interakcije s ILK i kindlinom (Slika 5).⁵



Slika 4. Shematski prikaz nastajanja fokalnih adhezija. Proteini talin, vinkulin i α -aktinin prisutni su u nascentnim adhezijama. Nakupljanjem integrina dolazi do novačenja drugih proteina poput kinaze fokalne adhezije (FAK) i paksilina. Preuzeto i prilagođeno iz Manzanares i sur.⁴⁷



Slika 5. Shematski prikaz interakcija proteina konsenzusnog adhesoma. Interakcije su prikazane različitom debljinom linije ovisno o tome kolika je jačina interakcija među pojedinim proteinima. Deblje crne linije predstavljaju interakcije potvrđene u adhezivnom konstruiranom *in silico* („literature-curated adhesom“). Žuto obojeni proteini vežu se na aktin (nije prikazan). α -aktinin iako ima dvije izoforme (α -aktinin 1 i 4) prikazan je kao jedan čvor. Proteini koji ostvaruju mali broj interakcija nisu prikazani (β -podjedinica prolil-4-hidroksilaze i peptidil-proлил izomeraza B). Preuzeto i prilagođeno iz Horton i sur.⁵

2.3.1. Sastav fokalnih adhezija

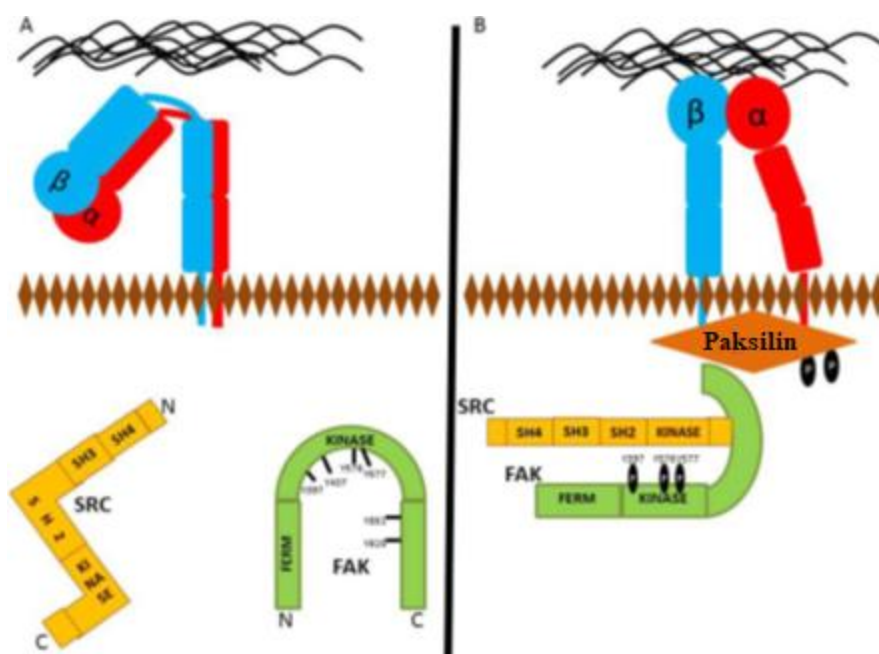
Struktura novostvorenih adhezija (fokalni kompleksi), koja nastaje prije nakupljanja integrina i stvaranja fokalnih adhezija, stvara se blizu samog ruba migratornih stanica. Fokalni kompleksi sadrže nekoliko stotina proteina uključujući integrine, talin i paksilin.⁴⁵ Novačenjem ostalih proteina pod utjecajem aktinsko-miozinskog mehanizma nastaju fokalne adhezije, iako točan mehanizam i redosljed novačenja proteina još uvijek nije razjašnjen.⁶ Razvoj učinkovite i reproducibilne metode za izolaciju adhesoma i analize spektrometrijom masa uvelike je doprinio daljnjim istraživanjima fokalnih adhezija u tumorskim stanicama.

Proteini fokalnih adhezija mogu se klasificirati u nekoliko skupina: 1) adaptorni proteini poput paksilina i talina 2) signalni proteini poput kinaze fokalnih adhezija (engl. *focal adhesion kinase*, FAK), 3) nereceptorske tirozin kinaze Src te 4) proteini koji sudjeluju u regulaciji aktina poput VASP (engl. *vasodilator-phosphoprotein*) i α -aktinina. Fosforilacija je posttranslacijska modifikacija koja regulira dinamiku fokalnih adhezija.

Jedan od prvih proteina koji se novači u fokalne adhezije je FAK, a sastoji se od N-terminalne FERM (engl. F for 4.1 protein, E-ezrin, R-radixin, M-moesin) domene, C-terminalne FAT domene i regije bogate prolinom. Nakupljanje integrina dovodi do autofosforilacije FAK na Y397 kojise pomoću FERM domene veže na citoplazmatski rep β podjedinice integrina čime se FAK razmotava i aktivira.⁴⁴ Osim uloge provođenja signala FAK je također i adaptorni protein, te je uključen u razne signalne puteve.

Imunohistokemijske analize su potvrdile njegovu povećanu ekspresiju u karcinomu dojke i kolorektalnom karcinomu.⁴⁸

Još jedna kinaza, nerekceptorska tirozin kinaza Src, pripada većoj obitelji kinaza (engl. *Src family kinases*) te je identificirano devet varijanti proteina Src. Strukturno su članovi Src kinaza slični i sadrže očuvane elemente: N-terminalna Src homologna domena (SH4), Src homologna domena 3 (SH3), Src homologna domena 2 (SH2), kinaznu domenu bogatu prolinom i C-terminalni rep. Autofosforilacija FAK (Y397) izlaže SH2 domenu proteina Src koji dodatno fosforilira FAK kinaznu domenu na Y576 i Y577 čime se stvaraju dodatna vezna mjesta za proteine paksilin i p130Cas (Slika 6).⁴⁹



Slika 6. Novačenje proteina u fokalne adhezije. A) Kada su integrini inaktivni, FAK i Src su također inaktivni i ne prenose signal za regrutiranje proteina paksilina. B) Vežanjem integrina na ECM, FAK se autofosforilira na Y397 što dovodi do aktivacije Src, potom signalni kompleks FAK-Src fosforilira paksilin na Y31 i Y118. Preuzeto i prilagođeno iz Mazivevi i Alahari⁴⁴

FAK-Src signalni kompleks fosforilira paksilin (Y31 i Y118), adaptorni protein koji sadrži pet ponavljajućih domena bogatih leucinom i aspartatom na N-terminalnom kraju (LD domene) i četiri domene bogate cisteinima i histidinima na C-kraju (LIM domene). LD domene izlažu vezna mjesta za druge proteine fokalnih adhezija poput vinkulina, talina, kinaze vezane za integrine (ILK) te već spomenutih FAK i Src, dok je LIM3 domena

odgovorna za regrutiranje paksilina u fokalne adhezije. Pokazano je da mutacija specifičnih tirozina (Y31 i Y118) i serina (S178) smanjuje mogućnost narušavanja strukture fokalnih adhezija te utječe na migratornu sposobnost endotelih stanica.⁵⁰

S obzirom da integrini ne posjeduju enzimsku aktivnost, prijenos signala ovisi o raznim adaptornim i signalnim proteinima. Jedan od takvih proteina je kinaza vezana za integrine (engl. *integrin linked kinase*, ILK). Veže se na β_1 i β_3 podjedinice integrina te je jedan od najbolje opisanih proteina. ILK sadrži tri visoko očuvane domene: N-terminalnu domenu koja se sastoji od pet ankirinskih ponavljanja, „*plecstrin homology (PH) like domain*“ i C-terminalne katalitičke domene. ILK je, zajedno s FAK i Src, sastavni dio fokalnih adhezija, nalazi se i u miofilamentima, a otkriveno je i da može stupiti u interakciju s tubulinom i tubulin pridruženim proteinima.⁵¹ U različitim vrstama tumora pokazana je povećana ekspresija i kinazna aktivnost ovog proteina⁵², koja korelira s progresijom tumora u pacijentima.⁵³ Tako je katalitička aktivnost ILK, koja promovira stvaranje tumora fosforilacijom GSK-3 β , Akt i ERK, pokazana u tumoru dojke.⁵⁴

2.3.2. Fokalne adhezije u tumorskim stanicama

Sposobnost vezanja integrina na proteine ECM i prijenos signala pokazuje njihovu kritičnu ulogu u promjeni sastava fokalnih adhezija, a migracija i invazija tumora ovisna je o ekspresiji/aktivaciji/deaktivaciji integrina. Vezanje integrina na proteine ECM dovodi do fosforilacije proteina paksilina i FAK, formiranja fokalnih adhezija te nastajanja aktinskih filamenata koji imaju ulogu stabilizacije interakcija s ECM.⁵⁰

Kinaza fokalnih adhezija povećano je eksprimirana u metastatskom karcinomu dojke, a s obzirom na interakciju s brojnim proteinima, posebno s nereceptorskom tirozin kinazom Src, pretpostavljeno je da bi inhibicija aktivnih FAK i Src proteina mogla djelovati protutumorski. U tumorima dojke i debelog crijeva pokazana je povećana ekspresija FAK, što je posljedica mutacija u proteinu p53 koje se nalaze u ovim tumorima, za razliku od tumora koji sadrže nemutirani p53.⁵⁵ Pokazano je da TAE226, inhibitor fosforilacije FAK(Y397), inducira apoptozu u stanicama tumora dojke, dok pSrc(Y418) inhibitor ujedno blokira i fosforilaciju FAK Y397 čime je migracija i invazija tumora bila potisnuta.⁵⁶ Upravo suprotan učinak pokazan je u stanicama Cal27 u kojima inhibicija pSrc(Y397) dvama inhibitorima, dasatinibom i PP2, uzrokuje povećanu otpornost na protutumorske lijekove. Još više je iznenadilo da *de novo* ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ osigurava otpornost na protutumorske lijekove

upravo preko gubitka fosforilacije pSrc(Y418), a te stanice, što se i slaže s drugim literaturnim podacima za integrin $\alpha_v\beta_3$, migriraju i invadiraju bolje u odnosu na roditeljske stanice Cal27.¹

Paksilin je također jedan od proteina koji je pojačano eksprimiran u tumorima, a nedavne studije pokazale su povećanu ekspresiju na razini RNA u glioblastomu, što ga čini potencijalnim biomarkerom.⁵⁰

Iako je otkriveno da mnogi proteini fokalnih adhezija imaju ulogu u proliferaciji, migraciji i preživljenju stanica tumora, mnogo toga još nije jasno. Zapravo, postoji vrlo malo literaturnih podataka o adhesomu u tumorskim stanicama, dok se o proteinima fokalnih adhezija i njihovim ulogama zna iz nekoliko radova.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Stanična linija

Korištene su stanice karcinoma pločastog epitela jezika čovjeka, Cal 27 (engl. *human tongue squamos carcinoma*, ATCC, CRL-2095TM) te klonovi, 2B1 i 2B3, dobiveni stabilnom transfekcijom plazmidom koji sadrži gen za β_3 podjedinicu integrina.¹

3.1.2. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije navedene su u tablici 2.

Tablica 2. Osnovne kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , DMEM)	Invitrogen, SAD
Serum fetusa goveda (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Invitrogen, SAD
10x Pen/Strep	Sigma, SAD
Tripsin	Invitrogen, SAD
Cisplatina	Sigma-Aldrich, Njemačka
Etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA)	Kemika, Hrvatska
Natrij-dodecil sulfat (SDS)	Serva, Njemačka
N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (TEMED)	Serva, Njemačka
Tween – 20	Sigma, SAD
3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT)	Chemicon International, SAD
Amonijev persulfat (APS)	Serva, Njemačka
Agaroz	Serva, Njemačka
Akrilamid	Serva, Njemačka

Bisakrilamid	Serva, Njemačka
2-merkaptetanol	Serva, Njemačka
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Kemika, Hrvatska
Etanol	Kemika, Hrvatska
Metanol	Kemika, Hrvatska
Klorovodična kiselina	Kemika, Hrvatska
Natrijeva lužina	Kemika, Hrvatska
Paraformaldehid	Merck Millipore, Njemačka
Podloga za uklapanje (engl. <i>mounting medium</i>)	Dako, Danska
Albumin seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumine, BSA</i>)	Sigma-Aldrich, Njemačka
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Njemačka
Amido Black	Kemika, Hrvatska
InstantBlue Ultrafast Protein Stain	Sigma-Aldrich, Njemačka
Razvijlač	Fotokemika, Hrvatska
Fiksir	Fotokemika, Hrvatska
mqH₂O	-
diH₂O	-
RIPA (engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>) (kataloški broj 89901)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Smjesa koktela inhibitora proteaza Halt™ (kataloški broj 78430)	Thermo Fisher Scientific, SAD
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Cat. No. 161-0374)	Bio-Rad, SAD
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer Life Science, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat, DTBP	Thermo Fisher Scientific, SAD
Ditiotreitol	Thermo Fisher Scientific, SAD

3.1.3. Priprema otopina i pufera

Korištene otopine i priprema prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Priprema otopina

Otopina	Priprema
DMEM-FCS	DMEM s 10% -tnim serumom fetusa goveda i 1%-tnim penicilinom/streptomycinom
Medij za zamrzavanje stanica	950 μL suspenzije stanica u DMEM-FCS + 50 μL DMSO
PBS fosfatni pufer (bez Ca^{2+} i Mg^{2+}), PBSA	1,37 mmol dm^{-3} natrijev klorid + 2,7 mM kalijev klorid + 4,3 mmol dm^{-3} natrijev hidrogenfosfat heptahidrat + 1,4 mmol dm^{-3} kalijev hidrogenfosfat, čuva se pri 4°C
Albumin iz seruma goveda (engl. <i>bovine serum albumine</i>, BSA) u PBS	0,01, 0,1, 0,3 ili 0,5 mg BSA se otapa u 10 mL PBS, kako bi se dobilo 0,1 , 1, 3 ili 5% BSA u PBS, čuva se pri 4°C
Paraformaldehid (4%)	40 g paraformaldehida i 100 μL NaOH otapa se u 1000 mL PBS-a, čuva se pri -20°C u alikvotima po 500 μL .
Tripsin	2,5 g tripsina + 0,01 g streptomicina + 0,006 g penicilina + 0,02 g fenol crvenog se otopi u otopini tripsina, nadopuni se do 1L i podesi pH na 7 do 7,2 te se sterilizira filtriranjem kroz filter veličine pora 0,22 μm , čuva se pri -20°C; 0,25% tripsin
Cisplatina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Otapa se u vodi, čuva pri -20°C
MTT otopina (12,1 mM)	5 mg MTT-a se otapa u 1 mL fosfatnog pufera (PBS), filtrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci pri 4°C
10x TBS	500 mL Tris-HCl (pH 7,5) + 300 mL 5 mol dm^{-3} NaCl + 200 mL diH_2O , čuva se pri 4°C
TBST pufer (TBS sa 0,1% Tween-20)	100 mL pufera 10X TBS + 900 mL deH_2O + 1 ml Tween-20 (1x TBS sa 0,1% Tween-20), čuva se pri 4°C
10x amonijev persulfat (APS)	500 mg APS-a otapa se u 5 mL diH_2O . Čuva se pri -20°C u alikvotima po 500 μL
Akrilamid/bisakrilamid	29.2 g akrilamida i 0.8 g bisakrilamida otapa se u 100 mL diH_2O , čuva se pri 4°C

Transfer pufer	50 mL Tris-glicinski pufer + 350 mL H ₂ O + 100 mL metanola
6X SB pufer (engl. <i>sample buffer</i> za SDS-PAGE)	1,2 g SDS-a + 2 mL deH ₂ O, + 2,5 mL 1,5 mol dm ⁻³ Tris-HCl (pH 6,8) + 30 mg bromfenol plavila + 3 mL glicerola + 1,2 mL 2-merkptoetanol, dopuni se do 10 mL diH ₂ O i čuva pri -20°C
10X SDS Tris-glicinski elektroforetski pufer	80 mL 10X SDS Tris-Gly pufer + 720 mL deH ₂ O
Towbin pufer za prijenos (pH 8,1 do 8,4)	3,03 g Tris baze i 14,4 g glicina se otopi u diH ₂ O, dodaje 200 mL metanola i nadopuni do 1 L s diH ₂ O (25 mM TrisHCl, 192 mmol dm ⁻³ glicin, 20% metanol. pH varira između 8,1 i 8,4, ovisno o kvaliteti sastojaka i ne podešava se naknadno. Pufer se čuva pri 4°C
Tris-HCl (pH 7,6)	12,11 g Tris-HCl u 100 mL diH ₂ O, pH se podese dodatkom NaOH; konačna koncentracija Tris-HCl je 1 mol dm ⁻³
Tris-HCl, pH 8,0	12,11 g Tris-HCl u 100 mL deH ₂ O, pH se podese dodatkom NaOH; konačna koncentracija Tris-HCl je 1 mol dm ⁻³
5X RIPA pufer	25 mL 1 mol dm ⁻³ Tris-HCl (pH 7,6); c ₂ = 250 mmol dm ⁻³ 18,75 mL 4 mol dm ⁻³ NaCl; c ₂ = 750 mmol dm ⁻³ 5 mL EDTA, 0.5 mol dm ⁻³ ; c ₂ = 25 mmol dm ⁻³ 2,5 g SDS; 12,5% (w/v) SDS 5 mL Triton X-100 (5%) 5 g natrijevog deoksilata (5%) Dodati mqH ₂ O do 100 mL
NaCl	23,38 g otopiti u 100 mL diH ₂ O; konačna koncentracija je 4 mol dm ⁻³
EDTA, 5M	18,6 g otopiti u 100 mL diH ₂ O; konačna koncentracija je 0,5 mol dm ⁻³
4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina, HEPES	3,57 g otopiti u 15mL mqH ₂ O, filtrirati kroz 0,2 μm filter; konačna koncentracija je 1 mol dm ⁻³
DMEM-HEPES	12,5mL 1 mol dm ⁻³ HEPES u 500 mL

	DMEM
DTBP-DMEM-HEPES	Otopiti DTBP u DMEM-HEPES; konačna koncentracija je 6 mmol dm^{-3}
Adhesion recovery solution, ARS	0,25mL 1 mol dm^{-3} Tris-HCl (pH=6,8); $c_2=125 \text{ mmol dm}^{-3}$ 20 mg 1% SDS 46 mg DTT; $c_2=150 \text{ mmol dm}^{-3}$ Dodati diH ₂ O do 2 mL
Glicinski pufer (pH=2,8)	7,51 g glicina ($c=100 \text{ mmol dm}^{-3}$) se otapa u 1000 mL diH ₂ O, čuva se pri 4°C

3.1.4. Ostali materijali i uređaji

Ostali materijali i korišteni uređaji navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Ostali materijali i uređaji

Korišteni uređaji i materijali	Proizvođač
Brojač stanica	Coulter Counter Beckman Coulter, UK
Inkubator za uzgoj stanica	Heraeus, Njemačka
Kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
Spektrofotometar	StatFax 2100 Awareness Technology INC, SAD
Centrifuga za stanice (do 12568 x g)	Heraeus, Njemačka
Centrifuga za mikroprevute (do 14000 x g)	Eppendorf, Njemačka
Svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
Termoblok	Thermomixer compact Eppendorf, Njemačka
Spremnik za tekući dušik	
Magnetska mješalica	Tehnica, Slovenija
Protočni citometar	FACSCalibur, Becton-Dickinson, SAD

Uvitek uređaj	Cambridge, Engleska
Mikropipete	Eppendorf, Njemačka
Nastavci za mikropipete	Eppendorf, Njemačka
Pipete (plastične i staklene)	Superior, Njemačka
Automatska pipeta (Pipetboy)	Integra Biosciences, SAD
Bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj stanica s 96/24 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
Petrijeve zdjelice za uzgoj stanica, 10 cm	BD Falcon, SAD
Plastične epruvete 15 mL	BD Falcon, SAD
Plastične mikroeprovete od 1 ili 2 mL	Eppendorf, Njemačka
Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Sigma-Aldrich, Njemačka
Ampule za smrzavanje stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
Konfokalni mikroskop Leica TSC SP2	Leica Microsystems, Njemačka
Vaga	Tehnica, Slovenija
Uređaj za elektroforezu u gelu agaroze (kadica, češalj, kalup za izlivanje gela)	Hofer Scientific Instruments, SAD

3.1.5. Protutijela

Protutijela korištena u ovom diplomskom radu prikazana su u tablici 5.

Tablica 5. Protutijela s pripadajućim koncentracijama korištena u metodama protočne citometrije, „western blota“ i imunofluorescencije

	Protutijela	Proizvedeno u organizmu	Proizvođač	Kataloški broj	γ/mgmL^{-1}	Razrjeđenje
Primarna protutijela	Izotipska kontrola, IgG	Miš	Sigma Aldrich, SAD	M5284	0,2	1:50 u PBS Δ
	Podjedinica integrina α_v	Miš	CalBioChem, SAD	407286	1	1:50 u PBS Δ
	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Miš	Merck Millipore, SAD	CBL544	0,1	5 μL protutijela
	Integrin $\alpha_v\beta_5$	Miš	Merck Millipore, SAD	MAB1961	1	1:50 u PBS Δ
	pPax (Y113) („western blot“)	Zec	Abcam, Engleska	ab32084	0,04	1:7500 u 10 mL 5% mlijeka u TBST puferu
	pPax (Y113) (imunofluorescencija)	Zec	Abcam, Engleska	ab32084	0,04	1:100 u 500 μL 5% BSA-PBS Δ
	FAK	Zec	Abcam, Engleska	ab40794	0,58	1:1000 u 5 mL 5% mlijeka u TBST
	Talin	Miš	Abcam, Engleska	ab11188	1,4	1:1000 u 5 mL 5% mlijeka u TBST
	ILK	Zec	Cell Signaling Technology, SAD	3862S	0,2	1:1000 u 10 mL 5% mlijeka u TBST
	Erk (Y113)	Zec	Santa Cruz Biotechnology SAD	sc94	0,1	1:1000 u 10 mL 5% mlijeka u TBST
	EEA1	Zec	Cell Signaling Technology, SAD	2411s, LOT3	1	1:1000 u 10 mL 5% mlijeka u TBST
	LDH	Zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc33781	0,2	1:400 u 10 mL 5% mlijeka

						u TBST
Sekundarna protutijela	Fluorescein izotiocijanat, FITC	Koza	BD Pharmingen	554001	0,5	1:10 u PBSΔ (0,5 μL protutijela + 4,5 μL PBSΔ)
	Protu-zečji imunoglobulini	Koza	Thermo Fisher, SAD	RL243150	1	1:5000 u 10 ili 5 mL 5% mlijeka u TBST
	Protu-mišji imunoglobulini	Ovca	Sigma-Aldrich, SAD	NA931V	1	1:5000 u 10 ili 5 mL 5% mlijeka u TBST
	Alexa-Fluor 488	Magarac	Thermo Fisher, SAD	A-21206	2	1:1000 u 500 μL 5% BSA-PBSΔ; V ₂ =80 μL
	Phalloidin-FITC		Sigma Aldrich, SAD	P5282	0,5	1:200 u 500 μL 5% BSA-PBSΔ; V ₂ =80 μL
	TO-PRO®-3 iodide		ThermoFisher Scientific, SAD	T3605	1 mmol dm ⁻³	1:1000 u 5% BSA-PBSΔ

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanična linija Cal 27 raste pričvršćena za podlogu, a stanice su uzgajane *in vitro* u T-25 i T-75 bočicama te Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM-FCS u inkubatoru pri 37 °C i 5%-tnoj zasićenosti ugljikovim dioksidom.

3.2.2. Posađivanje stanica

Kada stanice iscrpe hranjivu podlogu, potrebno ih je posaditi, najbolje dva puta tjedno. S obzirom da stanice rastu pričvršćene na podlogu, odvajaju se otopinom tripsina koju je prethodno potrebno zagrijati na 37 °C kao i DMEM-FCS. Stanicama se prvo ukloni hranjiva podloga, a zatim se ispere s 2-4 mL fosfatnog pufera, PBSΔ nakon čega se doda 1-2 mL otopine tripsina, a odvajanje od podloge prati se svjetlosnim mikroskopom. Djelovanje tripsina zaustavlja se dodatkom 5-10 mL hranjive podloge DMEM-FCS/PenStrep. Stanice se

nekoliko puta resuspendiraju pipetom. Suspenzija se koristi za novo nasadivanje ovisno o eksperimentu.

3.2.3. Brojanje stanica

Broj stanica u suspenziji nakon odvajanja tripsinom (poglavlje 3.2.2.) se određivao pomoću automatskog brojača stanica (Coulter Counter Beckman Coulter, UK). Uzorak suspenzije stanica se razrjeđuje u izotoničnoj otopini 200 puta, a i broji. Automatski brojač stanica iz tako pripremljenog razrjeđenja uzima 0,5 mL otopine, za što daje broj stanica. Koncentracija stanica u početnoj suspenziji stanica se izračunava uzevši u obzir da su stanice izbrojene za 0,5 mL razrijeđene suspenzije.

3.2.4. Zamrzavanje stanica

Stanice se zamrzavaju u eksponencijalnoj fazi rasta, odnosno dok još nisu prekrile podlogu na kojoj rastu. Suspenzija stanica dobivena odvajanjem od podloge otopinom tripsina se prebaci u sterilnu plastičnu epruvetu od 15 mL te centrifugira 5 min pri 1100xg. Supernatant se odlije, a na talog se doda 0,95 mL hranjive podloge DMEM-FCS, resuspendira te prebaci u ampulu za smrzavanje stanica koja se pohrani u led. Nakon 30 min, u suspenziju se dodaje 50 µL DMSO, a ampula se postavi na držač spremnika za tekući dušik na -80 °C. Idući dan stanice se spremaju u spremnik za tekući dušik (-196 °C).

3.2.5. Odmrzavanje stanica

Prije samog odmrzavanja stanica, potrebno je u vodenoj kupelji zagrijati DMEM-FCS na 37 °C. Stanice smrznute u tekućem dušiku u ampuli izravno se zagrijavaju u vodenoj kupelji tijekom dvije do tri minute. Suspenzija se zatim prebacuje u T-25 ili T-75 bočicu s 5-10 mL zagrijane hranjive podloge DMEM-FCS te pohrani u inkubator pri 37 °C i 5% CO₂. Nakon 24 sata stanice su prihvaćene za podlogu što se provjerava svjetlosnim mikroskopom i po potrebi im se promijeni hranjiva podloga DMEM-FCS novom kako bi se uklonili ostaci DMSO iz podloge za zamrzavanje.

3.2.6. Određivanje preživljenja stanica MTT testom

MTT je kolorimetrijska metoda koja mjeri preživljenje stanica, a temelji se na sposobnosti stanica da pomoću mitohondrijskih reduktaza prevedu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid), tetrazolijevu sol u netopljive ljubičaste kristale formazana.

Kristali formazana se otapaju dodatkom DMSO-a, a zatim se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 600 nm.

Stanice se nasađuju u mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića u prethodno određenoj, povoljnoj koncentraciji (5000 stanica Cal27, 2B1 i 2B3 po bunariću). U svaki bunarić dodaje se 180 µL suspenzije stanica, a jedan bunarić se ostavi prazan koji služi kao slijepa proba. Pločica se inkubira 24 sata pri 37°C, nakon čega se stanicama doda 20 µL protutumorskog lijeka određene koncentracije (0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 i 4 µg/mL; navedene koncentracije pripremljene su za sve tri stanične linije), te se pločica ostavlja 72 sata u inkubatoru pri 37°C. Nakon inkubacije, višak hranjive podloge i mrtve stanice odvojene od podloge se uklone naglim okretanjem pločice. Otopina MTT-a (40 µL) se dodaje u svaki bunarić, a tijekom inkubacije od 3 sata pri 37 °C nastaju ljubičasti kristali formazana. Kristali se otapaju dodatkom 170 µL DMSO i pločica se zatim stavlja na tresilicu 30 minuta kako bi se u potpunosti otopili te se mjeri apsorbancija na 600 nm. Preživljenje stanica je proporcionalno apsorbanciji a računa se prema sljedećoj formuli:

preživljenje (%) = (apsorbancija stanica izloženih djelovanju citostatika – apsorbancija negativne kontrole) / (apsorbancija kontrolnih stanica – apsorbancija negativne kontrole)

3.2.7. Analiza proteina kompleksa adhezije integrina (*engl. integrin adhesion complex, IAC*)

3.2.7.1. Izdvajanje IAC

Za izdvajanje IAC korištena je objavljena metoda (Jones i sur. 2015, modificirano)⁵⁷. Većina interakcija ostvarenih između liganda tj. proteina izvanstaničnog matriksa (*engl. extracellular matrix proteins, ECM*) i integrina je kratkotrajna i slaba, pa se za pomoć pri izdvajanju ovakvih kompleksa koriste kemijski umreživači (*engl. crosslinkers*) kao što je dimetil 3,3'-ditiobispropionimidat (DTBP), nakon čega se stanice liziraju, jezgre i citoplazma se ispiru, a ono što ostane vezani na plastiku su proteini IAC koji se stružu, koncentriraju taloženjem acetonom i zatim se sastav izdvojenih IAC određuje spektrometrijom masa. Prije samog postupka izdvajanja, stanice Cal27 i klon 2B1 nasađeni su u zasebne Petrijeve zdjelice promjera 10 cm u različitim koncentracijama kako bi na dan skupljanja IAC količina stanica bila jednaka ($9,4 \times 10^5$ – 2B1; 1×10^6 – Cal27). Kako bi se osigurala izolacija IAC iz iste količine stanica za Cal27 i Cal27-2B1, uz svaki pokus se nasadi jedna dodatna Petrijeva zdjelica kojoj se na dan izolacije proteina IAC provjeri broj nakon tripsinizacije i na temelju omjera broja stanica se uskladi broj Petrijevih zdjelica za izolaciju proteina IAC. U prosjeku su se proteini IAC izolirali iz 12 Petrijevih zdjelica. Nakon 3 dana inkubacije pri 37 °C kada

su stanice 80-90% konfluentne, ispiru se s 5 mL prethodno zagrijanog DMEM-HEPES kako bi se uklonile stanice koje nisu vezane na podlogu. Umrežavanje započinje dodatkom otopine DTBP-DMEM-HEPES. Za svaki model stanica potrebno je optimizirati vrijeme inkubacije koje obično traje 5 do 30 minuta pri 37 °C. Djelovanje DTBP se zaustavlja dodatkom 150 μL 1 mol dm^{-3} Tris-HCl (pH=8) direktno u otopinu DTBP i inkubacijom tijekom 2 minute na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja inaktivirane otopine DTBP stanice se ispiru s 5 mL hladnog PBS Δ . Stanice se zatim liziraju inkubacijom 2-3 minute u 5 mL pufera RIPA po Petrijevoj zdjelici sve do potpune lize stanica što se prati svjetlosnim mikroskopom. Zatim slijedi ispiranje ostataka stanica mlazom vodovodne vode u trajanju od oko 10 sekundi po svakoj Petrijevoj zdjelici, pazeći da ispiranje bude jednoobrazno i potpuno, tako da se Petrijeve zdjelice isperu cik-cak motivom od ruba do ruba Petrijeve zdjelice prvo horizontalno, vertikalno, pa kružno iz sredine prema krajevima i obrnuto. Dodatkom PBS Δ stanice više ne bi trebale biti vidljive, u suprotnom, potrebno je ponoviti postupak lize i/ili ispiranja. Nakon uklanjanja pufera Petrijeve zdjelice se cijede i suše par minuta na ledu kako bi se uklonila većina vode. Dodatkom ARS otopine (300 μL po Petrijevoj zdjelici), i struganjem strugalicom skupljaju se IAC proteini, prebacujući sastrugane proteine iz jedne Petrijeve zdjelice u drugu. Postupak se ponavlja još jednom, obrnutim redosljedom Petrijevih zdjelica, kako bi se poboljšalo iskorištenje. Sakupljeni IAC proteini se precipitiraju dodatkom 4 volumena acetona (-20 °C) na svaki uzorak (npr. 800 μL acetona na 200 μL uzorka). Uzorci se inkubiraju minimalno 24h na -80 °C. Prije nanošenja na gel, uzorci se centrifugiraju 20 minuta na mikrocentrifugi (16000 x g) na 4 °C, supernatant se odlije, pritom pazeći na talog. Uz svaki pokus skupljeni su i ukupni stanični lizati iz po jedne Petrijeve zdjelice. Stanice se ispiru 2 puta s 5mL hladnog PBS Δ , i liziraju oko 5 minuta na ledu dodatkom 1mL RIPA s dodatkom inhibitora proteaza i fosfataza (1x) i EDTA (1x) . Uzorci u RIPA se centrifugiraju 20 min. na mikrocentrifugi (16000 x g) na 4 °C nakon čega se odstrani talog a proteini u RIPA se čuvaju na -20 °C.

3.2.7.2. Određivanje koncentracije proteina BCA metodom

Koncentracija proteina u lizatima određena je kolorimetrijskom metodom koja se bazira na redukciji Cu^{2+} u Cu^{+} ione u lužnatom mediju, pomoću reagensa koji sadrži 2-(4-karboksikinolin-2-il)kinolin-4-karboksilnu kiselinu (engl. *Bicinchoninic acid*, BCA). Vezanjem kelirajućeg agensa odnosno BCA na metalni ion, nastaje ljubičasti produkt koji

apsorbira na valnoj duljini 562 nm. Koncentracija proteina određuje se iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama albumina iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA). Lizati stanica (Cal 27, 2B1) razrijeđeni su u RIPA puferu (2x), nanoseni u duplikatima po 10 μ L u mikrotitarsku pločicu nakon čega je dodano 200 μ L BCA Working Reagenta. Nakon kratkog miješanja na tresilici, pločica se inkubira 30 minuta pri 37 °C, a potom se mjeri apsorbancija na 545 nm (Awareness Technologies StatFax 2100 Microplate Reader).

Talozi osušeni na sobnoj temperaturi, resuspendiraju se u 30 μ L 2x pufera za nanošenje uzoraka (engl. *sample buffer*) razrijeđenog u RIPA puferu, a potom zagriju na 96 °C. Dobivena smjesa je vrlo viskozna, zbog prisutne DNA te se uzorci izlažu ultrazvuku amplitude 30% tijekom 15 sekundi. Nakon polimerizacije gelova, proteini se razdvajaju u Tris-glicinskom puferu za elektroforezu (pH=8,3) pomoću sustava za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Cell pri konstantnom naponu od 100 V. Kao standard za određivanje molekulske mase korišten je Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher, SAD).

3.2.7.3. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE i western blot

Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. *Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je metoda razdvajanja proteina na temelju razlike u njihovoj molekulskoj masi. Glavna karakteristika ovog tipa elektroforeze je upotreba anionskog detergenta, natrij dodecil sulfata (SDS), koji denaturira protein. Proteini obrađeni na ovaj način ponašaju se kao da imaju jednak omjer mase i naboja te su istog oblika. Također, koristi se β -merkaptoetanol koji je i jedna od komponenata pufera za nanošenje uzoraka, kako bi se razorile disulfidne veze između proteina. Primjenom električnog polja, denaturirani proteini, odnosno polipeptidni lanci, kreću se prema anodi različitom brzinom. Ovom metodom postiže se maksimalno razlučivanje pri odjeljivanju peptida, pri čemu se koriste dva gela. Gel za sabijanje odnosno gornji gel, koncentrira proteine u usku zonu, a gel za razdvajanje ima ulogu molekuskog sita te odvaja protein na temelju različitih molekulskih masa. Gelovi se pripremaju u puferima različitih pH vrijednosti (Tablica 6) i ionske jakosti što je povezano s njihovom ulogom u elektroforezi. Priprema i nanošenje uzoraka na gel opisano je u poglavlju 3.2.7.2.

Tablica 6. Sastav 10%-tnog gela za razdvajanje i sabijanje

Sastav 10%-tnog gela za razdvajanje	Volumen
diH₂O	4 mL
1,5 M Tris-HCl; pH=8,8	2,5 mL
30% akrilamid/bisakrilamid	3,3 mL
10% SDS	100 µL
10% APS	100 µL
TEMED	4 µL

Sastav 10%-tnog gela za sabijanje	Volumen
diH₂O	2,1 mL
0,5 M Tris-HCl; pH=6,8	380 µL
30% akrilamid/bisakrilamid	500 µL
10% SDS	30 µL
10% APS	30 µL
TEMED	3 µL

„Western blot“ je metoda koja omogućuje detekciju te polukvantitativno određivanje količine specifičnih proteina u uzorku smjese proteina razdvojenih pomoću SDS-PAGE. Temelji se na stvaranju kompleksa između proteina i specifičnog protutijela.

Nakon SDS-PAGE, proteini se prenose na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,45 µm. Za prijenos proteina na membranu koristi se pufer za prijenos koji se stavi u kadnicu zajedno s kazetama za prijenos. Elektroforeza se odvija pri konstantnoj jakosti struje, 400 mA, 90 minuta. Kako bi se potvrdila uspješnost prijenosa proteina, membrana se oboji otopinom Amido black te ispere u TBST puferu. Slijedi blokiranje u 5%-tnom nemasnom mlijeku u TBST puferu tijekom jednog sata, da bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Membrana se nakon još jednog ispiranja u TBST puferu, inkubira s primarnim protutijelom tijekom dva sata na sobnoj temperaturi ili preko noći pri 4 °C. Nakon ispiranja (6 puta po 5 min) u TBST puferu, membrana se inkubira s odgovarajućim sekundarnim protutijelom obilježenim peroksidazom u trajanju od dva sata. Po završetku inkubacije i ispiranja u TBST puferu, membrana se inkubira u otopini supstrata, Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus tijekom 1-2 minute, nakon čega slijedi detekcija proteina na fotografskom filmu. Na istoj membrani može se detektirati više različitih proteina pri čemu je prvo potrebno ukloniti protutijelo inkubiranjem membrane u glicinskom puferu (pH=2,8) (engl. *stripping*), a potom

blokirati sat vremena u 10% nemasnom mlijeku u TBST puferu. Nakon toga se membrana može inkubirati sa idućim primarnim protutijelom.

S obzirom da je „western blot“ polukvantitativna metoda detekcije specifičnih proteina, s ciljem bolje karakterizacije proteina uzorci su analizirani metodom spektrometrije masa u laboratoriju Martina J. Humpriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester). Prije same analize, proteini su razdvojeni elektroforezom, nakon čega se vrpce uzorka izrezuju te stavljaju u jedan bunarić perforirane pločice s 96 bunarića. Proteini se zatim tretiraju ditiotreitolum koji razara disulfidne veze, alkiliraju jodoacetamidom, nakon čega slijedi izdvajanje peptida pomoću 99,8% acetonitrila u 0,2% mravljoj kiselini i na kraju analiza na spektrometru masa.

3.2.7.4. Analiza IAC proteina metodom spektrometrije masa

S obzirom da je „western blot“ polukvantitativna metoda detekcije specifičnih proteina, s ciljem bolje karakterizacije proteina uzorci su analizirani metodom spektrometrije masa u laboratoriju Martina J. Humpriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester). Prije same analize, proteini su razdvojeni elektroforezom, nakon čega se vrpce uzorka izrezuju te stavljaju u jedan bunarić perforirane pločice s 96 bunarića. Proteini se zatim tretiraju ditiotreitolum koji razara disulfidne veze, alkiliraju jodoacetamidom, nakon čega slijedi izdvajanje peptida pomoću 99,8% acetonitrila u 0,2% mravljoj kiselini i na kraju analiza na spektrometru masa.

3.2.7.5. Određivanje ekspresije proteina metodom protočne citometrije

Metoda neizravne protočne citometrije korištena je za određivanje ekspresije podjedinice integrina α_v , te heterodimera $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$. Stanice su uzgojene u Petrijevim zdjelicama do 50% popunjenosti podloge (jedan dan nakon nasađivanja), isprane s PBS Δ te odvojene od podloge s 0,5 mM EDTA. Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven te je dodano 5 mL PBS Δ . Stanice su resuspendirane te im je utvrđena povoljna koncentracija za daljni postupak obilježavanja primarnim mišjim protutijelom (5 μ L) te inkubacijom 60 minuta na ledu. Za postupak obilježavanja korišteno je 1×10^5 kontrolnih stanica, Cal 27 te 2×10^5 2B1 klon. Uzorci su nakon inkubacije primarnim protutijelom isprani s 1 mL PBS Δ , centrifugirani 5 minuta (1100 rpm) te je postupak ponovljen, uklanjanjem 950 μ L supernatanta pazeći da stanice uvijek ostanu u 50 μ L PBS Δ . Potom je slijedilo obilježavanje

sekundarnim kozjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina, obilježenim fluorescein izotiocijanatom (FITC) koje se veže na primarno protutijelo, te inkubacija 30 minuta na tamnom, u ledu. Slijedi ponovno ispiranje uzoraka s PBSΔ te centrifugiranje, supernatant je odliven ostavljajući stanice u 50 μL PBSΔ nakon čega su uzorci resuspendirani u 250 μL propidij jodida i na kraju analizirani na protočnom citometru.

3.2.7.6. *Određivanje lokalizacije proteina paksilina (Y113) metodom imunofluorescencije*

Za vizualizaciju proteina karakterističnog za fokalne adhezije korištena je metoda imunofluorescencije u kojoj se primarno protutijelo specifično veže za protein u stanicama uzorka, a primarno protutijelo se vizualizira sekundarnim protutijelom koje je obilježeno fluorescentnom bojom.

Stanice su nasade u bunariće za uzgoj stanica (24 bunarića) na prethodno sterilizirano pokrovno stakalce (uranjanjem u 96% etanol i UV zračenjem u kabinetu za sterilni rad tijekom 30 minuta) u 500 μL DMEM-FCS. Stakalce je sterilizirano. Nakon 48 sati stakalca su isprana s 500 μL PBSΔ 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su fiksirana s 80 μL 4% paraformaldehida tijekom 20 minuta. Nakon ispiranja tri puta po 5min. s PBSΔ, stanice se permeabiliziraju 80 μL 0,1% Triton X-100-PBSΔ tijekom 2 minute, nakon čega se stanice ponovno isperu tri puta s PBSΔ. Kako bi se smanjila mogućnost nespecifičnog vezanja protutijela, uzorak se blokira s 80 μL 3% BSA-PBSΔ 30 minuta. Slijedi inkubacija s 80 μL primarnog protutijela 60 minuta, ispiranje dva puta s PBSΔ te inkubacija sekundarnim protutijelom 60 minuta u mraku. S ciljem vizualizacije aktina, stanice su dodatno inkubirane s 80 μL otopine fluorescentno obilježenog faloidina te s 80 μL otopine TO-PRO-3 s ciljem bojanja jezgre. Nakon još jednog ispiranja, stanice su uklopljene u podlogu za uklapanje na predmetno stakalce (engl. *mounting medium*). Uzorci su analizirani pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TSC SP2 (Lasertechnik GmbH, Njemačka)

3.2.7.7. *Mikroskopija refleksijskog interferencijskog kontrasta, RICM*

Mikroskopija refleksijskog interferencijskog kontrasta (engl. *reflection interference contrast microscopy*, RICM) temelji se na interferenciji svjetlosti reflektirane s različitih površina. Slika nastaje kao posljedica interferencije reflektirane svjetlosti s površine stakla i svjetlosti

reflektirane s površine stanica. Takva interferencija rezultira pojavom zacrnjenja na konačnoj slici, dok svjetla područja nastaju kada stanice nisu pričvršćene za podlogu (staklo).⁵⁸

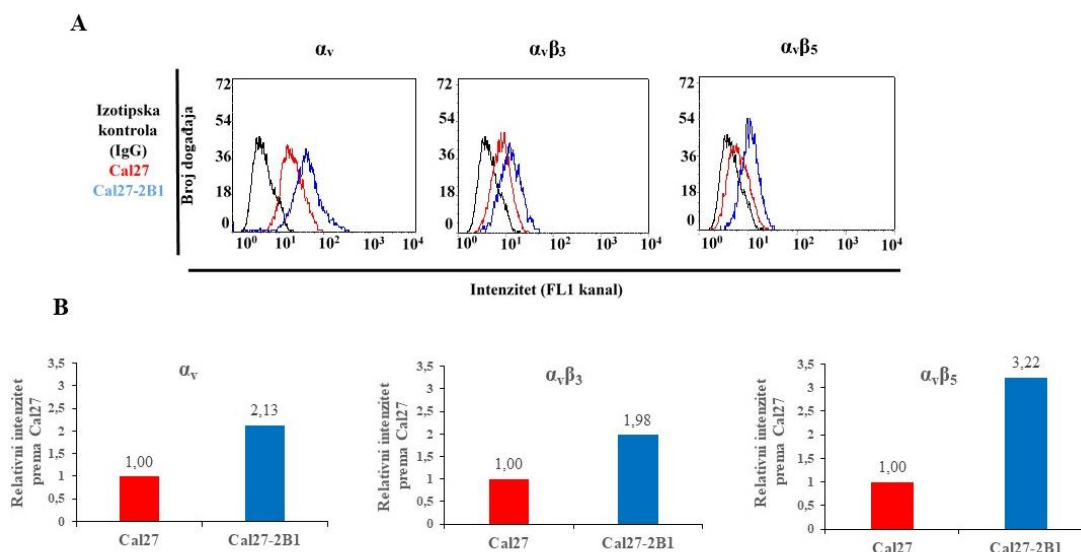
Stanice na stakalcima su isprane s PBS Δ na sobnoj temperaturi, a potom fiksirane s metanolom (-20 °C) 3 minute na sobnoj temperaturi. Nakon još jednog ispiranja s PBS Δ (3 puta po 5 minuta), stanice su uklopljene u podlogu za uklapanje na predmetno stakalce. Uzorci su analizirani na konfokalnom mikroskopu LeicaTSC SP2 (Lasertechnik GmbH, Njemačka).

§ 4. REZULTATI

4.1. Eksperimentalni model stanica karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 sa različitom ekspresijom integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$

Rezultati laboratorija u kojem je izrađen ovaj diplomski rad pokazali su da klonovi stanica Cal27-2B1 i Cal27-2B3, izdvojeni nakon stabilne transfekcije stanica karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β_3 , ekspresiraju integrin $\alpha_v\beta_3$. Također je pokazano da klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju povećanu ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_5$ u odnosu na roditeljske stanice Cal27. S obzirom da podjedinice integrina β_3 i β_5 stvaraju heterodimere s podjedinicom integrina α_v , pokazana je i povećana ekspresija ukupne količine podjedinice integrina α_v u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 u odnosu na stanice Cal27.¹

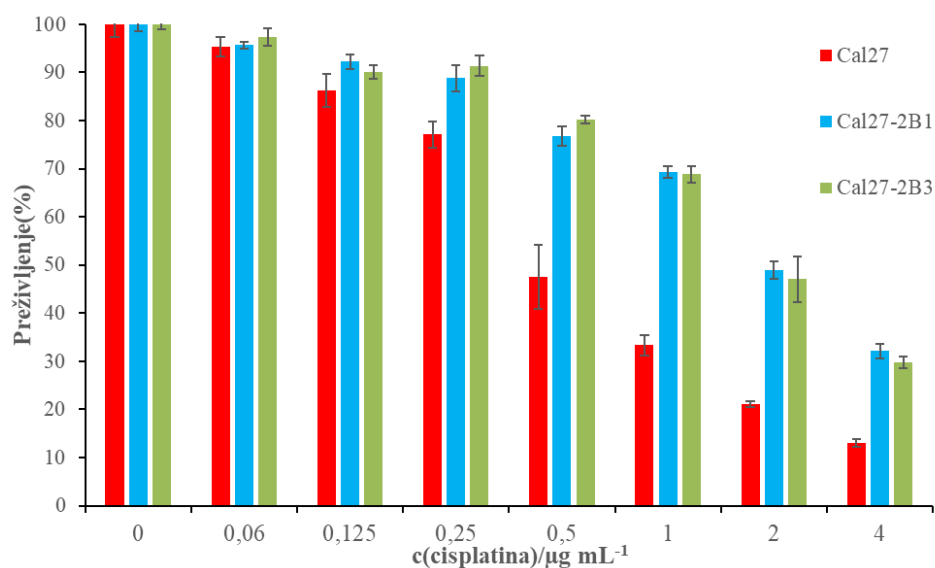
Cilj ovog istraživanja je usporedba adhesoma stanica Cal27 i jednog stabilno transficiranog klona, Cal27-2B1. Kako bi se nakon odmrzavanja stanica provjerio njegov identitet u odnosu na roditeljsku staničnu liniju Cal27, mjerena je ekspresija podjedinice integrina α_v i heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ na površini ovih stanica. Ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u stanicama Cal27 i Cal27-2B1 određena je metodom protočne citometrije pri čemu su korištena protutijela specifična za heterodimere integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$. Provjerena je i ekspresija podjedinice integrina α_v pomoću protutijela specifičnog za podjedinicu integrina α_v . Na Slici 7A prikazani su histogrami ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$ te izotipske kontrole na površini stanica Cal27. Relativne vrijednosti intenziteta (Slika 7B) pokazuju da je u klonu sa stabilno transficiranom β_3 podjedinicom integrina došlo do povećanja ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$. Iako roditeljske stanice Cal27 ne pokazuju ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_3$, što je prethodno pokazano metodama RT-PCR i RT-qPCR¹, kao posljedica nespecifičnog vezanja primarnog i/ili sekundarnog protutijela u Cal27 stanicama izmjerena je vrijednost relativnog intenziteta koja je na grafu prikazana s 1,00. Prema izmjerenim vrijednostima u pokusima sa stanicama Cal27-2B1 utvrđena je povećana ekspresija heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u odnosu na stanice Cal27, i to 1,98 puta za heterodimer $\alpha_v\beta_3$ te 3,22 puta za heterodimer $\alpha_v\beta_5$ (Slika 7B). Usporedbom relativnih intenziteta može se uočiti da je i ekspresija podjedinice integrina α_v povećana u stanicama Cal27-2B1 i to 2,13 puta u odnosu na stanice Cal27.



Slika 7. Ekspresija podjedinice integrina α_v i heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u stanicama Cal27 i Cal27-2B1. Stanice su obilježene primarnim protutijelima specifičnim za podjedinicu integrina α_v i heterodimere integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$, te sekundarnim, fluorescentno obilježenim kozjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina, a intenzitet fluorescencije je mjereno protočnim citometrom. (A) Histogrami fluorescencije za podjedinicu integrina α_v i heterodimere $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$. Crna krivulja prikazuje fluorescenciju izotipske kontrole, crvena krivulja prikazuje fluorescenciju specifičnu za podjedinicu integrina α_v te heterodimere $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u stanicama Cal27, a plava krivulja fluorescenciju specifičnu za podjedinicu integrina α_v i heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u stanicama Cal27-2B1. (B) Relativne vrijednosti intenziteta za Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 za ekspresiju podjedinice integrina α_v i heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$.

4.2. Integrin β_3 -stabilno transficirani klon Cal27-2B1 pokazuje povećanu otpornost na protutumorski lijek cisplatinu u odnosu na stanice Cal27

U radu Stojanović i suradnika¹ pokazano je da stabilno transficirani klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 pokazuju otpornost na četiri različita protutumorska lijeka: cisplatinu, mitomicin C, doksorubicin i 5-fluorouracil u odnosu na roditeljsku staničnu liniju Cal27. Kako bi se provjerila stabilnost staničnog modela, mjerena je osjetljivost Cal27 stanica te klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na cisplatinu MTT testom. Rezultati na Slici 8 u skladu su sa prethodno objavljenim podacima i pokazuju da dolazi do smanjene osjetljivosti Cal27-2B1 i Cal27-2B3, između 1,5 do 2 puta u odnosu na stanice Cal27.

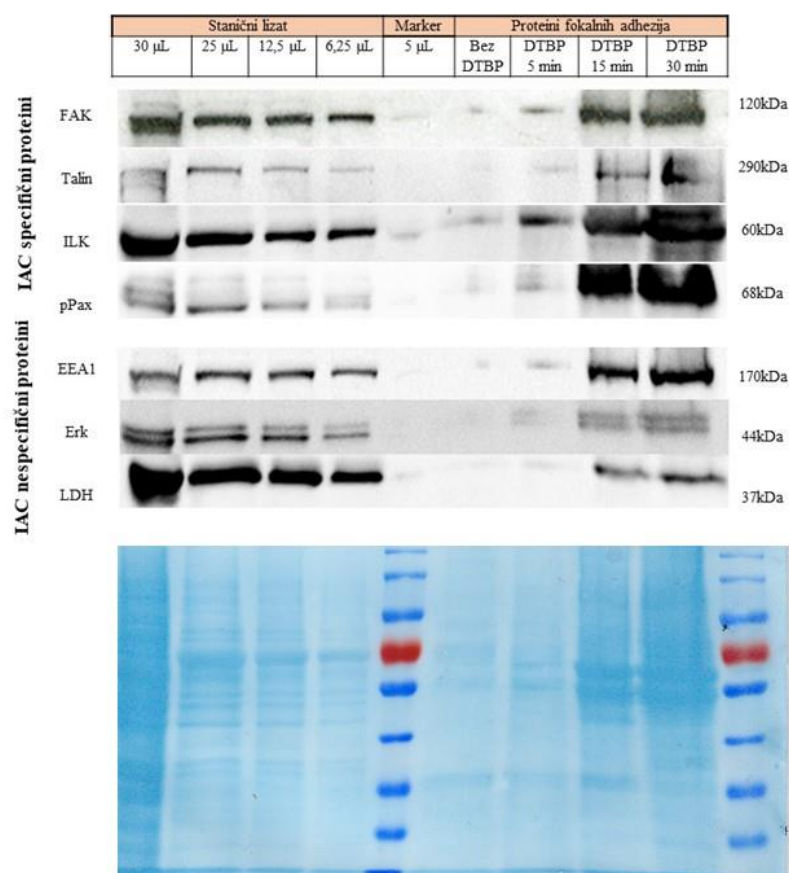


Slika 8. Osjetljivost stanica Cal27, Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na cisplatinu. Stanice Cal27, Cal27-2B1 i Cal27-2B3 nasadene su u pločicu za uzgoj stanica s 96 bunarića te su nakon 24 sata dodane različite koncentracije cisplatine. Preživljenje je praćeno MTT testom, 72 sata nakon dodatka protutumorskog lijeka i prikazano kao postotak preživljenja stanica prema stanicama koje nisu izložene cisplatinu +/- standardna devijacija.

4.3. Utvrđivanje uvjeta izolacije fokalnih adhezija iz stanica Cal27

Kako bi se istražio sastav fokalnih adhezija u klonu Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27 korištena je nedavno objavljena metoda za izolaciju fokalnih adhezija⁵⁷, koja se temelji na primjeni kemijskog umreživača (engl. *crosslinker*) dimetil 3,3'-ditiobispropionimidata (DTBP). DTBP sadrži imidoesterske skupine koje mogu reagirati s primarnim amino skupinama proteina čime se omogućava stabilizacija kompleksa proteina izvanstaničnog matriksa i integrina. Nakon umrežavanja, stanice se liziraju, ispiru se jezgre i citoplazma te se proteini fokalnih adhezija skupljaju i talože acetonom, a njihov sastav određuje i kvantificira metodom spektrometrije masa. Kako bi se u izolaciji povećali udjeli proteina fokalnih adhezija u odnosu na ostale nespecifične proteine, potrebno je prvo utvrditi optimalno vrijeme umrežavanja proteina. S tim ciljem, iz stanica Cal27 izolirani su proteini fokalnih adhezija nakon različitog vremena trajanja umrežavanja pomoću DTBP. Nakon taloženja proteini su razdvojeni metodom SDS-PAGE i relativna količina odabranih proteina utvrđena je metodom „western blot“. Na temelju literaturnih podataka o sastavu fokalnih adhezija^{4,45,59}, odabrani su neki proteini koji se nalaze u fokalnim adhezijama. Cilj eksperimenta je utvrditi optimalno vrijeme umrežavanja pri čemu će izolat biti obogaćen proteinima fokalnih adhezija i u kojem će se nalaziti što manja količina proteina koji se u fokalnim adhezijama ne nalaze.

Nakon izdvajanja proteina fokalnih adhezija prema protokolu (modificirano iz Jones i sur., 2015, vidi poglavlje Materijali i metode), relativna količina proteina utvrđena je metodom „western blot“ pomoću protutijela specifičnih za proteine FAK, ILK, talin i pPax(Y113) o kojima je bilo riječi u uvodu ovog diplomskog rada (poglavljja 1.3.1 i 1.3.2.). Izabran je fosforilirani oblik paksilina jer je poznato da je fosforilacija na tirozinskim, ali i serinskim aminokiselinskim ostacima, ključna za novačenje proteina u fokalne adhezije. Rezultati pokazuju prisutnost navedenih proteina u izolatima fokalnih adhezija, pri čemu je, od tri vremena umrežavanja, očekivano, najveća količina ovih proteina prisutna nakon 30 minuta (Slika 9). Mala količina navedenih proteina prisutna je i u izolatima uzorka u kojem nije korišten umreživač. Kako bi se procijenili uvjeti u kojima se dobiva najpovoljniji omjer proteina fokalnih adhezija u odnosu na proteine koji se ne nalaze u fokalnim adhezijama, korištena su i protutijela specifična za: laktat-dehidrogenazu (LDH), ERK (engl. *extracellular signal regulated* kinase) i EEA1 (engl. *early endosome antigen*). LDH je enzim glikolitičkog puta koji katalizira oksidaciju L-laktata u piruvat posredstvom NAD^+ . Nalazi se u citoplazmi svih stanica, ali postoje izoenzimi koji su karakteristični za određene tipove stanica (npr. LDH1 se nalazi u eritrocitima i bubrezima dok se LDH5 nalazi u jetri i skeletnim mišićima).⁶⁰ ERK sudjeluje u signalnom putu posredovanom MAP kinazama (engl. *mitogen activated protein*) koje reguliraju proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanice.⁶¹ EEA1 protein se nalazi s citoplazmatske strane endosomalne membrane, a vezanjem na protein Rab5 posreduje u sidrenju vezikule na ciljnu membranu prije same fuzije.⁶² Iako je poznato da navedeni proteini nisu sastavni dio fokalnih adhezija, pozitivan signal dobiven u uzorcima nakon 15 minuta umrežavanja pokazuje da produljenim umrežavanjem dolazi do izolacije proteina koji se ne nalaze u fokalnim adhezijama. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da se nakon 30 minuta trajanja umrežavanja postiže najveća količina proteina specifičnih za fokalne adhezije. Međutim, nakon 30 minuta je omjer između specifičnih i nespecifičnih proteina nepovoljan (velika količina nespecifičnih proteina). Nakon samo 5 minuta umrežavanja vidljivi su, iako dosta slabo, specifični proteini, a nespecifični se jedva naziru. Na temelju ovih podataka odabrano je vrijeme umrežavanja od 10 minuta. Utvrđeno je da se pri takvim uvjetima postiže kompromis između ukupne količine proteina specifičnih za fokalne adhezije i količine nespecifičnih proteina.



Slika 9. Utvrđivanje trajanja umrežavanja pomoću DTBP u metodi izolacije fokalnih adhezija iz stanica Cal27. Stanice su nasade u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm te je nakon četiri dana provedena izolacija proteina fokalnih adhezija na način opisan u poglavlju Materijali i metode. A) Ekspresija odabranih proteina u uzorcima izdvojenih fokalnih adhezija utvrđena je inkubacijom protutijelima specifičnim za FAK, talin, ILK i pPax te odgovarajućim sekundarnim protutijelima obilježenim enzimom peroksidaza. Detekcija je izvršena pomoću kemiluminescentnog reagensa, a intenzitet kemiluminescentnog signala izmjeren je pomoću uređaja Uvitek Alliance 4.7 Cambridge. B) Za vizualizaciju proteina nakon prijenosa na nitroceluloznu membranu (western blot), membrana je obojana Amido Black otopinom 1 minutu te isprana tri puta u tri otopine za ispiranje, sve dok vrpce nisu postale vidljive.

4.4. Identifikacija proteina adhesoma metodom spektrometrije masa

Izolati proteina fokalnih adhezija iz stanica Cal27 i Cal27-2B1 iz 5 neovisnih pokusa analizirani su metodom spektrometrije masa u laboratoriju Martina J. Humphriesa u Manchesteru, (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK) na uređaju Thermo Orbitrap Elite. Prije same analize, uzorci se unose u gel (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm), no proteini se u uzorcima ne razdvajaju. Unos uzoraka u gel (3 min, 200V) omogućio je robusniji sustav za daljnu

obradu. Kako bi lakše vizualizirali proteine unutar gela, gelovi se bojaју uz pomoć boje InstantBlue (Sigma-Aldrich). Vrpce s uzorcima se potom izrezuju, nakon čega slijedi serija ispiranja i odbojavanja gela (izmjenom amonijevog bikarbonata te acetonitrila), redukcija ditiotreitolum, alkiliranje jodoacetamidom i razgradnja proteina tripsinom (“razgradnja u gelu”). Dobiveni peptidi se izdvajaju iz matrice gela, koncentriraju te analiziraju spektrometrom masa. Podaci su pretraženi pomoću programa Mascot Daemon (Matrix science, inačica 2.5.1). Server je podešen na pretragu Swissprot baze podataka čovjeka (inačica 2018_01, 161629 unosa). Dopuštena tolerancija mase prekursora i fragmenata iona iznosila je 5 PPM, odnosno 0.50 Da. Identificirani peptidi te broj spektara svakog proteina analizirani su te dodatno validirani koristeći računalni program Scaffold (Proteome software). Identifikacija spektara vršena je prema algoritmu Scaffold local FDR (prag vjerojatnosti 95%). Proteini su identificirani uz vjerojatnost iznad 99% te minimalno 2 prepoznata karakteristična peptida pri čemu je korišten algoritam Protein prophet⁶³. Na temelju empirijskih opažanja koncentracija proteina u uzorku povezuje se s brojem dobivenih spektara te je moguće napraviti relativnu kvantifikaciju identificiranih proteina. Koncentracija proteina u uzorku je velika ako oni sadrže više od deset spektara, srednja (umjerena) ako sadrže od dva do deset spektara, a niska koncentracija ako je broj spektara manji od dva. Poveznica između broja spektara i koncentracije proteina je približna s obzirom da postoje faktori koje treba uzeti u obzir kao što je primjerice učinkovitost fragmentacije i ionizacije što utječe na broj spektara određenog proteina. Ovakav pristup povezivanja koncentracije proteina i broja spektara često se koristi za proteine slične molekulske mase. U slučaju apsolutne kvantifikacije proteina u obzir bi trebalo uzeti i duljinu proteina.⁶⁴

Ukupno je identificirano 639 proteina (Dodatak tablica 1), od kojih se isključivo 92 proteina nalazi u Cal27, 157 proteina isključivo u Cal27-2B1, a 390 proteina nalazi se u obje stanične linije. Proteini fokalnih adhezija čine 17% ukupnog broja proteina (79 proteina u Cal27 i 98 proteina u Cal27-2B1), a proteini ECM 13,8% (62 proteina u Cal27 i 73 proteina u 2B1). P vrijednost za proteine fokalnih adhezija iznosi $1,1 \cdot 10^{-62}$ te $1,4 \cdot 10^{-54}$ za proteine ECM, a korigirana P vrijednost dobivena pomoću metode Benjamini-Hochberg iznosi $1,1 \cdot 10^{-64}$ odnosno $1,7 \cdot 10^{-52}$ za proteine ECM. Kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati koji se često pojavljuju tijekom statističke obrade podataka, koristi se Benjamini-Hochberg metoda. Funkcionalna anotacija zajedno sa statističkom vrijednošću (izračunate P vrijednosti i

Benjamini faktor/koefficient) dobivene su pomoću računalnog alata David Functional Annotation Tool Bioinformatic Resources 6.8 (David Bioinformatics Database).

U Tablici 6 prikazani su svi proteini fokalnih adhezija i ECM s pripadajućim funkcijama te je za svaki protein naznačeno u kojoj staničnoj liniji je identificiran. Od 60 proteina koji pripadaju konsenzus adhesomu⁴, u staničnom modelu Cal27 pronađeno ih je 19. Proteini za koje je utvrđena razlika u ekspresiji između dvije stanične linije navedeni su u tablici 7.

Kako bi pokazali razliku u ekspresiji proteina u stanicama Cal27 i klonu Cal27-2B1 konstruirane su mape pomoću programa GraphPad Prism (GraphPad software, inačica 7.0). U tablici 7 su prikazani proteini fokalnih adhezija i ECM s prosječnim vrijednostima broja spektara i pripadnim standardnim devijacijama na temelju čega je konstruirana mapa (slika 10). Na drugoj mapi su prikazani isti proteini, ali iz pet neovisnih setova uzoraka Cal27 i Cal27-2B1 (slika 11).

Tablica 6. Funkcionalna analiza proteina fokalnih adhezija* i ECM

Funkcija	Ime proteina	Konsenzus adhesom	Cal27	2B1
Adaptorni proteini	Flotilin-1	NE	-	+
	Talin-1	DA	+	+
	Tenzin-3	DA	+	+
	Tensin-4	DA	-	+
	LIM domena koja sadrži protein 1	DA	-	+
	Kaveolin	NE	+	+
	Paksilin	DA	+	+
	Vinkulin	DA	+	+
	Ziksin	DA	+	+
Regulatori aktina	Arp 2 homolog	NE	-	+
	Arp 3 homolog	NE	+	+
	LIM i SH3 domena proteina 1	DA	+	+

LIM domena aktin vezujućeg proteina	NE	+	+
PDZ i LIM domena proteina 1	DA	+	+
TRIO i F-aktin vezujući protein	NE	+	+
Aktin, citoplazmatski	NE	+	+
α -aktinin 1	DA	+	+
α -aktinin 4	DA	+	+
Protein Arp2/3 kompleksa; podjedinica 5	NE	-	+
Protein Arp2/3 kompleksa; podjedinica 3	NE	+	+
Adenilil ciklazni vezujući protein (engl. <i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>)	NE	-	+
EGFR (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>)	NE	+	+
Kalponin-2	DA	+	+
Katenin α 1	NE	+	+
Katenin β 1	NE	-	+
MPRIIP protein (engl. <i>myosine phosphatase Rho-interacting protein</i>)	NE	+	-
Plektin	NE	+	+
Profilin-1	NE	+	+

	Tropomiozin $\alpha 4$ lanac	NE	-	+
	Kofilin-1	NE	+	+
	Koronin-1C	NE	+	+
	Kortaktin	NE	+	+
	Citoplazmatski FMR1 protein	NE	-	+
	Ezrin	NE	+	+
	Filamin A	NE	+	+
	Filamin B	NE	+	+
	Gelzolin	NE	+	+
	MISP (engl. <i>mitotic interactor and substrate of PLK1</i>)	NE	+	+
	Moezin	NE	+	+
	β -2-sintropin	NE	-	+
	ZNF185 (engl. <i>zinc finger protein 185</i>)	NE	+	-
Membranski receptori	Podjedinica integrina α_6	NE	+	+
	Podjedinica integrina β_4	NE	+	+
	Podjedinica integrina α_v	DA	-	+
	Podjedinica integrina β_5	DA	-	+
G-proteini	Rac2 (engl. <i>Ras related C3 botulinum toxin substrate 2</i>)	NE	-	+

	Ras GTP-protein (engl. <i>Ras GTP-ase activating protein-binding protein 1</i>)	NE	-	+
	Rac1 (engl. <i>Ras related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)	NE	+	+
	IQGAP1(engl. <i>IQ domain GTP-ase activating protein</i>)	DA	+	+
Tirozin kinaze/fosfataze	Liprin- β -1	NE	-	+
	ILK	DA	-	+
Ostalo	AHNAK (engl. <i>Neuroblast differentiation associated protein</i>)	NE	+	+
	Aneksin-1	DA	+	+
	Kalpain-1	NE	+	-
	Nukleofosmin	NE	+	+
	Nup214 (engl. <i>nuclear pore complex protein</i>)	NE	+	+
	Peptidil prolil cis-trans izomeraza A	NE	+	+
	PHLDB2 (engl. <i>plecstrin homology-like domain family B member 2</i>)	NE	-	+
	Poliadenilat vezujući protein 1	NE	+	+
	Poli (rC) vezujući protein 2	NE	+	+
Protein disulfid	NE	-	+	

	izomeraza A3			
	TRIP6 (engl. <i>thyroid receptor-interacting protein 6</i>)	DA	-	+
	Klatrin, teški lanac	NE	+	+
	HSPA5 (engl. <i>heat shock protein family A member 5</i>)	NE	+	+
	HSPA9 (engl. <i>heat shock protein family A member 5</i>)	NE	+	+
	HSPB1 (engl. <i>heat shock protein family B member 1</i>)	NE	+	+
	HSPA8 (engl. <i>heat shock protein family A member 8</i>)	NE	+	+
Proteini koji se vežu na RNA	HNRNPK (engl. <i>Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K</i>)	NE	+	+
	JUP (engl. <i>Junction plakoglobin</i>)	NE	+	+
	protein L12(RPL12)	NE	+	+
	protein L13a(RPL13A)	NE	+	+
	protein L18(RPL18)	NE	+	+
	protein L22(RPL22)	NE	+	+
	protein	DA	+	+

	L23(RPL23)			
	protein L27(RPL27)	NE	+	+
	protein L3(RPL3)	NE		
	protein L30(RPL30)	NE	+	+
	protein L4(RPL4)	NE	+	+
	protein L6(RPL6)	NE	+	+
	protein L7	NE	+	+
	protein L7a(RPL7A)	NE	+	+
	protein L8(RPL8)	NE	+	+
	protein L9(RPL9)	NE	+	+
	protein S11(RPS11)	NE	+	+
	protein S13(RPS13)	NE	+	+
	protein S14(RPS14)	NE	+	+
	protein S16(RPS16)	NE	+	+
	protein S17(RPS17)	NE	+	+
	protein S18(RPS18)	NE	+	+
	protein S2(RPS2)	NE	-	+
	protein S3(RPS3)	NE	-	+
	protein S3A(RPS3A)	NE	+	-
	protein S4, X-linked(RPS4X)	NE	+	+
	protein S5(RPS5)	NE	-	+
	protein S7(RPS7)	NE	-	+
	protein S8(RPS8)	NE	+	+

	protein S9	NE	+	+
	14-3-3 protein β/α	NE	+	+
	14-3-3 protein ϵ	NE	+	+
	14-3-3 protein γ	NE	+	+
	14-3-3 protein ϑ	NE	+	+
	14-3-3 protein ζ/δ	NE	+	+
	DNAJ (Hsp40) homolog	DA	+	+
	ECM proteini			
ATP-azna aktivnost	ATP sintaza, β podjedinica	+	-	
	HSP60 (engl. <i>heat shock protein 60 kDa</i>) mitohondrijski	+	+	
	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	+	+	
	Stress-70 protein, mitohondrijski	+	+	
	Miozin-9	+	+	
	Miozin, laki lanac 6	+	+	
	HSP90 (engl. <i>heat shock protein 90 kDa</i>)	+	+	
	Eukariotski inicijacijski faktor	+	+	
	Dinein, teški lanac 1, citoplazmatski	+	+	
	T-kompleks protein 1, podjedinica β	-	+	
	Šaperonin koji sadrži TCP1,	+	-	

	podjedinica 6A (Zeta 1)		
	ADP/ATP translokaza 2	+	+
Proteini vezani na ugljikohidrate	Tetranectin	-	+
	Galektin	-	+
Strukturna funkcija	EDIL3 (engl. <i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i>)	+	+
	Prelamin- A/C	+	+
	Laminin, podjedinica β 1	-	+
	Laminin, podjedinica α 5	+	+
	Laminin, podjedinica γ 1	-	+
	Vitronektin	+	+
	<i>Junction plakoglobin</i>	+	+
	Keratin 1	+	+
	IGFBP7 (engl. <i>Insulin-like growth factor-binding protein 7</i>)	-	+
	Fibronektin	+	+
	Filamin B	+	+
	Desmoplakin	+	+
	Plektin	+	+
	Kolagen α 1(IV) lanac	-	+
	Kolagen α 2(IV) lanac	+	+
	Kofilin-1	+	+

	Trombospondin-1	+	+
	TGFBI (engl. <i>Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3</i>)	+	+
	Agrin	+	+
Proteolitička funkcija	Serinska proteaza HTRA1	+	+
	Metaloproteinazni inhibitor 3	-	+
GTP-azna aktivnost	Ran protein	+	-
	Filamin A	+	+
	Tubulin β -4B lanac	+	+
	Tubulin, β lanac	+	+
	Rac1 (engl. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)	+	+
	Elongacijski factor 2	+	+
Proteini koji se vežu na Ca²⁺	Aneksin A1	+	+
	Matrilin-2	-	+
	Heparan sulfat proteoglikan 2 (Perlekan)	+	+
Vezikularni promet	Klatrin, teški lanac 1	+	+
Ostalo	Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza	+	+
	Tenascin C	+	+
	TINAGL1 (engl. <i>Tubulointerstitial nephritis antigen-</i>	+	+

	<i>like 1)</i>		
Proteini koji se vežu na RNA	HNRNPK (engl. <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>)	+	+
	HNRNPU (engl. <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>)	+	+
	protein L12(RPL12)	+	+
	protein L22(RPL22)	+	+
	protein L23(RPL23)	+	+
	protein L27(RPL27)	+	+
	protein L30(RPL30)	+	+
	protein L35a(RPL35A)	+	+
	protein L9(RPL9)	+	+
	protein S11(RPS11)	+	+
	protein S13(RPS13)	+	+
	protein S14(RPS14)	+	+
	protein S15a(RPS15A)	+	+
	protein S16(RPS16)	+	+
	protein S17(RPS17)	-	+
	protein S18(RPS18)	-	+

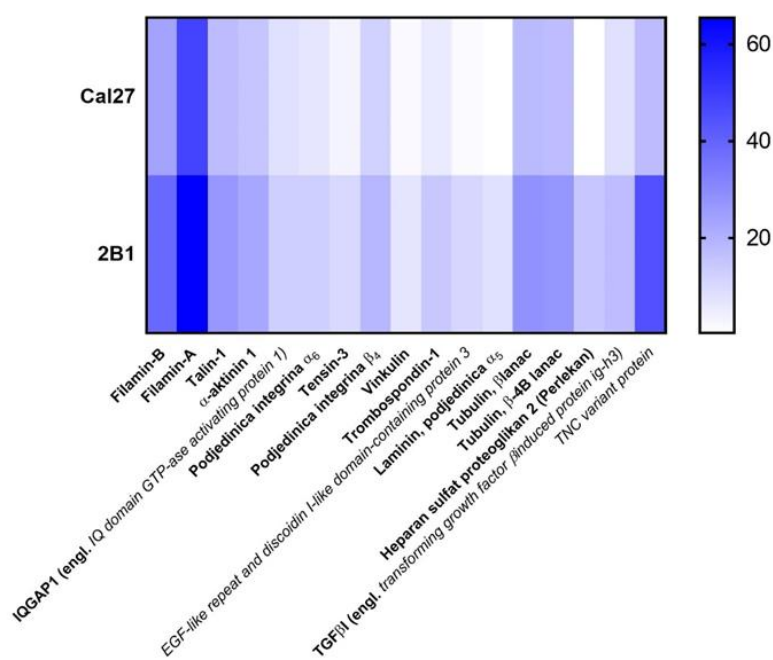
	protein S20(RPS20)	-	+
	protein S25(RPS25)	+	-
	protein S3(RPS3)	-	+
	protein S3A(RPS3A)	+	-
	protein S4	+	+
	protein S5	-	+
	protein S7	-	+
	SFPQ (engl. <i>Splicing factor proline/glutamine-rich</i>)	+	+
	Peroksiredoksin-1	+	+
	HNRPM (engl. <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>)	+	+
Proteini koji se vežu na DNA	Histon H4	+	+
Kinazna aktivnost	ILK (engl. <i>integrin linked kinase</i>)	-	+
	Piruvat kinaza	+	+

* Funkcionalna analiza proteina fokalnih adhezija napravljena je prema podjeli iz rada Zaidel-Bar i suradnika⁶⁵

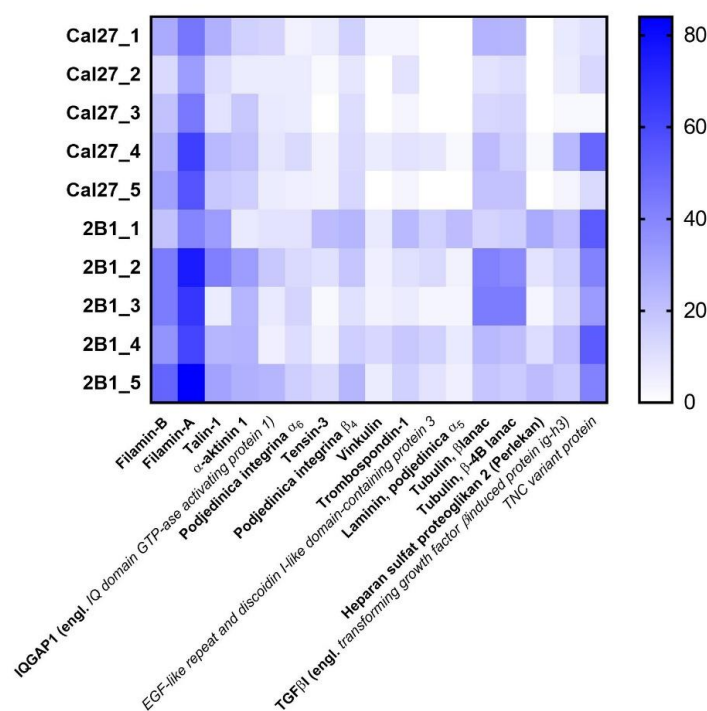
Tablica 7. Proteini fokalnih adhezija i ECM koji pokazuju različitu ekspresiju u stanicama Cal27 i Cal27-2B1 s pripadnim standardnim devijacijama

		Ime proteina	Prosječna vrijednost broja spektara +/- standardna devijacija	
			Cal27	Cal27-2B1
Proteini fokalnih adhezija	1	Filamin-B	23,4± 7,6	38,4 ± 11,8
	2	Filamin-A	48±11,9	65,4±16,6
	3	Talin-1	17,4±7,4	26,8±13,3
	4	α-aktinin-1	15±5,4	22,8±9,3
	5	IQGAP1 (engl. <i>IQ-domain GTP-ase activating protein</i>)	8,2±3,4	12,6±8,0
	6	Podjedinica integrina α ₆	6,6±3,1	12,4±2,7
	7	Tensin-3	3,2±2,2	10±7,8
	8	Podjedinica integrina β ₄	11,8±2,6	18,6±5,9
	9	Vinkulin	1,8±2,6	7±3,6
ECM proteini	10	Trombospondin-1	5,4±3,3	14,4±6,7
	11	EGF domena i domena diskoidin-1	1,6±3,6	10,8±5,1
	12	Laminin, podjedinica α ₅	0,4±0,8	8,2±7,8
	13	Tubulin, β lanac	17,8±6,6	28±13,2
	14	Tubulin, β-4B lanac	17±5,1	27±12,6
	15	Heparan sulfat proteoglikan 2 (perlekan)	0,4±0,8	14,6±10,1

16	TGFβ1 (engl. <i>transforming growth factor beta-induced protein ig-h3</i>)	8,2±8,6	17,2±3,9
17	Tenascin C	17,4±18,8	44,6±9,1



Slika 10. Prikaz različite ekspresije proteina fokalnih adhezija i ECM u stanicama Cal27 i Cal27-2B1. Mapa je napravljena pomoću programa GraphPad Prism (inačica 7.0). Prikazani su proteini s prosječnim vrijednostima broja spektara, različito ekspimirani u stanicama Cal27 i Cal27-2B1.



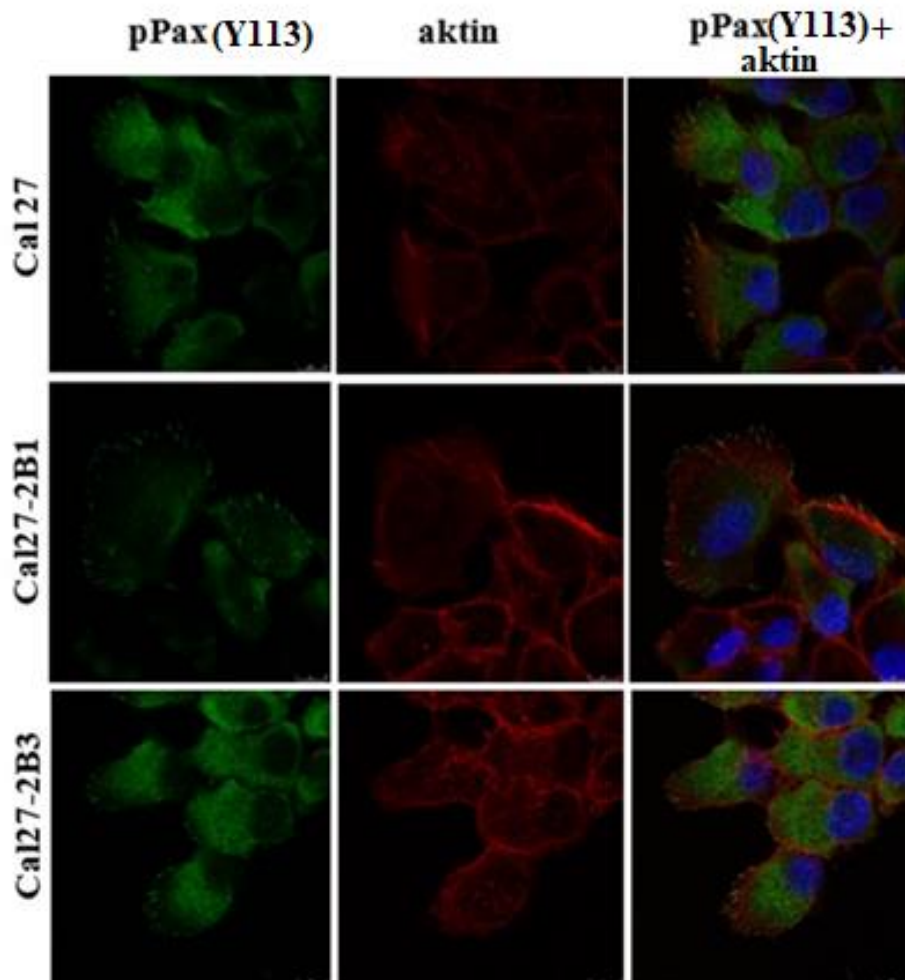
Slika 11. Prikaz različite ekspresije proteina u stanicama Cal27 i Cal27-2B1. Mapa je napravljena pomoću programa GraphPad Prism (inačica 7.0). Prikazani su proteini s prosječnim vrijednostima broja spektara iz pet neovisnih setova uzoraka.

4.5. Lokalizacija paksilina (Y113) i aktina u stanicama Cal27 te klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3

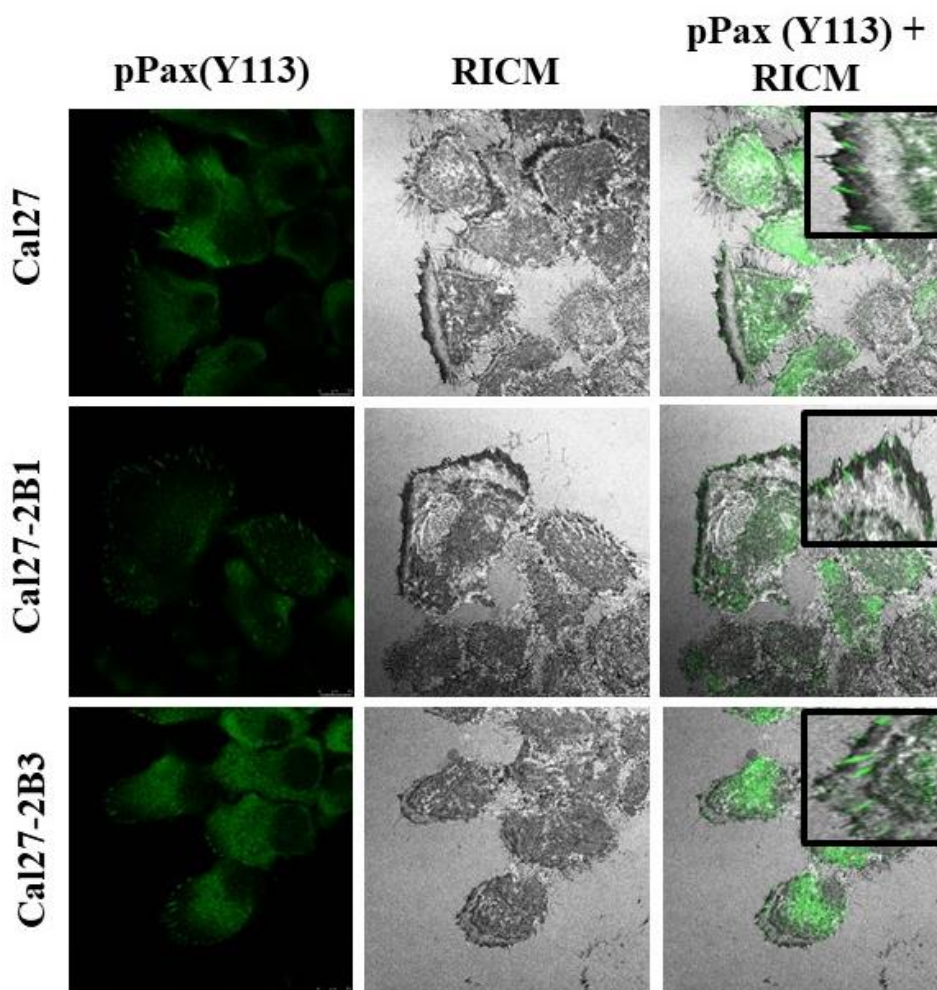
Za lokalizaciju pPax u stanicama Cal27 te klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 korištena je metoda imunofluorescencije u kojoj su stanice obilježene protutijelom specifičnim za pPax(Y113) te faloidinom obilježenim fluorescentnom bojom FITC koji se veže na aktin. Prema rezultatima prikazanim na Slici 12 pPax(Y113) je lokaliziran na vrhovima aktinskih niti.⁶⁶

Mikroskopija refleksijskog interferencijskog kontrasta (engl. *reflection interference contrast microscopy*, RICM) korištena je u svrhu bolje lokalizacije fokalnih adhezija. Metoda se temelji na interferenciji svjetlosti reflektirane s različitih površina. Slika nastaje kao posljedica interferencije reflektirane svjetlosti s površine stakla i svjetlosti reflektirane s površine stanica. Takva interferencija rezultira pojavom zacrnjenja na konačnoj slici, dok svjetla područja nastaju kada stanice nisu pričvršćene za podlogu (staklo).⁵⁸ Dobiveni rezultati (Slika 13) pokazuju da pPax(Y113) kolokalizira sa zacrnjenjima na slici. U gornjem desnom

kutu nalazi se i uvećani prikaz kako bi se bolje istaknula lokalizacija pPax(Y113) sa zacrnjenjima odnosno mjestima gdje se stanica čvrsto veže za podlogu.



Slika 12. Lokalizacija pPax(Y113) i aktina u stanicama Cal27 i klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3. Stanice su nasadene na prethodno sterilizirana pokrovna stakalca. Nakon 48 sati stanice se fiksiraju, permeabiliziraju i inkubiraju primarnim zečjim protutijelom specifičnim za pPax i sekundarnim protutijelom usmjerenim protiv zečjih imunoglobulina obilježenim Alexa Fluor 488 fluorescentnom bojom. Zelena boja označava pPax, crvena boja aktin koji je vizualiziran pomoću faloidina obilježenog fluorescentnom bojom FITC, a jezgra je vizualizirana pomoću boje TO-PRO-3.



Slika 13. Lokalizacija pPax(Y113) u stanicama Cal27 i klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3. Stanice su nasadene na prethodno sterilizirana pokrovna stakalca. Nakon 48 sati stanice se fiksiraju, permeabiliziraju i inkubiraju primarnim zečjim protutijelom specifičnim za pPax i sekundarnim protutijelom usmjerenim protiv zečjih imunoglobulina obilježenim Alexa Fluor 488 fluorescentnom bojom. Zelena boja označava pPax. Stanice su vizualizirane pomoću mikroskopije refleksijskog interferencijskog kontrasta (RICM). Zacrtnjenja na slikama posljedica su interferencije reflektiranog svjetla s površine stakla i reflektiranog svjetla s površine stanica. pPax kolokalizira sa zacrtnjenjima na slici.

§ 5. RASPRAVA

Integrini djeluju kao mjesta prijenosa signala, a njihova interakcija s izvanstaničnim matriksom važna je za proliferaciju, migraciju, diferencijaciju i preživljenje stanice. Jedan od mehanizama kako stanice mogu steći otpornost na djelovanje protutumorskih lijekova je promjenom ekspresije integrina.²⁹ Za *de novo* ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_3$ je pokazano da može regulirati osjetljivost na protutumorske lijekove, migraciju i invaziju tumora^{31,1}. Osim što se nalaze na tumorskim stanicama, ovi se integrini povećano eksprimiraju na endotelnim stanicama u angiogenezi gdje imaju ulogu u stvaranju krvnih žila tumora.²⁴ Prema tome, $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ integrini su potencijalne ciljne molekule za terapiju tumora s ciljem inhibicije angiogeneze, povećanja osjetljivosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove i smanjenja migracije i invazije tumorskih stanica.

Ambriović-Ristov i suradnici⁴² pokazali su da u stanicama karcinoma grkljana čovjeka HEp2 otpornima na cisplatinu, dolazi do *de novo* ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$. Dokaz da povećana ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ na stanicama HEp2 osigurava otpornost na cisplatinu ali i na druge protutumorske lijekove (doksorubicin i mitomicin C) potvrđeno je istraživanjem β_3 -stabilno transficiranih stanica HEp2 koje eksprimiraju integrin $\alpha_v\beta_3$ na svojoj površini. *De novo* ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ u HEp2 stanicama povećala je ukupnu količinu glutationa što je omogućilo preživljenje stanica uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta koje su nastale kao posljedica djelovanja protutumorskih lijekova. Ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ u stanicama HEp2 povećala je i migratornu sposobnost ovih stanica.³¹ Kako bi se pokazalo postoji li isti mehanizam i u drugim stanicama tumora glave i vrata integrin $\alpha_v\beta_3$ eksprimiran je *de novo* u stanicama Cal27. Pokazano je da klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 dobiveni stabilnom transfekcijom stanica Cal27 plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu β_3 integrina, eksprimiraju *de novo* integrin $\alpha_v\beta_3$, ali istovremeno je došlo i do povećane ekspresije integrina $\alpha_v\beta_5$ u odnosu na roditeljske stanice Cal27. Dokazano je da je upravo ekspresija $\alpha_v\beta_3$ odgovorna za otpornost na cisplatinu, mitomicin C, doksorubicin i 5-fluorouracil, ali mehanizam nije uključivao povećanu ukupnu koncentraciju glutationa već je razlog otpornosti bio smanjenje pSrc(Y418). Stanice Cal27-2B1 pokazale su povećanu migraciju i invaziju u odnosu na Cal27 stanice.¹

U ovom smo radu željeli odrediti sastav fokalnih adhezija u stanicama Cal27 i usporediti ga s onime u klonu Cal27-2B1 kako bi eventualno pronašli molekule uključene u mehanizam otpornosti na protutumorske lijekove, migraciju i invaziju. Prvi korak prema tom cilju je bio provjera identiteta stabilno transficiranih klonova Cal27-2B1 i Cal27-2B3 nakon odmrzavanja, u odnosu na stanice Cal27. Mjerenjem ekspresije podjedinice integrina α_v i heterodimera $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ pokazano je da klon Cal27-2B1 pokazuje povećanu ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u odnosu na Cal27. Povećanje ekspresije $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ integrina dovelo je do povećanja ukupne količine α_v podjedinice integrina na površini stanica. Ovi rezultati su potpuno u skladu s objavljenim rezultatima na ovom staničnom modelu.¹ Ovo je primjer fenomena nazvanog engl. *Integrin Switching* kojeg možemo prevesti kao preslagivanje integrina. Preslagivanje integrina je fenomen u kojem ekspresija jednog integrina mijenja ekspresiju nekog drugog integrina bez obzira radi li se o povećanju ili smanjenju ekspresije. U literaturi postoji relativno mali broj primjera preslagivanja integrina koji uključuje $\alpha_v\beta_3$. Pokazano je da specifična inaktivacija β_1 podjedinice izaziva metastaziranje i progresiju 4T1 stanica tumora dojke povećavajući ekspresiju podjedinice integrina β_3 .⁶⁷ Na modelu stanica HEp2 opažen je također fenomen preslagivanja. Transfekcijom gena za podjedinicu integrina β_3 izdvojeno je šest klonova u kojima je došlo do *de novo* ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$, tako da je svaki klon imao veću ekspresiju od prethodnog. Mjerenjem ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u ovim klonovima, pokazano je da u prva tri klona u kojima je eksprimirana mala količina $\alpha_v\beta_3$ integrina, dolazi do neznatnog smanjenja ekspresije integrina $\alpha_v\beta_5$ dok ekspresija ukupne količine podjedinice α_v nije bila promijenjena. Međutim, u tri klona u kojima je eksprimirana veća količina $\alpha_v\beta_3$ integrina, značajno se smanjila ekspresija $\alpha_v\beta_5$, što je vrlo vjerojatno posljedica natjecanja podjedinica integrina β_3 i β_5 za podjedinicu integrina α_v . Zanimljivo je da je u tim klonovima zabilježena povećana transkripcija gena za podjedinicu integrina α_v .⁴² Podjedinica integrina α_v može stvarati dimere s β_1 , β_3 , β_5 ili β_6 podjedinicama. Na staničnom modelu Cal27, mjerenjem mRNA ekspresije (RT-qPCR) pokazano je da nema značajnih razlika u ekspresiji α_v , β_1 i β_6 podjedinica, ali da je u klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 povećana ekspresija podjedinice β_5 . Pretpostavlja se da je količina određenog heterodimera integrina na površini stanice ovisna o ekspresiji podjedinice integrina α_v . Pokazano je da se α_v podjedinica sintetizira u suvišku, što znači da nastajanje bilo koje heterodimera ovisi o dostupnosti β podjedinice.⁶⁸ Na temelju ovog podatka, može se zaključiti da je nakon vezanja

podjedinice integrina β_3 u $\alpha_v\beta_3$ heterodimer ostalo više slobodne podjedinice α_v , na nju se moglo vezati više β_5 podjedinice, što je dovelo i do veće ekspresije $\alpha_v\beta_5$ heterodimera.

U nastojanju da prije analize adhesoma potvrdimo je li klon Cal27-2B1 otporan na cisplatinu u odnosu na roditeljske stanice Cal27 mjerili smo preživljenje ovih stanica MTT testom nakon izlaganja različitim koncentracijama cisplatine. U eksperiment smo uključili i drugi klon stanica istog staničnog modela Cal27-2B3. U skladu s objavljenim rezultatima¹ pokazali smo da su klonovi Cal27-2B1 i Cal27-2B3 otporniji na djelovanje cisplatine 1,5 do 2 puta u odnosu na Cal27. Iz tog istraživanja također znamo da je upravo povećana ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$, a ne integrina $\alpha_v\beta_5$ odgovorna za otpornost budući da je inhibicija ovog integrina blokirajućim protutijelima dokidala otporni fenotip.

Interakcija proteina izvanstaničnog matriksa i aktinskog citoskeleta posredovana je dinamičnim kompleksima adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complex*, IAC) tj. fokalnim adhezijama čije komponente osim strukturne uloge, prenose signale u ECM i obrnuto i na taj način kontroliraju funkcije u stanici.⁴⁴ Kako je većina interakcija integrina i proteina ECM kratkotrajna do nedavno nije bilo moguće izolirati IAC komplekse. Metodu za njihovu učinkovitu izolaciju su objavili Jones i suradnici⁵⁷, a temelji se na primjeni umreživača točnije DTBP koji ima ulogu stabilizacije interakcija integrina i proteina ECM. Ova metoda je upotrijebljena kako bi se prvo utvrdio sastav adhesoma stanica Cal27, a zatim usporedio sastav adhesoma stanica Cal27 sa klonom Cal27-2B1. Prvi korak prema tom cilju je bio optimizacija duljine trajanja umrežavanja proteina. Cilj je bio dobiti izolat koji će biti obogaćen proteinima fokalnih adhezija, a sadržavati što manje proteina koji se tamo ne nalaze. Na temelju dobivenih rezultata odabrano je vrijeme umrežavanja od 10 minuta jer se umrežavanjem dužim od 15 minuta količina proteina fokalnih adhezija nije znatno povećavala, ali se povećavala količina proteina koji se tamo ne bi trebali nalaziti. Prema literaturnim podacima, dužina umrežavanja ovisi o tipu stanica pa je tako za izolaciju IAC iz MEF stanica (engl. *mouse embryonic fibroblast*) vrijeme umrežavanja bilo 30 minuta⁵, dok je za izolaciju IAC iz HFF stanica (engl. *human foreskin fibroblast*) vrijeme umrežavanja bilo 5 minuta.⁴⁹

Prvo pitanje na koje smo željeli naći odgovor je koji integrin stanice Cal27 koriste za vezanje pri rastu u kulturi stanica. Očekivani rezultat je bio pronalaženje podjedinica integrina α_v , β_3 i β_5 . Iz tablice 1 u dodatku vidi se da su identificirana samo dva spektra za podjedinice α_v i β_5 i to samo u klonu Cal27-2B1, u jednom od pet neovisno dobivenih uzoraka. Kako su

spektrometrom masa istovremeno analizirani uzorci iz drugih staničnih linija (neobjavljeni rezultati koji nisu prikazani) u kojima su ove podjedinice otkrivene sa značajno velikim brojem specifičnih spektara možemo pretpostaviti da integrin $\alpha_v\beta_5$ ipak sudjeluje u vezanju stanica Cal27 te da integrini $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ sudjeluju u vezanju stanica Cal27-2B1 na podlogu tijekom rasta u kulturi, ali da osjetljivost primijenjene metode nije bila dovoljna za njihovu identifikaciju. U radu Stojanović i suradnika¹ pokazano je da se vezanje integrina $\alpha_v\beta_3$ na protein ECM, fibronektin može usporediti s razinom ekspresije $\alpha_v\beta_3$ u klonovima, dok se vezanje $\alpha_v\beta_5$ na vitronektin može usporediti s razinom ekspresije α_v podjedinice. Ono što iznenađuje je da su s velikim brojem specifičnih spektara identificirane podjedinice α_6 i β_4 . Povećana ekspresija obje podjedinice nađena je u klonu Cal27-2B1 i to s prosječnim vrijednostima broja spektara 12,4 za α_6 podjedinicu te 18,6 za β_4 podjedinicu u odnosu na prosječan broj spektara u Cal27 koji iznosi 6,6 za podjedinicu α_6 i 11,6 za β_4 podjedinicu. Podjedinica integrina β_4 razlikuje se od drugih β podjedinica u dugoj citoplazmatskoj domeni koja sadrži preko tisuću aminokiselina. Najpoznatija je kao komponenta hemidesmosoma, strukture koja omogućava adheziju epitelnih stanica na bazalnu laminu.⁶⁹ Podjedinica integrina α_6 može stvarati heterodimer s β_1 ili β_4 podjedinicom. S obzirom da je u klonu Cal27-2B1 povećana količina obje podjedinice vrlo vjerojatno se radi upravo o heterodimeru $\alpha_6\beta_4$. Povećanje ekspresije ovog integrina u stanicama Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 je još jedan primjer fenomena preslagivanja integrina u kojem transfekcija genom za integrin β_3 ima za posljedicu *de novo* ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_3$, povećanu ekspresiju $\alpha_v\beta_5$ i povećanu ekspresiju integrina $\alpha_6\beta_4$. Ovakav slučaj preslagivanja integrina nije do sada pronađen u literaturi. Za potvrdu da je integrin $\alpha_6\beta_4$ povećano eksprimiran u klonu stanica Cal27-2B1 bit će potrebno mjeriti ekspresiju na površini stanice metodom protočne citometrije.

Todorović i suradnici⁷⁰ usporedili su komponente adhesoma stanica keratinocita miša koji ne eksprimiraju protein plakoglobin ($PG^{-/-}$) u odnosu na stanice koje ga eksprimiraju ($PG^{+/-}$). Plakoglobin je protein potreban za adheziju i interakciju dviju stanica, a pokazano je da inhibira pokretljivost keratinocita te da je njegova ekspresija smanjena u nekoliko različitih tipova tumora.^{71,72,73} Pokazali su da keratinociti koje eksprimiraju plakoglobin, povećano eksprimiraju podjedinice α_6 i β_4 . Također je utvrđena i povećana pokretljivost stanica $PG^{-/-}$ što implicira da bi plakoglobin mogao imati ulogu u regulaciji ekspresije proteina koji su potrebni za adheziju i migraciju. S obzirom da je metastaziranje tumora glave i vrata povezano s reorganizacijom ECM, promjenama u mobilnosti i invaziji, gubitkom molekula koje sudjeluju

u adheziji, u istom su radu autori odredili komponente adhesoma dviju vrste stanica tumora pločastog epitela usne šupljine, UM-SCC i Cal33. Pokazali su u stanicama Cal33 koje pokazuju veću migratornu sposobnost, povećanu ekspresiju podjedinice integrina β_4 u odnosu na UM-SCC stanice. Iako još uvijek nije poznato kako bi integrin $\alpha_6\beta_4$ mogao utjecati na migraciju i invaziju SCC stanica, istraživanja su pokazala da bi vezanje na protein ECM laminin moglo imati utjecaj na ponašanje SCC stanica. Upravo je na stanicama tumora pločastog epitela glave i vrata pokazana različita ekspresija proteina (u odnosu na normalne epitelne stanice usne šupljine) koji su zaslužni za migraciju i invaziju ovog tipa tumora. Posebno bitan rezultat je povećana ekspresija integrina $\alpha_6\beta_4$, ali i laminina-5, proteina ECM koji se nalazi na bazalnoj lamini i receptor je integrina $\alpha_6\beta_4$.⁷⁴ Ovi podaci u potpunosti se slažu s našim rezultatima, s obzirom da je u Cal27-2B1 utvrđena povećana ekspresija integrina $\alpha_6\beta_4$, ali i laminina-5 (prosječan broj spektara u Cal27 iznosi 0,4, a u klonu 2B1 8,2). Možemo pretpostaviti da je povećana ekspresija $\alpha_6\beta_4$ i laminina jedan od faktora zaslužnih za povećanu migraciju i invaziju ovog tipa tumora, što je i pokazano na klonovima, 2B1 i 2B3, koji pokazuju povećanu migraciju i invaziju u odnosu na Cal27 stanice.¹ Ovaj rezultat mogao bi biti ključan za daljnja istraživanja u kojima bi se laminin-5 i integrin $\alpha_6\beta_4$ koristili kao potencijalni biomarkeri u liječenju tumora pločastog epitela glave i vrata. Osim toga, integrin $\alpha_6\beta_4$ ima značajan utjecaj na signalne molekule koje potiču migraciju i invaziju posebice Rho GTP-aze i PI3-K (fosfatidilinozitol-3 kinaza)⁶⁹ no, zaključuju autori studije, da li je to tako zasigurno bi se trebalo utvrditi daljnim istraživanjima.

Od ukupno 639 identificiranih proteina (Dodatak tablica 1), sličan broj spektara u obje stanične linije za većinu proteina pokazuje da je metoda dobro izvedena. Sljedeći korak je bio utvrditi postoji li među identificiranim proteinima oni koji pokazuju različitu ekspresiju u stanicama Cal27 i klonu Cal27-2B1. Pronađeno je devet proteina fokalnih adhezija čija je ekspresija veća u klonu Cal27-2B1 u odnosu na Cal27 stanice (Tablica 7), ujedno prikazano i na mapama ekspresije (Slike 10 i 11). Utvrđeno je da 17% proteina čine fokalne adhezije, a 13,8% proteini ECM. Konsenzus adhesom je skup proteina koji su nađeni u adhesomima više različitih vrsta stanica i sadrži 60 proteina⁴ a u našim rezultatima pronađeno ih je 19. Većina proteina su adaptorni, njih sedam (talin-1, tensin-3, tensin-4, LIM domena koja sadrži protein 1, paksilin, vinkulin i ziksin), zatim regulatori aktina (LIM i SH3 domena proteina 1, PDZ i LIM domena proteina 1, α -aktinin 4 i kalponin-2), membranski receptori (podjedinica integrina α_v i β_5), G-proteini (IQGAP1) i tirozin kinaza ILK. Ostatak čine proteini koji se vežu

na RNA te proteini TRIP6 (engl. *thyroid receptor-interacting protein 6*), aneksin-1 i šaperon DNAJ (Hsp40) (Tablica 6). S obzirom da je utvrđena povećana količina podjedinica integrina α_6 i β_4 u klonu Cal27-2B1, pretpostavljamo da se na ovm stanicama nalazi povećana ekspresija heterodimera $\alpha_6\beta_4$. Možemo pretpostaviti da ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$ dovodi do povećane ekspresije integrina $\alpha_6\beta_4$. Pitanje na koje u budućnosti treba dati odgovor je koji od ta dva integrina dovodi direktno do smanjenja osjetljivosti stanica na protutumorske lijekove i povećane migratorne sposobnosti stanica Cal27-2B1 u odnosu na stanice Cal27.

Ovisno o funkciji, proteini za koje je utvrđena različita ekspresija u dvije stanične linije, mogu se podijeliti u nekoliko skupina, a to su: adaptorni proteini, membranski receptori, regulatori aktina i G-proteini.⁶⁵ Neki od njih bit će detaljnije opisani.

Talin, adaptorni protein koji veže brojne proteine fokalnih adhezija poput FAK, vinkulina, integrina, odlučujući je faktor veličine fokalnih adhezija. Osim što se ponaša kao poveznica između integrina i aktina, bitnu ulogu ima kao aktivator integrina. Prekomjerna ekspresija talina zabilježena je u trostruko negativnom tumoru dojke i tumoru jetre.^{75,76} Također, povećana ekspresija talina-1 je nađena u stanicama tumora usne šupljine, a upravo je na staničnoj liniji Cal27 pokazano da utišavanje ekspresije talina smanjuje rast tumora i njegovu invaziju.⁷⁷

Tensin je protein koji se veže na aktinske filamente, sadrži fosfotirozin-vezujuću domenu na C-kraju koja se veže s citoplazmatskim dijelom β podjedinice integrina, a razlikujemo četiri vrste gena: tensin 1, 2 i 3 i cten (engl. *C-terminal tensin like protein*). Upravo je za tensin-3 pronađeno da u stanicama tumora pluća, tumora dojke i melanomu doprinosi migraciji stanica i tumorigenezi. Osim toga, pokazano je da je tensin supstrat za nerekceptorsku tirozin kinazu Src, te da ekspresija tensina u stanicama NIH3T3 utječe na transformaciju i migraciju tih stanica potaknutu sa Src.⁷⁸ U stanicama Cal27-2B1 nađena je smanjena ekspresija fosforiliranog oblika Src(Y418) u odnosu na roditeljske stanice Cal27, te je utvrđeno da je inhibicija fosforilacije Src(Y418) odgovorna za otpornost na protutumorske lijekove.¹ Budući da pSrc(Y418) sudjeluje u velikom broju signalnih puteva ne možemo na temelju povećane količine tensina koji je potencijalni supstrat za pSrc(Y418) pretpostaviti vezu s povećanom otpornosti na protutumorske lijekove opažene u klonu Cal27-2B1.

Jedan od proteina ECM koji pokazuje povećanu ekspresiju u stanicama Cal27-2B1 je tubulin, gradivna jedinica mikrotubula, jednog od tri tipa filamenata (uz aktinske i intermedijarne filament) koji grade stanični citoskelet. Mikrotubuli su dinamične strukture

koje se sastoje od heterodimera α i β tubulina, oba imaju vezno mjesto za GTP molekulu pri čemu se GTP u α tubulinu ne izmjenjuje dok je GTP u β tubulinu važan za njegovu dinamiku. Promjene u stabilnosti strukture mikrotubula te ekspresija različitih izotipa tubulina pronađene su u različitim tipovima tumorskih stanica. Za razliku od α izotipa tubulina, β -izotipovi tubulina više su istraženi, dijelom zbog većeg broja specifičnih protutijela. Povećana ekspresija β II, IVa, β IVb i β V tubulina povezana je s otpornošću različitih tumorskih stanica na protutumorske lijekove tj. TBA (engl. *tubulin binding agents*).⁷⁹ Povećana ekspresija β III izotipa pronađena je i tumorima glave i vrata te se povezuje s negativnom prognozom za oboljele zbog otpornosti na TBA⁸⁰, dok su naši rezultati pokazali povećanu ekspresiju β -4B izotipa tubulina u klonu Cal27-2B1, ali i ukupnog β izotipa tubulina.

Vinkulin, jedan od proteina koji se pojavljuje u ranoj fazi nastajanja fokalnih adhezija, veže se s brojnim proteinima koji su važni za dinamiku aktinskog citoskeleta. Njegova interakcija s talinom potrebna je za ostvarivanje čvrste veze između integrina i aktinskog citoskeleta.⁸¹ Vinkulin je jedan od ključnih proteina za nastajanje fokalnih adhezija te ima ulogu u proliferaciji stanice. U nekoliko tipova tumora, a jedan od njih su i tumori usne šupljine, pokazana je povezanost smanjene ekspresije vinkulina i loše prognoze za oboljele.⁸² Nedavne studije su pokazale da je smanjena ekspresija vinkulina u stanicama tumora usne šupljine povezana s metastatskim potencijalom ovog tipa tumora. Suprotan efekt, odnosno povećana ekspresija vinkulina inhibira migraciju tumora debelog crijeva.⁸³ S obzirom da je u stanicama Cal27-2B1 pronađena povećana ekspresija vinkulina u odnosu na Cal27 stanice (Tablica 7), na temelju ovih podataka moglo bi se pretpostaviti da bi povećana ekspresija i u ovom staničnom modelu mogla utjecati na smanjenu migraciju i invaziju tumora.

Bitno je istaknuti funkciju još jednog adaptornog proteina, paksilina. Iako nije identificiran spektrometrijom masa, poznato je da je ovaj protein marker fokalnih adhezija i s tim ciljem smo napravili imunofluorescencijsku analizu na staničnim linijama Cal27 i Cal27-2B1. Pokazali smo da paksilin kolokalizira s aktinskim filamentima te smo istovremeno stanice snimili pomoću metode RICM (engl. *reflection interference contrast microscopy*) kako bi pokazali na kojim se mjestima stanica čvrsto veže za podlogu. Funkcija i lokalizacija paksilina regulirana je fosforilacijom, a njegova uloga u migraciji stanica prvenstveno se veže s povećanom ekspresijom fosforiliranih oblika (S178 i Y118) u nekoliko tipova tumorskih stanica, primjerice glioblastomu.⁵⁰ Povećana ekspresija utvrđena je i u SCC stanicama u usporedbi s drugim tipovima tumora.⁸⁴

Od proteina koji reguliraju dinamiku aktinskog citoskeleta, pronađena je povećana ekspresija filamina A i B i α -aktinina 1 .

Protein filamin osim što je regulator aktinskog citoskeleta, također je i adaptorni protein koji može vezati više od 90 različitih proteina. Njegova uloga u migraciji i adheziji tumorskih stanica je dvojaka. Kada se nalazi u citoplazmi ima efekt koji doprinosi nastanku tumora interakcijom sa signalnim molekulama, dok u jezgri može inhibirati rast tumora i metastaziranje interakcijom s transkripcijskim faktorima. Stoga bi se lijekovi koji bi mogli potaknuti transport filamina iz citoplazme u jezgru mogli koristiti za liječenje tumora.⁸⁵ U tumorima glave i vrata pokazana je povećana migracija i metastaziranje kroz interakciju filamina s RhoA GTP-azom.⁸⁶ Postoji niz molekula za koje je pokazano da reguliraju migraciju i metastaziranje posredstvom filamina A. Jedan od mehanizama koji vodi prema metastaziranju tumora je aktivacija c-Met, receptora za faktor rasta hepatocita. Interakcija filamina A i c-Met prvi puta je identificirana kada su fibroblasti koji su bili izloženi zračenju, pokazali povećanu ekspresiju oba proteina. Upravo su ove stanice potaknule invaziju i rast stanica tumora glave i vrata T3M-1 za razliku od fibroblasta koji nisu bili izloženi zračenju. Pretpostavljeno je da fibroblasti izloženi zračenju potiču invaziju i rast tumora preko TGF β 1 mehanizma.⁸⁷

Protein α -aktinin, također aktin vezujući protein, član je obitelji citoskeletnih proteina spektrina, distrofina i njihovih izoformi. Razlikujemo dvije izoforme, a to su α -aktinin 1 i 4, koji se vežu za F-aktin. Povećana ekspresija izoforme 4 pronađena je u nekoliko tipova tumora kao što su tumori dojke, jajnika i gušterače. Daljna istraživanja su pokazala da povećana ekspresija izoforme 1 u tumoru dojke pospješuje migraciju te utječe na reorganizaciju F-aktina.⁸⁸ Povećana ekspresija α -aktinina 4 pronađena je i u tumorima usne šupljine te se povezuje s invazijom tumora, a istraživanja su pokazala da bi α -aktinin 4 mogao biti potencijalna meta za terapiju pomoću RNAi.⁸⁹

Još jedna skupina proteina, IQGAP (engl. *IQ domain GTP-ase activating protein*) nazvana po izoleucin-glutamin domeni (IQ) i GAP domeni. Veže se na razne proteine poput F-aktina, kalmodulina i E-kadherina. Regulacija G proteina je izrazito bitna za razne stanične procese poput staničnog ciklusa i hormonske regulacije. Jedan od homologa GAP proteina je IQGAP (engl. *IQ domain GTP-ase activating protein*). Njegova povećana ekspresija primjećena je u stanicama trostruko negativnog tumora dojke MDA-MB-231. Uloga ovog

proteina u tumorima nije potpuno razjašnjena ali je pokazano da stanice tumora dojke MCF-7 koje povećano eksprimiraju IQGAP1 imaju povećanu proliferaciju.⁹⁰

U ovom smo radu opisali adhesom stanica Cal27 i pronašli više proteina adhesoma koji se mijenjaju nakon *de novo* ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$ čija ekspresija osigurava povećanu otpornost na nekoliko protutumorskih lijekova, povećanu migraciju i invaziju. Za utvrđivanje ključnih molekula u signalnom putu integrina $\alpha_v\beta_3$ potrebno je izvršiti dodatne funkcionalne analize. Daljnja istraživanja otpornosti posredovane integrinima i procesa migracije i invazije na molekularnoj razini u budućnosti bi mogli doprinijeti razvoju novih strategija liječenja ovog tipa tumora.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Stabilno transficiran klon stanica Cal27-2B1, dobiven stabilnom transfekcijom stanica Cal27 plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β_3 , pokazuje povećanu ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u odnosu na stanice Cal27.
- Klon Cal27-2B1 pokazuje smanjenu osjetljivost na protutumorski lijek cisplatinu u odnosu na Cal27 stanice.
- Metodom spektrometrije masa identificirano je 639 proteina, od kojih 17% čine proteini fokalnih adhezija, a 13,8% proteini izvanstaničnog matriksa.
- Veći je broj proteina identificiran u stanicama Cal27-2B1 nego u Cal27 što je u skladu s prethodno, u literaturi, objavljenom povećanom adhezijom stanica Cal27-2B1 u odnosu na stanice
- Usporedbom adhesoma stanica Cal27 i Cal27-2B1 jednoliko je eksprimirano 239 proteina.
- U adhesomu stanica Cal27 i Cal27-2B1 najviše su zastupljene podjedinice α_6 i β_4 , što ne isključuje postojanje fokalnih adhezija integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$.
- Usporedbom adhesoma stanica Cal27 i Cal27-2B1 pronađena je povećana ekspresija podjedinica integrina α_6 i β_4 u Cal27-2B1 te pretpostavljamo da se na ovim stanicama nalazi povećana ekspresija heterodimera integrina $\alpha_6\beta_4$. Osim toga, u stanicama Cal27-2B1 je pronađena povećana ekspresija liganda za integrin $\alpha_6\beta_4$, laminin-5.
- Na temelju broja spektara dobivenih spektrometrijom masa zaključujemo da je u stanicama Cal27-2B1 pronađena povećana ekspresija 9 proteina fokalnih adhezija i 8 proteina izvanstaničnog matriksa u odnosu na Cal27 stanice. Potiču li različito eksprimirani proteini fokalnih adhezija iz adhesoma integrina $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_v\beta_3$ ili $\alpha_v\beta_5$, preostaje za utvrditi.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

- [1] N. Stojanović, A. Brozović, D. Majhen, M. H. Bosnar, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriović-Ristov, *Biochim. Biophys. Acta* **1836** (2016) 1969–1978.
- [2] A. Manninen, M. Varjosalo, *Proteomics* (2016) 1–27.
- [3] J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresch, *Nat. Rev. Cancer* **10** (2010) 9–21.
- [4] E. R. Horton, J. D. Humphries, J. James, M. C. Jones, J. A. Askari, M. J. Humphries, *J. Cell. Sci* **129** (2016) 4159–4163.
- [5] E. R. Horton, A. Byron, J. A. Askari, D. H. J. Ng, A. Millon-Frémillon, J. Robertson, E. J. Koper, N. R. Paull, S. Warwood, D. Knight, J. D. Humphries, M. J. Humphries, *Nat. Cell Biol.* **17** (12) (2015) 1577–1587.
- [6] K. A. Jansen, P. Atherton, C. Ballestrem, *Semin. Cell. Dev. Biol.* **71** (2017) 75–83.
- [7] C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, *J. Cell. Sci.* **123** (2010) 4195–4200.
- [8] R. O. Hynes, *Science* **326** (2009) 1216–1219.
- [9] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Rafi, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, New York, Garland Science, 2008, str. 1205–1268.
- [10] G. Karp, *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*, New York, John Wiley & Sons, 2010
- [11] T. Rozario, D. W. DeSimone, *Dev. Biol.* **341** (2010) 126–140.
- [12] P. Szpak, *J. Archaeol. Sci.* **38** (12) (2011) 3358–3372.
- [13] O. DeWever, P. Demetter, M. Mareel, M. Bracke, *Int. J. Cancer* **123** (10) (2008) 2229–2238.
- [14] S. G. Wise, A. S. Weiss, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **41**(3) (2009) 494–497.
- [15] H. A. Lucero, H. M. Kagan, *Cell. Mol. Life. Sci.* **63** (2006) 2304–2316.
- [16] R. Pankov, K. M. Yamada, *J. Cell Sci* **115** (2002) 3861–3863.
- [17] W. F. Boron, E. L. Boulpaep, *Medical Physiology*, Saunders, 2012, p.1097.
- [18] I. Schwartz, D. Seger, S. Shaltiel, *Int. J. Biochem. Cell. Biol* **31** (1999) 539–544.
- [19] C. Rüegg, G. C. Alghisi, *Recent Results Cancer Res.* **180** (2010) 83–101.
- [20] E. Farahani, H. K. Patra, J. R. Jangamreddy, I. Rashed, M. Kawalec, R. K. Pariti, P. Batakis, E. Wiechec, *Carcinogenesis* **35** (2014) 747-759.

- [21] C. H. Streuli, *Moll. Biol. Cell* **27**(19) (2016) 2885–2888.
- [22] A. Manninen, M. Varjosalo, *Proteomics* (2016) 1–27.
- [23] C. G. Gahmberg, S. C. Fagerholm, T. Chavalis, S. Marchesau, M. Grönholm, *Biochim. Biophys. Acta* **1790** (2009) 431–444.
- [24] J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresch, *Nat. Rev. Cancer* **10** (2010) 9–21.
- [25] M. Das, S. S. Ithychanda, J. Qin, E. F. Plow, *Biochim. Biophys. Acta* **1838** (2014) 579–588.
- [26] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **144** (2011) 646–674.
- [27] V. V. Padma, *Biomedicine* **5**(4) (2015) 1–6.
- [28] Y. A. Luqmani, *Med. Princ. Prac.* **14** (2005) 35–48.
- [29] F. Aoudjit, K. Vouri, *Chemother. Res. Pract.* **2012** (2012) 1–16.
- [30] T. Sethi, R. C. Rintoul, S. M. Moore, A. C. MacKinnon, D. Salter, C. Choo, E. R. Chilvers, I. Dransfield, S. C. Donnelly, R. Strieter, C. Haslett, *Nat. Med.* **5**(6) (1999) 662–668.
- [31] A. Brozović, D. Majhen, V. Roje, N. Mikac, S. Jakopec, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriović-Ristov, *Mol. Pharmacol* **74** (2008) 298–306.
- [32] Y. L. Hsu, C. Y. Wu, J. Y. Huang, Y. S. Lin, M. S. Huang, P. L. Kuo, *Carcinogenesis* **34** (6) (2013) 1370–1381.
- [33] H. Zhang, C. C. Wong, H. Wei, D. M. Gilkes, P. Korangath, P. Chatuverdi, L. Schito, J. Chen, B. Krishnamachary, P. T. Winnard, V. Raman, L. Zhen, W. A. Mitzner, S. Sukumar, G. L. Semenza, *Oncogene* **31**(14) (2012) 1757–1770.
- [34] J. D. Hood, D. A. Cheresch, *Nat. Rev. Cancer* **2** (2002) 91–100.
- [35] J. D. Humphries, A. Byron, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **119**(19) (2006) 3901–3903.
- [36] J. S. Desgrosellier, L. A. Barnes, D. J. Shields, M. Huang, S. K. Lau, N. Prévost, D. Tarin, S. J. Shattil, D. A. Cheresch, *Nat. Med* **10** (2009) 1163–1169.
- [37] A. Bianchi-Smiraglia, S. Paesante, A. V. Bakin, *Oncogene* **32**(25) (2013) 3049–3058.
- [38] S. Raab-Westphal, J. F. Marshall, S. L. Goodman, *Cancers* **9**(9) (2017) 1–28.
- [39] M. V. Agrez, R. C. Bates, D. Mitchell, N. Wilson, N. Ferguson, P. Anseline, D. Sheppard, *Br. J. Cancer* **73** (1996) 887–892.
- [40] J. G. Parvani, M. D. Gujrati, M. A. Mack, W. P. Schiemann, Zheng-Rong Lu, *Cancer Res.* **75** (11) (2015) 2316–2325.
- [41] L. Seguin, J. S. Desgrosellier, S. M. Weis, D. A. Cheresch, *Trends. Cell. Biol* (2014) 1–7.

- [42] A. Ambriović-Ristov, J. Gabrilovac, T. Čimbora-Zovko, M. Osmak, *Int. J. Cancer* **110** (2004) 660–667.
- [43] M. Christmann, K. Diesler, D. Majhen, C. Steirgewald, N. Berte, H. Freund, N. Stojanović, B. Kaina, M. Osmak, A. Ambriović-Ristov, M. T. Tomicic, *Oncotarget* **8** (17) (2017) 27754–27771.
- [44] M. Maziveyi, S. K. Alahari, *Oncotarget* **8** (2017) 48471–48487.
- [45] B. Geiger, K. M. Yamada, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3** (2011) 1–22.
- [46] S. E. Winograd-Katz, R. Fassler, B. Geiger, K. R. Legate, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (2014) 273–288.
- [47] V. Manzanares, D. J. Webb, A. R. Horwitz, *J. Cell. Sci* **118** (2005) 4917–4919.
- [48] W. G. Cance, J. E. Harris, M. V. Iacocca, E. Roche, X. Yang, J. Chang, S. Simkins, L. Xu, *Clin. Cancer Res.* **6** (6) (2000) 2417–2423.
- [49] E. R. Horton, J. D. Humphries, B. Stutchbury, G. Jacquemet, C. Ballestrem, S. T. Barry, M. J. Humphries, *J. Cell Biol.* **212**(3) (2016) 349–364.
- [50] A. M. Lopez-Colome, I. Lee-Rivera, R. Benavides-Hidalgo, E. Lopez, *J. Hematol. Oncol* (2017) 1–15.
- [51] I. A. Dobрева, L. Fielding, J. Foster, S. Dedhar, *Journal of Proteome Research* **7**(4) (2008) 1740–1749.
- [52] P. C. McDonald, A. B. Fielding, S. Dedhar, *J. Cell. Sci* **121**(19) (2008) 3121–3132.
- [53] S. Persad, S. Dedhar, *Cancer Metastasis Rev.* **22**(4) (2003) 375–384.
- [54] D. E. White, R. D. Cardiff, S. Dedhar, W. J. Muller, *Oncogene* **20**(48) (2001) 7064–7072.
- [55] V. M. Golubovskaya, M. Zheng, L. Zhang, J. L. Li, W. G. Cance, *BMC Cancer* **9** (2009) 1–16.
- [56] M. J. van Nimwegen, B. van de Water, *Biochem. Pharmacol* **73** (2007) 597–609.
- [57] M. C. Jones, J. D. Humphries, A. Byron, A. Millon-Fremillon, J. Robertson, N. R. Paul, Daniel H. J. Ng, Janet A. Askari, M. J. Humphries, *Curr. Protoc. Cell. Biol* **66**: 9.8.1-9.8.15 (2015), Wellcome Trust Centre for Cell Matrix Research, Faculty of Life Sciences University of Manchester, Manchester, United Kingdom
- [58] M. R. Holt, Y. Calle, D. H. Sutton, D. R. Critchley, G. E. Jones, G. A. Dunn, *J. Microsc* **232** (2008) 73–81.

- [59] R. Zaidel-Bar, C. Ballestrem, Z. Kan, B. Geiger, *J. Cell. Sci* **116** (2003) 4605–4613.
- [60] I. Jialal, J. K. Sokoll, *Am. J. Clin. Pathol.* **143** (2) (2015)
- [61] P. P. Roux, J. Blenis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68** (2) (2004) 320–344.
- [62] J. M. Wilson, M. de Hoop, N. Zorzi, B. H. Toh, C. G. Dotti, R. G. Parton, *Mol. Biol. Cell.* **11** (8) (2000) 2657–2671.
- [63] A. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, *Anal Chem.* **75**(17) 4646–4658.
- [64] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3761408/> (datum pristupa 16.9.2017.)
- [65] R. Zaidel-Bar, B. Geiger, *J. Cell Sci.* **123** (2010) 1385–1388.
- [66] Y. L. Hu, S. Lu, K. W. Szeto, J. Sun, Y. Wang, J. C. Lasheras, S. Chien, *Sci Rep.* **4**(1) (2014) 1–7.
- [67] J. G. Parvani, A. J. Galliher-Beckley, B. J. Schiemann, W. P. Schiemann, *Mol. Biol. Cell.* **24**(21) (2013) 3449–3459.
- [68] P. Koistinen, J. Heino, *J. Biol. Chem* **277** (2002) 24835–24841.
- [69] A. M. Mercurio, I. Rabinovitz, L. M. Shaw, *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**(5) (2001) 541–545.
- [70] V. Todorovic, B. V. Desai, R. A. Eigenheer, T. Yin, E. V. Amargo, M. Mrksich, K. J. Green, M. J. Schroeder Patterson, *Mol. Cell. Proteomics* **9.2** (2009) 351-361.
- [71] L. A. Girolidi, P. P. Bringuier, T. Shimazui, K. Jansen, J. A. Schalken, *Int. J. Cancer* **82** (1999) 70–76.
- [72] C. L. Sommers, E. P. Gelmann, R. Kemler, P. Cowin, S. W. Byers, *Cancer Res.* **54** (1994) 3544–3552.
- [73] C. Denk, J. Hulsken, E. Schwarz, *Cancer Lett.* **120** (1997) 185–193.
- [74] M. A. Ginos, Grier P. Page, B. S. Michalowicz, K. J. Patel, S. E. Volker, S. E. Pambuccian, F. G. Ondrey, G. L. Adams, Patrick M. Gaffney, *Cancer Res.* **64** (2004) 55–63.
- [75] S. M. Singel, C. Cornelius, K. Batten, G. Fasciani, W. E. Wright, L. Lum, JW. A. Shay, *Clin Cancer Res.* **19** (2013) 2061–2070.
- [76] K. P. Fang, W. Dai, Y. H. Ren, Y. C. Xu, S. M. Zhang, Y. B. Qian, *BMC Cancer* (2016) 16–45.
- [77] M. T. Lai, C. H. Hua, M. H. Tsai, L. Wan, Y. J. Lin, C. M. Chen, *J. Pathol.* **224**(3) (2011) 367–376.

- [78] X. Qian, G. Li, W. C. Vass, A. Papageorge, R. C. Walker, L. Asnaghi, P. J. Steinbach, G. Tosato, K. Hunter, D. R. Lowy, *Cancer Cell*. **16**(3) (2009) 246–258.
- [79] A. L. Parker, M. Kavallaris, J. A. McCarroll, *Front Oncol*. **4** (2014) 1–19.
- [80] J. C. Nienstedt, A. Gröbe, T. Clauditz, R. Simon, A. Muenscher, R. Knecht, G. Sauter, C. Moebius, M. Blessmann, M. Heiland, C. Pflug, *J. Oral Pathol. Med*. **46**(10) (2017) 986–990.
- [81] K. Kawakami, Y. Fujita, T. Kato, K. Mizutani, K. Kameyama, H. Tsumoto, Y. Miura, T. Deguchi, M. Ito, *Int. J. Oncol*. **47** (2015) 384–390.
- [82] E. Kawahara, R. Tokuda, I. Nakanishi, *Cell Biol. Int*. **23** (1999) 163–174.
- [83] T. Li, H. Guo, Y. Song, X. Zhao, Y. Shi, Y. Lu, S. Hu, Y. Nie, D. Fan, K. Wu, *Mol. Cancer* **13** (2014) 1–15.
- [84] S. Shekhar, P. V. Angadi, *J. Oral. Maxillofac. Pathol*. **21**(2) (2017) 318–319.
- [85] Q. Q. Shao, T. P. Zhang, W. J. Zhao, Z. W. Liu, L. You, L. Zhou, J. C. Guo, Y. P. Zhao, *Pathol. Oncol. Res*. **22**(2) (2015) 245–252.
- [86] L. Y. Bourguignon, E. Gilad, A. Brightman, F. Diedrich, P. Singleton, *J. Biol. Chem*. **281**(20) (2006) 14026–14040.
- [87] N. Kamochi, M. Nakashima, S. Aoki, K. Uchihashi, H. Sugihara, S. Toda, S. Kudo, *Cancer Sci*. **99**(12) (2008) 2417–27.
- [88] B. Kovač, T. P. Makela, T. Vallenius, *PLoS One* **13**(5) (2018) 1–20.
- [89] S. Yamada, S. Yanamoto, H. Yoshida, I. Yoshitomi, G. Kawasaki, A. Mizuno, T. K. Nemoto, *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg*. (2010) 61–67.
- [90] L. Jadeski, J. M. Mataraza, H. W. Jeong, Z. Li, D. B. Sacks, *J. Biol. Chem*. **283**(2) (2008) 1008–10017.

Table with columns for ID, Name, Gene, Molecular Weight, and various numerical data points. Rows include entries like ALDOA (Fructose-bisphosphate aldolase A), TMPO (Lamina-associated polypeptide 2), NUP153 (Nuclear pore complex protein), and many others, ending with CTNNA1 (Catenin alpha-1).

161	RPL18	Ribosomal protein L18, isoform CRA_c	0A024QZD1_HUMAN (+5)	22 kDa	3	4	0	4	3	5	6	3	3	2	3	3,6	2,12132	1,14018	
162	CG_19893f	HCG1989366, isoform CRA_a	0A024R4X7_HUMAN (+1)	50 kDa	5	0	0	2	0	6	8	0	2	0	3	1,6	3,4641	2,60768	
163	IA FLJ13913 fls, clone Y79AA1000231, highly similar to Nucleolar	B3KN82_HUMAN		52 kDa	5	0	2	7	3	0	4	0	5	7	3,8	2,8	1,30384	2,83406	
164	RPS24	40S ribosomal protein S24	RS24_HUMAN (+2)	15 kDa	4	4	2	4	0	6	4	0	0	2	2	3,2	2	2,28035	
165	DSC3	Desmocollin-3	DSC3_HUMAN (+2)	100 kDa	3	0	3	3	0	8	0	0	5	5	2,2	3,2	2,16795	3,42053	
166	MYH10	Myosin-10	MYH10_HUMAN	229 kDa	0	10	0	11	0	0	0	0	9	8	15	1,6	9	3,57771	5,52268
167	H3F3B	Histone H3	B2R4P9_HUMAN (+6)	15 kDa	3	4	0	3	0	2	3	4	0	3	1,2	3,2	1,64317	0,83666	
168	RPS14	40S ribosomal protein S14	RS14_HUMAN	16 kDa	4	0	0	5	0	6	2	3	2	3	1,6	3,4	1,67332	2,30217	
169	SERPINC1	Antithrombin-III	ANT3_HUMAN (+2)	53 kDa	3	0	2	2	3	0	4	6	0	0	2,4	1,6	1,51658	2,60768	
170	CNN2	Calponin-2	CNN2_HUMAN (+2)	34 kDa	8	0	0	8	0	4	0	3	0	0	1,6	3	3,57771	3,31662	
171	LAD1	Ladinin-1	LAD1_HUMAN (+1)	57 kDa	2	0	0	4	2	3	3	2	2	5	1,8	2,8	1,09545	1,92354	
172	TP63	Tumor protein p63 isoform 1 (Fragment)	0A052Z4N5_HUMAN (+2)	77 kDa	3	0	2	4	0	4	4	0	3	4	2,4	2,4	1,51658	2,19089	
173	YWHAH	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN (+2)	28 kDa	6	3	0	3	0	9	5	7	0	0	2,2	4,4	3,03315	3,57771	
174	PRPF19	Pre-mRNA-processing factor 19	PRP19_HUMAN	55 kDa	5	0	0	4	7	0	2	0	2	9	3,2	2,6	2,77489	3,97492	
175	SMC1A	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A_HUMAN	143 kDa	3	0	0	8	3	0	0	0	3	6	1,8	2,8	1,64317	0,89872	
176	ar to Homo sapiens stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsc70)	A8K690_HUMAN (+2)		63 kDa	4	2	0	5	0	4	4	2	0	3	1,6	3,2	2,19089	3,30384	
177	TRIM28	Transcription intermediary factor 1-beta	TIF1B_HUMAN (+1)	89 kDa	6	0	0	8	3	0	3	3	0	0	2,4	2,2	2,50998	3,49285	
178	TINAGL1	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	TINAL_HUMAN	52 kDa	0	6	2	4	0	2	2	5	0	5	0,8	4,4	1,09545	1,51658	
179	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	ADA0UIRRM4_HUMAN	62 kDa	0	0	0	3	0	7	5	3	0	6	1	3,8	2,26307	2,77489	
180	F2	Fibrinogen	THRB_HUMAN (+2)	70 kDa	0	5	3	2	0	2	8	8	0	0	2,2	3,4	3,49285	3,1305	
181	RPL3	60S ribosomal protein L3	RL3_HUMAN	46 kDa	0	2	2	4	4	0	2	0	0	6	1,6	2,4	1,67332	2,60768	
182	RPL13A	60S ribosomal protein L13a (Fragment)	MOQYS1_HUMAN	24 kDa	3	2	0	4	0	2	0	0	4	2	1,4	2	1,94936	1,41421	
183	LJ16494 fls, clone CTONG3004576, highly similar to Keratin, type II	B3KVFS_HUMAN		49 kDa	25	0	0	21	36	56	42	24	50	0	30,6	20,2	19,3856	22,9826	
184	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75_HUMAN (+2)	74 kDa	3	0	0	0	3	6	2	3	2	2	2	2,2	2,2474	2,48998	
185	cDNA FLJ60647, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal	B4DKV4_HUMAN		56 kDa	45	0	71	41	87	73	51	0	93	0	69,4	22,8	21,2321	33,2069	
186	NOP56	Nucleolar protein 56	NOP56_HUMAN (+2)	66 kDa	4	0	0	4	6	2	2	0	3	5	3	2	2,12132	2,73861	
187	NUP214	Nucleoporin 214kDa, isoform CRA_b	0A024R8B6_HUMAN (+1)	218 kDa	5	0	0	5	2	0	0	0	3	5	2	2	2,12132	2,73861	
188	SNW1	SNW domain-containing protein 1	G3V344_HUMAN (+1)	65 kDa	4	0	0	6	0	5	2	2	2	0	1,6	2,6	1,67332	2,79285	
189	EPPK1	Epiplakin	EPIPL_HUMAN	556 kDa	0	7	0	13	0	0	0	0	2	5	0,4	5	0,89443	3,43139	
190	HMGGB1	High-mobility group box 1, isoform CRA_a	0A024RDR0_HUMAN (+1)	25 kDa	4	3	2	2	4	0	3	3	0	0	2,6	1,6	1,67332	1,51658	
191	HNRPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, isoform CRA0A024R7T3	0A024R7T3_HUMAN (+1)	46 kDa	4	0	0	4	0	8	2	0	3	3	1,8	3	1,78885	3,31662	
192	SEC16A	Protein transport protein sec16	F1T01_HUMAN	249 kDa	0	0	2	6	0	2	3	0	5	4	2	2,4	2,12132	2,60768	
193	ILF3	leukin enhancer binding factor 3, 90kDa, isoform CRA0A024R7C7	0A024R7C7_HUMAN (+4)	95 kDa	4	0	0	10	0	3	2	0	0	5	1,2	3,6	1,78885	4,15933	
194	SULF2	Extracellular sulfatase Sulf-2	SULF2_HUMAN	100 kDa	0	5	0	4	0	2	0	9	0	0	0	4	0	3,39116	
195	PCBP2	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2_HUMAN	39 kDa	4	6	4	7	0	7	5	4	0	4	2,6	5,6	2,40832	1,51658	
196	INRNP2B	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2_HUMAN	37 kDa	5	0	0	5	3	4	0	0	2	3	2	2,4	2,12132	2,30217	
197		HCFC1	0A223PQH6_HUMAN (+1)	209 kDa	2	0	0	6	2	7	0	0	2	2	1,2	3	1,09545	3,31662	
198	RBM4	RNA-binding protein 4	RBM4_HUMAN	40 kDa	6	0	0	3	0	2	2	2	0	2	1,4	2,4	2,4949	1,34164	
199	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	MIF_HUMAN (+1)	12 kDa	4	0	3	4	3	2	2	3	2	2	2,8	2,2	0,83666	1,48324	
200	SEPT9	Septin-9	SEPT9_HUMAN	65 kDa	0	0	0	5	4	2	0	0	0	3	0,8	2	1,78885	2,12132	
201	RPL35A	60S ribosomal protein L35a	RL35A_HUMAN	13 kDa	2	0	3	4	2	0	0	0	3	3	2	1,4	1,22474	1,94936	
202	DBNL	Drebrin-like protein	DBNL_HUMAN	48 kDa	3	0	0	8	0	3	4	2	0	0	1,4	2,6	1,94936	2,8634	
203	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN (+1)	45 kDa	3	2	0	3	0	4	2	4	0	4	1	3,4	1,41421	0,89443	
204	DNJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1	DNJA1_HUMAN	45 kDa	5	0	0	4	3	0	2	0	3	5	2,6	1,8	1,81659	2,48998	
205	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_HUMAN (+1)	42 kDa	22	0	0	41	0	45	46	38	0	37	13,6	32,2	20,4646	18,2675	
206	RPS6	40S ribosomal protein S6	A2A3R6_HUMAN (+2)	29 kDa	4	0	0	6	3	2	3	0	2	0	2,4	1,6	1,51658	2,60768	
207	ACTR3	Actin-related protein 3	ARP3_HUMAN (+1)	47 kDa	0	0	0	4	0	10	0	0	2	2	0,4	3,2	0,89443	4,14729	
208	RPS9	40S ribosomal protein S9	RS9_HUMAN (+1)	23 kDa	0	3	0	3	3	4	2	2	2	3	1,4	3	1,34164	0,70711	
209	EGFR	Epidermal growth factor receptor	EGFR_HUMAN (+4)	134 kDa	3	0	2	0	3	2	2	0	2	3	2,4	1	0,54772	1,41421	
210	YWHAQ	14-3-3 protein theta	1433T_HUMAN	28 kDa	3	0	0	2	0	9	6	7	4	4	2,6	4,4	2,60768	3,64692	
211	KRT6B	Keratin, type II cytoskeletal 6B	K2C6B_HUMAN	60 kDa	0	0	0	40	83	78	0	32	93	72	35,2	44,4	48,3291	31,7616	
212	RPL11	60S ribosomal protein L11	RL11_HUMAN (+2)	20 kDa	5	0	3	3	0	0	0	2	4	2	2,4	1,4	2,30217	1,34164	
213	RPS23	40S ribosomal protein S23	RS23_HUMAN (+1)	16 kDa	3	5	0	0	0	2	2	2	0	3	1	2,4	1,41421	1,81659	
214	PRDX6	Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN (+1)	25 kDa	6	0	0	4	2	4	0	2	0	0	1,6	2	2,60768	2	
215	LASP1	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1_HUMAN (+1)	30 kDa	0	0	0	5	2	3	4	4	0	2	1,2	2,8	1,78885	1,92354	
216	MYBBP1A	Myb-binding protein 1A	MBB1A_HUMAN	149 kDa	3	0	2	5	2	0	0	0	2	0	1,8	1	1,09545	2,26307	
217	RPL26	60S ribosomal protein L26	RL26_HUMAN (+4)	17 kDa	2	5	0	3	0	0	4	2	0	0	1,2	2	1,78885	1,12132	
218	FTH1	Ferritin	0A024R525_HUMAN (+4)	21 kDa	3	0	0	0	5	3	3	0	0	0	2,2	0,6	2,16795	3,34164	
219	SNTB2	Beta-2-syntrophin	SNTB2_HUMAN (+1)	58 kDa	0	8	0	4	0	0	0	2	0	2	0	3,2	0	3,03315	
220	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_HUMAN (+1)	37 kDa	2	0	2	4	2	4	0	2	2	0	1,6	2	0,89443	2	
221	RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform	RS4X_HUMAN (+2)	30 kDa	3	2	0	4	2	2	2	0	0	2	1,4	2	1,34164	1,41421	
222	MSN	Moesin	MOES_HUMAN (+1)	68 kDa	0	0	0	8	0	6	7	9	8	10	3	6,6	4,12311	3,97492	
223	RPS15A	40S ribosomal protein S15a	RS15A_HUMAN (+2)	15 kDa	2	0	3	4	2	3	0	0	0	2	1,4	1,8	1,34164	1,78885	
224	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	ADT2_HUMAN (+1)	33 kDa	0	6	0	4	2	0	0	0	0	4	0,4	2,8	0,89443	2,68328	
225	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/	H3BP1_HUMAN (+1)	857 kDa	3	0	0	0	2	0	0	0	3	3	1,6	0,6	1,51658	3,41664	
226	TAGLN2	Transgelin-2	TAGL2_HUMAN	22 kDa	0	0	0	2	7	5	3	0	0	1,4	2	2,19089	0,88221		
227	NOP2	ribosomal 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	NOP2_HUMAN	89 kDa	5	0	0	2	3	0	0	0	3	0	2,2	0,4	2,16795	0,89443	
228	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	TBA1C_HUMAN (+2)	50 kDa	21	11	0	31	18	0	19	16	0	0	11,6	11,6	10,6442	12,8957	
229	NONO	NONO domain containing octamer-binding isoform 1 (Fragment)	0A052Z429_HUMAN (+2)	54 kDa	2	0	2	3	2	2	2	3	0	3	1,6	2,2	0,89443	3,30384	
230	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_HUMAN (+2)	29 kDa	0	0	0	0	0	7	0	5	0	2	0	2,8	0	3,11448	
231	CORO1C	Coronin-1C	CORO1C_HUMAN (+5)	53 kDa	0	0	0	6	0	0	0	2	3	6	0,6	2,8	1,34164	3,03315	
232	SMC3	Structural maintenance of chromosomes protein 3	SMC3_HUMAN (+1)	142 kDa	4	0	0	5	0	0	0	2	4	1,2	1,8	1,78885	2,48998		
233	PFN1	Profilin-1	PROF1_HUMAN	15 kDa	2	0	0	0	2	3	2	2	3	0	1,8	1	1,09545	1,41421	
234	RPL13A	60S ribosomal protein L13	RL13_HUMAN (+2)	24 kDa	3	0	0	4	0	2	3	2	0	2	1,2	2	1,64317	1,41421	
235	NUP53	Nucleoporin NUP53	ABK3Z5_HUMAN (+1)	35 kDa	0	0	0	2	0	4	3	4	0	3	0,6	2,6	1,34164	1,67332	
236	TRIOBP	TRIO and F-actin-binding protein	0A155U231_HUMAN (+1)	255 kDa	2	2	0	0	0	0	2	3	3	5	1,4	2	1,34164	1,12132	
237	RIF1	Telomere-associated protein RIF1	RIF1_HUMAN	274 kDa	3	0	0	2	2	0	0	0	6	0	2,2	0,4	2,48998	0,89443	
238	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN (+1)	89 kDa	0	0	0	7	3	2	2	0	0	4	1	2,6	1,41421	2,96648	
239	EVPL	Envelopin, isoform CRA_a	0A024RRL8_HUMAN (+3)	232 kDa	2	0	2	0	6	0	0	0	7	2	3,4	0,4			

241	UTRN	Utrophin	UTRO_HUMAN	394 kDa	0	3	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2,2	0	2,04939	
242	ACP1	14-3-3 molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase inhibitor-1	PPAC_HUMAN (+1)	18 kDa	4	0	0	2	3	3	0	0	0	2	1,4	1,4	1,94936	1,34164	
243	RNH1	Ribonuclease inhibitor	RINI_HUMAN (+2)	50 kDa	3	0	2	4	4	2	0	0	0	0	1,8	1,2	1,78885	1,78885	
244	HIST1H1A	Histone H1.1	H11_HUMAN	22 kDa	5	8	4	6	0	0	10	5	0	0	3,8	3,8	4,14729	3,63318	
245	FSCN1	Fascin	FSCN1_HUMAN	55 kDa	3	0	0	3	2	2	0	0	0	5	1	2	1,41421	2,12132	
246	RPL34	60S ribosomal protein L34	RL34_HUMAN (+1)	13 kDa	3	0	0	3	0	0	2	0	0	0	1	0,6	1,41421	1,34164	
247	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3_HUMAN (+2)	21 kDa	0	0	0	3	0	4	4	0	2	0	1,2	1,4	1,78885	1,94936	
248	COL17A1	Collagen alpha-1(XVII) chain	COHA1_HUMAN	150 kDa	0	0	0	4	0	2	2	0	2	2	0,8	1,6	1,09545	1,67332	
249		highly similar to pre-mRNA-splicing factorATP-dependent RNA helicase A	B4E056_HUMAN (+1)	90 kDa	0	0	0	4	2	0	0	0	2	4	0,8	1,6	1,09545	2,19089	
250	CSNK1A1	Casein kinase I isoform alpha	KC1A_HUMAN (+1)	39 kDa	0	0	0	0	6	2	0	3	0	4	1,2	1,8	2,68328	1,78885	
251	FST	Follistatin	FST_HUMAN (+1)	38 kDa	0	6	0	0	0	0	3	3	0	2	0,6	2,2	1,34164	2,48998	
252		Testicular secretory protein Li 53	l0A140VK53_HUMAN (+2)	300 kDa	4	0	0	4	3	0	0	0	3	2	2	1,2	1,87083	1,78885	
253	XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5_HUMAN	83 kDa	4	0	0	7	2	0	0	0	3	0	1,8	1,4	1,78885	3,1305	
254	AHNAK2	Protein AHNAK2	AHNAK2_HUMAN	617 kDa	2	0	0	0	5	0	0	0	6	0	2,6	0	2,79285	0	
255	TARDBP	TAR DNA binding protein, isoform CRA_b	l0A024R4E2_HUMAN (+3)	45 kDa	0	0	0	2	2	2	3	0	0	2	1	1,2	1,41421	1,09545	
256	RPL10	60S ribosomal protein L10	RL10_HUMAN (+2)	25 kDa	3	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0,6	1,2	1,34164	1,09545	
257	ME1-NME	NME1-NME2 readthrough	J3KPD9_HUMAN (+3)	22 kDa	0	0	0	2	2	4	2	2	0	0	0,8	1,6	1,09545	1,67332	
258	NUP98	Nucleoporin 98kDa, isoform CRA_a	l0A024RCC4_HUMAN (+1)	141 kDa	2	0	0	3	2	2	0	0	2	3	1,2	1,6	1,09545	1,51658	
259	ATP6V1A	V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_HUMAN	68 kDa	3	3	0	4	2	0	0	0	0	0	1	1,4	1,41421	1,94936	
260	RPS2	40S ribosomal protein S2	RS2_HUMAN	31 kDa	0	2	0	2	0	5	0	2	0	4	0	3	0	1,41421	0
261	PML	Protein PML	PML_HUMAN	98 kDa	10	0	2	3	0	0	0	0	0	0	2,4	0,6	4,3359	1,34164	
262	DNAAF5	Dynein assembly factor 5, axonemal	DAAF5_HUMAN	94 kDa	0	0	0	5	0	0	0	0	3	3	0,6	1,6	1,34164	2,30217	
263	RPL12	60S ribosomal protein L12	RL12_HUMAN	18 kDa	3	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0,6	1,2	1,34164	1,78885	
264	MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A	ML12A_HUMAN (+3)	20 kDa	0	0	0	0	0	4	0	3	0	0	0	1,4	0	1,94936	0
265		2NA FLJ75556, highly similar to Homo sapiens ribosomal protein S100A2	A8K7N0_HUMAN (+2)	24 kDa	0	0	0	2	0	3	0	0	3	2	0,6	1,4	1,34164	1,34164	
266	S100A2	Protein S100-A2	S10A2_HUMAN	11 kDa	2	0	0	2	0	0	3	0	3	0	1,6	0,4	1,51658	0,89443	
267	RPL36AL	60S ribosomal protein L36a-like	RL36L_HUMAN	12 kDa	3	2	3	2	0	0	0	0	0	0	1,2	0,8	1,64317	1,09545	
268	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1_HUMAN (+1)	118 kDa	4	0	0	3	0	0	3	0	2	2	1,8	1	1,78885	1,41421	
269	MDK	Midkine	MK_HUMAN (+2)	16 kDa	0	3	0	0	0	2	5	4	0	0	1	1,8	2,23607	1,78885	
270	CAB_2	Complement C4-B	l0A0AG2JL54_HUMAN (+8)	188 kDa	0	4	2	0	0	0	3	0	0	2	1	1,2	1,41421	1,78885	
271	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16, isoform CRA_a	D3DUZ3_HUMAN	82 kDa	7	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1,4	0,8	3,1305	1,78885	
272	RPS3	40S ribosomal protein S3	RS3_HUMAN	27 kDa	0	3	0	3	0	0	0	3	0	5	0	2,8	0	1,78885	0
273	MYO1B	Unconventional myosin-Ib	MYO1B_HUMAN (+2)	132 kDa	3	2	0	2	4	0	0	0	2	1,4	1,2	1,94936	1,09545		
274	SFPQ	Serine/glutamine-rich (Poly)pyrimidine tract binding protein	Q86VG2_HUMAN (+2)	76 kDa	2	0	0	3	0	4	2	0	0	2	0,8	1,8	1,09545	1,78885	
275	CPNE1	Copine-1	B0QZ18_HUMAN (+2)	60 kDa	3	0	2	2	0	0	2	0	2	1,4	0,8	1,34164	1,09545		
276	SNRPE	Small nuclear ribonucleoprotein E	RUXE_HUMAN	11 kDa	2	0	0	5	0	0	0	0	0	2	0,4	1,4	0,89443	2,19089	
277	CSE1L	Exportin-2	XPO2_HUMAN (+2)	110 kDa	2	0	0	4	2	0	0	0	0	3	0,8	1,4	1,09545	1,94936	
278	HNRNPA0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	ROAO_HUMAN	31 kDa	3	0	0	3	0	3	0	0	0	3	0,6	1,8	1,34164	1,64317	
279	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA_HUMAN	29 kDa	0	0	0	4	0	4	0	2	0	3	0	2,6	0	1,67332	0
280	GSN	Gelsolin	l0A0A0M551_HUMAN (+6)	83 kDa	0	2	2	0	0	0	4	2	0	0	1,2	0,8	1,78885	1,09545	
281	LIMA1	LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1_HUMAN (+3)	85 kDa	0	0	0	4	0	3	2	2	0	3	0,4	2,4	0,89443	1,51658	
282	TMEM33	Transmembrane protein 33, isoform CRA_a	l0A024R9W7_HUMAN (+2)	28 kDa	2	0	0	3	0	3	0	0	3	0	1	1,2	1,41421	1,64317	
283	FAU	40S ribosomal protein S30	RS30_HUMAN (+1)	7 kDa	0	3	2	0	0	0	2	3	0	0	0,8	1,2	1,09545	1,64317	
284	RPS27	40S ribosomal protein S27	RS27_HUMAN	9 kDa	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	1,2	0	1,64317	0	
285	CTTN	Cortactin, isoform CRA_c	l0A024R5M3_HUMAN (+2)	57 kDa	2	0	0	2	0	0	3	2	2	0	1,4	0,8	1,34164	1,09545	
286	RPL35	60S ribosomal protein L35	RL35_HUMAN	15 kDa	2	2	0	2	0	0	3	0	0	0	1	0,8	1,41421	1,09545	
287	ZC3HAV1	Zinc finger CCHC-type antiviral protein 1	ZCCHV_HUMAN (+2)	101 kDa	3	0	0	3	0	0	2	0	0	3	1	1,2	1,41421	1,64317	
288	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	4F2_HUMAN (+3)	68 kDa	3	0	0	0	0	3	3	2	0	0	1,2	1	1,64317	1,41421	
289	DYNLL2	Dynein light chain 2, cytoplasmic	DYL2_HUMAN	10 kDa	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	0	1,2	0	1,78885	0
290	RPL27	60S ribosomal protein L27	RL27_HUMAN (+2)	16 kDa	2	3	0	4	0	0	2	0	0	2	0,8	1,8	1,09545	1,78885	
291	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	IF4G1_HUMAN (+8)	175 kDa	2	0	0	5	0	0	0	0	0	2	0,4	1,4	0,89443	2,19089	
292	EEF1D	Elongation factor 1-delta	l0A087X1X7_HUMAN (+5)	69 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0,4	0,8	0,89443	1,09545	
293	SEPT7	Septin-7	SEPT7_HUMAN (+7)	51 kDa	0	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0,4	1,2	0,89443	2,68328	
294	POLR2A	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	RPB1_HUMAN	217 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1,41421	0	
295	CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	l0A0C4DGG9_HUMAN (+2)	220 kDa	5	0	0	3	0	0	0	0	3	0	1,6	0,6	2,30217	1,34164	
296	TKT	Transketolase	TKT_HUMAN (+8)	68 kDa	0	0	0	5	2	0	0	0	0	4	0,4	1,8	0,89443	2,48998	
297	HBD	Delta globin	A0N071_HUMAN (+25)	16 kDa	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0,8	0	1,09545	0
298	RPL22	60S ribosomal protein L22	RL22_HUMAN (+3)	15 kDa	3	0	0	2	0	0	2	2	0	0	1	0,8	1,41421	1,09545	
299	RANGAP1	Ran GTPase activating protein 1, isoform CRA_d	l0A024R1U0_HUMAN (+1)	64 kDa	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0,4	1,2	0,89443	1,09545	
300	MISP	Mitotic interactor and substrate of PLK1	MISP_HUMAN	75 kDa	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0,8	0,4	1,09545	0,89443	
301	COL4A2	Collagen alpha-2(IV) chain	CO4A2_HUMAN (+1)	168 kDa	0	4	0	0	0	2	2	0	0	2	0,4	1,6	0,89443	1,67332	
302	RBM28	RNA binding motif protein 28 isoform 1	l0A024R753_HUMAN (+1)	86 kDa	2	0	0	2	5	0	0	0	4	2	2,2	0,8	2,28035	1,09545	
303	STAT1	Signal transducer and activator of transcription	J3KPM9_HUMAN (+1)	83 kDa	4	0	0	2	2	0	3	0	0	0	1,8	0,4	1,78885	0,89443	
304	FEN1	Flap endonuclease 1	FEN1_HUMAN (+1)	43 kDa	5	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0,4	2,23607	0,89443	0	
305	DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYH1_HUMAN	532 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
306	FN1	Fibronectin	FINC_HUMAN	263 kDa	0	0	4	9	0	0	0	0	0	0	0,8	1,8	1,78885	4,02492	
307	YWHAQ	14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN	28 kDa	6	5	0	0	0	7	3	6	0	0	1,8	3,6	2,68328	3,36155	
308	TUBB8	Tubulin beta chain	Q2NKY5_HUMAN	50 kDa	0	0	0	0	6	20	0	0	0	0	1,2	4	2,68328	8,94427	
309	PPP2R1A	Protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit 1	2AAA_HUMAN (+5)	65 kDa	2	0	0	3	0	2	2	2	0	0	0,8	1,4	1,09545	1,34164	
310		Protein S100	B2R4M6_HUMAN (+1)	13 kDa	0	0	0	0	2	4	0	0	3	0	1	0,8	1,41421	1,78885	
311	DNAJB1	DnaJ homolog subfamily B member 1	DNJB1_HUMAN (+2)	38 kDa	2	0	0	3	0	5	2	2	0	0	0,8	2	1,09545	2,12132	
312	RRP1B	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B_HUMAN	84 kDa	3	0	0	3	0	0	2	0	0	2	1	1	1,41421	1,41421	
313	TMPO	Thymopoietin, isoform CRA_c	l0A024RBE7_HUMAN (+1)	51 kDa	0	0	0	8	0	0	7	0	7	0	2,8	1,6	3,8406	3,57771	
314	ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	ITPR3_HUMAN	304 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0,8	0,89443	1,78885	0	
315	MAGEA4	Melanoma antigen family A, 4, isoform CRA_a	l0A024RC12_HUMAN (+3)	35 kDa	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0,4	1,2	0,89443	1,64317	
316	KRT13	Keratin 13	A1A4E9_HUMAN	50 kDa	21	0	0	0	33	0	26	0	32	20	22,4	4	13,4276	8,94427	
317	APEX1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1_HUMAN (+1)	36 kDa	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,8	0,4	1,78885	0,89443	
318	AHCTF1	Protein ELYS	ELYS_HUMAN	253 kDa	2	0	2	0	0	0	0	0	3	2	1,4	0,4	1,34164	0,89443	
319	SEPT2	Septin-2	SEPT2_HUMAN	41 kDa	2	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0,4	0,8	0,89443	1,09545	
320	ARPC4	Actin-related protein 2																	

321	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN (+4)	29 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	1,2	0	1,09545		
322	RPS16	40S ribosomal protein S16	R516_HUMAN (+1)	16 kDa	0	0	0	3	2	3	0	0	0	2	0,4	1,6	0,89443	1,51658		
323	NUDT21	isoidiphosphate linked moiety X-type motif 21, isoform CRA_1	iso0A024R6W2_HUMAN (+2)	26 kDa	0	0	0	2	0	4	2	2	0	0	0,4	1,6	0,89443	1,67332		
324	CAPZB	cap protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_1	B1AK87_HUMAN (+3)	29 kDa	0	0	0	0	0	4	0	3	0	0	0	1,4	0	1,94936		
325	SET	SET	Q5VXV3_HUMAN (+1)	33 kDa	4	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,8	0,6	1,78885	1,34164		
326	SON	Protein SON	SON_HUMAN	264 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,2	0	1,78885	0	
327	RPS13	40S ribosomal protein S13	R513_HUMAN	17 kDa	0	0	0	2	3	0	3	2	0	0	0,8	1,2	1,09545	1,64317		
328	ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN (+2)	57 kDa	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0,8	0	1,09545	0		
329	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN (+4)	39 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
330	NAT10	RNA cytidine acetyltransferase	0A087WV29_HUMAN (+1)	94 kDa	0	0	0	2	4	0	0	0	0	2	1,2	0,8	1,78885	1,09545		
331	RAE1	mRNA export factor	RAE1L_HUMAN	41 kDa	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	1,4	0	3,1305	0	
332	RACGAP1	Rac GTPase-activating protein 1	RGAP1_HUMAN (+2)	71 kDa	4	0	0	2	0	2	3	0	0	0	1,4	0,8	1,94936	1,09545		
333	UTP20	Small subunit processome component 20 homolog	UTP20_HUMAN	318 kDa	0	0	0	2	3	0	0	0	2	3	1	1	1,41421	1,41421		
334	RPL36AL	60S ribosomal protein L36	RL36_HUMAN	12 kDa	2	0	0	3	0	0	5	0	0	0	1,4	0,6	2,19089	1,34164		
335	MYO18A	Unconventional myosin-XVIIIa	MY18A_HUMAN (+2)	233 kDa	3	0	0	3	0	0	0	0	4	2	1,4	1	1,94936	1,41421		
336	LAMC1	Laminin subunit gamma-1	LAMC1_HUMAN (+1)	178 kDa	0	5	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1,6	0	2,30217	0	
337	EPRS	Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	SYEP_HUMAN	171 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	5	0	1,6	0	2,30217	0
338	MTA2	metastasis associated 1 family, member 2, isoform CRA_1	iso0A024R534_HUMAN (+1)	75 kDa	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0	2	0	2,73861	0
339	RPL30	60S ribosomal protein L30	RL30_HUMAN (+2)	13 kDa	0	0	0	2	2	0	0	2	0	2	0,4	1,2	0,89443	1,09545		
340	ADNP	Activity-dependent neuroprotector homeobox protein	ADNP_HUMAN (+2)	124 kDa	0	0	0	2	0	2	0	2	0	0	1,2	0	1,09545	0		
341	RPL9	NPC-A-16	Q53Z07_HUMAN (+1)	22 kDa	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0,4	1,2	0,89443	1,09545		
342	RANBP5	RAN binding protein 5, isoform CRA_d	iso0A024RDY0_HUMAN (+2)	124 kDa	4	0	0	0	2	0	2	0	0	0	1,6	0	1,67332	0		
343		Sulfhydryl oxidase	ABK4C2_HUMAN	67 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1,2	0	1,78885	0	
344	RPS26	40S ribosomal protein S26	RS26_HUMAN (+1)	13 kDa	0	2	0	0	0	0	3	2	0	0	0,6	0,8	1,34164	1,09545		
345	SNRPD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SMD3_HUMAN	14 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0	
346	AHCY	Adenosylhomocysteinase	SAHH_HUMAN (+1)	48 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3	0	1,4	0	1,94936	0	
347	PKN	Paxillin, isoform CRA_e	iso0A140VJQ8_HUMAN (+2)	65 kDa	0	2	0	5	0	0	0	2	0	0	0	1,8	0	2,04939	0	
348	HNRNP2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRH2_HUMAN	49 kDa	5	0	0	4	0	0	0	0	0	3	1	1,4	2,23607	1,94936	0	
349	SNUI3	NHP2-like protein 1	B1AHD1_HUMAN (+2)	15 kDa	0	0	0	3	0	3	3	0	0	0	0,6	1,2	1,34164	1,64317		
350	F5	Coagulation factor V	FAS_HUMAN (+1)	252 kDa	0	0	0	0	0	0	5	4	0	0	1	0,8	2,23607	1,78885	0	
351	RUVBL1	RuvB-like helicase (Fragment)	B5BUB1_HUMAN (+1)	50 kDa	0	0	0	4	0	2	0	0	0	2	0	1,6	0	1,67332	0	
352	GAPVD1	ie-activating protein and VPS9 domain-containing protein	GAPD1_HUMAN (+4)	165 kDa	2	2	0	0	3	0	0	0	0	2	1	0,8	1,41421	1,09545	0	
353	387 fis, clone PLACE6005546, highly similar to Polymerase I and transcription factor I	B3KR5_HUMAN (+3)	39 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0,4	0,8	0,89443	1,09545	0		
354	Iar to Homo sapiens acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetate acetyltransferase)	A8K4W5_HUMAN (+2)	41 kDa	0	0	0	3	0	3	0	2	0	0	0	1,6	0	1,51658	0		
355	NUP107	Nuclear pore complex protein Nup107	NU107_HUMAN	106 kDa	0	0	0	2	3	0	0	0	0	2	0	1	0,4	1,41421	0,89443	0
356	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats	IFIT3_HUMAN (+1)	56 kDa	4	0	0	0	0	2	4	0	0	0	1,6	0,4	2,19089	0,89443	0	
357	UBTF	Nucleolar transcription factor 1	E9PKP7_HUMAN	87 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	0	
358	clone OCBBF2009603, highly similar to Staphylococcal nuclease	B3KU67_HUMAN	101 kDa	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0,8	0,4	1,09545	0,89443	0		
359	to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/e	B4DMY3_HUMAN (+4)	35 kDa	2	0	0	2	0	4	2	0	0	0	0,8	1,2	1,09545	1,78885	0		
360	SART1	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	SNUT1_HUMAN	90 kDa	4	0	3	2	0	0	0	2	0	0	1,8	0,4	1,78885	0,89443	0	
361	PIN1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	PIN1_HUMAN	18 kDa	2	0	0	7	0	0	0	2	0	0	0,4	1,8	0,89443	3,03315	0	
362	hly similar to Homo sapiens general transcription factor II, I (GTF2B)	A8K9W7_HUMAN (+7)	110 kDa	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1,2	0,4	2,68328	0,89443	0		
363	NSUN2	tRNA (cytosine[34]-C[5])-methyltransferase	NSUN2_HUMAN	86 kDa	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2,23607	0	0	
364	H1FO	Histone H1.0	H10_HUMAN	21 kDa	0	3	0	0	0	0	4	2	0	0	0,8	1	1,78885	1,41421	0	
365	FBL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	FBRL_HUMAN	34 kDa	0	0	0	4	2	2	0	0	0	0	0,4	1,2	0,89443	1,78885	0	
366	IST1H12B	Histone H2B type 1-O	H2B10_HUMAN	14 kDa	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	2	2	4,47214	4,47214	0	
367		Nuclear pore complex protein Nup93	A8K897_HUMAN (+1)	93 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6	0	1,34164	0	
368	HNRPA3	erogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, isoform CRA_1	B4DD86_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	2	0	0	3	2	0	0	0,6	0,8	1,34164	1,09545	0	
369		Testicular tissue protein Li 75	iso0A140VJK1_HUMAN (+1)	37 kDa	2	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0,8	0,8	1,09545	1,09545	0	
370	HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	HABP2_HUMAN	63 kDa	0	4	0	0	0	0	0	3	0	2	0	1,8	0	1,78885	0,89443	0
371	PDLM4	PDZ and LIM domain protein 4	PDL4_HUMAN	35 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	1,2	0	1,09545	0	
372	RPL29	60S ribosomal protein L29	RL29_HUMAN (+2)	18 kDa	0	2	0	2	0	0	0	2	0	0	1,2	0	1,09545	0	0	
373	OAS3	5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa, isoform CRA_1	iso0A024RBQ5_HUMAN (+2)	121 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0	0	
374	EMD	Emerin	EMD_HUMAN	29 kDa	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0	1,2	0	1,78885	0	0	
375	SPTBN2	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	SPTN2_HUMAN	271 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0	0	
376	BXDC2	BXDC2 protein (Fragment)	A0JLQ5_HUMAN (+2)	39 kDa	3	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0,6	1	1,34164	1,41421	0	
377	DDX27	DEAD box polypeptide 27	B3GQE6_HUMAN (+2)	87 kDa	3	0	0	2	3	0	0	0	2	0	1,6	0,4	1,51658	0,89443	0	
378	TOP1	Topoisomerase (DNA) I	B9EG90_HUMAN (+1)	91 kDa	2	0	0	3	0	2	0	0	0	2	0,8	1	1,09545	1,41421	0	
379	CSNK2B	Casein kinase II subunit beta	Q5SRQ6_HUMAN	27 kDa	0	0	0	3	0	2	0	2	0	0	0	1,4	0	1,34164	0	0
380	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN (+2)	61 kDa	0	0	0	0	0	3	2	3	0	0	0,4	1,2	0,89443	1,64317	0	
381	RPS5	Ribosomal protein S5, isoform CRA_a	iso0A024R4Q8_HUMAN (+4)	23 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	0
382	COL4A1	Collagen alpha-1(IV) chain	CO4A1_HUMAN	161 kDa	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1,2	0	1,78885	0	0
383	DDX18	RNA helicase	iso0A024RAH8_HUMAN (+2)	75 kDa	2	0	0	3	3	0	0	0	0	2	1	1	1,41421	1,41421	0	
384	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Fragment)	A0A0A0MRM9_HUMAN	75 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443	0	0	
385	PCM1	PCM1 protein	A2RUU9_HUMAN (+1)	210 kDa	3	0	2	0	0	0	0	0	3	0	1,6	0	1,51658	0	0	
386	PABPC1	Polyadenylate-binding protein 1	PABP1_HUMAN (+6)	71 kDa	2	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0,4	1	0,89443	1,41421	0	
387	SLAIN2	HCG17415, isoform CRA_a	iso0A024R9T6_HUMAN (+1)	63 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0	0	
388	TNS4	Tensin-4	TENS4_HUMAN	77 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0	0	
389	UACA	I autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	UACA_HUMAN (+1)	163 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	0	
390	HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1, isoform CRA_a	iso0A024RDQ0_HUMAN (+2)	92 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0,4	0,4	0,89443	0,89443	0	
391	ACTR2	Actin-related protein 2	ARP2_HUMAN	45 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,2	0	1,78885	0	0
392	IPO4	Impartin-4	IPO4_HUMAN	119 kDa	2	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0,4	0,8	0,89443	1,09545	0	
393	VA FLJ50574, highly similar to ATP-dependent RNA helicase DDX3	B4DM03_HUMAN (+2)	86 kDa	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1,41421	0	0	0	
394	cDNA FLJ1896, highly similar to Gli3-derived nexin	B4DMR3_HUMAN	37 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0,4	0,8	0,89443	1,09545	0	
395	FTL	Ferritin (Fragment)	B1Q3B3_HUMAN (+1)	10 kDa	2	0	0	0	0	3	3	0	0	0	1	0,6	1,41421	1,34164	0	
396	CG_20056	DDX39B	iso0A024RCM3_HUMAN (+1)	49 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	1,4	0	2,19089	0	0
397	MATN2	Matrilin 2, isoform CRA_b	iso0A024R9B9_HUMAN (+3)	103 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1,41421	0	0	
398	IGFBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	IBP7_HUMAN	29 kDa	0	2	0	0												

401	A FLI59571, highly similar to Eukaryotic translation initiation fac	B4D2F2_HUMAN (+1)	110 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0,8	0	1,09545	0	
402	RPS20 40S ribosomal protein S20	R520_HUMAN	13 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
403	CBX3 romobox homolog 3 [HP1 gamma homolog, Drosophil	A4D177_HUMAN (+1)	21 kDa	3	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0,6	1	1,34164	1,41421	
404	NHP2 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	NHP2_HUMAN	17 kDa	0	0	0	4	2	3	0	0	0	0	0,4	1,4	0,89443	1,94936	
405	NCOR2 Nuclear receptor co-repressor 2, isoform CRA_c	AOA024RBS3_HUMAN (+6)	274 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	1,2	0	1,78885	0	
406	DID01 Death-inducer obliterator 1	DID01_HUMAN	244 kDa	2	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0,4	0,8	0,89443	1,78885	
407	SUN1 SUN domain-containing protein 1	AOA146HP0_HUMAN (+3)	99 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	1,6	0	2,19089	
408	CDK1 cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M, isoform CRA_a	AOA024QZP7_HUMAN (+2)	34 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
409	CG_2448 HCG24487, isoform CRA_c	AOA024R261_HUMAN (+8)	21 kDa	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0,8	0	1,09545	
410	JTV1 JTV1 gene, isoform CRA_a	AOA024QZY1_HUMAN (+2)	35 kDa	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
411	YWHAE 14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN (+1)	29 kDa	0	0	0	0	0	5	0	4	3	0	0,6	1,8	1,34164	2,48998	
412	to Homo sapiens WD repeat and HMGB-box DNA binding protein	ABKAE0_HUMAN (+4)	126 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
413	ZYX Zyxin	ZYX_HUMAN	61 kDa	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
414	TCOF1 Treacle protein	TCOF_HUMAN (+2)	152 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
415	RPA3 Replication protein A3, 14kDa	A4D105_HUMAN (+1)	14 kDa	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
416	SUPT16H FACT complex subunit SPT16	SP16H_HUMAN	120 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
417	BANF1 Barrier to autointegration factor 1, isoform CRA_a	AOA024R5H0_HUMAN (+1)	10 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
418	CAPN1 Calpain 1, (Mu/I) large subunit, isoform CRA_a	AOA024R580_HUMAN (+3)	82 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	1	0	1,41421	0	
419	PDCD11 Protein RRP5 homolog	RRP5_HUMAN	209 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0,8	0	1,09545	0	
420	SNRPB ill nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B ani	R5MB_HUMAN (+3)	25 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
421	RBM27 RNA-binding protein 27	RBM27_HUMAN	119 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0	
422	DDX54 ATP-dependent RNA helicase DDX54	DDX54_HUMAN	99 kDa	0	0	0	2	3	0	0	0	2	0	1	0,4	1,41421	0,89443	
423	112434 fis, clone NT2RM1000037, highly similar to Homo sapiens	B3KMR5_HUMAN (+1)	144 kDa	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
424	5'-3' exonuclease	B3KMC9_HUMAN (+2)	109 kDa	3	0	0	3	0	0	0	0	2	0,6	1	1,34164	1,41421		
425	HNRPH3 geneous nuclear ribonucleoprotein H3 (ZH9), isoform	AOA024QZK8_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	1	0	1,41421	0	
426	IMPDH2 iosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment	HOYR41_HUMAN	51 kDa	0	0	0	2	0	4	0	0	0	2	0	1,6	0	1,67332	
427	THRAP3 Thyroid hormone receptor-associated protein 3	TR150_HUMAN	109 kDa	0	0	0	4	0	0	2	0	0	0	0,4	0,8	0,89443	1,78885	
428	MCM3AP Germinal-center associated nuclear protein	GANP_HUMAN	218 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6	0	1,34164	0		
429	EDC4 Enhancer of mRNA-decapping protein 4	EDC4_HUMAN	152 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	4	0,6	0,8	1,34164	1,78885		
430	RAP1B AP1B, member of Ras oncogene family, isoform CRA_a	AOA024R8B7_HUMAN (+6)	21 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0,6	0,4	1,34164	0,89443	
431	cDNA FLJ54030, highly similar to Polymerase delta-interacting f	B4E0L0_HUMAN (+4)	48 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
432	RPRI1B lation of nuclear pre-mRNA domain-containing protei	RPR1B_HUMAN	37 kDa	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	1	0	1,41421	0	
433	SUMO1 Small ubiquitin-related modifier	AOA024R3Z2_HUMAN (+2)	12 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443	0	
434	Serine/threonine-protein phosphatase	AOA140VJ59_HUMAN (+1)	39 kDa	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	1	0	1,41421	0	
435	SERPINH1 Serpin H1	SERPH_HUMAN (+1)	46 kDa	2	0	0	2	0	0	3	0	0	0	1	0,4	1,41421	0,89443	
436	ACTL6A Actin-like protein 6A	ACTL6A_HUMAN (+1)	47 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0,8	0	1,09545	0	
437	ALDH16A1 Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	A16A1_HUMAN	85 kDa	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
438	DDX48 AD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 48, isoform CRA_a	AOA024R8W0_HUMAN (+1)	47 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	1,6	0	2,19089	0	
439	G3BP1 Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1_HUMAN (+2)	52 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0,8	0	1,09545	
440	CAD CAD protein	PYR1_HUMAN (+2)	243 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0,4	0,6	0,89443	1,34164		
441	SSSCA1 egrein syndrome/scleroderma autoantigen 1 (Fragmen	HOYEB6_HUMAN (+1)	21 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
442	TP11 Triosephosphate isomerase	TP1S_HUMAN (+2)	31 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
443	LEM03 LEM domain containing 3, isoform CRA_a	AOA024R8B9_HUMAN (+1)	100 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
444	ACLY ACLY variant protein (Fragment)	Q4LE36_HUMAN (+3)	125 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0	
445	CSD1 Cold shock domain-containing protein E1	CSD1_HUMAN (+4)	89 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1,4	0	1,94936	0	
446	PUM3 Pumilio homolog 3	PUM3_HUMAN	74 kDa	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
447	PDSSA SCC-112 protein, isoform CRA_b	GLU116_HUMAN (+1)	151 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1,41421	
448	TTLL12 jilin tyrosine ligase-like family, member 12, isoform CR	AOA024R4U3_HUMAN (+1)	74 kDa	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
449	GPI Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment)	AOA0A0MT52_HUMAN (+3)	65 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
450	RAD50 DNA repair protein RAD50	RAD50_HUMAN	154 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0	
451	RPS7 40S ribosomal protein S7	R57_HUMAN	22 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0
452	PSM1 26S proteasome regulatory subunit 4	PRS4_HUMAN (+2)	49 kDa	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
453	SARG Specifically androgen-regulated gene protein	SARG_HUMAN	64 kDa	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
454	CAZP21 protein (Actin filament) muscle Z-line, alpha 1, isoform	AOA024R0E5_HUMAN (+2)	33 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0,8	0	1,09545	0	
455	BZW2 basic leucine zipper and W2 domains 2, isoform CRA_a	AOA024RA42_HUMAN (+8)	48 kDa	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,8	0	1,09545	0	
456	TNPO1 Transportin 1, isoform CRA_a	AOA024RAM0_HUMAN (+1)	102 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
457	RUVB1.2 RuvB-like 2	RUVB2_HUMAN	51 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0,8	0	1,09545	0	
458	PKP4 Plakophilin-4	AOA095SF60_HUMAN (+2)	134 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
459	VDAC2 Voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a	AOA024QZN9_HUMAN (+3)	34 kDa	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
460	PPF1B Liprin-beta-1	LIP1B_HUMAN	114 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0,8	0	1,09545	0	
461	KTN1 Kinetin 1 (Kinesin receptor), isoform CRA_a	AOA024R6G3_HUMAN (+1)	156 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
462	TRIM25 Tripartite motif-containing 25, isoform CRA_a	D3DTY9_HUMAN (+1)	48 kDa	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	0	1,2	0	1,09545	
463	GART Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	PUR2_HUMAN (+2)	108 kDa	2	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0,8	0,6	1,09545	1,34164	
464	FLOT1 Flotillin-1	FLOT1_HUMAN (+2)	47 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1,41421	
465	NCOA4 Nuclear receptor coactivator 4, isoform CRA_a	AOA024QZ55_HUMAN (+4)	70 kDa	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1,2	0	1,78885	0	
466	CALD1 Caldesmon	E7EX44_HUMAN (+1)	64 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
467	NUP155 Nucleoporin 155kDa, isoform CRA_a	AOA024R071_HUMAN (+3)	155 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	2	3	0,4	1	0,89443	1,41421	
468	TOMM34 Mitochondrial import receptor subunit TOM34	TOM34_HUMAN	35 kDa	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2,23607	0	
469	FLI11806 Nuclear protein UKp68, isoform CRA_a	AOA024R6F2_HUMAN (+4)	48 kDa	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0,6	1,34164	1,34164	
470	cDNA FLJ60461, highly similar to Peroxiredoxin-2 (EC 1.11.1.	B4DF70_HUMAN (+2)	20 kDa	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	1,2	0	1,78885	0	
471	MX2 Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	MX2_HUMAN	82 kDa	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1,41421	0	
472	MX1 Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	MX1_HUMAN	76 kDa	5	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1,4	0	2,19089	0	
473	RAC2 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2_HUMAN (+3)	21 kDa	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0	
474	PLG Plasminogen	AOA0F7G8J1_HUMAN	91 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
475	ARPC5 Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5_HUMAN	16 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0,89443	
476	MPRI2 Myosin phosphatase Rho-interacting protein	MPRI2_HUMAN (+1)	117 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0	
477	SAFB2 Scaffold attachment factor B2	SAFB2_HUMAN	107 kDa	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
478	UBE2M conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast), isof	AOA024R4T4_HUMAN (+1)	21 kDa	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443	
479	LDHB L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN (+1)	37 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0	
480	UBE2D3 conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast), iso	AOA024RDH2_HUMAN (+2)	17 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0	

481	ELAVL1	ELAV-like protein 1	ELAV1_HUMAN	36 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443
482	CSTB	Cystatin-B	CYTB_HUMAN (+1)	11 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
483	C1QTNF3	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein	C1QT3_HUMAN (+3)	27 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
484		cDNA FLJ38393 fis, clone FEBRA2007212	B3KTJ9_HUMAN (+1)	103 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
485	SF3B6	Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6_HUMAN	15 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
486	ILK	Integrin-linked protein kinase	AOA0A0MTH3_HUMAN (+2)	55 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
487	PRG4	Proteoglycan 4, isoform CRA_a	AOA024R930_HUMAN (+3)	151 kDa	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
488	PAICS	oxylase, phosphoribosylaminimidazole succinocarbi	AOA024RD93_HUMAN (+1)	47 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164		
489	XPO1	Exportin-1	XPO1_HUMAN	123 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164		
490	S100A6	Protein S100 (Fragment)	RAGN98_HUMAN (+1)	10 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164		
491	CG_1966	HCG19665, isoform CRA_a	AOA024QZF1_HUMAN (+2)	53 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
492	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	AOA024R6D4_HUMAN (+1)	12 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164		
493	DCTN2	Dynactin subunit 2	DCTN2_HUMAN (+2)	44 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
494	MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (Yeast)	A4D218_HUMAN (+1)	92 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0			
495	NOP10	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	NOP10_HUMAN	8 kDa	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
496	ZNF185	Zinc finger protein 185	ZNF185_HUMAN (+2)	74 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
497	SSBP1	e-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (Frag	AOA0G2JLD8_HUMAN (+6)	16 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
498	DAB2IP	Disabled homolog 2-interacting protein	DAB2IP_HUMAN (+1)	132 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
499	PRPF6	Pre-mRNA-processing factor 6	PRPF6_HUMAN	107 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
500	NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205	NU205_HUMAN	228 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6	0	1,34164			
501	7, highly similar to Homo sapiens superkiller viralicidic activity 2		ABK614_HUMAN (+1)	118 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
502	S100A11	Protein S100-A11	S100A11_HUMAN (+2)	12 kDa	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0		
503	CRISPLD2	steine-rich secretory protein LCCL domain-containing	CRLD2_HUMAN (+2)	56 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
504	DKC1	/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (Fragment	C9IYTO_HUMAN (+3)	30 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1,41421		
505	RPS3A	40S ribosomal protein S3a	ABK4W0_HUMAN (+3)	30 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0		
506	RTCB	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB_HUMAN	55 kDa	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
507	UNC45A	Protein unc-45 homolog A	AOA1W2PNX8_HUMAN (+1)	118 kDa	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1,41421	0		
508	CDC37	cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae), isoform	AOA024R7B7_HUMAN (+2)	44 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
509	PRPF8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRPF8_HUMAN	274 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
510	FTSJ3	pre-rRNA processing protein FTSJ3	SPB1_HUMAN	97 kDa	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0		
511	PHLDB2	strin homology-like domain family B member 2 (Fragm	E9PFQ4_HUMAN (+2)	125 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0		
512	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein	D3DPU2_HUMAN (+6)	52 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0		
513	RPS17	40S ribosomal protein S17	RS17_HUMAN (+2)	16 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
514	ROD1	1 regulator of differentiation 1 (S. pombe), isoform CR	AOA024R163_HUMAN (+1)	60 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0		
515	TUBB3	Tubulin beta-3 chain	TBB3_HUMAN (+1)	50 kDa	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	5,2	0	11,6276		
516	SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1_HUMAN	146 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
517	23, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serin		ABK588_HUMAN (+3)	39 kDa	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
518	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	AOA286YF22_HUMAN (+7)	56 kDa	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
519	GCN11	al control of amino-acid synthesis 1-like 1 (Yeast), isof	AOA024RBS1_HUMAN	267 kDa	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
520	KIFC1	Kinesin-like protein	AOA024RC57_HUMAN (+4)	74 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
521	KRT78	Keratin, type II cytoskeletal 78	K2C78_HUMAN	57 kDa	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	3,57771	0		
522	TRIP6	Thyroid receptor-interacting protein 6	TRIP6_HUMAN	50 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
523		cDNA FLJ60860, highly similar to Histone deacetylase 1	B4DSK9_HUMAN (+13)	27 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6	0	1,34164	0		
524		Protein disulfide-isomerase	B3KJQ2_HUMAN (+3)	55 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
525	VPS35	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	VPS35_HUMAN	92 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6	0	1,34164	0		
526	HIP1R	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	HIP1R_HUMAN (+1)	119 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,4	0	0,89443	0		
527	GTBPB4	Nucleolar GTP-binding protein 1	D2CFK9_HUMAN (+3)	74 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0		
528	MCM7	DNA helicase (Fragment)	AOA052Z4A5_HUMAN (+2)	81 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0		
529	ITGB5	Integrin beta-5	ITB5_HUMAN (+2)	88 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0		
530	CTGF	Connective tissue growth factor	CTGF_HUMAN (+3)	38 kDa	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164		
531	DNITIP2	oxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein	TDIF2_HUMAN	84 kDa	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164		
532	LAMB1	Laminin subunit beta-1	G3XA12_HUMAN (+1)	200 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,8	0	1,09545		
533	277, highly similar to Homo sapiens ribonuclease, RNase A famil		ABK912_HUMAN (+2)	17 kDa	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	1,2	0	1,64317	0		
534	ANP32E	c leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family mem	AN32E_HUMAN (+1)	31 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0		
535	FZp686A1	Uncharacterized protein DKFZp686A1195	Q6MZU1_HUMAN	190 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0,6	0	1,34164	0		
536	FLJ10292	Mago nashi protein	AOA023T6R1_HUMAN (+3)	17 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0,8	0	1,78885	0		
537	KRT80	Keratin, type II cytoskeletal 80	K2C80_HUMAN	51 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
538	LIMD1	LIM domain-containing protein 1	LIMD1_HUMAN (+1)	72 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
539	SRSF3	Serine/arginine-rich-splicing factor 3	AOA087X2D0_HUMAN (+2)	10 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
540	POLR2E	IA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPAB	AOA087WV29_HUMAN (+5)	21 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
541	CCT6A	eronin containing TCP1, subunit 6A (Zeta 1), isoform C	AOA024RD11_HUMAN (+3)	58 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
542	RPS25	40S ribosomal protein S25	RS25_HUMAN	14 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
543	70 fis, clone THYMU2035319, highly similar to RNA-binding regic		B3KWK7_HUMAN (+9)	57 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
544	SH3GL1	Endophilin-A2 (Fragment)	MOQYEO_HUMAN (+4)	14 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
545	U116777 fis, clone BRHIP2029567, highly similar to Cell division c		B3KY60_HUMAN (+2)	92 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
546	similar to Homo sapiens CD3E antigen, epsilon polypeptide assc		ABK818_HUMAN (+1)	55 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
547	RRP8	Ribosomal RNA-processing protein 8	E9PPY3_HUMAN (+1)	34 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0			
548	LRRFIP2	rich repeat (in FLII) interacting protein 2, isoform CI	AOA024R2K4_HUMAN (+1)	84 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
549	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' variant (Frag		Q53G21_HUMAN (+2)	28 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	0		
550	317, highly similar to Homo sapiens retinoblastoma binding proi		ABK6A2_HUMAN (+3)	48 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
551	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD_HUMAN (+4)	53 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
552	SART3	quamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells	SART3_HUMAN	110 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0,4	0	0,89443	0		
553		Uncharacterized protein	F5H423_HUMAN	23 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
554	RPS18	40S ribosomal protein S18	RS18_HUMAN	18 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
555	OGT	icosamine-peptide N-acetylglucosaminyltransferase 3	OGT1_HUMAN	117 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
556	EL-S-169m	Epididymis secretory sperm binding protein Li 169mP	AOA0K0K113_HUMAN	18 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0		
557	ghly similar to Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein pr		B2R802_HUMAN (+3)	31 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,8	0	1,09545	0		
558	I59378, highly similar to Brain-specific angiogenesis inhibitor1-as		B4DQ43_HUMAN (+3)	50 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0			
559		Structural maintenance of chromosomes protein	B3KXX5_HUMAN (+3)	144 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
560	HMGB2	High mobility group protein B2	HMGB2_HUMAN (+1)	24 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0		

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Kristina Čuljak

Datum rođenja: 16.03.1994.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2000.–2008. Osnovna škola Đuro Pilar, Slavonski Brod

2008.–2012. Gimnazija Matija Mesić, Slavonski Brod

2012.–2016. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012.-2016. Volonterski projekt „Znastvene čarolije“

2013.-2018. Otvoreni dan kemijskog odsjeka