

Karakterizacija adhesoma u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 nakon de novo ekspresije integrina αvβ3

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:212111>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**



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

3.2.7.5. <i>Određivanje ekspresije proteina metodom protočne citometrije</i>	29
3.2.7.6. <i>Određivanje lokalizacije proteina paksilina (Y113) metodom imunofluorescencije</i>	30
3.2.7.7. <i>Mikroskopija refleksijskog interferencijskog kontrasta</i>	30
§ 4. REZULTATI	32
4.1. Eksperimentalni model stanica karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 sa različitom 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. Utvrdjivanje 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

Vezanjem 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 klena 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

Ocenitelji:

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 squamous 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

Kristina Čuljak

Diplomski rad

§ 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 , eksprimiraju integrin $\alpha_v\beta_3$ te povećano eksprimiraju integrin $\alpha_v\beta_5$, a putem smanjene ekspresije nereceptorske 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, preživljivanje, 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 eksprimiran u tumorima dojke, prostate i melanomu dok je $\alpha_v\beta_5$ integrin povećano eksprimiran u glioblastomu te tumorima dojke ali je također eksprimiran 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

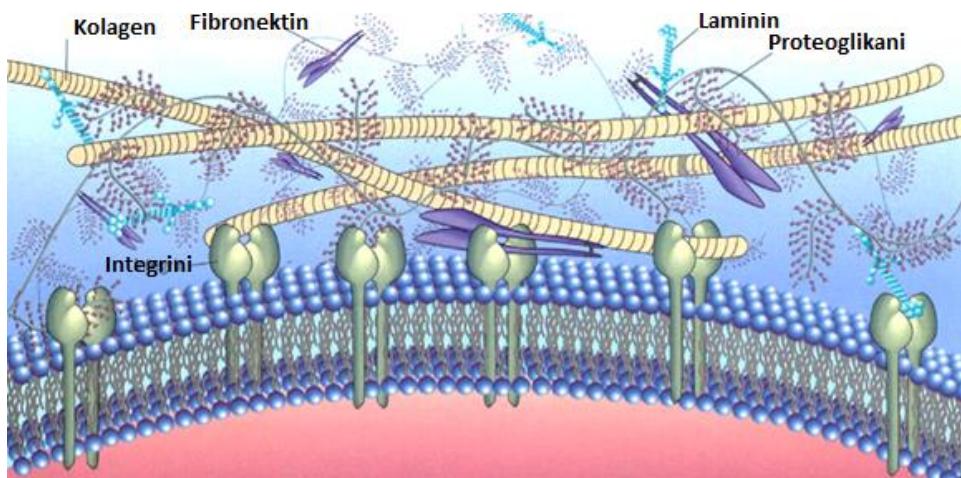
Cilj ovog diplomskog rada je analiza sastava adhesoma stanica Cal27 i usporedba s adhesomom klena Cal27-2B1 dobivenog stabilnom transfekcijom plazmidom koji sadrži gen za podjedinicu integrina β_3 u svrhu boljeg razumijevanja mehanizma otpornosti stanica na protutumorske lijekove te njihove povećane migratorne i invazivne sposobnosti. Korištena je metoda protočne citometrije kako bi se provjerio identitet klena 2B1 nakon odmrzavanja, a u svrhu utvrđivanja otpornosti na cisplatinu klena 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 (α_1 lanci), a treća se razlikuje u kemijskoj strukturi (α_2 lanac).¹² Kolagen izlučuju

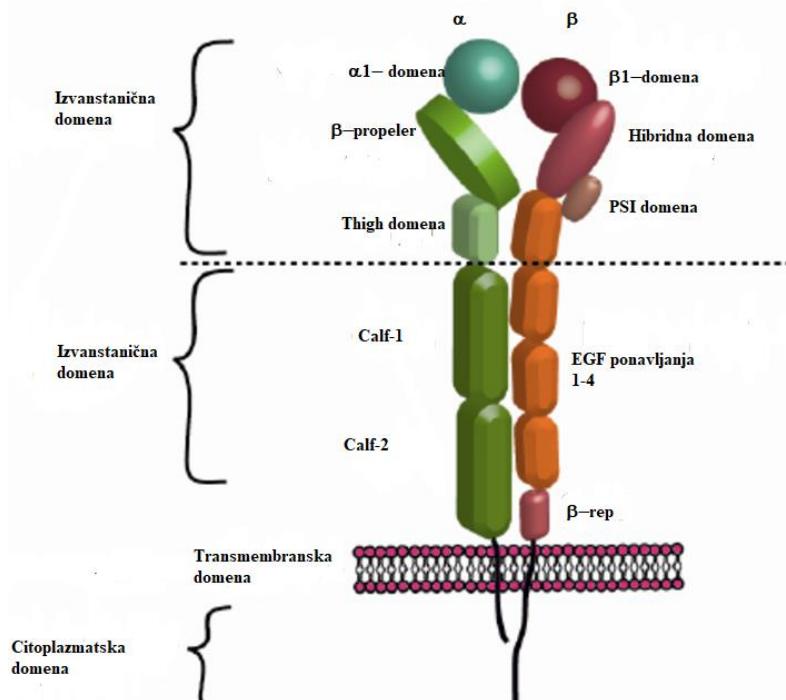
fibroblasti¹³ koji imaju mogućnost organizirati kolagenske uzvojnice u veće supramolekularne strukture kao što su vlakna. Kolagen se veže na elastin, još jedan od proteina ECM koji omogućuje tkivima koja se rastežu da se vrate u prvotno stanje.¹⁴ Elastin je građen od molekula tropoelastina koje stvaraju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

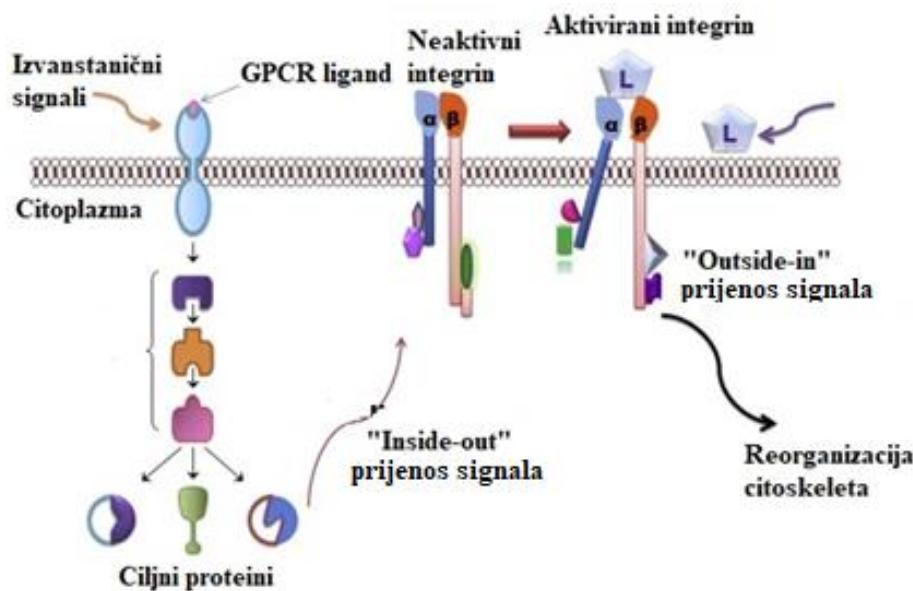
2.2. Integrini

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 preživljjenje, 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 $\beta 1$ -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, preživljjenje 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 dvostruko: 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 mijenjanju 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 stanci (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 ugrožavanju život, primarni uzrok smrti pacijenata. Metastaziranje je proces koji zahtjeva širenje tumora s primarnog na sekundarno mjesto u organizmu, preživljjenje u novoj okolini te proliferaciju. Prilikom mestastaziranja 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, eksprimiran 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 gušteraće.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 nepoznana 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 preživljivanja 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 preživljivanje 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 doksurubicin, usitnu 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 eksprimiraju 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, doksurubicin i 5-fluorouracil putem gubitka pSrc(Y418).¹

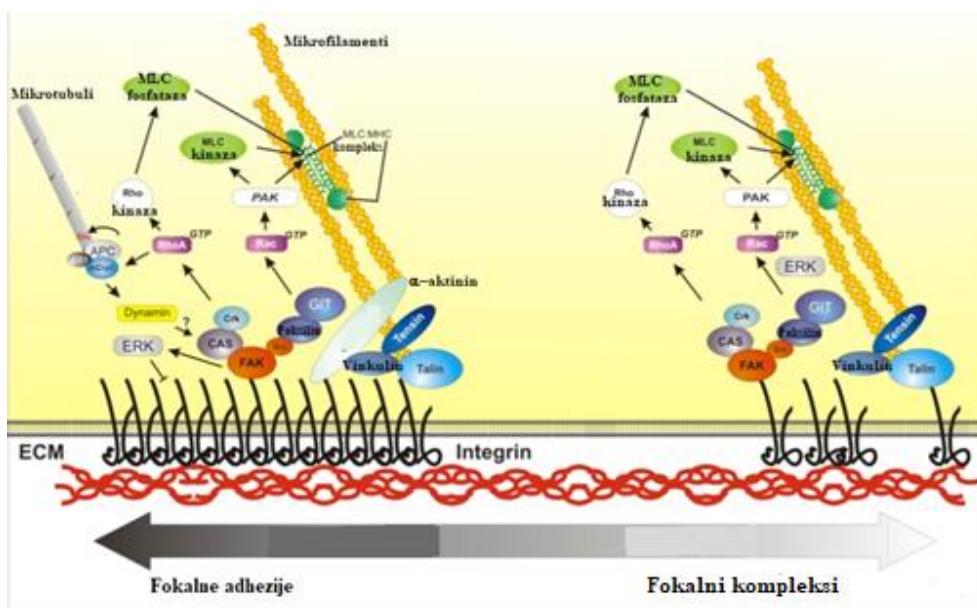
Upravo suprotni pristup u istraživanju i potencijalno u terapiji tumora je utišavanje integrina koje bi moglo učiniti stanice osjetljivima na protutumorske lijekove. Utišavanjem podjedinica integrina β_3 , β_5 , α_v , α_3 i α_4 tumorske stanice glioma postaju osjetljive na temozolomid. Od četiri stanične 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)

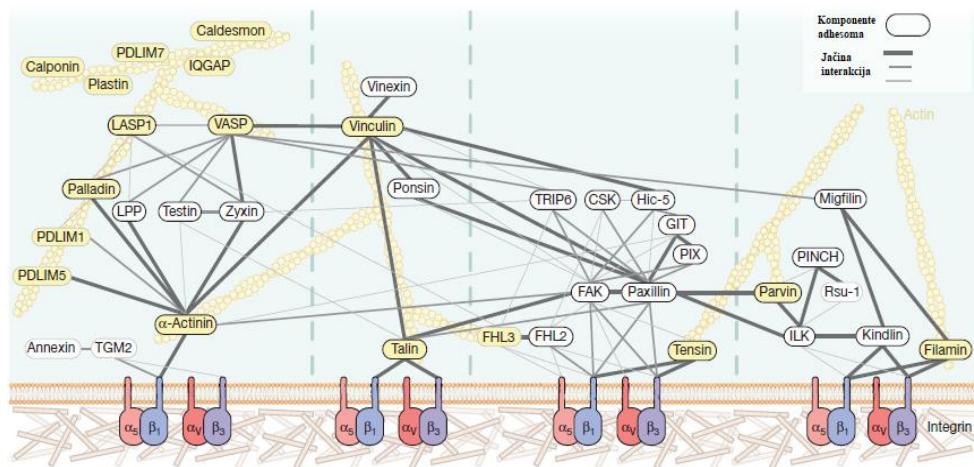
Vezanjem integrina na komponente ECM dolazi do nakupljanja integrina (engl. *clustering*) i nastanka dinamičnog makromolekularnog kompleksa adhezije integrina (engl. *integrin adhesion complex*, IAC) odnosno fokalnih adhezija. Komponente fokalnih adhezija osim strukturne, imaju ulogu prenošenja signala u ECM i obrnuto kako bi kontrolirali razne funkcije u staniči. 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 (vezanjem 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 najčešćalije 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 različitim debljinom linije ovisno o tome kolika je jačina interakcije među pojedinim proteinima. Deblje crne linije predstavljaju interakcije potvrđene u adhesoru 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-prolil izomeraza B). Preuzeto i prilagođeno iz Horton i sur.⁵

2.3.1. Sastav fokalnih adhezija

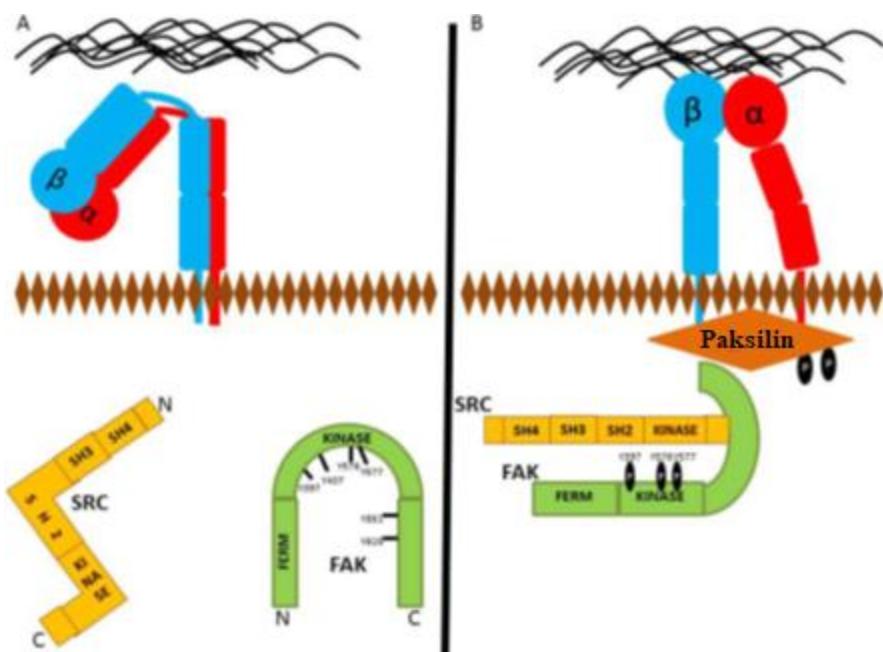
Struktura novostvorenih adhezija (fokalni kompleksi), koja nastaje prije nakupljanja integrina i stvaranja fokalnih adhezija, stvara se blizu samog ruba migratornih stanica. Fokalni kompleksi sadrže nekoliko stotina proteina uključujući integrine, talin i paksilin.⁴⁵ Novačenjem ostalih proteina pod utjecajem aktinsko-miozinskog mehanizma nastaju fokalne adhezije, iako točan mehanizam i redoslijed novačenja proteina još uvijek nije razjašnjen.⁶ Razvoj učinkovite i reproducibilne metode za izolaciju adhesoma i analize spektrometrijom masa uvelike je doprinio dalnjim 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, nereceptorska 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 regutiranje proteina paksilin. B) Vezanjem 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 Maziveyi 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 endotelnih 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 nereceptorskog 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 preživljenu stanicu tumora, mnogo toga još nije jasno. Zapravo, postoji vrlo malo literaturnih podataka o adhesoru 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 squamous 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	Proizvodač
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podlage (engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)	Invitrogen, SAD
Serum fetusa goveda (engl. fetal calf serum, 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
Agaroza	Serva, Njemačka
Akrilamid	Serva, Njemačka

Bisakrilamid	Serva, Njemačka
2-merkaptoetanol	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
Razvijač	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/streptomicinom
Medij za zamrzavanje stanica	950 µL suspenzije stanica u DMEM-FCS + 50 µL DMSO
PBS fosfatni pufer (bez Ca²⁺ i Mg²⁺), PBSΔ	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, BSA</i>) 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 µg/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 ₂ O, čuva se pri 4°C
TBST pufer (TBS sa 0,1% Tween-20)	100 mL pufera 10X TBS + 900 mL deH ₂ O + 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 ₂ O. 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 ₂ O, čuva se pri 4°C

Transfer pufer	50 mL Tris-glicinski pufer + 350 mL H ₂ O + 100 mL metanola
6X SB pufer (engl. sample buffer 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-merkaptoetanola, 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 podesi dodatkom 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 podesi 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 mikroeprevute (do 14000 x g)	Eppendorf, Njemačka
Svetlosni 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
Boćice 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 mikroepruvete 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 LeicaTSC SP2	Leica Microsystems, Njemačka
Vaga	Tehnica, Slovenija
Uredaj za elektroforezu u gelu agaroze (kadica, češalj, kalup za izljevanje gela)	Hoefer 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	Proizvodač	Kataloški broj	γ/mgmL^{-1}	Razrjedenje
Primarna protutijela	Izotipska kontrola, IgG	Miš	Sigma Aldrich, SAD	M5284	0,2	1:50 u PBSΔ
	Podjedinica integrina α_v	Miš	CalBioChem, SAD	407286	1	1:50 u PBSΔ
	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 PBSΔ
	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-PBSΔ
	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% mljeka u TBST
	EEA1	Zec	Cell Signaling Technology, SAD	2411s, LOT3	1	1:1000 u 10 mL 5% mljeka u TBST
	LDH	Zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc33781	0,2	1:400 u 10 mL 5% mljeka

						u TBST
Sekundarna protutijela	Fluorescin 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. Presadivanje stanica

Kada stanice iscrpe hranjivu podlogu, potrebno ih je presaditi, 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 određiva 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 uvezši 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 μ L DMSO, a ampula se postavi na držać 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% CO_2 . 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 nasadjuju 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:

$$\text{preživljenje (\%)} = (\text{apsorbancija stanica izloženih djelovanju citostatika} - \text{apsorbancija negativne kontrole}) / (\text{apsorbancija kontrolnih stanica} - \text{apsorbancija negativne kontrole})$$

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 izdvajaju 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 nasadjeni 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 PBSΔ. 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 PBSΔ 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 redoslijedom 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 PBSΔ, 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 Cu²⁺ u Cu⁺ ione u lužnatom mediju, pomoću reagensa koji sadrži 2-(4-karboksikolin-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), naneseni u duplikatima po 10 µL u mikrotitarsku pločicu nakon čega je dodano 200 µL 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 µL 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 molekulskog 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 poglavljju 3.2.7.2.

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

Sastav 10%-tnog gela za razdvajanje	Volumen
diH ₂ O	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
diH ₂ O	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 kadicu 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 fotografском 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% nemasnem 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 izrežu te stavlju u jedan bunarić perforirane pločice s 96 bunarića. Proteini se zatim tretiraju ditiotreitolom 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 izrežu te stavlju u jedan bunarić perforirane pločice s 96 bunarića. Proteini se zatim tretiraju ditiotreitolom 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% popunjenoosti podloge (jedan dan nakon nasadijanja), isprane s PBSΔ te odvojene od podloge s 0,5 mM EDTA. Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven te je dodano 5 mL PBSΔ. 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 klona. Uzorci su nakon inkubacije primarnim protutijelom isprani s 1 mL PBSΔ, centrifugirani 5 minuta (1100 rpm) te je postupak ponovljen, uklanjanjem 950 μ L supernatanta pazeći da stanice uvijek ostanu u 50 μ L PBSΔ. Potom je slijedilo obilježavanje

sekundarnim kozjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina, obilježenim fluorescin 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 nasađene 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

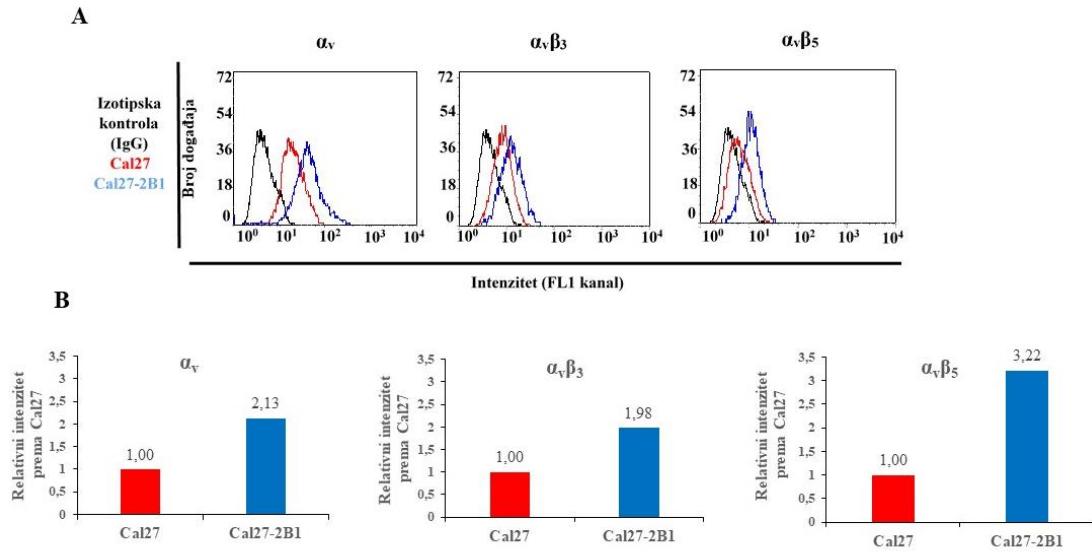
Stanice na stakalcima su isprane s PBSΔ na sobnoj temperaturi, a potom fiksirane s metanolom (-20°C) 3 minute na sobnoj temperaturi. Nakon još jednog ispiranja s PBSΔ (3 puta po 5 minuta), stanice su uklopljene u podlogu za uklapanje na predmetno stakalce. Uzorci su analizirani na konfokalnom mikroskopu 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 laboratorijskih istraživanja 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 , eksprimiraju 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

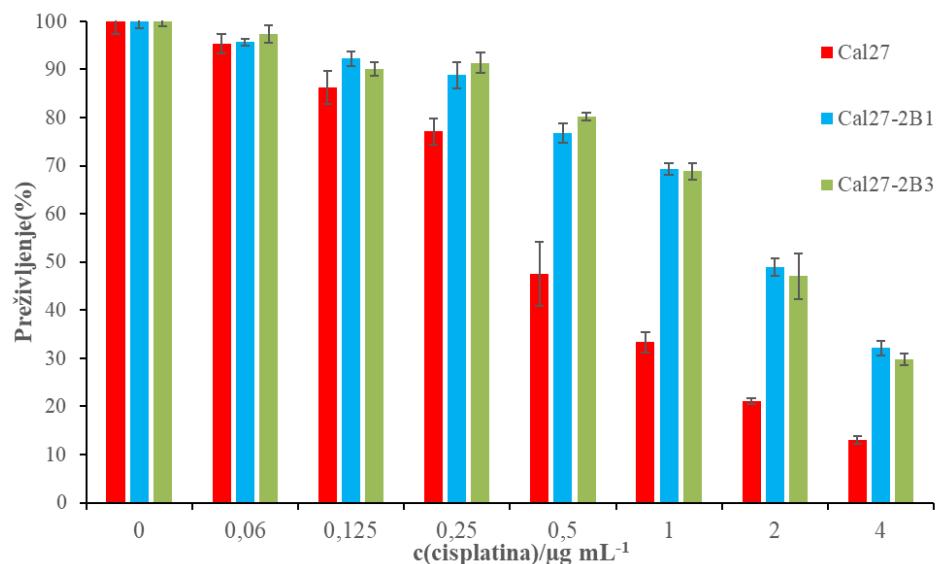
Cilj ovog istraživanja je usporedba adhesoma stanica Cal27 i jednog stabilno transficiranog klena, Cal27-2B1. Kako bi se nakon odmrzavanja stanica provjerio njegov identitet u odnosu na roditeljsku staničnu liniju Cal27, mjerena je ekspresija podjedinice integrina α_v i heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$ 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 mјeren 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, doksurubicin 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.

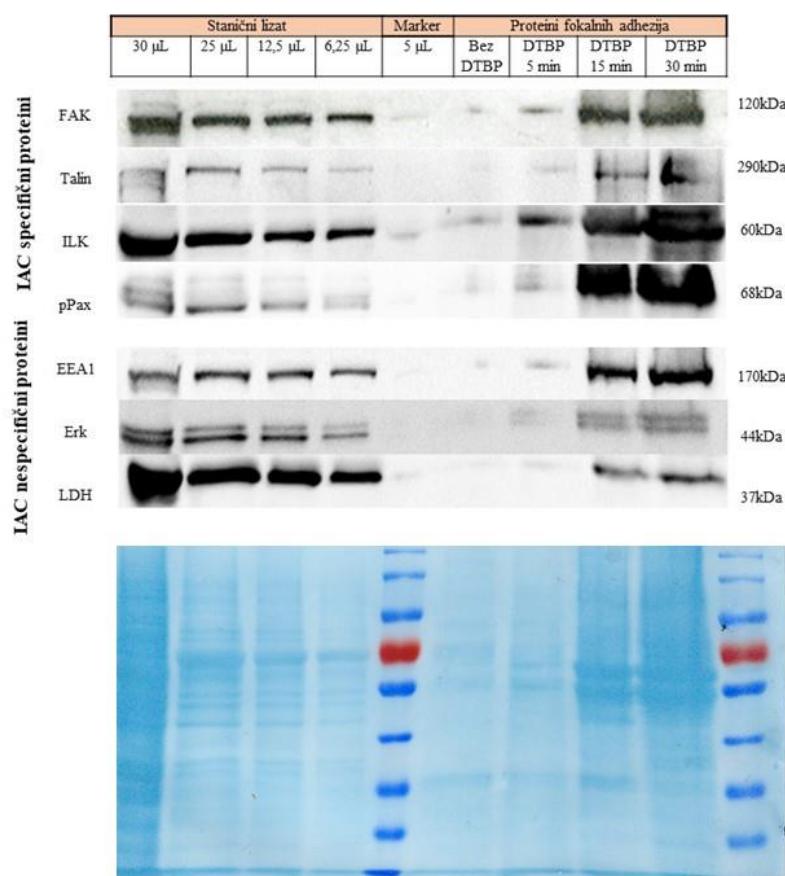


Slika 8. Osjetljivost stanica Cal27, Cal27-2B1 i Cal27-2B3 na cisplatinu. Stanice Cal27, Cal27-2B1 i Cal27-2B3 nasuđene su u pločicu za uzgoj stanica s 96 bunarića te su nakon 24 sata dodane različite koncentracije cisplatine. Preživljenje je praćeno MTT testom, 72 sata nakon dodatka protutumorskog lijeka i prikazano kao postotak preživljenja stanica prema stanicama koje nisu izložene cisplatini +/- 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 (poglavlja 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 bubrežima 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 prezivljjenje 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 odabранo 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 nasadene 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 odgovorajućim sekundarnim protutijelima obilježenim enzimom peroksidaza. Detekcija je izvršena pomoću kemiluminiscentnog reagensa, a intenzitet kemiluminiscentnog signala izmjerен je pomoću uređaja Uvitek Alliance 4.7 Cambridge. B) Za vizualizaciju proteina nakon prijenosa na nitroceluloznu mebranu (western blot), membrana je obojana Amido Black otopinom 1 minuta 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 uzorka u gel (3 min, 200V) omogućio je robusniji sustav za daljnju

obradu. Kako bi lakše vizualizirali proteine unutar gela, gelovi se bojaju 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 ditiotreitolom, 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/koeficijent) 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	-	+
	MPRIP 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 prolij 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	-	+

Proteini koji se vežu na RNA	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	+	+
	hnRNP K (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	+	+

ATP-azna aktivnost	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 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 incijacijski 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 $\beta 1$	-	+
	Laminin, podjedinica $\alpha 5$	+	+
	Laminin, podjedinica $\gamma 1$	-	+
	Vitronektin	+	+
	<i>Junction plakoglobin</i>	+	+
	Keratin 1	+	+
	IGFBP7 (engl. <i>Insulin-like growth factor- binding protein 7</i>)	-	+
	Fibronektin	+	+
	Filamin B	+	+
	Desmoplakin	+	+
	Plektin	+	+
	Kolagen $\alpha 1(IV)$ lanac	-	+
	Kolagen $\alpha 2(IV)$ 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>)	+	+
Proteini koji se vežu na Ca²⁺	Elongacijski factor 2	+	+
	Aneksin A1	+	+
	Matrilin-2	-	+
Vezikularni promet	Heparan sulfat proteoglikan 2 (Perlekan)	+	+
	Klatrin, teški lanac 1	+	+
Ostalo	Gliceraldehid-3- fosfat dehidrogenaza	+	+
	Tenascin C	+	+
	TINAGL1 (engl. <i>Tubulointerstitial nephritis antigen-</i>	+	+

	<i>like 1)</i>		
	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	+	+

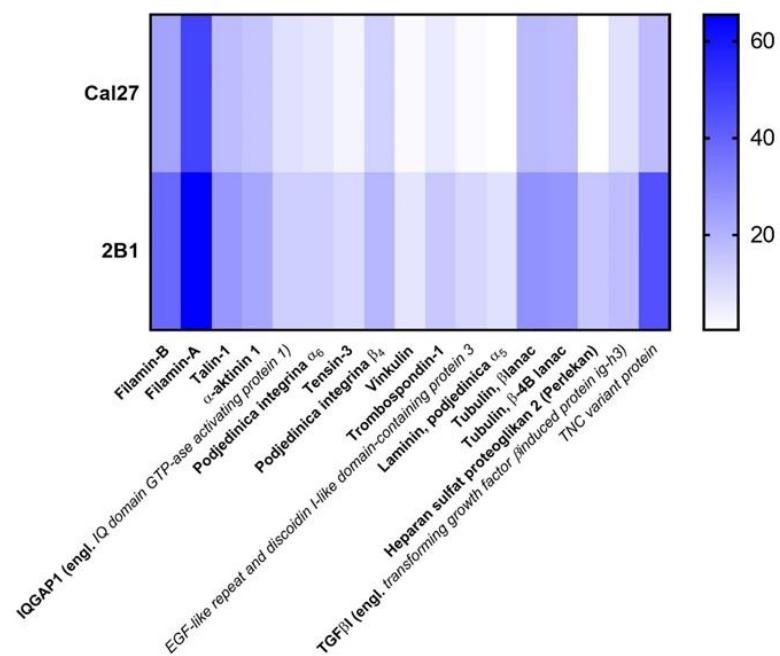
* Funkcionalna analiza proteina fokalnih adhezija napravljena je prema podjeli iz rada

Zaidel-Bar i suradnika⁶⁵

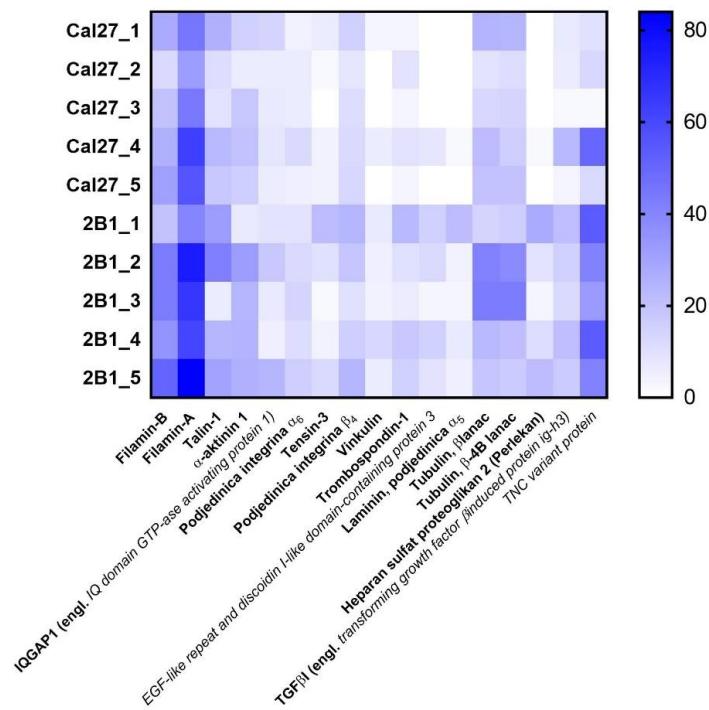
Tablica 7. Proteini fokalnih adhezija i ECM koji pokazuju različitu ekspresiju u stanicama Cal27 i Cal27-2B1 s pripadnim standardnim devijacijama

		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	TGF β I (engl. <i>transforming growth factor beta-induced protein ig-h3)</i>	8,2 \pm 8,6	17,2 \pm 3,9
	17	Tenascin C	17,4 \pm 18,8	44,6 \pm 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 eksprimirani u stanicama Cal27 i Cal27-2B1.



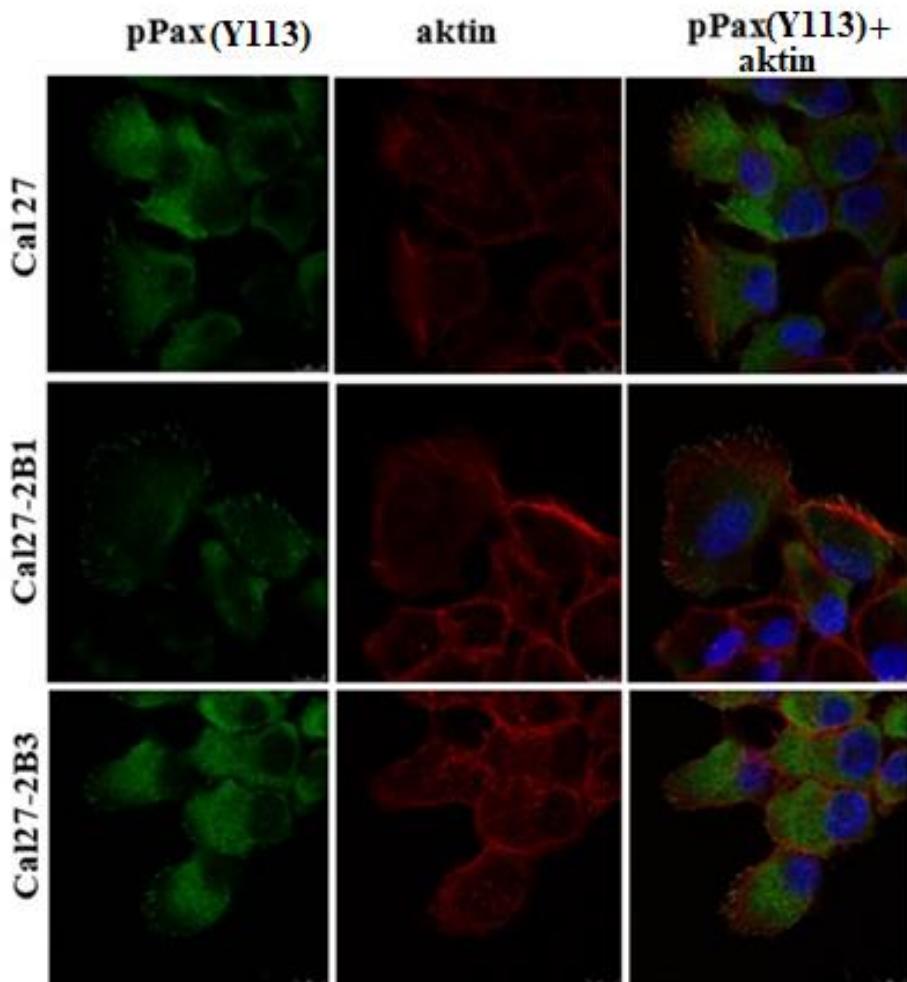
Slika 11. Prikaz različite ekspresije proteina u stanicama Cal27 i Cal27-2B1. Mapa je napravljena pomoću programa GraphPad Prism (inačica 7.0). Prikazani su proteini s prosječnim vrijednostima broja spektara iz pet neovisnih setova uzoraka.

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

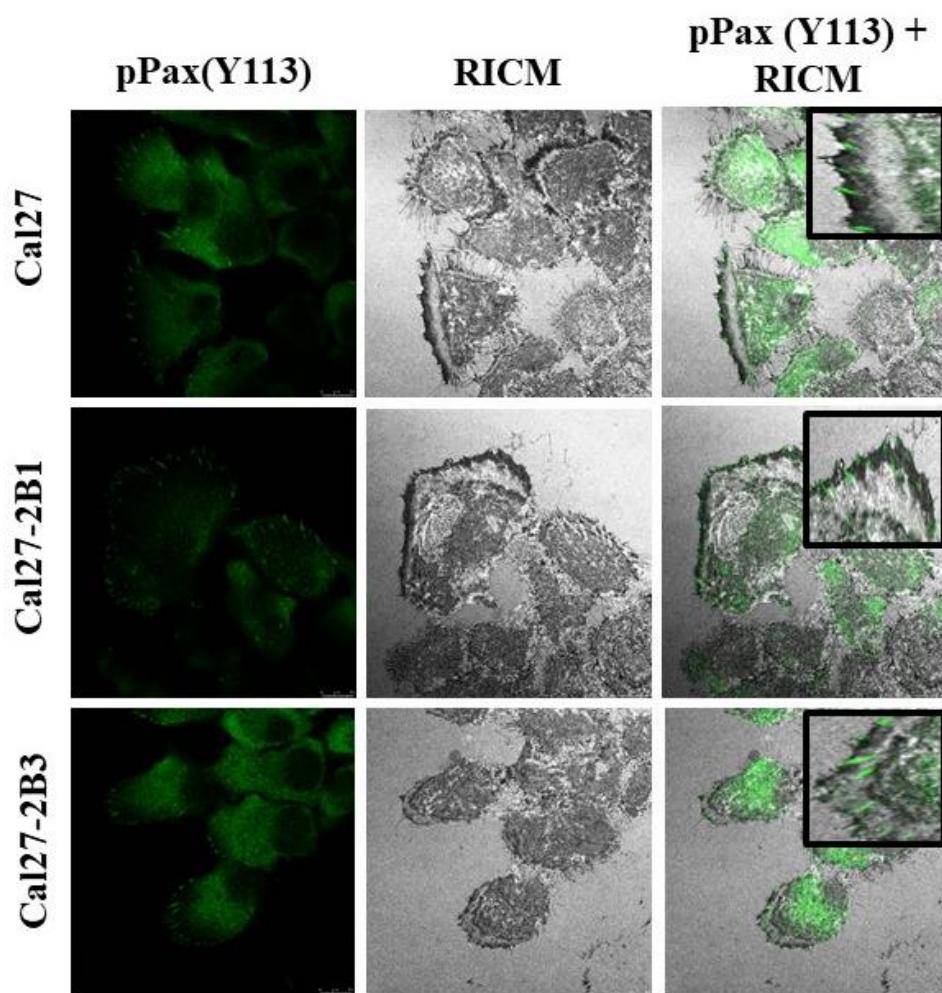
Za lokalizaciju pPax u stanicama Cal27 te klonovima Cal27-2B1 i Cal27-2B3 korištena je metoda imunofluorescencije u kojoj su stanice obilježene protutijelom specifičnim za pPax(Y113) te faloidinom obilježenim fluorescentnom bojom FITC koji se veže na aktin. Prema rezultatima prikazanim na Slici 12 pPax(Y113) 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. Stalice 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). Zacrnjenja na slikama posljedica su interferencije reflektiranog svjetla s površine stakla i reflektiranog svjetla s površine stanica. pPax kolokalizira sa zacrnjenjima na slici.

§ 5. RASPRAVA

Integrini djeluju kao mesta 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 stаницe 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 stаницe 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). Stаницe Cal27-2B1 pokazale su povećanu migraciju i invaziju u odnosu na Cal27 stаницe.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. Mjeranjem 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. Mjeranjem ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ u ovim klonovima, pokazano je da u prva tri klena 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 klena 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 podjedinicima. Na staničnom modelu Cal27, mjeranjem 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 . Prepostavlja 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 odabранo 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 prepostaviti 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 primjenjene 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 daljna 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 daljnjim 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, prepostavljamo da se na ovm stanicama nalazi povećana ekspresija heterodimera $\alpha_6\beta_4$. Možemo prepostaviti 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-vezujući 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 nereceptorsku tirozin kinazu Src, te da ekspresija tensina u stanicama NIH3T3 utječe na transformaciju i migraciju tih stanica potaknuta 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) prepostaviti 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 prepostaviti 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 stanic 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 pokazuju 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 adhesoru 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 prepostavljamo 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 matriks 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. Cheresh, *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, *Semmin. 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. Grönhelm, *Biochim. Biophys. Acta* **1790** (2009) 431–444.
- [24] J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *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. Pract.* **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. Cheresh, *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. Cheresh, *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. Cheresh, *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. Dobreva, 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), Welcome 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. Giroldi, P. P. Bringuer, 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. Hulskens, 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.

§ 8. DODATAK

#	Gen	Proteini	Pristupni broj	Molekulska masa/kDa	Broj spektara										Prosječni broj spektara	Standardna devijacija		
					Cal27_1	2B1_1	Cal27_2	2B1_2	Cal27_3	2B1_3	Cal27_4	2B1_4	Cal27_5	2B1_5	Cal27	2B1	Cal27	2B1
1	PLEC	Plectin	PLEC_HUMAN	532 kDa	150	147	93	153	134	57	112	92	185	193	134,8	128,4	35,42174473	53,7289
2	KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	K2C5_HUMAN	62 kDa	111	48	162	100	182	133	136	66	228	145	163,8	98,4	44,76829235	41,7169
3	KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14	K1C14_HUMAN	52 kDa	100	32	144	77	190	134	108	53	211	118	150,6	82,8	49,038676018	42,9034
4	AHNK	1st differentiation-associated protein	AHNK_HUMAN	629 kDa	93	36	56	60	71	35	71	24	169	61	92	43,2	45,02221674	16,4833
5	FLNA	Filamin-A	Q50FE5_HUMAN (+1)	278 kDa	45	40	32	75	44	66	63	61	56	84	48	65,2	11,93733639	16,6042
6	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	K2C6A_HUMAN (+2)	60 kDa	54	30	108	54	142	91	67	39	140	97	102,2	62,2	40,64726313	30,343
7	LAMB3	Laminin subunit beta-3	LAMB3_HUMAN (+1)	130 kDa	32	44	33	50	16	49	69	68	30	51	36	52,4	19,68501969	9,12688
8	DSP	Desmoplakin	DESP_HUMAN	332 kDa	57	16	43	53	54	20	23	11	77	87	50,8	37,4	19,80403999	32,2537
9	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	54 kDa	47	54	38	46	45	76	69	51	51	60	50	57,4	11,61895004	11,5672
10	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	42 kDa	33	20	26	52	27	71	64	52	37	50	37,4	49	15,53383404	18,3303
11	MYH9	Myosin-9	MYH9_HUMAN (+1)	227 kDa	44	47	30	55	38	17	45	28	58	86	43	46,6	10,29563014	26,6702
12	KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	K1C18_HUMAN (+1)	48 kDa	39	40	33	52	29	55	47	34	39	46	37,4	45,4	6,841052551	8,90969
13	LAMA3	Laminin subunit alpha-3	LAMA3_HUMAN (+1)	367 kDa	18	42	40	33	11	39	60	55	21	43	30	42,4	19,91307075	8,04984
14	LMNA	Prelamin A/C	LMNA_HUMAN	74 kDa	44	5	14	49	45	39	49	26	46	36	39,6	31	14,43260198	16,6883
15	TNC	TNC variant protein (Fragment)	Q4LE33_HUMAN (+1)	244 kDa	10	54	13	41	2	33	50	54	12	41	17,4	44,6	18,72965563	9,1815
16	HNRNPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	HNRNP_HUMAN	78 kDa	33	6	21	50	20	22	34	23	25	45	26,6	29,2	6,58027551	18,1025
17	KRT17	Keratin, type I cytoskeletal 17	K1C17_HUMAN	48 kDa	35	19	36	40	51	82	47	33	72	45	48,2	43,8	14,98999666	23,4883
18	ACTN4	Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN (+1)	105 kDa	29	18	10	40	29	36	40	31	31	40	27,8	33	10,94074952	9,16515
19	LAMC2	Laminin subunit gamma-2	LAMC2_HUMAN	131 kDa	16	33	25	31	5	33	43	37	19	36	21,6	34	13,99285532	2,44949
20	FLNB	Filamin-B	FLNB_HUMAN	278 kDa	28	20	12	43	20	43	26	35	31	51	23,4	38,4	7,53657473	11,7388
21	KRT1	Keratin 1	H6VRF8_HUMAN (+4)	66 kDa	11	24	18	25	17	37	38	30	51	31	27	29,4	16,83745824	5,22494
22	HSPB4	Heat shock cognate 70 kDa protein	HSP7C_HUMAN (+1)	71 kDa	27	9	25	29	29	27	23	19	24	31	25,6	23	2,408138916	9,05539
23	TUBB	Tubulin beta chain	Q5SU16_HUMAN (+1)	50 kDa	25	14	9	41	13	43	22	23	20	19	17,8	28	6,610597552	13,1909
24	TUN1	Talin-1	A0A1S5UZ07_HUMAN	271 kDa	26	32	11	42	9	6	23	24	18	30	17,4	26,8	7,368853371	13,3116
25	KRT15	Keratin, type I cytoskeletal 15	K1C15_HUMAN	49 kDa	25	8	33	22	40	56	44	23	53	23	39	26,4	10,65363788	17,7285
26	TUBB	Tubulin alpha chain	B3KP53_HUMAN (+1)	46 kDa	23	9	10	29	20	30	17	16	14	15	16,8	19,8	5,06951674	9,25743
27	ANXA2	Anxinin	A0A024R5Z7_HUMAN (+2)	39 kDa	19	8	12	17	17	22	26	15	25	22	19,8	16,8	5,805170109	5,80517
28	ITGB4	Integrin beta-4	ITB4_HUMAN (+4)	202 kDa	15	24	8	19	11	10	12	16	13	24	11,8	18,6	2,558435281	5,89915
29	JUP	Junction plakoglobin	PLAK_HUMAN (+2)	82 kDa	21	6	11	15	14	23	19	11	20	25	17	16	4,301162634	8
30	HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1B	A0AG2JW1V1_HUMAN (+3)	70 kDa	21	11	11	15	14	24	27	18	16	22	17,8	18	6,300793601	5,24404
31	CYR61	Protein CYR61	CYR61_HUMAN (+1)	42 kDa	6	19	14	16	5	7	19	21	10	19	10,8	16,4	5,805170109	5,54977
32	SPTAN1	nectrin alpha chain, non-erythrocytic	A0AD95GF6_HUMAN (+1)	288 kDa	18	5	7	22	4	5	21	12	21	16	14,2	12	8,1055353625	7,13437
33	TGFB1	ting growth factor-beta-induced protein	BGH3_HUMAN (+1)	75 kDa	7	21	6	15	2	12	23	21	3	17	8,2	17,2	8,52642949	3,89872
34	KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	K1C9_HUMAN	62 kDa	10	14	11	9	7	21	19	15	20	14	13,4	14,6	5,770451529	4,27785
35	NPM1	Nucleophosmin	NPM_HUMAN (+1)	33 kDa	16	0	6	18	14	19	16	8	11	11	12,6	11,2	4,21904622	7,79102
36	KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16	K1C16_HUMAN	51 kDa	33	16	64	43	88	70	43	26	80	52	61,6	41,4	23,47977853	21,3026
37	PP1A	3'peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PP1A_HUMAN (+2)	18 kDa	8	9	6	17	13	17	13	12	15	15	10,4	14	3,209361307	3,4641
38	PKP1	Plakophilin-1	PKP1_HUMAN (+1)	83 kDa	12	0	11	6	22	28	13	3	16	13	14,8	10	4,438468204	11,158
39	PPL	Periplakin	PEPL_HUMAN (+1)	205 kDa	21	4	8	11	13	2	14	2	22	11	15,6	6	5,856620186	4,63681
40	PKP3	Plakophilin-3	PKP3_HUMAN	87 kDa	13	3	10	15	8	19	12	10	10	12	10,6	11,8	1,949358869	5,97495
41	IQGAP1	GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGA1_HUMAN (+1)	189 kDa	14	9	6	18	7	7	8	5	6	24	8,2	12,6	3,346640108	8,08084
42	ITGA6	Integrin alpha-6	ITAG_HUMAN	127 kDa	4	9	6	12	6	14	12	11	5	16	6,6	12,4	3,130495168	2,70185
43	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	59 kDa	14	16	16	16	14	26	27	21	28	18	19,8	19,4	7,085195834	4,219
44	HIST1H1E	Histone H1e	A3R0T8_HUMAN (+2)	22 kDa	4	23	8	14	2	6	14	10	2	2	6	11	5,099019514	8,06262
45	EEF2	Elongation factor 2	EF2_HUMAN	95 kDa	9	9	2	19	12	7	6	4	11	17	8	11	4,062019202	6,49615
46	THBS1	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	129 kDa	3	23	9	10	3	6	9	18	3	15	5,4	14,4	3,286335345	6,65582
47	SPTBN1	Spectrin beta chain	A0A087WU23_HUMAN (+2)	275 kDa	9	0	3	18	5	0	5	8	14	16	7,2	8,4	4,381704086	8,53229
48	GAPDH	aldehyde-3 phosphate dehydrogen	G3P_HUMAN (+1)	36 kDa	8	7	3	14	8	11	10	11	6	7	7	10	2,645751311	3
49	KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2	K2C22_HUMAN	65 kDa	12	25	28	27	25	38	33	21	39	28	27,4	27,8	10,11434625	6,30079
50	PRKDC	Dependent protein kinase catalytic sub	PRKDC_HUMAN	469 kDa	16	0	2	17	11	0	0	0	6	29	7	9,2	6,557438524	13,2929
51	ENO1	Alpha-enolase	ENO1A_HUMAN (+1)	47 kDa	9	2	4	12	7	16	14	17	3	5	7,4	10,4	4,393176529	6,65582
52	MATR3	Matri-3	A0A04J2E8B_HUMAN (+2)	95 kDa	16	0	4	12	9	7	10	4	5	12	8,8	7	4,7644517	5,19615
53	HIST1H2BD	Histone H2B	A0A024QZ27_HUMAN (+1)	14 kDa	9	4	8	11	6	11	10	9	8	6	8,2	8,2	1,483239697	3,11448
54	HIST1H4H	Histone H4	B2R40_HUMAN (+2)	11 kDa	10	7	5	12	6	12	7	10	9	8	7,4	9,8	2,073644339	2,28035
55	NAFL53619	Highly similar to heat shock protein	B4DG10_HUMAN	82 kDa	10	4	4	18	5	8	9	5	3	14	6,2	9,8	3,1144823	6,01664
56	PRDX1	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN (+1)	22 kDa	5	4	6	13	7	16	8	8	9	11	7	10,4	1,58113883	4,61519
57	LMNB1	Lamin-B1	LMNB1_HUMAN	66 kDa	6	0	0	16	14	2	12	4	15	12	9,4	6,8	6,308724118	6,87023
58	ACTN1	Alpha-actinin-1	ACTN1_HUMAN (+1)	103 kDa	15	7	6	32	18	24	20	25	16	26	15	22,8	3,385164807	9,36483
59	VTN	Vitronectin	VTNC_HUMAN (+1)	54 kDa	5	7	7	8	4	8	8	17	9	7	8	7,8	5,196152433	0,83666
60	LMNB2	Lamin-B2	LMNB2_HUMAN	70 kDa	6	0	2	17	13	8	7	3	13	20	8,2	9,6	4,7644517	8,67756
61	TNS3	Tensin-3	TNS3_HUMAN (+1)	155 kDa	6	22	2	10	0	2	4	4	12	3,2	10	2,28035085	7,87401	
62	HSPG2	flate proteoglycan 2 (Perlecan), isoform	A0A024RA6B_HUMAN	464 kDa	0	28	0	9	0	3	2	11	0	22	0,4	14,6	0,894427191	10,1637
63	FASN	Fatty acid synthase	FAS_HUMAN (+1)	273 kDa	22	1												

82	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN (+1)	39 kDa	12	0	0	10	0	7	10	6	2	6	4,8	5,8	5,76194	3,63318
83	TMPO	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	LAP2A_HUMAN	75 kDa	11	0	2	7	4	5	10	2	7	8	6,8	4,4	3,83406	3,36155
84	NUP153	Nuclear pore complex protein Nup153	NU153_HUMAN (+1)	154 kDa	6	0	2	6	9	4	5	0	18	5	8	3	6,12372	2,82843
85	PRSS23	Serine protease 23	PRS23_HUMAN (+1)	43 kDa	4	9	3	9	2	3	13	8	3	7	5	7,2	4,52769	2,88998
86	RANBP2	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RBP2_HUMAN	358 kDa	8	0	0	14	6	0	0	0	12	10	5,2	4,8	5,21536	6,72309
87	MYL6	Myosin light polypeptide 6	B72624_HUMAN (+5)	27 kDa	2	2	3	9	4	11	8	11	0	4	3,4	7,4	2,96648	4,15933
88	HIST1H1B	Histone H1.5	H15_HUMAN	23 kDa	4	13	10	12	0	5	14	11	5	0	6,6	8,2	5,45894	5,54076
89	GDF15	Growth/differentiation factor 15	GDF15_HUMAN	34 kDa	0	12	0	9	0	0	7	12	0	6	1,4	7,8	3,1305	5,01996
90	PCBP1	Poly(C)-binding protein 1	PCBP1_HUMAN (+1)	37 kDa	3	7	5	6	7	9	5	3	4	3	4,8	5,6	1,48324	2,60768
91	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1_HUMAN (+2)	238 kDa	14	0	3	7	9	0	3	0	10	6	7,8	2,6	4,76445	3,57771
92	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_HUMAN (+7)	50 kDa	4	10	4	8	6	4	6	4	3	8	4,6	6,8	1,34164	2,68328
93	ALB	Serum albumin	ALBU_HUMAN (+5)	69 kDa	2	7	0	7	3	6	11	9	4	3	4	6,4	4,1833	2,19089
94	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5_HUMAN	69 kDa	8	0	0	12	3	5	8	0	5	3	4,8	4	3,42053	4,94975
95	RPL32	60S ribosomal protein L32	R32_HUMAN (+3)	16 kDa	2	8	6	8	0	0	7	6	2	6	3,4	5,6	2,96648	3,28634
96	TUBB4B	Tubulin beta-4B chain	TBB4B_HUMAN (+1)	50 kDa	24	16	11	38	14	43	16	21	20	17	17	27	5,09092	12,5897
97	SFN	14-3-3 protein sigma	143S5_HUMAN	28 kDa	0	0	4	5	10	15	6	6	9	6	5,8	6,4	4,02492	5,41295
98	VCL	Vinculin	VINC_HUMAN (+2)	124 kDa	3	7	0	5	0	4	6	13	0	6	1,8	7	2,68328	3,35553
99	GLNC1	Globin C1	A0A1KGX21_HUMAN	19 kDa	4	5	0	10	2	5	7	2	4	3	6,2	2,64575	2,38747	
100	PKM	Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN (+1)	58 kDa	8	8	2	8	2	2	5	2	0	9	3,4	5,8	3,13053	3,49285
101	DDX21	Nucleolar RNA helicase 2	DDX21_HUMAN	87 kDa	8	0	0	10	5	0	3	3	9	9	5	4,4	3,67423	4,82701
102	PLS3	Plastin-3	PLST_HUMAN	71 kDa	0	0	2	5	2	16	8	10	3	4	3	7	3	6,16461
103	KPNB1	Importin subunit beta-1	IMB1_HUMAN (+1)	97 kDa	5	3	5	5	5	5	6	5	3	5	4,4	0	1,34164	
104	RPS8	40S ribosomal protein S8	R58_HUMAN (+1)	24 kDa	4	3	2	8	6	6	7	7	0	6	3,8	6	2,86356	1,87083
105	RPL23A	60S ribosomal protein L23	R32_HUMAN (+2)	15 kDa	8	0	4	10	5	7	4	3	2	6	4,6	5,2	2,19089	3,83406
106	RPL15	60S ribosomal protein L15	R15_HUMAN (+1)	24 kDa	5	2	4	11	7	2	2	2	4	6	4,4	4,6	1,81659	3,97492
107	CRYBG1	Beta/gamma crystallin domain-containing protein 1	A0A0J9YWL_HUMAN	232 kDa	2	8	0	12	2	0	2	4	2	9	1,6	6,6	0,89443	4,66905
108	DSG2	Desmoglein-2	DSG2_HUMAN	122 kDa	5	0	3	5	5	4	3	2	6	7	4,4	3,6	1,34164	2,70185
109	RPL28	60S ribosomal protein L28	R32_HUMAN (+1)	16 kDa	4	3	3	7	3	5	4	4	4	5	3,6	4,8	0,54772	1,48324
110	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	B5MDF5_HUMAN (+2)	26 kDa	3	4	5	3	6	5	6	0	6	5	5,2	3,4	1,30384	2,07364
111	HSP95	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_HUMAN (+1)	72 kDa	8	0	3	7	5	11	6	4	4	8	5,2	6	1,92354	4,18333
112	SQSTM1	Sequestosome-1	SQSTM_HUMAN	48 kDa	12	2	4	3	5	4	5	2	4	2	6	2,6	3,39116	0,89443
113	DSG3	Desmoglein-3	DSG3_HUMAN (+1)	108 kDa	6	0	4	2	5	11	3	2	6	4	4,8	3,8	1,30384	4,26615
114	KPK2	Plakophilin-2	KPK2_HUMAN	97 kDa	7	0	0	5	6	3	6	0	6	4	5	2,4	2,82843	2,30217
115	LAMAS	Laminin subunit alpha-5	LAMAS_HUMAN	400 kDa	0	22	0	4	0	3	2	7	0	5	0,4	8,2	0,89443	7,85493
116	RPL7A	60S ribosomal protein L7	RL7_HUMAN	29 kDa	4	0	3	9	0	0	2	0	4	3	2,6	2,4	1,67332	3,91152
117	FUBP3	Far upstream element-binding protein 3	FUBP3_HUMAN (+1)	62 kDa	7	3	0	8	2	5	8	2	0	6	3,4	4,8	3,87408	2,38747
118	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	RL7A_HUMAN	30 kDa	6	2	4	6	3	3	4	2	3	4	4	3,4	1,22474	1,67332
119	CAV1	Caveolin-1	CAV1_HUMAN (+1)	20 kDa	3	0	7	8	5	2	3	0	4	3	4,4	2,6	1,67332	3,28634
120	EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	IF5A1_HUMAN (+2)	17 kDa	7	2	0	10	2	4	5	2	2	4	3,2	4,4	2,77489	3,28634
121	GSTP1	Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMAN (+1)	23 kDa	5	5	2	3	3	5	5	2	3	3	3,6	3,6	1,34164	1,34164
122	RPS11	40S ribosomal protein S11	RS11_HUMAN	18 kDa	2	3	2	5	3	4	5	4	3	4	3	4	1,22474	0,70711
123		Testicular tissue protein Li 82	0A140VJK6_HUMAN	77 kDa	7	3	0	11	0	0	0	0	4	7	2,2	4,2	3,19374	4,76445
124	LUZP1	Leucine zipper protein 1	LUZP1_HUMAN (+1)	120 kDa	0	4	0	8	2	0	5	3	4	5	2,2	4	2,28035	2,91548
125	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN (+2)	51 kDa	8	0	0	10	0	7	3	5	0	2	2,2	4,8	3,49285	3,96232
126	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNU_HUMAN (+2)	91 kDa	2	0	2	8	5	0	4	3	4	6	3,4	3,4	1,34164	0,89443
127	RPL8	60S ribosomal protein L8	RL8_HUMAN	28 kDa	4	5	0	7	2	3	4	3	4	2	2,8	4	1,78885	2
128	KHSRP	Far upstream element-binding protein 2	FUBP2_HUMAN (+1)	73 kDa	3	0	0	11	0	12	5	6	2	3	2	6,4	2,12132	5,12835
129	PP1R13L	RelA-associated inhibitor	IA5PP_HUMAN (+1)	89 kDa	2	3	0	4	2	2	4	4	3	3	2,2	3,2	1,48324	0,83666
130	RPL24	60S ribosomal protein L24	RL24_HUMAN	18 kDa	0	3	0	6	6	4	5	2	4	5	3	4	2,82843	1,58114
131	HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN (+2)	49 kDa	5	0	0	7	3	4	0	6	3	3	2,2	4	2,16795	2,73861
132	TNKS1BP1	182 kDa tankyrase-1-binding protein	TB182_HUMAN (+1)	182 kDa	2	0	0	6	0	8	5	4	5	4	2,4	4,4	2,50998	2,96648
133	ADENYL	Adenosine deaminase, RNA-specific isoform ADAR-a variant (Fr	Q59ECO_HUMAN	138 kDa	7	0	3	5	4	0	0	0	3	2	3,4	1,4	2,50998	2,19089
134	CTNND1	Catenin delta-1	C9JZR2_HUMAN (+3)	105 kDa	9	0	2	5	0	2	5	0	2	2	3,6	1,8	3,50714	2,04939
135	RPL23A	60S ribosomal protein L23a	RL23A_HUMAN	18 kDa	2	3	2	3	0	0	10	7	2	0	3,2	2,6	3,89872	2,88097
136	3NA	FLJ96568, highly similar to Homo sapiens tropomyosin 3 (TP	B2RDE1_HUMAN	29 kDa	2	0	0	4	2	9	7	6	3	5	2,8	4,8	2,58844	3,27109
137	RPL21	60S ribosomal protein L21	RL21_HUMAN (+1)	19 kDa	4	0	4	4	4	2	5	2	4	5	4,2	2,6	0,44721	1,94936
138	cDNA FLJ59399, highly similar to Keratin, type II cytoskeleton 4D8R7_HUMAN (+3)	54 kDa	8	0	11	3	9	5	6	0	10	0	8,8	1,6	1,92354	2,30217		
139	HTRA1	Serine protease HTRA1	HTRA1_HUMAN	51 kDa	0	13	2	2	0	5	2	5	0	7	0,8	6,4	1,09545	4,09878
140	MK67	Proliferation marker protein Ki-67	KI67_HUMAN	359 kDa	5	0	2	2	3	0	0	0	16	0	5,2	0,4	6,30079	0,89443
141	GFBP1	Fibroblast growth factor-binding protein 1	FGFP1_HUMAN	26 kDa	0	3	3	4	3	3	6	4	3	3	3,4	3,4	2,12132	0,54772
142	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRPC_HUMAN (+1)	34 kDa	4	2	0	7	0	4	3	0	2	6	1,8	3,8	1,78885	2,86356
143	DKK1	Dickkopf-related protein 1	DKK1_HUMAN	29 kDa	2	4	2	4	0	4	5	8	3	4	2,4	4,8	1,81659	1,78885
144	EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	IF4A1_HUMAN (+1)	46 kDa	4	4	3	5	0	0	3	0	3	1,4	3	1,94936	1,87083	
145	CFL1	Cofilin-1	E9PK25_HUMAN	23 kDa	5	2	0	3	2	4	3	4	2	4	2,4	3,4	1,81659	0,89443
146	TXN	Thioredoxin	THIO_HUMAN (+1)	12 kDa	6	0	2	2	3	7	3	3	4	3,4	3,2	1,51658	2,58844	
147	HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRL_HUMAN (+2)	64 kDa	10	0	0	4	0	4	2	2	5	2,8	3	4,14729	2	
148	CLTC	Clathrin heavy chain 1	CLH1_HUMAN (+1)	192 kDa	4	0	0	11	5	0	2	0	2	8	2,6	3,8	1,94936	5,31037
149	RSL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RL1D1_HUMAN	55 kDa	6	0	0	0	4	2	3	2	2	4	3	1,6	2,23607	1,67332
150	RPL27A	Ribosomal protein L27a	Q6NZ52_HUMAN (+1)	16 kDa	2	2	4	3	3	2	7	4	3	2,8	2,6	1,92354	0,89443	
151	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1_HUMAN (+3)	21 kDa	0	3	2	3	2	4	4	7	2	3	2	4	1,41421	1,73205
152	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	EF1G_HUMAN (+1)	50 kDa	3	3												

161	RPL18	Ribosomal protein L18, isoform CRA_c	l0A024QZD1_HUMAN (+5	22 kDa	3	4	0	4	3	5	6	3	3	2	3	3,6	2,12132	1,14018	
162	LG_19893	HCG1989366, isoform CRA_a	l0A024R4X7_HUMAN (+1	50 kDa	5	0	0	2	0	6	8	0	2	0	3	1,6	3,4641	2,60768	
163	IA_FLU13913	fis, clone Y79AA1000231, highly similar to Nucleolar	B3K8N82_HUMAN	52 kDa	5	0	2	7	3	0	4	0	5	7	3,8	2,8	1,30384	3,83406	
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	9	8	15	1,6	9	3,57771	5,52268	
167	H3FB8	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	3,20217	
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)	l0A05224N5_HUMAN (+2	77 kDa	3	0	2	4	0	4	4	0	3	4	2,4	2,4	1,51658	2,19089	
173	YWHA8	14-3-3 protein beta/alpha	143B8_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	3,79492	
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	3,89872	
176	ar to Homo sapiens stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp	A8K690_HUMAN (+2)	63 kDa	4	2	0	5	0	4	4	2	0	3	1,6	3,2	2,19089	1,30384		
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	2,50988	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	Polyprymidine tract-binding protein 1	AOAOU1RRM4_HUMAN	62 kDa	0	0	0	3	0	7	5	3	0	6	1	3,8	2,23607	2,77489	
180	F2	Prothrombin	THRB_HUMAN (+2)	70 kDa	0	5	3	2	0	2	8	8	0	0	2,2	3,4	3,49283	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)	M0QY1_HUMAN	24 kDa	3	2	0	4	0	2	0	0	4	2	1,4	2	1,94936	1,41421	
183	U16494	clone CTONG3004576, highly similar to Keratin, type	B3KWF5_HUMAN	49 kDa	25	0	0	21	36	56	42	24	50	0	30,6	20,2	19,856	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	1,22474	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	NOP5F	Nucleolar protein 56	NOP56_HUMAN (+2)	66 kDa	4	0	0	4	6	2	2	0	3	5	3	2,2	2,23607	2,28035	
187	NUP214	Nucleoporin 214kDa, isoform CRA_b	l0A024R8B6_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	G3V3A4_HUMAN (+1)	65 kDa	4	0	0	6	0	5	2	2	2	0	1,6	2,6	1,67332	2,79285	
189	EPPLK1	Epiplakin	EPPL_HUMAN	556 kDa	0	7	0	13	0	0	0	0	2	5	0,4	5	0,89443	5,43139	
190	HMGBL1	High-mobility group box 1, isoform CRA_a	l0A024RDR0_HUMAN (+1	25 kDa	4	3	2	2	4	0	3	3	0	0	2,6	1,6	1,67332	1,51658	
191	HRNPf	terogenous nuclear ribonucleoprotein F, isoform CRA0A024R773_HUMAN (+1	45 kDa	4	0	0	4	0	8	2	0	3	3	1,8	3	1,78885	3,31662		
192	SEC16A	Protein transport protein sec16	F1T01L_HUMAN	249 kDa	0	0	2	6	0	2	3	0	5	4	2	2,4	2,12132	2,60768	
193	ILF3	Interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa, isoform CRA0A024R7C7_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(C)-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	INRNP2A2B	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		HFC1	l0A223PQH6_HUMAN (+1	209 kDa	2	0	0	6	2	7	0	0	2	2	1,2	3	1,09545	3,13662	
198	RBPM4	RNA-binding protein 4	RBPM4_HUMAN	40 kDa	6	0	0	3	0	2	2	2	0	2	1,4	2,44949	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	2,122474	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	3,28634	
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	DNAJ1A1	DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJ1_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	RP56	40S ribosomal protein S6	A2A3R6_HUMAN (+2)	29 kDa	4	0	0	6	3	2	3	0	2	0	2,4	1,6	1,67332	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	RP59	40S ribosomal protein S9	RS9_HUMAN (+1)	23 kDa	0	3	0	3	3	4	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	143T_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	2	4	2	2	1,4	2,4	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	MYBB1A	Myb-binding protein 1A	MBB1A_HUMAN	149 kDa	3	0	2	5	2	0	0	2	0	2	1,8	1	1,09545	2,23607	
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	2,12132	
218	FTH1	Ferritin	l0A024R525_HUMAN (+4	21 kDa	3	0	0	0	5	3	3	0	0	0	0	2,2	0,6	2,16795	1,34164
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	RP54X	40S ribosomal protein S4, Xisomform	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	2,122474	1,94936	
223	RP51A	40S ribosomal protein S15a	RS15A_HUMAN (+2)	15 kDa	2	0	3	4	2	3	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	H3BPE1_HUMAN (+1)	857 kDa	3	0	0	0	2	0	0	0	3	3	1,6	0,6	1,51658	1,34164	
226	TAGLN2	Transgelin-2	TAGL2_HUMAN	22 kDa	0	0	0	0	2	7	5	3	0	0	1,4	2	2,19089	3,08221	
227	NOP2	b2bile 285 rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransfera	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 (Frag	l0A0522429_HUMAN (+2	54 kDa	2	0	2	3	2	2	3	0	3	1,6	2,2	0,89443	1,30384		
230	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_HUMAN (+2)	29 k															

241	UTRN	Urophilin	UTRO_HUMAN	394 kDa	0	3	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2,2	0	2,04939	
242	ACP1	<i>μ</i> -molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase catalytic subunit	PPAC_HUMAN (+1)	18 kDa	4	0	0	2	3	3	0	0	0	2	1,4	1,4	1,94936	1,34164	
243	RNHL1	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	H1_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	ARP3C	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARP3C_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	COH1_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 factor ATP-dependent RNA helicase	B4E05E_HUMAN (+1)	90 kDa	0	0	0	4	2	0	0	0	2	4	0,8	1,6	1,09545	2,19089		
250	CSNK1A1	Casitin kinase I isoform alpha	KC1A_HUMAN (+1)	39 kDa	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	2,48996	
252		Testicular secretory protein Li 53	VA140VK53_HUMAN (+2)	300 kDa	4	0	0	4	3	0	0	0	0	3	2	2	1,2	1,87083	1,78885
253	XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRC5_HUMAN	83 kDa	4	0	0	7	2	0	0	0	0	3	0	1,8	1,4	1,78885	3,1305
254	AHNAK2	Protein AHNAK2	AHNK2_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	VA024RME2_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	VA024RC4C_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	
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	
265	DNAJ17	homo sapiens ribosomal protein S10	AS87ND_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	5,1658	0,89443	
267	RPL36AL	60S ribosomal protein L36a-like	RL36L_HUMAN	12 kDa	3	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	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	16 kDa	0	3	0	0	0	2	5	4	0	0	1	1,8	2,23607	1,78885	
270	C4B_2	Complement C4-B	VA00G2JL54_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_e	D3DU23_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	
273	MYO1B	Unconventional myosin-Ib	MYO1B_HUMAN (+2)	132 kDa	3	2	0	2	4	0	0	0	0	2	1,4	1,2	1,94936	1,09545	
274	SFPQ	online/glutamine-rich Polypropidimide 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	BOQZ18_HUMAN (+2)	60 kDa	3	0	2	2	0	0	2	0	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	
280	GSN	Gelsolin	VA0AD0M551_HUMAN (+ε)	83 kDa	0	2	2	0	0	0	4	2	0	0	1,2	0,8	1,78885	0,09545	
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	VA0A24R9W7_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	VA0A24R5M3_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	1,2	1,41421	1,64317	
287	ZC3H8V1	Zinc finger CCHC-type antiviral protein 1	ZCHCH_HUMAN (+2)	101 kDa	3	0	0	3	0	0	2	0	0	3	1	1,2	1,41421	1,78885	
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	0	1,78885	0	
289	DYNLL2	Dynein light chain 2, cytoplasmic	DYD2_HUMAN	10 kDa	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	0	1,2	0	1,78885	
290	RPL27	60S ribosomal protein L27	RL27_HUMAN	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	VA0A87XK7_HUMAN (+5)	69 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0,4	0,8	1,2	0,89443	2,68328
293	SEPT7	Septin-7	SEPT7_HUMAN (+7)	51 kDa	0	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0,4	1	0	1,41421	0
294	POLR2A	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	RPB1_HUMAN	217 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1,41421	0
295	CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	VA0AC4DG09_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)	15 kDa	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0,8	0	1,09545	
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	VA0A24R1U0_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	RBMB28	RNA binding motif protein 28 isoform 1	VA0A24R753_HUMAN (+1)	86 kDa	2	0	0	2	5	0	0	0	4	2	2,2	0,6	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	0	1	0,4	2,23607	0,89443	
305	DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYHC1_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	YWHAZ	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	TUBB6	Tubulin beta chain	Q2NKYS_HUMAN	50 kDa	0	0	0	0	6	20	0	0	0	0	1,2	4	1,78885	8,94427	
309	PPP2R1A	i-e-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit <i>f</i>	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	Dna																	

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	RS16_HUMAN (+1)	16 kDa	0	0	0	3	2	3	0	0	0	2	0,4	1,6	0,89443	1,51658	
323	NUDT21	ribose diphosphate linked moiety X)-type motif 21, isoform CRA_0A024R6W2_HUMAN (+2	26 kDa	0	0	0	2	0	4	2	2	0	0	0,4	1,6	0,89443	1,67332		
324	CAPZB	g protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform B1AK87_HUMAN (+3)	29 kDa	0	0	0	0	0	4	0	3	0	0	0	0	1,4	0	1,94936	
325	SET	SET	Q5VX93_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	S01_HUMAN	264 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,2	0	1,78885	0	
327	RPS13	40S ribosomal protein S13	RS13_HUMAN	17 kDa	0	0	2	3	0	3	2	0	0	0	0,8	1,2	0,9545	1,64317	
328	ATPB5	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN (+2)	57 kDa	0	0	0	2	0	2	0	2	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	0,4	0	0,89443	0	
330	NAT10	RNA cytidine acetyltransferase	lOA087WV29_HUMAN (+1)	94 kDa	0	0	0	2	4	0	0	0	2	2	1,2	0,8	1,78885	1,09545	
331	RAE1	mRNA export factor	RAE1L_HUMAN	41 kDa	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	1,4	0	3,1305		
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	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-XVIIa	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	
337	EPRS	Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	SYEP_HUMAN	171 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	5	0	1,6	0	2,30217	
338	MTA2	metastasis associated 1 family, member 2, isoform CRA_0A024R534_HUMAN (+1	75 kDa	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	2	0	0,73861		
339	RPL30	60S ribosomal protein L30	RL30_HUMAN (+2)	13 kDa	0	0	2	2	0	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	2	0	2	0	2	0	0	0	1,2	0	1,09545	0	
341	RPL9	NPC-A-16	Q5Z07_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	lOA024RDY0_HUMAN (+2	124 kDa	4	0	0	0	2	0	2	0	0	0	1,6	0	1,67332	0	
343		Sulphydryl oxidase	A8K4C2_HUMAN	67 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1,2	0	1,78885	
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	SM3D_HUMAN	14 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164		
346	AHCY	Adenosylhomocysteinate	SAHH_HUMAN (+1)	48 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3	0	1,4	0	1,94936	
347	PXN	Paxillin; isoform CRA_e	lOA14OV1Q8_HUMAN (+2	65 kDa	0	2	0	5	0	0	0	2	0	0	0	1,8	0	2,04939	
348	HNRNPH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRRH2_HUMAN	49 kDa	5	0	0	4	0	0	0	0	0	3	1	1,4	2,23607	1,94936	
349	SNU13	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	F5_HUMAN (+1)	252 kDa	0	0	0	0	0	0	5	4	0	0	1	0,8	2,23607	1,78885	
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	
352	GAPVD1	je-activating protein and VP95 domain-containing prot	GAPD1_HUMAN (+4)	165 kDa	2	0	0	0	3	0	0	0	0	2	1	0,8	1,41421	1,09545	
353	387 fts, clone PLACE6005546, highly similar	Similar Polymerase I and tr	B3KRY5_HUMAN (+3)	39 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0,4	0,8	0,89443	1,09545	
354	lar to Homo sapiens acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acet	Acetyl-CoA acetyltransferase 2 (acet)	A8K4W5_HUMAN (+2)	41 kDa	0	0	0	3	0	3	0	2	0	0	0	1,6	0	1,51658	
355	NUP107	Nuclear pore complex protein Nup107	NU107_HUMAN	106 kDa	0	0	0	2	3	0	0	0	2	0	1	0,4	1,41421	0,89443	
356	IFT13	Interferon-induced protein with tetrapeptide repeat	IFT13_HUMAN (+1)	56 kDa	4	0	0	0	0	2	4	0	0	0	1,6	0,4	2,19089	0,89443	
357	UBTF	Nuclear transcription factor 1	E9PK7_HUMAN	87 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
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	1,78885	
359	r to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	f	B4DMY3_HUMAN (+4)	35 kDa	2	0	0	2	0	4	2	0	0	0	0,8	1,2	0,89443	1,09545	
360	SART1	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	SNUT1_HUMAN	90 kDa	4	0	3	2	0	0	0	0	2	0	1,8	0	1,78885	0,89443	
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	0,30315	
362	hly similar to Homo sapiens general transcription factor II, I (GTF	l	A8K9W7_HUMAN (+7)	110 kDa	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1,2	0,4	2,68328	0,89443	
363	NSUN2	tRNA (cytosine-34)(C5)-methyltransferase	NSUN2_HUMAN	86 kDa	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2,23607	0	
364	H1FO	Histone H1O	H1O_HUMAN	21 kDa	0	3	0	0	0	0	4	2	0	0	0,8	1	1,78885	1,41421	
365	FBL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	FBLR_HUMAN	34 kDa	0	0	0	4	2	2	0	0	0	0	0,4	1,2	0,89443	1,78885	
366	lIST1H2B	Histone H2B type 1-O	B2B10_HUMAN	14 kDa	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	2	2	4,47214	4,47214	
367		Nuclear pore complex protein Nup93	A8K897_HUMAN (+1)	93 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6	0	1,34164
368	HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, isoform CRA_b	lOA024RDB6_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	2	0	0	3	2	0	0	0,6	0,8	1,34164	1,09545	
369		Testicular tissue protein Li 75	lOA140V1K1_HUMAN (+1)	37 kDa	2	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0,8	0,8	1,09545	1,09545	
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	
371	PDLIM4	PDZ and LIM domain protein 4	PDLI4_HUMAN	35 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	1,2	0	1,09545	
372	RPL29	60S ribosomal protein L29	RL29_HUMAN (+2)	18 kDa	0	2	0	2	0	0	0	0	2	0	0	1,2	0	1,09545	
373	OAS3	-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa, isoform CRA_b	lOA024RBQ5_HUMAN (+2	121 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	0	
374	EMD	Emerin	EMD_HUMAN	29 kDa	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0	0	1,2	0	1,78885	
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	
376	BXDC2	BXDC2 protein (Fragment)	A0IQLQ5_HUMAN (+2)	39 kDa	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0,6	1	1,34164	1,41421
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	0,89443	0,89443	
378	TOP1	Topoisomerase (DNA) I	B9EG90_HUMAN (+1)	91 kDa	2	0	0	3	0	2	0	0	2	0	0,8	1	1,09545	1,41421	
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	
380	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN	61 kDa	0	0	0	0	0	3	2	3	0	0	0,4	1,2	0,89443	1,64317	
381	RP55	Ribosomal protein S5, isoform CRA_a	lOA024RQ55_HUMAN (+4)	23 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
382	COL4A1	Collagen alpha-1(IV) chain	C04A1_HUMAN	161 kDa	0	4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1,2	0	1,78885	
383	DXD18	RNA helicase	lOA024RAHB8_HUMAN (+2)	75 kDa	2	0	0	3	3	0	0	0	0	0	2	1	1	1,41421	1,41421
384	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Fragment)	A0A0AO0MRM9_HUMAN	75 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0,8	0,89443	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	
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	
387	SLAIN2	HCG17415, isoform CRA_a	lOA024RBT6_HUMAN (+1)	63 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
388	TNS4	Tensin-4	TENS4_HUMAN	77 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	
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	
390	HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1, isoform CRA_a	lOA024RDQD0_HUMAN (+2)	92 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0,4	0,4	0,89443	0,89443
391	ACTR2	Actin-related protein 2	ARP2_HUMAN	45 kDa	0														

401	A FLJ59571, highly similar to Eukaryotic translation initiation fac-	B4DZF2_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	RS20_HUMAN	13 kDa	0	0	0	0	0	3	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	0,6	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	0,4	1,4	0,89443	1,94936		
405	NCOR2	Nuclear receptor co-repressor 2, isoform CRA_c	A0A024RB53_HUMAN (+6)	274 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	1,2	0	1,78885	0	
406	DIDO1	Death-inducer obligator 1	DIDO1_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	A0A16HPD_HUMAN (+3)	99 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	1,6	0	2,19089	
408	CDK1	ell division cycle 2, G1 to S and G2 to M, isoform CRA_c	A0A024QZP7_HUMAN (+2)	34 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
409	lCG_2448*	HCG2448T, isoform CRA_c	A0A024R261_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	A0A024QZY1_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 HMG-box DNA binding protein	A8KAE0_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 autoantigen factor 1, isoform CRA_a	A0A024R5H0_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/l) large subunit, isoform CRA_a	A0A024R580_HUMAN (+3)	82 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	1	0	1,41421	0	
419	PDCD11	Protein RAMPs homolog	RRP5_HUMAN	209 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0,8	0	1,09545	
420	SNRPB	lil nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and C	RSMB_HUMAN (+3)	25 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164		
421	RBM27	RNA-binding protein 27	RBMB27_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	I2434 f, 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' exonuclease	B3KMC9_HUMAN (+2)	109 kDa	3	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0,6	1	1,34164	1,41421		
425	HNRPH3	neuronal nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9), isoform	A0A024QZK8_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0,1	0	1,41421		
426	IMPDH2	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment)	HOYR1_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	Germlinal center-associated nuclear protein	GANP_HUMAN	218 kDa	0	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	0	0	0,4	0,6	0,8	1,34164	1,78885
430	RAP1B	AP1B1, member of RAS oncogene family, isoform CRA_i	A0A024RB87_HUMAN (+6)	21 kDa	21	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0,6	0,4	1,34164	0,89443	
431	cDNA FU54030, highly similar to Polymerase III promoter-interacting protein	B4E0L0_HUMAN (+4)	48 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0		
432	RPR1B	Lation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein	RPR1B_HUMAN	37 kDa	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	1	0	1,41421	
433	SUMO1	Small ubiquitin-related modifier	A0A024R3Z2_HUMAN (+2)	12 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0	
434		Serine/threonine-protein phosphatase	A0A140VJS9_HUMAN (+1)	39 kDa	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1,41421	
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	A0C6A_HUMAN (+1)	47 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0,8	0	1,09545		
437	ALDH16A1	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	A16A1_HUMAN	85 kDa	0	0	2	2	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	A0A024RBW0_HUMAN (+1)	47 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	1,6	0	2,19089		
439	G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1_HUMAN (+2)	52 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0,8	0	1,09545		
440	CAD	CAD protein	PVR1_HUMAN (+2)	243 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,4	0,6	0,89443	1,34164	
441	SSSCA1	legion syndrome/scleroderma autoantigen 1 (Frager	HOYE86_HUMAN (+1)	21 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
442	TP1	Triosephosphate isomerase	TPIS_HUMAN (+2)	31 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
443	LEM3	LEM domain-containing 3, isoform CRA_a	A0A024RB99_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		
445	CSD1	Cold shock domain-containing protein E1	CSE1_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	0,4	0,6	0,89443	1,34164		
447	PD55A	SCC-112 protein, isoform CRA_b	G1U16_HUMAN (+1)	151 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1,41421	
448	TTL112	jlin tyrosine ligase-like family, member 12, isoform CR	A0A024RAU3_HUMAN (+1)	74 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
449	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment)	A0A040MT52_HUMAN (+3)	65 kDa	0	0	0	3	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	0	2	0	0,4	0	0,89443	
451	RPS7	40S ribosomal protein S7	RS7_HUMAN	22 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
452	PMS1	26S proteasome regulatory subunit 4	PR54_HUMAN (+2)	49 kDa	0	0	0	0	0	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	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
454	CAPZ1	protein (Actin filament) muscle Z-line, alpha 1, isoform CRA_a	A0A024R0E5_HUMAN (+2)	33 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0,8	0	1,09545		
455	BZW2	Basic leucine zipper and W2 domains 2, isoform CRA_a	A0A024RA42_HUMAN (+8)	48 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,8	0	1,09545		
456	TNP01	Transportin 1, isoform CRA_a	A0A024RAM0_HUMAN (+1)	102 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
457	UVBVL2	RuvB-like 2	RUVB2_HUMAN	51 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0,8	0	1,09545	
458	KPK4	Plakophilin-4	A0A0D95F60_HUMAN (+2)	134 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443		
459	VDAC1	Voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_N	A0A024QZN9_HUMAN (+3)	34 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,89443	0,89443		
460	PPFBP1	Liprin-beta-1	LIPB1_HUMAN	114 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,8	0	1,09545	
461	KTN1	Kinesin 1 (Kinesin receptor), isoform CRA_a	A0A024R663_HUMAN (+1)	156 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
462	TRIM25	Tripartite motif-containing 25, isoform CRA_a	D3DTY9_HUMAN (+1)	48 kDa	0	2	0	2	0	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	47 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1,41421
465	NCOA4	Nuclear receptor coactivator 4, isoform CRA_a	A0A024QZ15_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	A0A024R071_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	1	0	0	2,23607	0	
469	FLJ1806	Nuclear protein Upf68, isoform CRA_a	A0A024RF62_HUMAN (+4)	48 kDa	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0,6	1,34164	1,34164	
470	cDNA FLJ06461, highly similar to Peroxiredoxin-2 (EC 1.11.1.4)	B4DF70_HUMAN (+2)	20 kDa	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	1,2	0	1,78885		
471	MX2	Interferon-induced GTP-binding protein MX2	MX2_HUMAN	82 kDa	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1,41421	0	
472	MX1	Interferon-induced GTP-binding protein MX1	MX1_HUMAN																

561	Testicular tissue protein Li 27	A0A140VJF3_HUMAN (+3)	37 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164
562	AHSA1	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog	AHS1_HUMAN (+1)	38 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443
563	MTHFD1	(dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	A0A24R652_HUMAN (+3)	102 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0	
564	MTUS1	Microtubule-associated tumor suppressor 1	MTUS1_HUMAN	141 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	0
565	TNP1	TNFAIP3-interacting protein 1	A0A0ADMRZ4_HUMAN (+6)	70 kDa	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	0,89443
566	Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (Eta) variant (Frags)	Q53HV2_HUMAN (+2)	59 kDa	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0,89443
567	MAP4	Microtubule-associated protein	F8W9U4_HUMAN	88 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443
568	PSMC6	26S proteasome regulatory subunit 10B	A0A087X21_HUMAN (+4)	46 kDa	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0,8	0	1,78885	
569	TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3_HUMAN	24 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
570	ATF7IP	ing transcription factor 7 interacting protein, isoform 1	A0A24RAY1_HUMAN (+1)	136 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	0
571	cDNA FLJ5375, highly similar to Myosin Ic	B7T353_HUMAN (+3)	119 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443	
572	IFIT1	Interferon-induced protein with tripartite peptide repeat	IFIT1_HUMAN	55 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
573	CTNNB1	(Cathelin-associated protein), beta 1, 88kDa, isoform 1	A0A24RQZ3_HUMAN (+4)	85 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
574	NOL7	Nuclear protein 7, 27kDa, isoform CRA_a	A0A024QZ2_HUMAN (+1)	29 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
575	L76924	highly similar to Homo sapiens bri domain-containing	A8K800_HUMAN (+1)	36 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
576	Small proline rich protein	Q2377_HUMAN (+1)	8 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
577	TCEA1	Transcription elongation factor A Protein 1	A0A1W2PPZ5_HUMAN (+1)	34 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
578	SRSF7	Serine/arginine-rich-splicing factor 7	A0A0B41Z1_HUMAN (+4)	16 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
579	GOLG2A	Golgin subfamily A member 2	GOGA2_HUMAN	113 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
580	LGALS1	Galectin-1	LEG1_HUMAN	15 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
581	CSNK2A1	Casitin kinase II subunit alpha	CSK21_HUMAN (+5)	45 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
582	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	AGN1A2_HUMAN (+3)	51 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
583	CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	F5GW6_HUMAN (+3)	57 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
584	SRRT	Serate rRNA effector molecule homolog (Fragment)	H7C3A1_HUMAN (+1)	57 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
585	NPM3	Nucleoplasmin-3	NPM3_HUMAN	19 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
586	Importin subunit alpha	A8K7D9_HUMAN (+2)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,8	0	1,09545			
587	jhj similar to Homo sapiens interferon regulatory factor 2 bindin	B2RC8D_HUMAN (+1)	62 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443			
588	EIF3S9	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	A0A024R821_HUMAN (+3)	92 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
589	AIMP1	γ 1 RNA synthase complex-interacting multifunctional	AIMP1_HUMAN	34 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
590	CYFIP1	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYF1P1_HUMAN (+3)	145 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6	0	1,34164	
591	L195005	highly similar to Homo sapiens kininase family member	B2R4M6_HUMAN (+1)	119 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,4	0	0,89443		
592	WNT10A	Protein Wnt (Fragment)	Q5QB6_HUMAN (+1)	42 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	
593	Sperm binding protein 1a	A0A1L1UH1_HUMAN (+3)	31 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
594	ir to SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator	B4DQ1Y_HUMAN (+3)	112 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
595	DEK	Protein DEK (Fragment)	D6RD2A_HUMAN (+2)	14 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164		
596	NTN1	Netrin-1	NET1_HUMAN	68 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
597	PPIL1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	A0A024RCX8_HUMAN (+1)	18 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
598	PSMD11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	PSD11_HUMAN	47 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
599	PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase	A0A024RST8_HUMAN (+3)	113 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
600	KANK2	I motif and ankyrin repeat domain-containing protein	KANK2_HUMAN	91 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
601	EEF1B2	yeotic translation elongation factor 1 beta 1, isoform C	A0A024R3W7_HUMAN (+1)	25 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
602	RCC2	Regulator of chromosome condensation 2, isoform CRA_c	A0A024R5C5_HUMAN (+1)	56 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
603	ADSS	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	A0A024R5G7_HUMAN (+2)	50 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
604	LAMB2	Laminin, beta 2 (Laminin S), isoform CRA_a	A0A024R319_HUMAN (+2)	196 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443		
605	SUPT4H1	Transcription elongation factor SPT4	SPT4H_HUMAN (+2)	13 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
606	KDM2A	-box and leucine-rich repeat protein 11, isoform CRA_d	13VM53_HUMAN (+2)	133 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
607	SECL31L1	SECL31-like 1 (S. cerevisiae), isoform CRA_d	A0A024RD3D_HUMAN (+4)	133 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
608	TEX10	Testis expressed sequence 10, isoform CRA_a	A0A024R169_HUMAN (+2)	106 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
609	DHCR7	4-dehydrocholesterol reductase isoform 1	A0A024R5F7_HUMAN (+4)	54 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
610	CPZ	Carboxypeptidase Z	CBPZ_HUMAN	74 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443	
611	c caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, b)	A8K249_HUMAN (+4)	45 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443			
612	NELFA	Negative elongation factor A	A0A0C4DP9X_HUMAN (+4)	59 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
613	SEMA3C	Semaphorin-3C	SEM3C_HUMAN (+1)	85 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
614	cDNA FLJ56149, highly similar to Tax1-binding protein 2	B4DGS5_HUMAN (+4)	86 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443		
615	PPA1	Inorganic pyrophosphatase	IPYR_HUMAN (+1)	33 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
616	NMU	Neurominin-U	A0A0B41Z02_HUMAN (+5)	18 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443		
617	WN7TB	Protein Wnt	A8K0G1_HUMAN (+3)	39 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443	
618	ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	A0A02Q0B1_HUMAN (+4)	242 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
619	cDNA FLJ53952, highly similar to Fibrinogen beta chain	B4E1D3_HUMAN (+3)	54 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
620	SF1	Splicing factor, 1, isoform CRA_a	A0A024R566_HUMAN (+5)	62 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443		
621	s, clone CTONG2019029, highly similar to Pseudouridylyl transferase	B3KR2_HUMAN	75 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
622	EPS15L1	rowt factor receptor pathway substrate 15-1, iso1	A0A024R7G6_HUMAN (+4)	83 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	
623	SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	SM2D_HUMAN	14 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0,6	0	1,34164	
624	YWHAH	14-3-3 protein eta	A143F_HUMAN (+2)	28 kDa	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	1,2	0	2,68328	
625	APOL2	Apolipoprotein L, 2, isoform CRA_a	A0A024R1M8_HUMAN	37 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443			
626	EXOSC3	Exosome complex component RRP40	EXOS3_HUMAN	30 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
627	RPSA	40S ribosomal protein SA	A0A024R2P0_HUMAN (+4)	33 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	
628	DDX56	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	DDX56_HUMAN (+3)	62 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
629	LAMTOR1	Regulator complex protein LAMTOR1	F5GK19_HUMAN (+2)	16 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	
630	CLEC3B	Tetranectin	TETN_HUMAN (+2)	23 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443	
631	LMNA	Lamin A/C	W8QEH3_HUMAN	65 kDa	0	0	0	43	0	0	0	0	0	0	8,6	0	19,2302	
632	cDNA FLJ61544, highly similar to Nuclear autoantigen Sp-1	B4E28H9UNA_HUMAN (+4)	41 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443			
633	APOD	Apolipoprotein D	APOD_HUMAN (+1)	21 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4	0	0,89443		
634	Aspartate aminotransferase	A0A140VK69_HUMAN (+3)	46 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443			
635	ITGAV	Integrin alpha-V	ITAV_HUMAN (+2)	116 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,4	0	0,89443	
636	ene NT2RM2002100, highly similar to Probable ATP-dependent	B3KM65_HUMAN (+1)	46 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0,4	0	0,89443			
637	CD2BP2	Integron (cytoplasmic tail) binding protein 2, isoform CI	A0A02QZC1_HUMAN (+2)	38 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
638	SAV1	Protein salvador homolog 1	SAV1_HUMAN	45 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0,89443		
639	RPL36A	60S ribosomal protein L36a	J3K04_HUMAN (+1)	16 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0,6	0	1,34164		

§ 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