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

Vitković, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

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

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Zrinka Vitković

KARAKTERIZACIJA ADHESOMA U STANICAMA TROSTRUKO NEGATIVNOG KARCINOMA DOJKE MDA-MB-231 NAKON STABILNOG UTIŠAVANJA GENA ZA INTEGRIN αv

Diplomski rad

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

Zagreb, 2018.

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

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

Zahvale

Veliko hvala svima iz Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, a posebice dr. sc. Andreji Ambriović Ristov i dr. sc. Mladenu Paradžiku - naučili ste me puno toga i uvijek ću pamtiti vrijeme koje sam provela radeći s vama.
Veliko hvala i doc. dr. sc. Marku Močibobu na susretljivosti i pomoći pri pisanju rada.

Mojim roditeljima, Željki i Anđelku, najveće hvala na svoj potpori za cijelo vrijeme studiranja, a posebice za vrijeme nastanka ovog rada.
Mojoj sestri i cimerici Petri ogromno hvala na strpljenju, slušanju mojih monologa, filmskim večerima, sestrospojevima™® i nevjerojatnoj sposobnosti da donese čips svaki put kada sam zapela.
Mojoj dragoj prijateljici Ini ogromno hvala na kavama, smijehu, bezuvjetnoj potpori i pomoći i nizu drugih stvari koje bi vjerojatno bilo apsolutno neprimjereno spomenuti ovdje.
To my ziom and future flatmate Agata - a big dzikeuje for putting up with my virtual meltdowns and being a great ziom for the past (gulp) seven years.

Sadržaj

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

3.2.10. SDS-PAGE i western blot 26

3.2.11. Spektrometrija masa 28

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 29

4.1. Izdvajanje klonova stanica MDA-MB-231 stabilno transficiranih plazmidima pSUPER.puro i pSUPER.puro αv 29

4.2. Stabilno utišavanje podjedinice integrina αv dovodi do smanjene osjetljivosti stanica na protutumorkse lijekove paklitaksel i cisplatinu 35

4.3. Promjena sastava adhesoma u stanicama MDA-MB-231 nakon stabilnog utišavanja podjedinice integrina αv 40

§ 5. ZAKLJUČAK 51

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 52

§ 7. LITERATURNI IZVORI 54

§ 8. DODATAK XV

8.1. Spektrometrija masa xv

§ 9. ŽIVOTOPIS XXXIV

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA ADHESOMA U STANICAMA TROSTRUKO NEGATIVNOG KARCINOMA DOJKE MDA-MB-231 NAKON STABILNOG UTIŠAVANJA GENA ZA INTEGRIN αv

Zrinka Vitković

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

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

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

Ključne riječi: fokalne adhezije, adhesom, integrin αv, stanice trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231
Mentor: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica
Neposredni voditelj: dr. sc. Mladen Paradžik, viši asistent
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Marko Močibob

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

Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić, PMF, Zagreb
Datum diplomskog ispita: 29. 10. 2018.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

ADHESOME CHARACTERISATION IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CARCINOMA CELL LINE MDA-MB-231 UPON STABLE SILENCING OF INTEGRIN SUBUNIT αv

Zrinka Vitković

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

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

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

Keywords: focal adhesions, adhesome, integrin αv, triple negativne breast cancer cells MDA-MB-231
Mentor: Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Scientist
Assistant mentor: Mladen Paradžik, PhD
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers:
1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor

Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
Date of exam: 29 October 2018

§ 1. UVOD

1.1. Trostruko negativni karcinom dojke

Tumori su nakupine stanica koje se nekontrolirano dijele i ne obavljaju svoju normalnu ulogu u tkivu. Tumori dojke mogu nastati iz svih tkiva dojke.[1] Iza karcinoma pluća, karcinom dojke najčešći je uzrok smrti žena.[2] Karcinomi dojke su izuzetno heterogena skupina tumora. Istraživanjima je identificirano pet intrinzičnih podtipova karcinoma dojke: luminalni tip A, luminalni tip B, HER2-pozitivni, bazalni i normalni.[3,4] Trostruko negativni karcinom dojke (engl. *triple negative breast cancer*, TNBC) predstavlja heterogenu skupinu karcinoma dojke, no većina TNBC spada u skupinu bazalnih karcinoma – procjenjuje se da je oko 80% svih trostruko negativnih karcinoma dojke upravo ovog podtipa.[3] Od svih dijagnosticiranih karcinoma dojke, u 15-20% slučajeva radi se o trostruko negativnom karcinomu dojke.[5]

Trostruko negativni karcinom dojke naziva se tako jer stanice ovog karcinoma ne eksprimiraju receptor za estrogen, progesteron ni receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2), što otežava liječenje bolesnika s ovim tumorom i to zbog nemogućnosti primjene ciljane terapije kao što je ona koja cilja hormonske receptore i ona koja cilja HER2. Ipak, u TNBC je primijećena povećana osjetljivost na lijekove koji sadrže platinu.[6]

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

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

1.2. Integrini i fokalne adhezije

Integrini su heterodimerni transmembranski receptori koji se sastoje od α i β podjedinica. Integrini se vežu za ligande izvanstaničnog matriksa čime se potiče niz unutarstaničnih signala

koji reguliraju niz staničnih funkcija, uključujući migraciju, preživljenje, proliferaciju i diferencijaciju.[9] Za zarastanje tkiva uslijed nastanka rane, angiogenezu, migraciju i proliferaciju tumora osobito su važni integrini αv.[10,11] Podjedinica integrina αv može vezati pet različitih β podjedinica: β1, β3, β5, β6 i β8.

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

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

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

1.3. Cilj rada

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

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Tumori

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

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

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

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

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

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

2.1.1. Tumori dojke

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

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

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

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

2.1.2. Trostruko negativni karcinomi dojke

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

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

2.1.3. Terapija trostruko negativnog karcinoma dojke

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

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

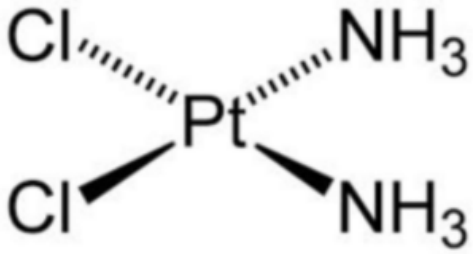
Iako dobar odgovor TNBC na kemoterapiju ohrabruje, zanimljivo je da kada oboljeli ne primaju kemoterapiju, veći je rizik od povratka TNBC nego drugih tipova karcinoma dojke. [19]

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

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

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

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



Slika 1. Struktura cisplatine. Preuzeto iz literaturnog navoda [20].

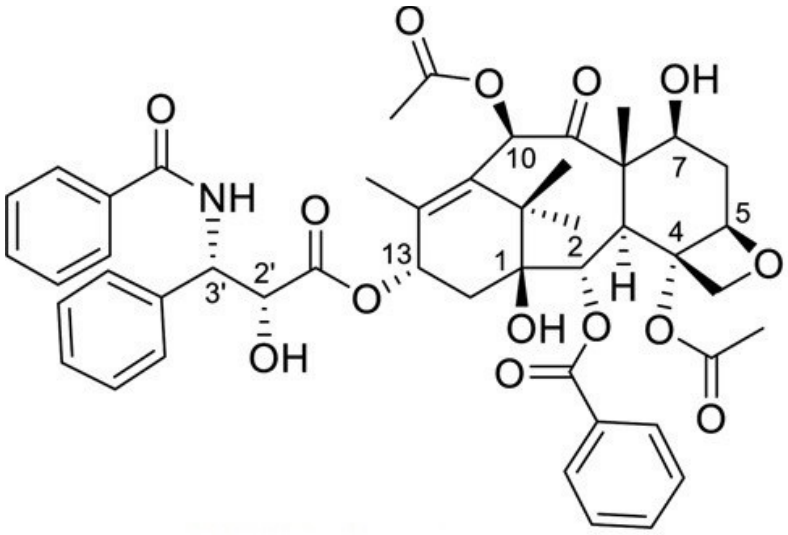
Osobe oboljele od TNBC osjetljiviji su na lijekove koji sadrže platinu. Budući da su to agensi koji oštećuju DNA, bitno je razumijevanje mehanizma popravka DNA, i upravo je to dovelo do poboljšanja terapije TNBC primjerice solima platine i inhibitorima PARP (engl. *poly(ADP-ribose) polymerase,* PARP).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

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

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

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

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



Slika 2. Struktura paklitaksela. Preuzeto iz literaturnog navoda [28].

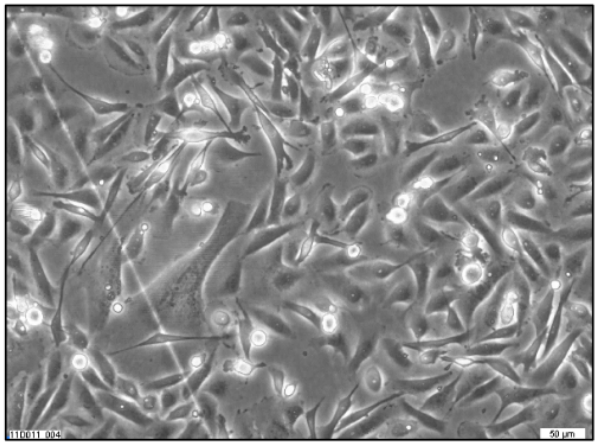
S obzirom na heterogenost TNBC, najbolji rezultati liječenja postigli bi se uporabom personalizirane terapije kojima bi se ciljale specifične molekularne promjene. Ovime bi se znatno poboljšala terapija velikog dijela bolesnika, budući da oko 60-70% oboljelih od TNBC ne odgovaraju na protutumorske lijekove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

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

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

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

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



Slika 3. Stanice MDA-MB-231 u kulturi. Preuzeto iz literaturnog navoda [29].

2.2. Integrini

2.2.1. Građa integrina

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

Zanimljivo je da, za razliku od drugih receptora na površini stanice, integrini imaju mali afinitet vezanja liganda. No, upravo ovo svojstvo integrina omogućuje stanicama brzo odvajanje i pričvršćivanje za podlogu, što pak znači da je stanicama omogućena lakša pokretljivost i invazija nego što bi to bilo da je afinitet vezanja liganda integrina veći. Ovisno o tome koje α i β podjedinice čine heterodimer, mijenja se specifičnost vezanja jednog ili više liganada. Mnogo tipova stanica ovisi o integrinima i njihovim interakcijama s izvanstaničnim matriksom da bi preživjele.[10] Integrini koji se nalaze na površini stanice određuju do koje će se mjere stanica vezati na, odnosno migrirati na određenoj površini.[11]
Prema tome na koju se komponentu izvanstaničnog matriksa ili ligand vežu, integrini se dijele u četiri skupine, kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Podjela integrina.

Skupina	Integrini
Receptori laminina	α3β1, α7β1, α6β1, α6β4
Leukocitni specifični integrini	α4β1, α4β7, αEβ7, cijela potporodica β2 integrina
Receptori kolagena	α1β1, α2β2, α10β1, α11β1
Receptori RGD	αvβ1, αvβ3, αvβ5, αvβ6, αvβ8, α5β1, α8β1, αIIbβ3

Glavna skupina integrina koja posreduje u interakciji stanica i izvanstaničnog matriksa su integrini iz porodice β1 i stoga su integrini iz ove porodice eksprimirani na velikom broju

različitih tipova stanica. Iz ove porodice integrina, integrini α1β1 i α2β1 glavni su receptori za kolagen, α4β1 i α5β1 za fibronektin, a α3β1 i α6β1 za laminin.[33]

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

2.2.2. Integrini αv i njihova uloga u razvoju tumora

Podjedinica integrina αv može vezati pet različitih β podjedinica (β1, β3, β5, β6, β8). Neki od ovih heterodimera vežu se samo na jedan ligand (integrin αvβ5 veže se isključivo na vitronektin), dok se drugi vežu na nekoliko liganada (integrin αvβ3 veže se na vitronektin, fibronektin, von Wildebrandov faktor, tenascin, osteopontin, fibrilin, fibrinogen i trombospondin). Integrini αv osobito su važni za zarastanje rana, angiogenezu te proliferaciju i migraciju tumora.[10]

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

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

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

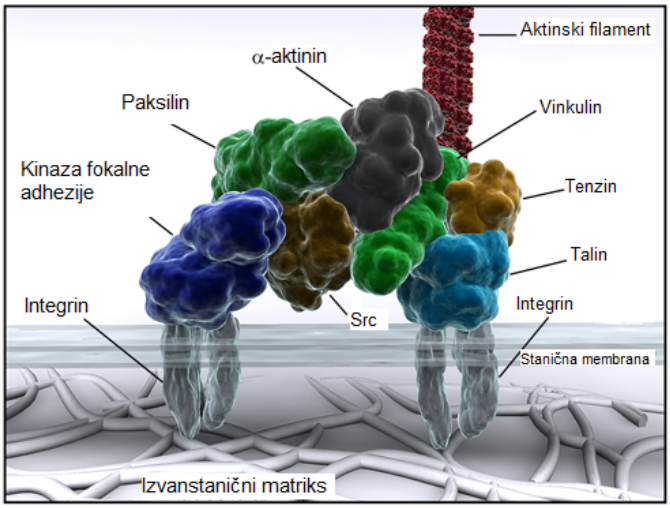
Integrini αvβ3 i αvβ5 najčešće su proučavani članovi potporodice integrina αv budući da je njihova povećana ekspresija često povezana s napredovanjem i agresivnošću tumora. Integrin αvβ3 povećano je eksprimiran u mnogim karcinomima, kao što su karcinom dojke, gušterače i prostate. Često je povećana razina integrina αvβ3 prisutna u metastazama, što upućuje na njegovu važnost za migraciju i invazivnost tumora. Povećana ekspresija integrina αvβ5 česta je karakteristika karcinoma jezika te glioblastoma.[11] Članovi porodice integrina αv, a posebice αvβ5, povezani su s epitelno-mezenhimalnom promjenom posredovanom transformirajućim faktorom rasta β (engl. *Transforming Growth Factor β,* TGF-β)[37], utječu na osjetljivost na protutumorske lijekove i angiogenezu.[38]

Integrin αvβ6 eksprimiraju samo stanice epitela i obično se detektira jedino na stanicama koje prolaze kroz proces remodeliranja tkiva. Visoka ekspresija integrina αvβ6 povezuje se s lošijom prognozom za oboljele od karcinoma dojke, pogotovo ako je istovremeno povećana ekspresija receptora ljudskog epidermalnog faktora rasta (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2).[39] Osim kod pacijenata oboljelih od karcinoma dojke, povećana ekspresija integrina αvβ6 korelira s manjom stopom preživljavanja pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva, vrata maternice i karcinoma pluća ne-malih stanica. Smatra se da je

ovo slučaj jer integrin αvβ6 povećava invazivnost stanica karcinoma te sposobnost migracije i preživljenja stanica tumora. [1,39]

2.2.3. Fokalne adhezije

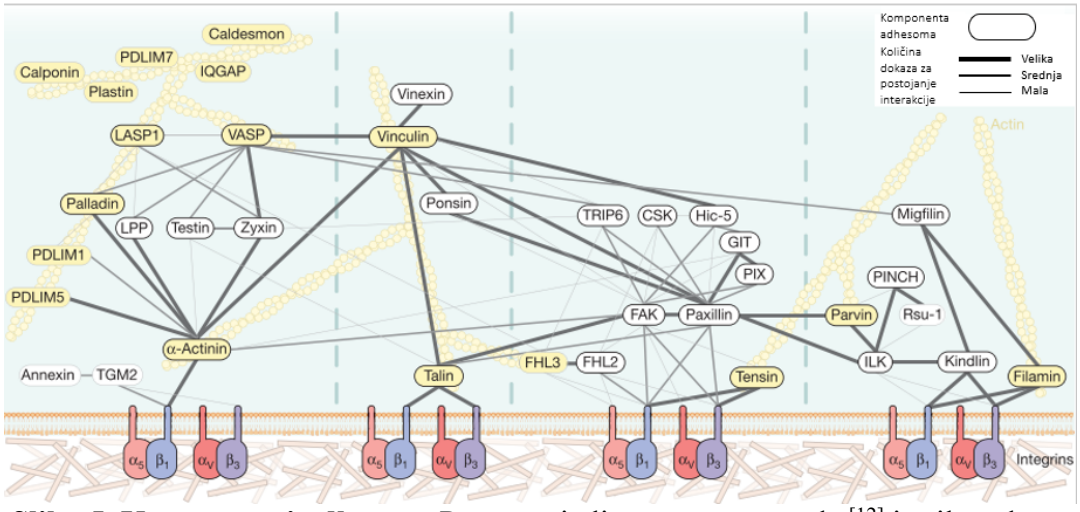
Vezanjem integrina na proteine izvanstaničnog matriksa dolazi do nakupljanja proteina s unutrašnje strane stanične membrane te stvaranja dinamičkog makromolekularnog kompleksa koji se naziva fokalna adhezija ili kompleks adhezije integrina. Ovi kompleksi imaju dvojaku ulogu: oni čine strukturne veze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



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

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

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



Slika 5. Konsenzusni adhesom. Preuzeto iz literaturnog navoda [12] i prilagođeno.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

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

Tablica 2. Osnovne kemikalije.

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

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

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

3.1.2. Stanična linija

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

3.1.3. Protutijela

Protutijela korištena za western blot popisana su u tablici 3.

Tablica 3. Protutijela za western blot.

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

3.1.4. Priprema otopina

Sastav korištenih otopina prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Korištene otopine.

Otopina	Sastav
Dulbeccova modifikacija Eagleove tekuće hranjive podloge (DMEM-FCS-Pen/Strep)	DMEM s 10% seruma fetusa goveda (FCS) i 0,5% penicilinom/streptomicinom
Modificirani RIPA pufer (5x)	50 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH 7,6) 150 mmol dm^{-3} NaCl 5 mmol dm^{-3} EDTA (pH 8) 5 g dm^{-3} SDS 1% Triton X-100 1% natrijev deoksikolat
Otopina za odbojavanje membrane nakon bojanja amido crnim	10% ocetna kiselina 45% metanol
Otopina za prikupljanje fokalnih adhezija (engl. *Adhesion recovery solution*)	125 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH 6,8) 10 g dm^{-3} SDS 150 mmol dm^{-3} ditiotreitol
Otopina za umrežavanje proteina	6 mmol dm^{-3} DTBP u DMEM-HEPES-u
Pufer za puferiranje DMEM-a	1 mol dm^{-3} HEPES (pH 7,4)
Pufer za prijenos	10% Tris-glicinski pufer 20% metanol
Pufer za prikupljanje staničnog lizata	pufer RIPA s 0,1% inhibitora proteaza i 0,1% EDTA (c = 0,5 mol dm^{-3})
PBS (1x, bez kalcija i magnezija)	0,14 mol dm^{-3} NaCl 2,7 mmol dm^{-3} KCl 10 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 1,8 mmol dm^{-3} KH_2PO_4
TBST (1x)	20 mmol dm^{-3} Tris 150 mmol dm^{-3} NaCl 0,1% Tween-20
SB (engl. *Sample buffer*) za SDS-PAGE	2% SDS 62,5 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH 6,8) 0,01% bromfenol plavo 25% glicerol 710 mmol dm^{-3} β-merkaptoetanola

3.1.5. Uređaji i ostali materijali

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

Tablica 5. Korišteni uređaji i ostali materijali.

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

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanice MDA-MB-231 uzgajane su *in vitro* u bočicama za uzgoj stanica površine 25 cm^2 (T25), odnosno 75 cm^2 (T75) u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37°C i 5% CO_2. Za uzgoj stanica

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

3.2.2. Rasađivanje stanica

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

3.2.3. Smrzavanje stanica

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

3.2.4. Odmrzavanje stanica

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

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

3.2.5. Provjera identiteta plazmida restrikcijskom analizom

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

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

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

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

3.2.6. Transfekcija i odabir stabilno transficiranih klonova

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

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

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

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

3.2.7. Određivanje preživljenja stanica MTT testom

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

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

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

formazana u potpunosti otopili, pločica je stavljena na tresilicu. Kada su se svi kristali otopili, mjerena je apsorbancija na 600 nm pomoću čitača za mikrotitarske pločice.
Preživljenje stanica se računa prema jednadžbi (1):

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

3.2.8. Određivanje ekspresije proteina na površini stanica pomoću protočne citometrije

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

3.2.9. Izdvajanje fokalnih adhezija

Petrijeve zdjelice isprane su dva puta tekućom hranjivom podlogom DMEM-HEPES, zagrijanom pri 37°C, kako bi se maknule stanice koje nisu pričvršćene za podlogu. U svaku

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

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

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

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

3.2.10. SDS-PAGE i western blot

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.11. Spektrometrija masa

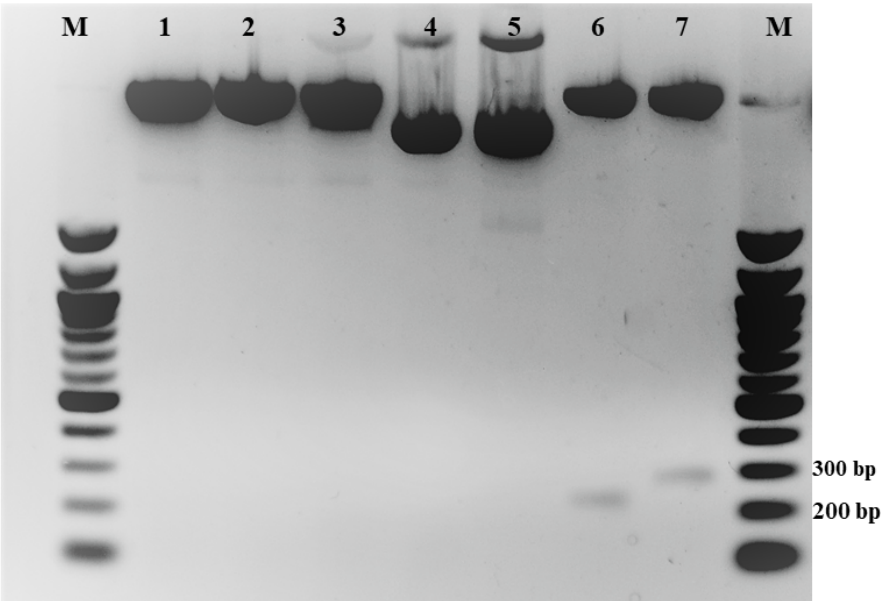
Spektrometrija masa rađena je u laboratoriju Dr. J. D. Humphriesa (Wellcome Trust Centre for Cell Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester). Opis postupka kojega je u Manchesteru radio Dr. M. Paradžik nalazi se u Dodatku.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

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

4.1.1. Provjera identiteta plazmida

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



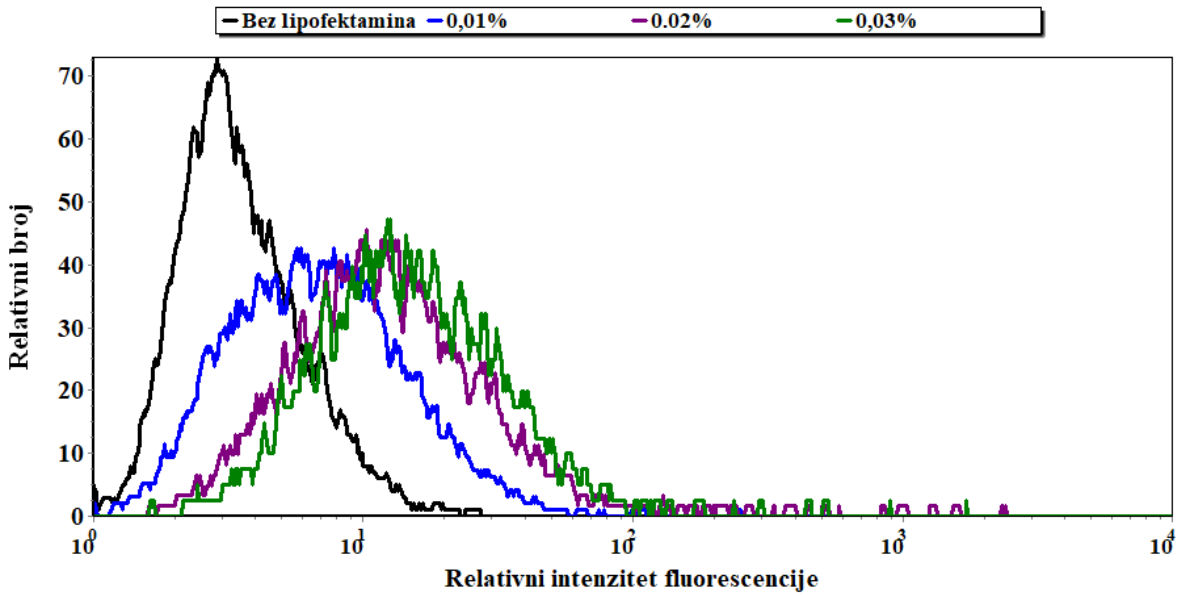
Slika 6. Provjera identiteta plazmida pSUPER.puro αv cijepanjem restrikcijskim enzimima i usporedbom s plazmidom pSUPER.puro.

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

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

4.1.2. Određivanje učinkovitosti transfekcije

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

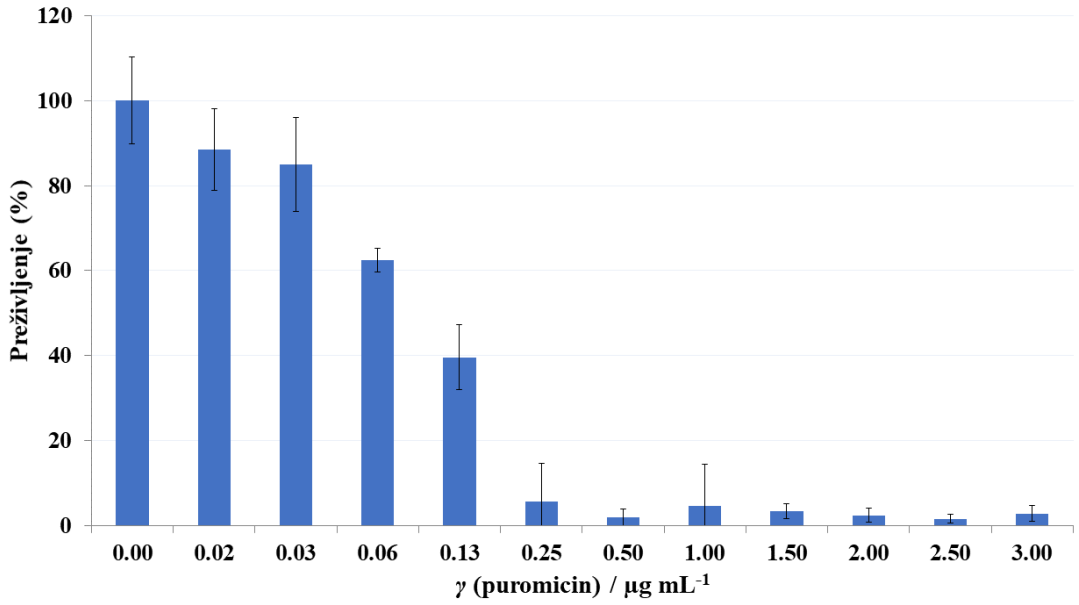


Slika 7. Provjera učinkovitosti transfekcije određivanjem intenziteta fluorescencije koju daje zeleni fluorescentni protein. Korištene su otopine s udjelom lipofektamina 0,01%, 0,02%, 0,03% i otopina bez lipofektamina.

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

4.1.3. Određivanje koncentracije puromicina za odabir stabilno transficiranih stanica

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

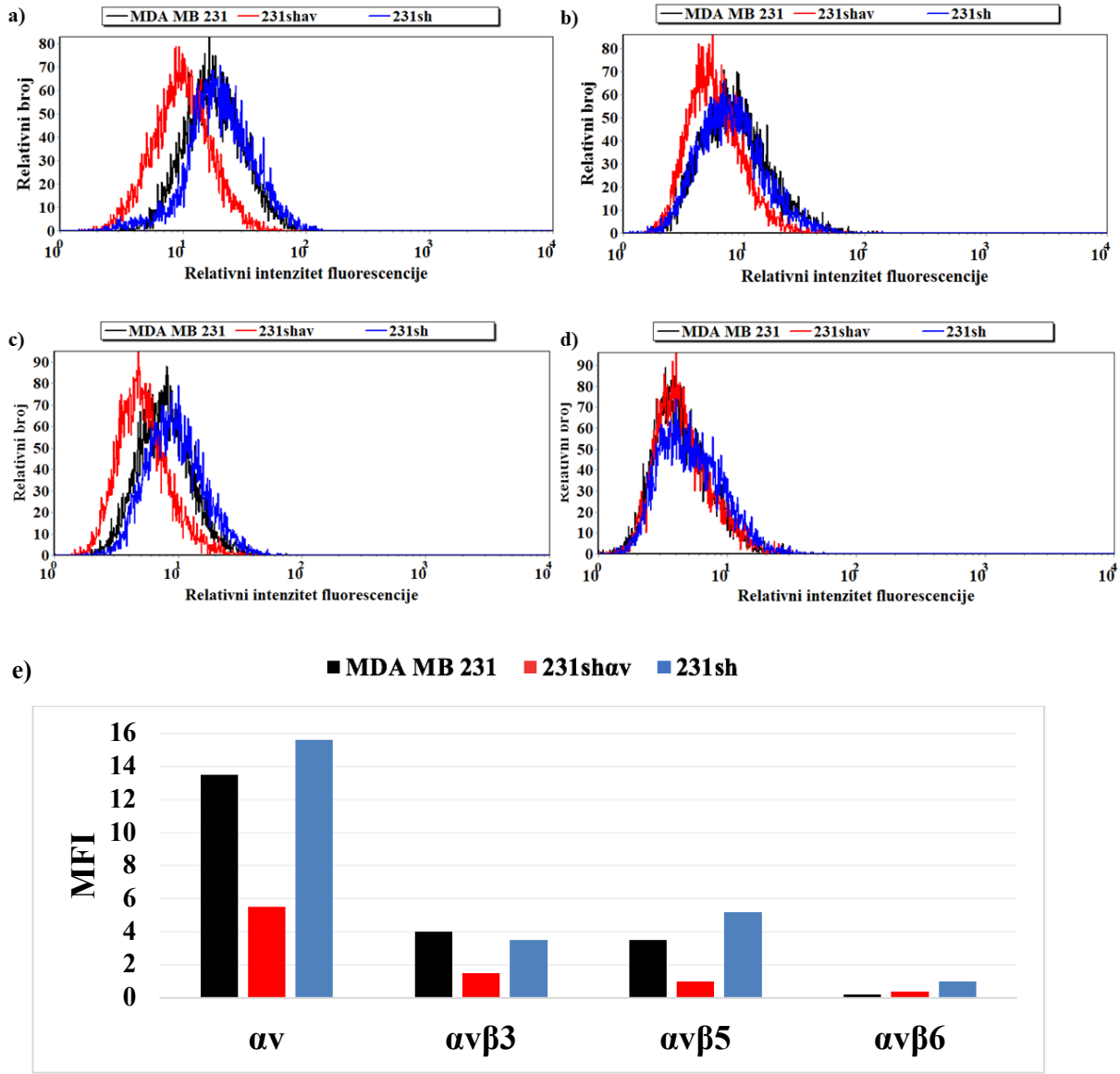


Slika 8. Utjecaj koncentracije puromicina na preživljenje stanica MDA-MB-231. Nasađeno je 2 000 stanica po bunariću, a preživljenje je prikazano kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolne stanice ± standardna devijacija.

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

4.1.4. Izdvajanje klonova stanica MDA-MB-231: kontrolni klon i klon sa smanjenom ekspresijom integrina αv

Stanice MDA-MB-231 transficirane su plazmidom pSUPER.puro αv, odnosno plazmidom pSUPER.puro i odvojene od netransficiranih stanica uzgojem u hranjivoj podlozi s puromicinom. Od klonova koji su izrasli odabrana su dva klona, 231shαv koji je transficiran plazmidom pSUPER.puro αv i 231sh koji je transficiran plazmidom pSUPER.puro. Za karakterizaciju navedenih klonova korištena je protočna citometrija kako bi se odredila površinska ekspresija podjedinice integrina αv te heterodimera αvβ3, αvβ5 i αvβ6.

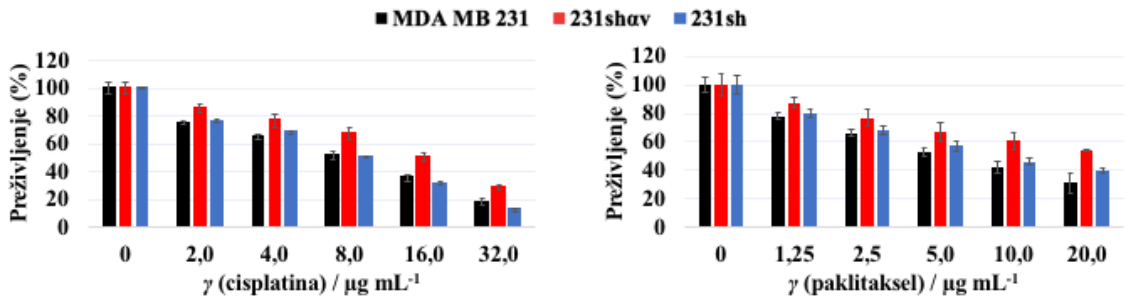


Slika 10. Određivanje ekspresije integrina αv (a), αvβ3 (b), αvβ5 (c) i αvβ6 (d) metodom protočne citometrije u stanicama MDA-MB-231, klonu stanica 231shαv stabilno transficiranom plazmidom pSUPER.puro αv i kontrolnom klonu stanica 231sh stabilno transficiranom plazmidom pSUPER.puro. Stanice su obilježene primarnim mišjim protutijelima za podjedinicu integrina αv, odnosno heterodimere integrina αvβ3, αvβ5 i αvβ6, a kasnije i sekundarnim, fluorescentno obilježenim, protutijelom usmjerenim na mišji imunoglobulin. Rezultati prikazani pod a), b), c) i d) su prikazani ponovno pod e), ako kao vrijednosti geometrijskog prosjeka intenziteta fluorescencije, MFI (engl. *mean fluorescence intensity*).

Stanice MDA-MB-231 i 231sh pokazuju približno jednaku ekspresiju svih istraživanih proteina na površini stanice ukazujući na to da je ovaj klon dobra kontrola transfekcije. U stanicama 231shαv je, prema očekivanju, zabilježena smanjena ekspresija podjedinice integrina αv i heterodimera integrina αvβ3 i αvβ5 u odnosu na stanice MDA-MB-231 i 231sh (slika 10a, 10b, 10c, 10e). Ekspresija integrina αvβ6 na stanicama MDA-MB-231 je, prema MFI, vrlo niska ili nepostojeća. To potvrđuje i preklapanje krivulja dobivenih s protutijelom specifičnim za αvβ6 i krivulje izotipske kontrole (rezultati nisu prikazani). Stoga ne iznenađuje da u stanicama 231shαv ne dolazi do promjene ekspresije u odnosu na stanice MDA-MB-231 i 231sh (slika 10d, slika 10e). Nakon utišavanja podjedinice integrina αv za očekivati je i da će doći i do smanjene ekspresije integrina αvβ1 što nismo provjeravali jer protutijelo za ovaj heterodimer ne postoji na tržištu. Ipak, sukladno prethodno objavljenim rezultatima da utišavanje podjedinice integrina αv povećava osjetljivost stanica MDA-MB-231 na paklitaksel, cilj našeg rada je bio odrediti adhesom stanične linije MDA-MB-231 odnosno adhesom integrina αv u navedenoj staničnoj liniji. Ipak, kako bi se kompletirali rezultati ovog rada bit će potrebno u budućnosti odrediti i ekspresiju integrina αvβ1 za što će biti potrebno napraviti imunoprecipitaciju.

4.2. Stabilno utišavanje podjedinice integrina αv dovodi do smanjene osjetljivosti stanica na protutumorkse lijekove paklitaksel i cisplatinu

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



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

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

Još od 1990.-ih godina poznato je da je adhezija tumorskih stanica na izvanstanični matriks bitan čimbenik u razvijanju otpornosti na terapiju. Istraživanja u ovom području podupire tvrdnju da korištenjem metoda koje ciljaju neke integrine tumorske stanice mogu postati osjetljivije na terapiju protutumorskim lijekovima i zračenjem[43]. Istraživanja provedena u grupi u kojoj je izrađen i ovaj rad fokusirana su upravo na integrine αvβ3 i αvβ5 i upućuju na činjenicu da, ovisno o staničnom modelu, ovi integrini osiguravaju signale preživljenja za stanice tumora nakon izlaganja protututmorskim lijekovima. Pokazali su da nakon *de novo* ekspresije integrina αvβ3 u stanicama karcinoma grkljana HEp2, dolazi do povećanja otpornosti stanica na cisplatinu, doksorubicin i mitomicin C zbog povećane razine glutationa u stanicama i uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta nastalih djelovanjem ovih protutumorskih lijekova.[44] Slično tome, ali ne istim mehanizmom, u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 *de novo* ekspresija integrina αvβ3 dovodi do povećane otpornosti

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

Upravo obrnuti pristup je primijenjen na stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 koje eksprimiraju integrine αvβ3 i αvβ5. Prolazno utišavanje podjedinice integrina αv u ovim stanicama povećava njihovu osjetljivosti na protutumorske lijekove cisplatinu, vinkristin i paklitaksel.

Korelacija između ekspresije integrina αvβ3 i αvβ5 i migracije i invazije raznih tumora, među kojima je i karcinom dojke, otprije je poznata.[11] U stanicama HEp2 i Cal27 ekspresija integrina αvβ3 dovela je do povećane migratorne sposobnosti stanica[23,45], a u modelu stanica Cal27 pokazana je i povećana sposobnost invazije.[45] Osim toga, u stanicama MDA-MB-231 utišavanje podjedinice integrina αv smanjilo je migraciju i invaziju ovih stanica. [14]

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

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

objasniti kompenzacijskim događajem pri odabiru stabilnih klonova za razliku od prolaznog utišavanja. Detaljnije, ovaj rezultat mogao bi se objasniti preslagivanjem integrina (engl. *integrin switching*) budući da pri stabilnom utišavanju stanice imaju vremena postići homeostazu i „odgovoriti“ na novonastalo stanje, dok pri prolaznom utišavanju to nije moguće. Preslagivanje integrina znači da promjena ekspresije jednog heterodimera integrina mijenja ekspresiju drugih heterodimera. Možemo pretpostaviti dva moguća procesa preslagivanja integrina. Prvi je da utišavanje podjedinice integrina αv oslobađa β podjedinice integrinskog heterodimera i takve β podjedinice zatim mogu formirati nove heterodimere s drugim raspoloživim α podjedinicama u stanici. Ovime se može povećati ekspresija drugih integrina koji bi mogli utjecati na povećanje otpornosti na citostatike. U ovom specifičnom slučaju moglo je doći do oslobađanja podjedinice integrina β1 koja može stvoriti heterodimere s jako velikim brojem podjedinica α. Poznato je da stanice MDA-MB-231 eksprimiraju heterodimer integrin αvβ1[47]. Što se tiče podjedinica β3 i β5, one stvaraju heterodimere samo s podjedinicom αv te za njih ne vrijedi ovaj predloženi mehanizam.

U stanicama HEp2 pokazano je da između integrina αvβ3 i αvβ5 postoji ravnoteža te da povećanjem ekspresije integrina αvβ3 dolazi do smanjenja ekspresije integrina αvβ5.[48] Nadalje, i u stanicama melanoma MDA-MB-435S pokazano je da između integrina αvβ3 i αvβ5 postoji ravnoteža i dolazi do preslagivanja integrina uslijed utišavanja jedne od integrinskih podjedinica.[14] U prijašnjim istraživanjima primijećeno je da u staničnoj liniji MDA-MB-231 signalni putevi posredovani integrinom β1 značajno inhibiraju apoptozu uzrokovanu paklitakselom i vinkristinom.[46] Osim toga, vrlo je vjerojatno da kod prolazne transfekcije integrin αv specifičnom siRNA je upravo integrin αvβ1 odgovoran za povećanje osjetljivosti na protutumorske lijekove[48] Ukoliko dolazi do preslagivanja integrina nakon stabilnog utišavanja integrina αv, moguće je da β1 podjedinice oslobođene iz heterodimera αvβ1 formiraju nove heterodimere s drugim α podjedinicama, čime signalni putevi zaslužni za inhibiciju apoptoze uzrokovane paklitakselom i vinkristinom postaju aktivni. Drugi mogući način preslagivanja integrina je da utišavanjem integrina αv dolazi do povećanja ekspresije bilo kojeg drugog integrina koji ne mora s integrinima αv dijeliti zajedničke podjedinice i koji zatim utječu na povećanje otpornosti stanica na citostatike.[48–50] Primjerice, u stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazano je da inaktivacija integrina β1 dovodi do povećanja ekspresije integrina β3 čime je došlo i do povećanog metastaziranja tumora.[49] Fenomen preslagivanja integrina je pokazan i na stanicama Cal27 u kojima *de novo* ekspresija

integrina αvβ3 dovodi do povećanja ekspresije αvβ5.[45] Osim toga neobjavljeni rezultati[51] pokazali su da u istom staničnom modelu tj. u stanicama Cal27 nakon *de novo* ekspresije integrina αvβ3 dolazi i do povećane ekspresije integrina α6β4.

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

Dosad je pokazano kako inhibicija aktivacije integrina može imati veliku primjenu u protutumorskim terapijama, osobito u inhibiciji angiogeneze i nastajanja metastaza. Trenutno se u tu svrhu koriste funkcionalno blokirajuća monoklonska protutijela, peptidni antagonisti i ciklički peptidi koji oponašaju normalne ligande integrina u izvanstaničnom matriksu. [52,53] Od cikličkih peptida koji su trenutno u fazi kliničkog ispitivanja posebno je zanimljiv cilengitid, pentapeptid koji sadrži RGD motiv kojega prepoznaju integrini. Smatra se da je primarna meta cilengitida integrin αvβ3, no pokazano je i djelovanje na integrin αvβ5. Djelovanjem cilengitida inhibiraju se integrini, što za posljedicu ima inhibiciju signalnih puteva ERK i PI3K koje stanice tumora koriste pri proliferaciji i migraciji, a aktivacija ovih signalnih puteva smatra se zaslužnom i za izbjegavanje apoptoze u stanicama tumora. Nadalje, inhibicija integrina αv putem cilengitida čini stanice trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 osjetljivijima na terapiju zračenjem.[54] Osim toga pokazano je da inhibicija integrina αvβ3/β5 pomoću cilengitida čini stanice MDA-MB-231 osjetljivijima na paklitaksel.[14] Ova činjenica govori u prilog da bi preslagivanje integrina mogao biti razlog za različite rezultate prolaznog i stabilnog utišavanja integrina αv.

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

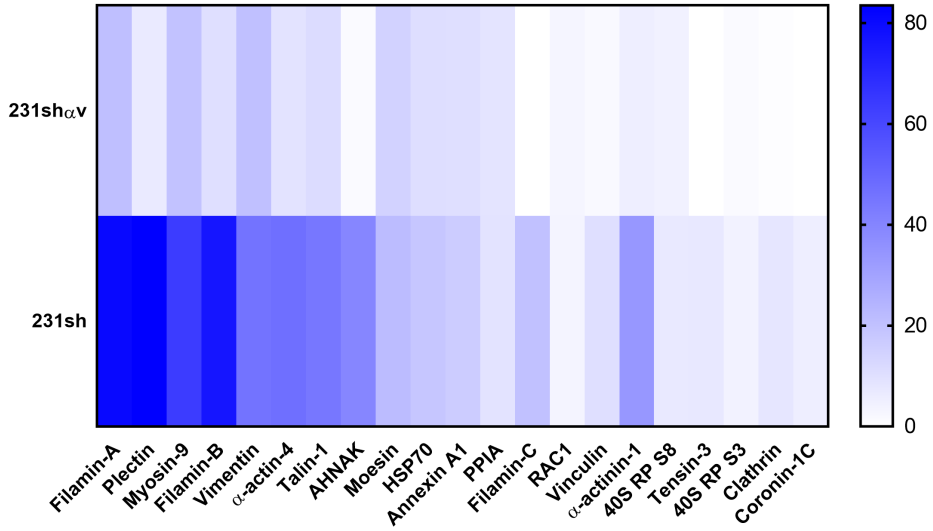
Proteini fokalnih adhezija nalaze se uz staničnu membranu te su među prvima do kojih umreživač dolazi nakon prolaska kroz membranu. Iako duljim vremenom umrežavanja dolazi do boljeg umrežavanja proteina fokalnih adhezija, također dolazi i do umrežavanja proteina koji ne čine fokalne adhezije te je stoga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

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

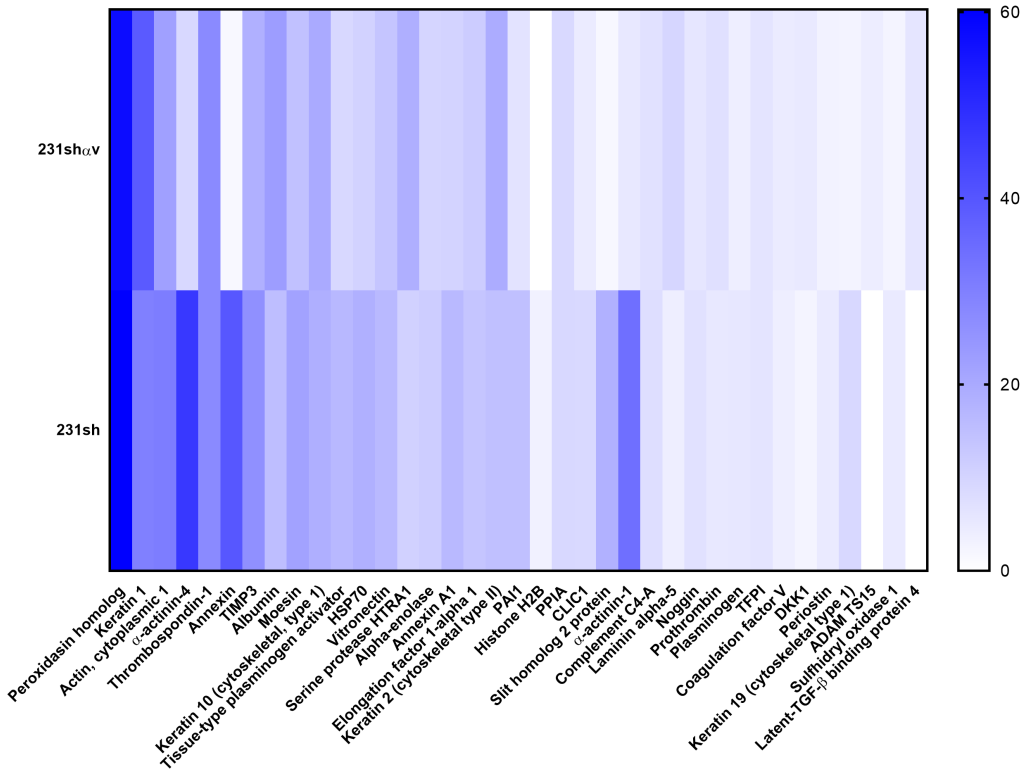
Za optimizaciju metode odabrano je određivanje fosforiliranog oblika proteina FAK (pFAK(Y397)) i paksilina (pPAX(Y113)) budući da se radi o proteinima koji su vrlo česte komponente fokalnih adhezija i čine konsenzusni adhesom.[55] Osim njih odabran je i protein γH2AX budući da se radi o proteinu koji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

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

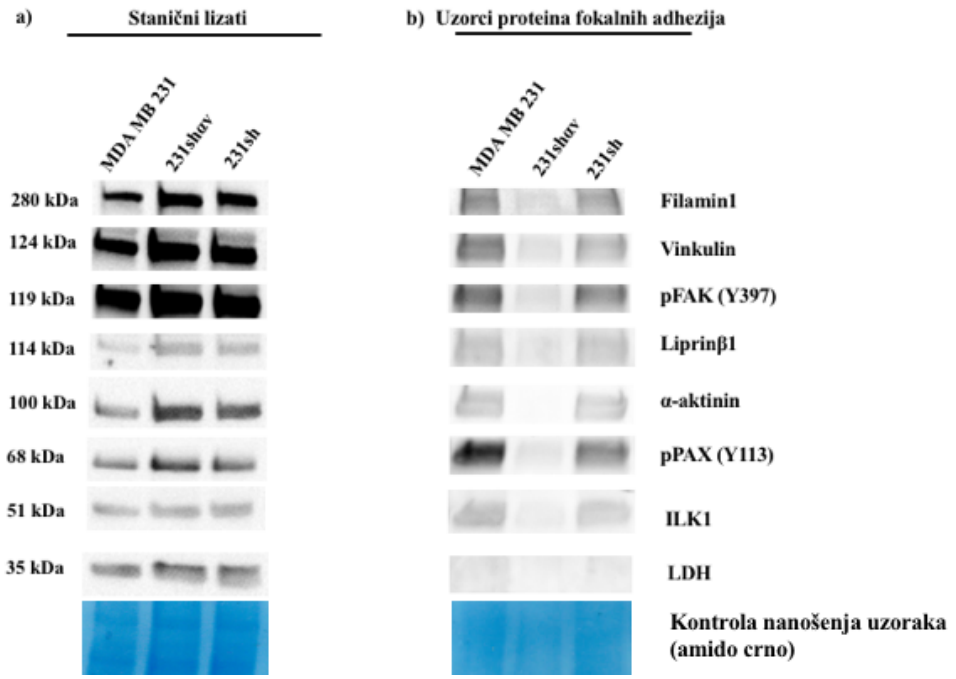
Spektrometrijom masa u laboratoriju dr. M. J. Humphriesa u Manchesteru (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester) analizirani su uzorci izdvojenih fokalnih adhezija. Korištena metoda ionizacije je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray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



Slika 12. Usporedba eskpresije proteina fokalnih adhezija stanica 231shαv i 231sh. Prikaz je napravljen pomoću programa GraphPad Prism, verzija 7.0e za operativni sustav Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornija, SAD, www.graphpad.com.



Slika 13. Usporedba ekspresije proteina izvanstaničnog matriksa stanica 231shαv i 231sh. Prikaz je napravljen pomoću programa GraphPad Prism, 7.0e za operativni sustav Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornija, SAD, www.graphpad.com.



Slika 14. Identifikacija proteina prisutnih u uzorcima lizata (a) i izdvojenih fokalnih adhezija (b) iz stanica MDA-MB-231 i klonova stanica 231shαv i 231sh metodom western blot. Stanični lizati prikupljeni su iz istog broja stanica. Uzorci fokalnih adhezija prikupljeni su iz istog broja stanica i pod istim uvjetima trajanja umrežavanja proteina od 15 minuta. Za detekciju kemilumiscentnog signala korištena je kamera UVITEC. Citoplazmatski protein laktat-dehidrogenaza (LDH) korišten je kao negativna kontrola.

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

Zanimljivo je da u uzorcima staničnih lizata svih korištenih stanica (MDA MB 231, 231shαv, 231sh) ima otprilike jednaka količina svih proteina fokalnih adhezija, što sugerira da utišavanjem integrina αv dolazi do promjene u adhesomu stanica, a ne do promjene u njihovoj

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

Budući da je motiv za ovo istraživanje bila primijećena povećana osjetljivost stanica na vinkristin i paklitaksel i smanjena mogućnost migracije i invazije stanica MDA-MB-231 nakon utišavanja integrina αv[14], u ovom smo radu željeli odrediti adhesom upravo pod tim uvjetima. Nadalje, osim osjetljivosti na paklitaksel, htjeli smo provjeriti i osjetljivost stanica na cisplatinu nakon stabilnog utišavanja integrina αv. Proteini izvanstaničnog matriksa u ovakvom tipu eksperimenta potječu od seruma u kojem se stanice uzgajaju i od samih stanica koje ga izlučuju i stvaraju svoj vlastiti okoliš. Prvi podatak koji smo željeli dobiti ovim eksperimentima je kojim se integrinima stanice MDA-MB-231 vežu na podlogu. Iako je spektrometrijom masa detektiran jako veliki broj proteina, broj spektara za integrine je vrlo malen u sva 4 neovisno pripremljena izolata fokalnih adhezija. Ipak, najzastupljeniji integrini po broju pojavljivanja u stanicama 231sh su integrin αv, zatim β5 te integrin β1, dok integrin β3 nije detektiran. Iako je na temelju tako malog broja spektara nemoguće govoriti o kvantitativnoj analizi za integrine, ipak možemo usporediti rezultate kvantitativnog mjerenja ekspresije integrina αv protočnom citometrijom s rezultatima spektrometrije masa koju smo izvršili na oba klona 231shαv i 231sh iz 4 eksperimenta (Tablica D1). U klonu 231sh prosječno je zabilježeno 2.86 spektara za integrin αv dok u klonu 231shαv spektri specifični za integrin αv nisu ni zabilježeni. Što se tiče podjedinice β5 u klonu 231sh prosječno je zabilježeno 2.38 spektrara dok je u klonu 231shαv otkriveno samo 0.86. Konačno, za podjedinicu β1 također je zabilježena razlika u istom smjeru sa 2.04 spektara u 231sh i 1.29 spektra u klonu 231shαv. Iako ove vrijednosti ne možemo smatrati statistički značajnim (za takvu analizu broj zabilježenih spektara mora biti najmanje 10), ipak ovi podaci podupiru tvrdnju iz rada Stojanović i sur.[14] da od integrina αv upravo integrin αvβ5 ima važnu ulogu u stanicama MDA-MB-231.

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

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

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

Prijašnja, neobjavljena istraživanja grupe u kojoj je izrađen ovaj rad potvrdila su promjenu u proteinu liprin-β1 u adhesomu stanica melanoma MDA-MB-435S nakon utišavanja integrina αv, a, kao što je vidljivo na slici 12, ovaj protein potvrđen je sada i u stanicama MDA-MB-231, te je pokazana njegova smanjena količina nakon utišavanja integrina αv metodom western blot. Međutim, spektrometrijom masa u stanicama MDA-MB-231 nije potvrđen ovaj protein, pa bi trebalo dodatnim metodama provjeriti smanjenje njegove ekspresije, kao i ovisnost o integrinu αv.

Liprin-β1 nije dio konsenzusnog adhesoma napravljenom na fibronektinu[12], no moguće je da će daljnja istraživanja potvrditi ulogu ovog proteina u adhesomu integrina αv.

Proteini iz obitelji liprina (engl. *LAR-interacting protein)* ostvaruju interakcije s obitelji transmembranskih tirozin-fosfataza LAR (engl. *Leukocyte common antigen-related*) za koje se zna da su bitne za razvoj mliječnih žlijezda. Smatra se da liprini pomažu lokalizirati LAR u blizinu fokalnih adhezija. Nadalje, moguće je da liprini čak sudjeluju u rastavljanju fokalnih adhezija.[63] Liprin-α1 pojačano je eksprimiran u karcinomima dojke i čini važan dio mreže proteina koji povećavaju invazivnost karcinoma *in vitro* tako da liprin-α1 potiče invazivnost na vodećem kraju migrirajuće tumorske stanice te potiče degradaciju izvanstaničnog matriksa. Poznato je da stanice MDA-MB-231 eksprimiraju liprin-α1 i da taj protein potiče metastaziranje u mišjim modelima. Osim liprina-α1, stanice MDA-MB-231 eksprimiraju i oba liprina iz β podskupine. Istraživanja upućuju na to da liprin-β1 i liprin-β2 imaju oprečne uloge. Liprin-β1 *in vitro* pokazuje doprinos pokretljivosti tumorskih stanica dok liprin-β2 smanjuje pokretljivost i invazivnost tumorskih stanica *in vitro*.[64] Unatoč tome što je uloga liprina-α1 u invazivnosti i metastaziranju tumora poznata, kao i uloga liprina-β2 u smanjenju invazivnosti tumora, uloga liprina-β1 još je uvelike neistražena i predstavlja zanimljiv predmet za daljnja istraživanja.

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

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

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

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

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

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

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

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

ILK je serin/treonin-specifična kinaza uključena u regulaciju interakcije stanice i izvanstaničnog matriksa. Primijećeno je kako prekomjerna ekspresija ILK-a dovodi do povećane proliferacije, pokretljivosti i invazivnosti stanica u velikom broju tumora. Utišavanje ILK-a specifičnom siRNA u stanicama tumora gušterače dovodi do smanjene fosforilacije nizvodnih proteina, poput proteina Akt i MLC, a smanjuje se i migracija stanica.[72] ILK ostvaruje interakcije s više proteina među kojima su citoplazmatske domene podjedinice integrina β1 i β3, adaptorni proteini (npr. PINCH, paksilin) katalitički proteini (npr.PKB/Akt).[73] Na C-kraju ILK-a nalazi se kinazna domena na koju se vežu β podjedinice integrina, a na N-kraju nalaze se domene preko kojih ILK ostvaruje interakcije s drugim proteinima. N-kraj ILK-a također je zaslužan za regulaciju lokalizacije ILK-a u fokalnim adhezijama. Točna uloga ILK-a u karcinomu je donekle nepoznata – postoje istraživanja koja ukazuju na to da prekomjerna ekspresija ILK-a uzrokuje apoptozu u stanicama epitela te da dolazi do smanjenja adhezije tih stanica na podlogu, no, s druge strane, niz istraživanja pokazuje da ILK doprinosi preživljenju stanica karcinoma dojke. Nadalje, pokazano je kako ILK pod utjecajem citokina potiče nastanak metastaza te je u mnogim zloćudnim tumorima, uključujući karcinom dojke, primijećena povećena ekspresija ILK-a. Osobe koji imaju tumore s povećanom ekspresijom ILK-a imaju znatno lošije prognoze od onih kod kojih je ekspresija ILK-a vrlo mala ili je uopće nema, no uloga ILK-a u razvoju i napredovanju tumora puno je kompleksnija no što izgleda budući da niz istraživanja govori i o njegovoj ulozi tumor-supresora.[40,74] Iz rezultata prikazanih u ovom radu jasno je kako utišavanjem integrina αv dolazi do smanjenja količine ILK-a u fokalnim adhezijama (potvrđeno metodom western blot i MS-om), što je možda samo rezultat smanjenja količine njegovih interakcijskih partnera, primjerice paksilina, koji sudjeluje u sastavljanju i sazrijevanju fokalnih adhezija.

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

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

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

§ 5. ZAKLJUČAK

- Iz stanica MDA-MB-231 izdvojeni su klon 231shαv s utišanom podjedinicom integrina αv i kontrolni klon 231sh. U stanicama 231shαv, u odnosu na stanice MDA-MB-231 i klon 231sh, potvrđena je smanjena ekspresija integrina αvβ3 i αvβ5 na površini stanica.
- Stanice 231shαv pokazuju smanjenu osjetljivost na protutumorske lijekove cisplatinu i paklitaksel u odnosu na staničnu liniju 231sh, što je u suprotnosti s rezultatima prolaznog utišavanja integrina αv. Ovakav rezultat može biti posljedica kompenzacijskih događaja u stanici pri izdvajanju stabilnih transfektanata kao što je preslagivanje integrina.
- U izolatima fokalnih adhezija stanica 231sh spektrometrijom masa identificirano je 426 proteina. Za 107 tih proteina utvrđeno je da pripadaju skupini proteina povezanih s fokalnim adhezijama, a 95 ih pripada skupini proteina povezanih s izvanstaničnim matriksom.
- Spektrometrijom masa pokazano je da su u izolatima fokalnih adhezija stanica 231shαv 17 proteina prisutno u manjoj količini u odnosu na izolate fokalnih adhezija stanica 231sh.
- U adhesomu stanica 231sh u najvećoj količini prisutan je integrin αv, a zatim integrini β1 i β5, dok u adhesomu stanicama 231shαv integrin αv nije detektiran, a integrini β1 i β5 detektirani su u vrlo malim količinama. Na temelju ovoga zaključeno je da su različito eksprimirani proteini dio adhesoma integrina αv.
- U izolatima fokalnih adhezija stanica 231shαv je metodom western blot potvrđena smanjena ekspresija nekoliko proteina identificiranih spektrometrijom masa u odnosu na izolate fokalnih adhezija stanica 231sh. Osim toga pokazana je i smanjena ekspresija liprin-β1, kinaze fokalne adhezije i paksilina koji nisu identificirani spektrometrijom masa.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

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

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

§ 7. LITERATURNI IZVORI

[1] M. D. Allen, G. J. Thomas, S. Clark, M. M. Dawoud, S. Vallath, S. J. Payne, J. J. Gomm, S. A. Dreger, S. Dickinson, D. R. Edwards, et al., *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 344–357.

[2] https://www.cancer.gov/, 20. 6. 2018.

[3] D. C. Temian, L. A. Pop, A. I. Irimie, I. Berindan-Neagoe, *J. Breast Cancer* **2018**, *21*, 233–243.

[4] E. Musta, N. Jonji, K. Rajkovi, M. Avirovi, *Med. Flumiensis* **2016**, *52*, 357–361.

[5] M. L. Plasilova, B. Hayse, B. K. Killelea, N. R. Horowitz, A. B. Chagpar, D. R. Lannin, *Medicine (Baltimore).* **2016**, *95*, e4614.

[6] W. A. W. Karima Oualla, Heba M. El-Zawahry, Banu Arun, James M. Reuben, N. T. U. and T. M. F. Heba Gamal El-Din, Bora Lim, Nawfel Mellas, *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2017**, *9*, 493–511.

[7] E. A. O'Reilly, L. Gubbins, S. Sharma, R. Tully, M. H. Z. Guang, K. Weiner-Gorzel, J. McCaffrey, M. Harrison, F. Furlong, M. Kell, et al., *BBA Clin.* **2015**, *3*, 257–275.

[8] K. J. Chavez, S. V Garimella, S. Lipkowitz, *Breast Dis.* **2010**, *32*, 35–48.

[9] A. Manninen, M. Varjosalo, *Proteomics* **2017**, *17*, 1–42.

[10] S. M. Weis, D. A. Cheresh, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2011**, *1*, 1–14.

[11] J. Desgrosellier, C. David, *Cancer, Nat Rev* **2015**, *10*, 9–22.

[12] E. R. Horton, A. Byron, J. A. Askari, D. H. J. Ng, A. Millon-Frémillon, J. Robertson, E. J. Koper, N. R. Paul, S. Warwood, D. Knight, et al., *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1577.

[13] K. A. Jansen, P. Atherton, C. Ballestrem, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *71*, 75–83.

[14] N. Stojanović, A. Dekanić, M. Paradžik, D. Majhen, K. Ferenčak, J. Ruščić, *Mol. Pharm.* **2018**, u postupku objavljivanja.

[15] D. Hanahan, R. a Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–74.

[16] J. Mendelsohn, P. M. Howley, M. A. Israel, J. W. Gray, C. B. Thompson, A. J. Levine, W. Hu, Z. Feng, *Mol. Basis Cancer* **2008**, 31–38.

[17] https://pathology.jhu.edu/breast/my-results/types-of-breast-cancer/, 5. 10. 2018.

[18] M. Akram, M. Iqbal, M. Daniyal, A. U. Khan, *Biol. Res.* **2017**, *50*, 33.

[19] G. Bianchini, J. M. Balko, I. A. Mayer, M. E. Sanders, L. Gianni, *Nat. Rev. Clin.*

Oncol. **2017**, *13*, 674–690.

[20] Shaloam Dasari and Paul Bernard Tchounwou, *Eur J Pharmacol* **2014**, *5*, 364–378.

[21] M. B. Hampton, S. Orrenius, *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 552–6.

[22] A. Shrivastava, P. M. Kuzontkoski, J. E. Groopman, A. Prasad, *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1161–1172.

[23] A. Brozovic, D. Majhen, V. Roje, N. Mikac, S. Jakopec, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriovic-Ristov, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 298–306.

[24] J. Anampa, D. Makower, J. A. Sparano, *BMC Med.* **2015**, *13*, 1–13.

[25] B. A. Weaver, *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 2677–2681.

[26] R. Rouzier, C. M. Perou, W. F. Symmans, N. Ibrahim, M. Cristofanilli, K. Anderson, K. R. Hess, J. Stec, M. Ayers, P. Wagner, et al., *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 5678–5685.

[27] D. F. Hayes, A. D. Thor, L. G. Dressler, D. Weaver, S. Edgerton, D. Cowan, G. Broadwater, L. J. Goldstein, S. Martino, J. N. Ingle, et al., *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 1496–1506.

[28] I. Ojima, B. Lichtenthal, S. Lee, C. Wang, X. Wang, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 1–20.

[29] ECACC, *Eur. Collect. Cell Cult.* **2017**, *2780*, 87092802.

[30] A. Hollestelle, Æ. J. H. A. Nagel, Æ. M. Smid, Æ. S. Lam, Æ. F. Elstrodt, M. Wasielewski, Æ. S. Sue, N. Æ. Pim, J. F. Æ. Justine, K. P. Æ. Marieke, et al., *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *121*, 53–64.

[31] M. B. Srichai, R. Zent, in *Cell-Extracellular Matrix Interact. Cancer*, Springer New York, New York, NY, **2010**, pp. 19–41.

[32] I. D. Campbell, M. J. Humphries, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 1–15.

[33] L. Pan, Y. Zhao, Z. Yuan, G. Qin, *Springerplus* **2016**, *5*, DOI 10.1186/s40064-016-2502-0.

[34] E. H. J. Danen, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 881–91.

[35] M. Nieberler, U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H. J. Wester, M. Schwaiger, M. Weinmüller, A. Räder, K. Steiger, H. Kessler, *Cancers (Basel).* **2017**, *9*, 1–33.

[36] M. Christmann, K. Diesler, D. Majhen, C. Steigerwald, N. Berte, H. Freund, N. Stojanović, B. Kaina, M. Osmak, A. Ambriović-ristov, et al., *Oncotarget* **2017**, *8*, 27754–27771.

[37] A. Bianchi-Smiraglia, S. Paesante, A. V. Bakin, *Oncogene* **2013**, *32*, 3049–3058.

[38] I. Eke, N. Cordes, *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *31*, 65–75.

[39] K. M. Moore, G. J. Thomas, S. W. Duffy, J. Warwick, R. Gabe, P. Chou, I. O. Ellis, A. R. Green, S. Haider, K. Brouilette, et al., *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*

[40] B. Wehrle-Haller, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 116–124.

[41] "https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/focal-adhesion, 21. 6. 2018.

[42] http://www.reading.ac.uk/cellmigration/adhesion.htm, 21. 6. 2018.

[43] E. Dickreuter, N. Cordes, *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 721–735.

[44] A. Brozovic, D. Majhen, V. Roje, N. Mikac, S. Jakopec, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriovic-Ristiv, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 298–306.

[45] N. Stojanović, A. Brozovic, D. Majhen, M. H. Bosnar, G. Fritz, M. Osmak, A. Ambriović-Ristov, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 1969–1978.

[46] F. Aoudjit, K. Vuori, *Oncogene* **2001**, *20*, 4995–5004.

[47] A. Taherian, X. Li, Y. Liu, T. A. Haas, *BMC Cancer* **2011**, *11*, 293.

[48] A. Ambriovic-Ristov, J. Gabrilovac, T. Cimbora-Zovko, M. Osmak, *Int J Cancer* **2004**, *110*, 660–667.

[49] J. G. Parvani, A. J. Galliher-Beckley, B. J. Schiemann, W. P. Schiemann, *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 3449–3459.

[50] H. H. Truong, J. Xiong, V. P. S. Ghotra, E. Nirmala, S. E. Le Dévédec, H. E. Balciolu, S. He, B. Ewa, E. Vreugdenhil, J. H. N. Meerman, et al., *Sci. Signal.* **2014**, *7*, ra15.

[51] K. Čuljak, Karakterizacija adhesoma u stanicama karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 nakon *de novo* ekspresije integrina αvβ3, **2018**.

[52] A. Byron, J. D. Humphries, J. a Askari, S. E. Craig, a P. Mould, M. J. Humphries, *J Cell Sci.* **20AD**, *122*, 4009–4011.

[53] M. Millard, S. Odde, N. Neamati, *Theranostics* **2011**, *1*, 154–188.

[54] T. Lautenschlaeger, J. Perry, D. Peereboom, B. Li, A. Ibrahim, A. Huebner, W. Meng, J. White, A. Chakravarti, *Radiat. Oncol.* **2013**, *8*, 1.

[55] E. R. Horton, J. D. Humphries, J. James, M. C. Jones, J. A. Askari, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 4159–4163.

[56] D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44–57.

[57] D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1–13.

[58] J. Robertson, G. Jacquemet, A. Byron, M. C. Jones, S. Warwood, J. N. Selley, D.

Knight, J. D. Humphries, M. J. Humphries, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6265.

[59] J. D. Humphries, M. R. Chastney, J. A. Askari, M. J. Humphries, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *56*, 14–21.

[60] S.-T. S. Lim, *Mol. Cells* **2013**, *36*, 1–6.

[61] H. Yoon, J. P. Dehart, J. M. Murphy, S. T. S. Lim, *J. Histochem. Cytochem.* **2015**, *63*, 114–128.

[62] A. A. Ahmed, A. D. Mills, A. E. K. Ibrahim, J. Temple, C. Blenkiron, M. Vias, C. E. Massie, N. G. Iyer, A. McGeoch, R. Crawford, et al., *Cancer Cell* **2007**, *12*, 514–527.

[63] C. Serra-Pagès, Q. G. Medley, M. Tang, A. Hart, M. Streuli, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15611–20.

[64] S. Chiaretti, V. Astro, E. Chiricozzi, I. De Curtis, *Biol. Cell* **2016**, *108*, 65–75.

[65] A. J. Ehrlicher, R. Krishnan, M. Guo, C. M. Bidan, D. A. Weitz, M. R. Pollak, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 6619–6624.

[66] N. Ye, D. Verma, F. Meng, M. W. Davidson, K. Suffoletto, S. Z. Hua, *Exp. Cell Res.* **2014**, *327*, 57–67.

[67] Y. Xu, T. A. Bismar, J. Su, B. Xu, G. Kristiansen, Z. Varga, L. Teng, D. E. Ingber, A. Mammoto, R. Kumar, et al., *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 2421–37.

[68] A. Carisey, C. Ballestrem, *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 157–163.

[69] J. L. M. Xiao Peng, Elke S. Nelson, K. A. DeMali, *Int Rev Cell Mol Biol* **2011**, *1*, 191–203.

[70] A. M. López-colomé, I. Lee-rivera, R. Benavides-hidalgo, E. López, *J. Hematol. Oncol.* **2017**, 1–15.

[71] M. D. Schaller, *Oncogene* **2001**.

[72] L. A. Shirley, S. Mccarty, M. Yang, X. Zhang, J. Phay, M. D. Ringel, S. Chen, T. O. State, *Surgery* **2016**, *159*, 163–170.

[73] C. Wu, S. Dedhar, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 505–510.

[74] C. V Hinton, S. Avraham, H. K. Avraham, *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 1517–26.

[75] B. Klapholz, N. H. Brown, *J. Cell Sci.* **2017**, jcs.190991.

[76] N. Bonakdar, A. Schilling, M. Spörrer, P. Lennert, A. Mainka, L. Winter, G. Walko, G. Wiche, B. Fabry, W. H. Goldmann, *Exp. Cell Res.* **2015**, *331*, 331–7.

[77] E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2015**, *1853*, 3132–3142.

[78] M. Arpin, D. Chirivino, A. Naba, I. Zwaenepoel, *Cell Adh. Migr.* **2011**, *5*, 199–206.

[79] A. I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4646–58.

[80] W. Zhou, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, *Cancer Genomics Proteomics* **2012**, *9*, 135–42.

[81] J. M. Matthews, K. Lester, S. Joseph, D. J. Curtis, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 111–122.

[82] L. Zhang, J. H. L. Fok, F. E. Davies, *Oncotarget* **2014**, *5*, 1132–48.

[83] K. L. Pennington, T. Y. Chan, M. P. Torres, J. L. Andersen, *Oncogene* **2018**, 1–18.

[84] https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ferm-domain, 29. 9.2018.

§ 8. DODATAK

8.1. Spektrometrija masa

Uzorci su naneseni u jažice gela za elektroforezu (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm) i elektroforeza je provođena dok uzorci nisu ušli u gel (3 min, 200 V). Da bi se mogle lako vizualizirati proteinske vrpce gel se boji bojom InstantBlue. Željene vrpce s proteinima izrezane su iz gela i proveden je postupak ispiranja željenih komadića gela te odbojavanja. Komadići gela zatim su inkubirani s 50% acetonitril / 50% NH_4HCO_3 (c = 25 mmol dm^{-3}) otopine u bunarićima pločice s 96 bunarića. Inkubacija je trajala 30 minuta pri sobnoj temperaturi.

Nakon 30 minuta otopina je uklonjena centrifugiranjem pri 1500 rpm 2 minute. Postupak inkubacije komadića gela u 50% acetonitril / 50% NH_4HCO_3 (c = 25 mmol dm^{-3}) otopini i centrifugiranja ponovljen je još jednom. Komadićima gela dodana je otopina acetonitrila kako bi se gel dehidrirao. Komadići gela držani su u acetonitrilu 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je acetonitril uklonjen centrifugiranjem.

Dodatno sušenje komadića gela rađeno je centrifugiranjem u vakuumu 20-30 minuta. Proteini su reducirani inkubacijom s otopinom DTT-a (c = 10 mmol dm^{-3}) pri 56°C u trajanju od 60 minuta. Nakon redukcije, otopina DTT-a uklonjena je centrifugiranjem, a proteini su zatim alkilirani inkubacijom s otopinom jodoacetamida (c = 55 mmol dm^{-3}) pri 37°C u mraku, u trajanju od 45 minuta. Jodoacetamid je uklonjen centrifugiranjem, a komadići gela su zatim isprani otopinom NH_4HCO_3 (c = 25 mmol dm^{-3}) 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je uklonjena centrifugiranjem, a komadići gela ponovno osušeni acetonitrilom, isprani otopinom NH_4HCO_3 (c = 25 mmol dm^{-3}), osušeni acetonitrilom i zatim centrifugiranjem u vakuum centrifugi. Donja pločica s 96 bunarića zamjenjena je novom, koja će kasnije poslužiti za eluaciju peptida. Komadići gela inkubirani su s otopinom tripsina (γ = 1,25 ng μL^{-1}) 45 minuta pri 4°C, a zatim preko noći pri 37°C. Idući dan su peptidi skupljeni u donju pločicu s 96 bunarića centrifugiranjem, a zatim ekstrahirani iz komadića gela inkubacijom s otopinom 99,8% (v/v) acetonitril / 0,2% mravlja kiselina pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Ponovnim centrifugiranjem otopina peptida je spuštena u donju pločicu s 96 bunarića. Otopine peptida tada su osušene kako bi se peptidi ukoncentrirali. Sušenje je provedeno u vakuum centrifugi

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

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

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

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

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

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

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

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

#	Gen	Protein	Pristupni broj (UniProt)	Molekulska masa	Broj spektara								Prosječni broj spektara		Standardna devijacija	
					231 shαv	231sh	231 shαv	231sh	231 shαv	231sh	231 shαv	231sh	231shαv	231sh	231shαv	231sh
1	CYR61	Protein CYR61	CYR61_HUMAN (+1)	42 kDa	70	58	50	80	49	50	45	73	53,5	65,25	9,70824392	11,8611762
2	PXDN	Peroxidasin homolog	PXDN_HUMAN	165 kDa	41	51	41	65	77	63	70	62	57,25	60,25	16,4373812	5,44862368
3	FLNA	Filamin-A	FLNA_HUMAN	281 kDa	13	107	7	44	42	62	21	110	20,75	80,75	13,2358415	28,4901299
4	PLEC	Plectin	PLEC_HUMAN	532 kDa	4	121	0	54	18	57	5	102	6,75	83,5	6,75925292	28,8140591
5	MYH9	Myosin-9	MYH9_HUMAN (+1)	227 kDa	15	84	11	47	41	47	12	77	19,75	63,75	12,3566784	16,9318487
6	FLNB	Filamin-B	FLNB_HUMAN	278 kDa	9	111	0	35	20	60	12	100	10,25	76,5	7,15454401	30,5655034
7	VIM	Vimentin	VIME_HUMAN (+1)	54 kDa	13	56	12	21	32	42	25	64	20,5	45,75	8,38152731	16,3152536
8	KRT1	Keratin 1	H6VRF8_HUMAN (+4)	66 kDa	31	32	43	34	47	30	34	24	38,75	30	6,49519053	3,74165739
9	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN (+5)	42 kDa	16	33	15	21	30	26	28	42	22,25	30,5	6,79613861	7,88986692
10	ACTN4	Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN (+1)	105 kDa	8	55	4	22	15	32	9	79	9	47	3,93700394	22,0113607
11	THBS1	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	129 kDa	26	25	26	31	33	28	25	26	27,5	27,5	3,20156212	2,29128785
12	TLN1	Talin-1	TLN1_HUMAN (+1)	271 kDa	9	59	4	27	21	33	11	59	11,25	44,5	6,17960355	14,6543509
13	ANXA2	Annexin	A0A024R5Z7_HUMAN (+1)	39 kDa	22	31	18	31	24	17	24	37	22	29	2,44948974	7,34846923
14	AHNAK	Neuroblast differenti	AHNK_HUMAN	629 kDa	0	59	0	9	6	34	0	56	1,5	39,5	2,59807621	20,0810856
15	-	Matrix metalloprotei	Q5TZP0_HUMAN	54 kDa	15	44	4	47	4	46	5	36	7	43,25	4,63680925	4,32290412
16	TIMP3	Metalloproteinase in	TIMP3_HUMAN	24 kDa	20	25	18	29	22	24	14	26	18,5	26	2,95803989	1,87082869
17	ALB	Serum albumin	ALBU_HUMAN (+5)	69 kDa	28	15	29	21	15	15	20	10	23	15,25	5,78791845	3,89711432
18	EDIL3	EGF-like repeat and c	EDIL3_HUMAN	54 kDa	16	13	14	17	27	18	23	14	20	15,5	5,24404424	2,06155281
19	CTGF	Connective tissue gro	CTGF_HUMAN (+3)	38 kDa	25	17	22	29	19	16	22	19	22	20,25	2,12132034	5,16599458
20	MSN	Moesin	MOES_HUMAN (+1)	68 kDa	15	23	9	23	20	14	14	27	14,5	21,75	3,90512484	4,76313972
21	TUBB	Tubulin beta chain	Q5SU16_HUMAN (+1)	50 kDa	4	32	9	13	19	16	22	40	13,5	25,25	7,29725976	11,1663557
22	KRT10	Keratin, type I cytosk	K1C10_HUMAN	59 kDa	16	19	19	22	27	16	18	18	20	18,75	4,18330013	2,16506351
23	-	Tubulin alpha chain	TBA1B_HUMAN (+1)	46 kDa	8	24	4	8	19	11	20	31	12,75	18,5	6,90561366	9,39414711
24	TNC	TNC variant protein (	Q4LE33_HUMAN (+1)	244 kDa	7	10	8	11	29	16	23	9	16,75	11,5	9,49670996	2,6925824
25	GAPDH	Glyceraldehyde-3-ph	G3P_HUMAN (+1)	36 kDa	7	20	8	14	18	12	24	18	14,25	16	7,08431366	3,16227766
26	PLAT	Tissue-type plasmino	TPA_HUMAN (+1)	63 kDa	13	18	9	15	8	17	6	17	9	16,75	2,54950976	1,08972474
27	KRT9	Keratin, type I cytosk	K1C9_HUMAN	62 kDa	13	11	18	19	30	15	14	13	18,75	14,5	6,75925292	2,95803989
28	HSPA8	Heat shock cognate 7	HSP7C_HUMAN (+1)	71 kDa	4	25	0	14	17	11	21	24	10,5	18,5	8,7321246	6,10327781
29	HTRA1	Serine protease HTR/	HTRA1_HUMAN	51 kDa	19	8	16	14	22	10	18	11	18,75	10,75	2,16506351	2,16506351
30	VTN	Vitronectin	VTNC_HUMAN (+1)	54 kDa	10	17	12	16	19	15	13	18	13,5	16,5	3,35410197	1,11803399
31	HIST1H1E	Histone 1, H1e	A3R0T8_HUMAN (+2)	22 kDa	5	8	13	17	16	13	13	8	11,75	11,5	4,08503366	3,77491722
32	ANXA1	Annexin A1	ANXA1_HUMAN (+1)	39 kDa	6	15	6	17	17	13	12	21	10,25	16,5	4,60298816	2,95803989
33	EEF1A1	Elongation factor 1-a	EF1A1_HUMAN (+6)	50 kDa	8	16	11	12	13	9	16	17	12	13,5	2,91547595	3,20156212
34	SERPINE1	Plasminogen activato	PAI1_HUMAN (+1)	45 kDa	7	15	5	13	9	11	5	20	6,5	14,75	1,6583124	3,34477204
35	KRT8	Keratin, type II cytosk	K2C8_HUMAN	54 kDa	8	28	6	14	10	14	8	22	8	19,5	1,41421356	5,89491306
36	KRT2	Keratin, type II cytosk	K22E_HUMAN	65 kDa	17	10	22	25	20	13	19	11	19,5	14,75	1,80277564	6,01560471
37	ENO1	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN (+1)	47 kDa	5	14	4	3	13	7	17	23	9,75	11,75	5,44862368	7,59522877
38	HIST1H2BD	Histone H2B	A0A024QZZ7_HUMAN (+1)	14 kDa	12	8	9	13	11	6	14	10	11,5	9,25	1,80277564	2,58602011
39	SLIT2	Slit homolog 2 protei	SLIT2_HUMAN (+1)	170 kDa	0	21	0	21	4	18	3	13	1,75	18,25	1,78535711	3,26917421
40	PRSS23	Serine protease 23	PRS23_HUMAN (+1)	43 kDa	8	7	6	14	12	11	4	9	7,5	10,25	2,95803989	2,58602011
41	SPTAN1	Spectrin, alpha, non-	A0A024R889_HUMAN (+3)	282 kDa	0	24	0	0	3	8	0	30	0,75	15,5	1,29903811	12,0312094
42	RPL32	60S ribosomal protei	RL32_HUMAN (+3)	16 kDa	8	6	7	11	10	9	8	12	8,25	9,5	1,08972474	2,29128785
43	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-tra	PPIA_HUMAN (+2)	18 kDa	6	10	5	4	10	7	14	15	8,75	9	3,56195171	4,0620192
44	IQGAP1	Ras GTPase-activating	IQGA1_HUMAN (+2)	189 kDa	0	23	0	4	3	9	0	27	0,75	15,75	1,29903811	9,52299848
45	PKM	Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN (+1)	58 kDa	5	5	0	7	13	4	20	14	9,5	7,5	7,63216876	3,90512484
46	FLNC	Filamin-C	FLNC_HUMAN	291 kDa	0	29	0	5	0	19	0	28	0	20,25	0	9,62743476
47	TFPI2	Tissue factor pathway	TFPI2_HUMAN	27 kDa	8	9	9	11	10	8	4	8	7,75	9	2,2776084	1,22474487
48	RPS27A	Ubiquitin-40S riboso	RS27A_HUMAN (+2)	18 kDa	5	10	3	8	9	6	12	7	7,25	7,75	3,49106001	1,47901995
49	ACTN1	Alpha-actinin-1	ACTN1_HUMAN (+1)	103 kDa	8	40	0	14	13	23	0	59	5,25	34	5,53962995	17,1901134
50	C4A	Complement C4-A	CO4A_HUMAN (+1)	193 kDa	7	8	8	10	5	6	8	7	7	7,75	1,22474487	1,47901995
51	SPTBN1	Spectrin beta chain	A0A087WUZ3_HUMAN (+2)	275 kDa	0	19	0	0	5	8	0	24	1,25	12,75	2,16506351	9,3641604
52	KRT18	Keratin, type I cytosk	K1C18_HUMAN (+2)	48 kDa	0	13	0	6	6	8	2	25	2	13	2,44948974	7,38241153
53	KRT14	Keratin, type I cytosk	K1C14_HUMAN	52 kDa	7	10	12	9	17	6	10	6	11,5	7,75	3,64005495	1,78535711
54	LAMA5	Laminin subunit alph	LAMA5_HUMAN	400 kDa	4	3	7	6	12	3	15	4	9,5	4	4,27200187	1,22474487
55	CLIC1	Chloride intracellular	CLIC1_HUMAN (+3)	27 kDa	3	10	2	6	7	6	6	13	4,5	8,75	2,06155281	2,94745653
56	A2M	Alpha-2-macroglobu	A2MG_HUMAN	163 kDa	8	5	9	6	7	3	7	4	7,75	4,5	0,8291562	1,11803399
57	VCL	Vinculin	VINC_HUMAN (+2)	124 kDa	2	18	2	4	3	5	0	14	1,75	10,25	1,08972474	5,93190526
58	HIST1H4H	Histone H4	B2R4R0_HUMAN (+2)	11 kDa	8	5	3	5	10	5	8	11	7,25	6,5	2,58602011	2,59807621
59	-	cDNA FLJ53698, high	B7Z992_HUMAN	79 kDa	6	8	5	6	7	6	7	8	6,25	7	0,8291562	1
60	HNRNPM	Heterogeneous nucle	A0A087X0X3_HUMAN (+3)	78 kDa	0	2	0	0	2	2	11	3	3,25	1,75	4,54835135	1,08972474
61	DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1	DYHC1_HUMAN	532 kDa	0	9	0	0	3	0	4	11	1,75	5	1,78535711	5,04975247
62	NOG	Noggin	NOGG_HUMAN (+1)	26 kDa	7	8	5	7	6	7	5	6	5,75	7	0,8291562	0,70710678
63	ADAMTS1	A disintegrin and me	ATS1_HUMAN (+2)	105 kDa	4	4	5	7	4	6	5	5	4,5	5,5	0,5	1,11803399
64	PLAU	Urokinase-type plasn	UROK_HUMAN (+4)	49 kDa	3	6	6	11	7	6	4	5	5	7	1,58113883	2,34520788
65	H3F3B	Histone H3	B2R4P9_HUMAN (+5)	15 kDa	6	4	4	5	5	5	7	5	5,5	4,75	1,11803399	0,4330127
66	C3	Complement C3	CO3_HUMAN (+1)	187 kDa	6	7	6	5	5	4	6	0	5,75	4	0,4330127	2,54950976
67	HSP90AB1	Heat shock protein 9	A0A024RD80_HUMAN (+2)	83 kDa	3	13	2	4	6	0	4	20	3,75	9,25	1,47901995	7,79021823
68	RPS8	40S ribosomal protei	RS8_HUMAN (+1)	24 kDa	6	8	4	8	3	7	5	5	4,5	7	1,11803399	1,22474487
69	RPL23A	60S ribosomal protei	RL23A_HUMAN	18 kDa	6	4	5	8	0	5	6	2	4,25	4,75	2,48746859	2,16506351

70	F2	Prothrombin	THRB_HUMAN (+1)	70 kDa	10	7	6	4	7	6	6	4	7,25	5,25	1,63935963	1,29903811
71	PLG	Plasminogen	A0A0F7G8J1_HUMAN	91 kDa	4	5	3	6	4	4	5	7	4	5,5	0,70710678	1,11803399
72	HBA2	Mutant hemoglobin	A0A0K2BMD8_HUMAN (+7)	15 kDa	7	4	5	8	5	6	3	0	5	4,5	1,41421356	2,95803989
73	TFPI	Tissue factor pathwa	TFPI1_HUMAN	35 kDa	6	6	5	7	6	6	8	6	6,25	6,25	1,08972474	0,4330127
74	LMNA	Prelamin-A/C	LMNA_HUMAN	74 kDa	2	6	2	5	9	5	10	3	5,75	4,75	3,76662979	1,08972474
75	CLTC	Clathrin heavy chain	CLH1_HUMAN (+1)	192 kDa	0	13	0	0	2	3	0	16	0,5	8	0,8660254	6,67083203
76	CRISPLD2	Cysteine-rich secreto	CRLD2_HUMAN (+2)	56 kDa	8	0	5	5	10	0	5	0	7	1,25	2,12132034	2,16506351
77	RPL27A	Ribosomal protein L2	Q6NZ52_HUMAN (+1)	16 kDa	5	4	6	6	6	6	4	5	5,25	5,25	0,8291562	0,8291562
78	AGRN	Agrin	AGRIN_HUMAN	217 kDa	2	0	6	3	9	3	8	2	6,25	2	2,68095132	1,22474487
79	FASN	Fatty acid synthase	FAS_HUMAN (+1)	273 kDa	0	16	0	0	0	0	2	14	0,5	7,5	0,8660254	7,53325959
80	RPL26	60S ribosomal protei	RL26_HUMAN (+4)	17 kDa	4	4	5	7	5	2	5	2	4,75	3,75	0,4330127	2,04633819
81	LAMB3	Laminin subunit beta	LAMB3_HUMAN (+1)	130 kDa	2	4	0	7	4	4	0	7	1,5	5,5	1,6583124	1,5
82	TNS3	Tensin-3	TENS3_HUMAN	155 kDa	0	8	0	6	0	5	0	11	0	7,5	0	2,29128785
83	H1F0	Histone H1.0	H10_HUMAN	21 kDa	5	2	4	8	6	4	3	3	4,5	4,25	1,11803399	2,2776084
84	F5	Coagulation factor V	FA5_HUMAN (+1)	252 kDa	3	4	4	6	4	3	7	3	4,5	4	1,5	1,22474487
85	POSTN	Periostin	POSTN_HUMAN (+2)	93 kDa	2	6	4	6	3	3	3	4	3	4,75	0,70710678	1,29903811
86	COL8A1	Collagen alpha-1(VIII	CO8A1_HUMAN	73 kDa	3	0	2	4	4	4	3	5	3	3,25	0,70710678	1,92028644
87	LDHA	L-lactate dehydrogen	LDHA_HUMAN (+1)	37 kDa	2	2	3	0	2	0	9	5	4	1,75	2,91547595	2,04633819
88	EEF2	Elongation factor 2	EF2_HUMAN	95 kDa	0	10	0	0	0	3	4	13	1	6,5	1,73205081	5,22015325
89	LTBP4	Latent-transforming	LTBP4_HUMAN (+1)	173 kDa	2	0	4	0	10	0	8	0	6	0	3,16227766	0
90	RPS24	40S ribosomal protei	RS24_HUMAN (+2)	15 kDa	5	3	5	6	6	4	3	5	4,75	4,5	1,08972474	1,11803399
91	SERPINC1	Antithrombin-III	ANT3_HUMAN (+2)	53 kDa	6	4	3	4	4	0	4	2	4,25	2,5	1,08972474	1,6583124
92	HIST2H2AA3	Histone H2A type 2-/	H2A2A_HUMAN (+1)	14 kDa	5	3	4	3	6	4	4	4	4,75	3,5	0,8291562	0,5
93	NT5E	5'-nucleotidase	5NTD_HUMAN (+3)	63 kDa	0	2	0	8	3	2	3	8	1,5	5	1,5	3
94	RAC1	Ras-related C3 botuli	RAC1_HUMAN (+3)	21 kDa	4	5	2	4	3	3	3	2	3	3,5	0,70710678	1,11803399
95	ITIH2	Inter-alpha-trypsin in	ITIH2_HUMAN (+3)	106 kDa	6	2	7	4	3	4	3	2	4,75	3	1,78535711	1
96	KRT6C	Keratin, type II cytosk	K2C6C_HUMAN	60 kDa	8	13	9	12	12	9	0	5	7,25	9,75	4,43705984	3,1124749
97	RPL6	60S ribosomal protei	RL6_HUMAN (+4)	33 kDa	3	4	2	9	2	2	0	3	1,75	4,5	1,08972474	2,6925824
98	RPL36A	60S ribosomal protei	J3KQN4_HUMAN (+1)	16 kDa	3	0	3	7	4	7	5	0	3,75	3,5	0,8291562	3,5
99	EEF1G	Elongation factor 1-g	EF1G_HUMAN (+1)	50 kDa	3	4	2	3	4	4	5	7	3,5	4,5	1,11803399	1,5
100	PLG	Plasminogen	PLMN_HUMAN (+1)	91 kDa	7	6	0	8	6	6	5	4	4,5	6	2,6925824	1,41421356
101	KRT5	Keratin, type II cytosk	K2C5_HUMAN	62 kDa	8	10	10	13	14	8	9	0	10,25	7,75	2,2776084	4,81534007
102	DKK1	Dickkopf-related pro	DKK1_HUMAN (+1)	29 kDa	4	0	6	4	6	3	4	3	5	2,5	1	1,5
103	SEMA3C	Semaphorin-3C	SEM3C_HUMAN (+1)	85 kDa	4	3	4	0	4	2	3	3	3,75	2	0,4330127	1,22474487
104	RPL29	60S ribosomal protei	RL29_HUMAN (+2)	18 kDa	5	0	2	6	5	3	2	4	3,5	3,25	1,5	2,16506351
105	HSPA1B	Heat shock 70 kDa pr	A0A0G2JIW1_HUMAN (+5)	70 kDa	3	6	0	5	6	4	6	8	3,75	5,75	2,48746859	1,47901995
106	-	Neuropilin-1 variant	Q59F20_HUMAN (+2)	100 kDa	0	2	0	2	5	3	0	9	1,25	4	2,16506351	2,91547595
107	RPL18	60S ribosomal protei	J3QQ67_HUMAN	22 kDa	5	3	2	5	3	6	3	3	3,25	4,25	1,08972474	1,29903811
108	QSOX1	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN (+3)	83 kDa	0	6	2	4	5	4	3	5	2,5	4,75	1,80277564	0,8291562
109	EIF4A1	Eukaryotic initiation	IF4A1_HUMAN (+1)	46 kDa	0	5	0	0	2	2	2	12	1	4,75	1	4,54835135
110	RPS3	40S ribosomal protei	RS3_HUMAN	27 kDa	0	6	0	5	0	0	6	6	1,5	4,25	2,59807621	2,48746859
111	SNRPD3	Small nuclear ribonu	SMD3_HUMAN	14 kDa	3	3	4	4	4	2	4	3	3,75	3	0,4330127	0,70710678
112	SERPINE2	Serpin peptidase inhi	A0A024R498_HUMAN (+1)	44 kDa	4	2	3	4	4	4	2	4	3,25	3,5	0,8291562	0,8660254
113	SLC25A5	ADP/ATP translocase	ADT2_HUMAN (+1)	33 kDa	2	2	0	3	3	0	4	8	2,25	3,25	1,47901995	2,94745653
114	ADAMTS15	A disintegrin and me	ATS15_HUMAN	103 kDa	4	2	3	3	5	3	4	0	4	2	0,70710678	1,22474487
115	PGK1	Phosphoglycerate kir	PGK1_HUMAN (+1)	45 kDa	0	4	0	2	2	0	9	7	2,75	3,25	3,69966215	2,58602011
116	AHSG	Alpha-2-HS-glycopro	FETUA_HUMAN (+1)	39 kDa	2	3	5	4	4	5	4	2	3,75	3,5	1,08972474	1,11803399
117	ANXA5	Annexin A5	ANXA5_HUMAN (+1)	36 kDa	0	4	0	0	4	0	8	7	3	2,75	3,31662479	2,94745653
118	-	cDNA FLJ57154, high	B4DMX4_HUMAN	51 kDa	2	6	4	4	2	0	3	3	2,75	3,25	0,8291562	2,16506351
119	KRT19	Keratin, type I cytosk	K1C19_HUMAN	44 kDa	7	13	0	5	0	6	4	12	2,75	9	2,94745653	3,53553391
120	MVP	Major vault protein	MVP_HUMAN (+1)	99 kDa	0	0	0	0	8	0	7	3	3,75	0,75	3,76662979	1,29903811
121	PFN1	Profilin-1	PROF1_HUMAN	15 kDa	0	4	0	2	5	2	6	6	2,75	3,5	2,77263413	1,6583124
122	RPS26	40S ribosomal protei	RS26_HUMAN (+1)	13 kDa	5	0	4	4	3	2	4	3	4	2,25	0,70710678	1,47901995
123	LGALS1	Galectin-1	LEG1_HUMAN	15 kDa	0	5	2	4	5	0	3	5	2,5	3,5	1,80277564	2,06155281
124	TGFBI	Transforming growth	A0A0S2Z4Q2_HUMAN (+3)	75 kDa	5	2	0	2	6	0	4	0	3,75	1	2,2776084	1
125	MYL6	Myosin light polypep	B7Z6Z4_HUMAN (+5)	27 kDa	0	5	0	2	2	6	0	6	0,5	4,75	0,8660254	1,63935963
126	RPL8	60S ribosomal protei	RL8_HUMAN	28 kDa	3	0	0	5	3	0	4	2	2,5	1,75	1,5	2,04633819
127	RAN	GTP-binding nuclear	B5MDF5_HUMAN (+2)	26 kDa	0	5	2	4	2	2	3	5	1,75	4	1,08972474	1,22474487
128	TPM3	Tropomyosin 3 isofo	A0A0S2Z4G4_HUMAN (+3)	29 kDa	0	3	0	0	0	2	0	8	0	3,25	0	2,94745653
129	CORO1C	Coronin-1C	COR1C_HUMAN (+5)	53 kDa	0	8	0	0	0	6	0	7	0	5,25	0	3,1124749
130	RPL34	60S ribosomal protei	RL34_HUMAN (+1)	13 kDa	3	0	0	3	0	4	0	2	0,75	2,25	1,29903811	1,47901995
131	SRPX	Sushi repeat-containi	SRPX_HUMAN	52 kDa	5	3	0	2	3	0	0	0	2	1,25	2,12132034	1,29903811
132	CD55	Complement decay-a	B1AP13_HUMAN	49 kDa	4	0	2	2	3	0	4	0	3,25	0,5	0,8291562	0,8660254
133	LAMB2	Laminin subunit beta	LAMB2_HUMAN (+1)	196 kDa	0	0	3	2	6	0	6	2	3,75	1	2,48746859	1
134	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/	1433Z_HUMAN (+1)	28 kDa	0	4	0	0	2	3	3	6	1,25	3,25	1,29903811	2,16506351
135	RPS11	40S ribosomal protei	RS11_HUMAN	18 kDa	0	4	2	2	0	0	2	3	1	2,25	1	1,47901995
136	NTN4	Netrin-4	NET4_HUMAN (+2)	70 kDa	3	3	0	3	0	4	0	4	0,75	3,5	1,29903811	0,5
137	RPL7A	60S ribosomal protei	RL7A_HUMAN	30 kDa	2	2	0	5	0	2	0	3	0,5	3	0,8660254	1,22474487
138	NACA	Nascent polypeptide-	NACAM_HUMAN	205 kDa	0	0	0	5	3	2	2	5	1,25	3	1,29903811	2,12132034
139	ISOC1	Isochorismatase dom	ISOC1_HUMAN	32 kDa	0	0	0	3	5	0	3	2	2	1,25	2,12132034	1,29903811
140	MACF1	Microtubule-actin cr	H3BPE1_HUMAN (+1)	857 kDa	0	10	0	0	0	0	0	3	0	3,25	0	4,08503366

141	C1QTNF3	Complement C1q tur	C1QT3_HUMAN (+2)	27 kDa	3	0	3	2	5	0	3	2	3,5	1	0,8660254	1
142	RPL35	60S ribosomal protei	RL35_HUMAN	15 kDa	0	0	2	0	0	2	2	0	1	0,5	1	0,8660254
143	NME1-NME2	Nucleoside diphosph	Q32Q12_HUMAN (+1)	33 kDa	0	2	0	0	2	0	3	6	1,25	2	1,29903811	2,44948974
144	RPL24	60S ribosomal protei	RL24_HUMAN (+3)	18 kDa	4	0	0	3	0	3	3	3	1,75	2,25	1,78535711	1,29903811
145	CPNE1	Copine-1	B0QZ18_HUMAN (+2)	60 kDa	0	2	0	2	0	0	2	4	0,5	2	0,8660254	1,41421356
146	FN1	Fibronectin	FINC_HUMAN	263 kDa	0	0	2	2	2	0	3	0	1,75	0,5	1,08972474	0,8660254
147	ITGB5	Integrin beta-5	ITB5_HUMAN (+1)	88 kDa	0	0	0	6	2	2	0	5	0,5	3,25	0,8660254	2,384848
148	TUBB4B	Tubulin beta-4B chai	TBB4B_HUMAN (+1)	50 kDa	0	26	0	0	18	15	0	33	4,5	18,5	7,79422863	12,4599358
149	EZR	Ezrin	EZRI_HUMAN (+3)	69 kDa	0	17	0	0	0	7	0	14	0	9,5	0	6,57647322
150	PRDX1	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN (+1)	22 kDa	0	5	0	0	0	3	4	6	1	3,5	1,73205081	2,29128785
151	HSPA5	78 kDa glucose-regul	GRP78_HUMAN (+1)	72 kDa	0	0	0	0	5	0	6	9	2,75	2,25	2,77263413	3,89711432
152	RPS9	40S ribosomal protei	RS9_HUMAN (+1)	23 kDa	0	0	0	2	0	2	0	3	0	1,75	0	1,08972474
153	FAU	40S ribosomal protei	RS30_HUMAN (+1)	7 kDa	0	0	4	3	3	3	2	0	2,25	1,5	1,47901995	1,5
154	RPL7	60S ribosomal protei	RL7_HUMAN (+2)	29 kDa	2	2	0	3	2	2	2	2	1,5	2,25	0,8660254	0,4330127
155	-	cDNA FLJ76654, high	A8K309_HUMAN	39 kDa	0	3	0	4	4	3	3	0	1,75	2,5	1,78535711	1,5
156	HNRNPA2B1	Heterogeneous nucle	ROA2_HUMAN	37 kDa	0	0	0	0	0	0	5	5	1,25	1,25	2,16506351	2,16506351
157	TIMP2	Metalloproteinase in	TIMP2_HUMAN (+2)	24 kDa	0	2	0	3	0	3	0	3	0	2,75	0	0,4330127
158	ADAMTSL1	ADAMTS-like protein	ATL1_HUMAN	193 kDa	5	0	3	0	4	0	5	0	4,25	0	0,8291562	0
159	GC	Vitamin D-binding pr	VTDB_HUMAN (+2)	53 kDa	3	0	2	2	0	3	0	2	1,25	1,75	1,29903811	1,08972474
160	SERPINF1	Pigment epithelium-c	PEDF_HUMAN (+1)	46 kDa	3	2	0	0	4	2	0	3	1,75	1,75	1,78535711	1,08972474
161	RPL28	60S ribosomal protei	RL28_HUMAN (+1)	16 kDa	2	4	0	3	0	4	3	2	1,25	3,25	1,29903811	0,8291562
162	NCL	Nucleolin	NUCL_HUMAN (+1)	77 kDa	0	3	0	0	6	0	0	2	1,5	1,25	2,59807621	1,29903811
163	HSP90AA1	Heat shock protein H	HS90A_HUMAN (+1)	85 kDa	0	7	0	0	0	0	3	16	0,75	5,75	1,29903811	6,57171971
164	HSPA9	Stress-70 protein, mi	GRP75_HUMAN (+1)	74 kDa	0	0	0	0	4	0	5	5	2,25	1,25	2,2776084	2,16506351
165	ZNF185	Zinc finger protein 18	ZN185_HUMAN	74 kDa	0	5	0	0	0	2	0	4	0	2,75	0	1,92028644
166	HSPD1	60 kDa heat shock pr	CH60_HUMAN (+2)	61 kDa	0	0	0	0	3	0	9	3	3	0,75	3,67423461	1,29903811
167	RPL27	60S ribosomal protei	RL27_HUMAN (+2)	16 kDa	0	2	2	2	2	2	2	2	1,5	2	0,8660254	0
168	okuribin	Nuclear envelope pro	CCD80_HUMAN (+2)	108 kDa	0	0	2	0	5	0	6	0	3,25	0	2,384848	0
169	PABPC1	Polyadenylate-bindir	PABP1_HUMAN (+4)	71 kDa	2	3	0	2	2	0	4	4	2	2,25	1,41421356	1,47901995
170	LAMA3	Laminin subunit alph	LAMA3_HUMAN (+1)	367 kDa	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	1,73205081	0
171	RDX	Radixin	RADI_HUMAN (+1)	69 kDa	0	17	0	16	0	8	0	15	0	14	0	3,53553391
172	CAP1	Adenylyl cyclase-assc	D3DPU2_HUMAN (+4)	52 kDa	0	5	0	0	0	2	0	6	0	3,25	0	2,384848
173	THSD4	Thrombospondin typ	THSD4_HUMAN	112 kDa	0	0	6	0	4	0	4	0	3,5	0	2,17944947	0
174	RPS15A	40S ribosomal protei	RS15A_HUMAN (+2)	15 kDa	0	2	2	2	2	2	3	2	1,75	2	1,08972474	0
175	RPS23	40S ribosomal protei	RS23_HUMAN (+1)	16 kDa	0	0	3	2	2	3	0	0	1,25	1,25	1,29903811	1,29903811
176	RPL5	Ribosomal protein L5	A2RUM7_HUMAN (+4)	34 kDa	0	4	0	3	0	0	2	2	0,5	2,25	0,8660254	1,47901995
177	RPL22	60S ribosomal protei	RL22_HUMAN (+1)	15 kDa	3	4	0	3	0	0	2	2	1,25	2,25	1,29903811	1,47901995
178	PCBP1	Poly(rC)-binding pro	PCBP1_HUMAN (+1)	37 kDa	0	0	0	0	3	0	0	6	0,75	1,5	1,29903811	2,59807621
179	IMPDH2	Inosine-5'-monopho	H0Y4R1_HUMAN (+1)	51 kDa	0	3	0	2	0	2	0	6	0	3,25	0	1,63935963
180	PLAUR	Urokinase plasminog	M0R1I2_HUMAN (+1)	32 kDa	0	0	3	5	3	0	2	3	2	2	1,22474487	2,12132034
181	MAP4	Microtubule-associat	E7EVA0_HUMAN	245 kDa	0	2	0	0	2	0	4	3	1,5	1,25	1,6583124	1,29903811
182	PAICS	Phosphoribosylamin	A0A024RD93_HUMAN (+1)	47 kDa	0	2	0	0	0	0	2	4	0,5	1,5	0,8660254	1,6583124
183	TPI1	Triosephosphate isor	TPIS_HUMAN (+1)	31 kDa	0	0	0	0	0	0	4	6	1	1,5	1,73205081	2,59807621
184	ITGAV	Integrin alpha-V	ITAV_HUMAN (+2)	116 kDa	0	2	0	0	0	0	0	7	0	2,25	0	2,86138079
185	ITGB1	Integrin beta-1	ITB1_HUMAN	88 kDa	0	2	0	0	0	0	3	5	0,75	1,75	1,29903811	2,04633819
186	ALDOA	Fructose-bisphospha	ALDOA_HUMAN (+2)	39 kDa	0	0	0	0	0	0	4	5	1	1,25	1,73205081	2,16506351
187	TKT	Transketolase	TKT_HUMAN (+7)	68 kDa	0	3	0	0	0	0	4	4	1	1,75	1,73205081	1,78535711
188	KRT7	Keratin, type II cytosk	K2C7_HUMAN	51 kDa	0	12	0	0	0	6	0	13	0	7,75	0	5,2141634
189	LTF	Lactoferrin	A0A161I202_HUMAN (+13)	78 kDa	2	0	2	2	0	2	2	2	1,5	1,5	0,8660254	0,8660254
190	SNRPB	Small nuclear ribonu	RSMB_HUMAN (+4)	25 kDa	2	2	2	2	0	2	3	2	1,75	2	1,08972474	0
191	CFL1	Cofilin-1	COF1_HUMAN (+3)	19 kDa	0	2	0	0	0	0	4	4	1	1,5	1,73205081	1,6583124
192	RPL11	60S ribosomal protei	RL11_HUMAN (+2)	20 kDa	2	0	0	0	2	0	5	0	2,25	0	1,78535711	0
193	TGFB2	Transforming growth	TGFB2_HUMAN (+1)	48 kDa	0	0	2	0	3	0	3	0	2	0	1,22474487	0
194	RPL14	RPL14 protein	Q6IPH7_HUMAN	24 kDa	0	2	0	2	2	0	2	3	1	1,75	1	1,08972474
195	SEMA3B	Semaphorin-3B	SEM3B_HUMAN (+3)	83 kDa	2	0	3	0	3	0	2	0	2,5	0	0,5	0
196	AHCY	Adenosylhomocystei	SAHH_HUMAN (+1)	48 kDa	0	2	0	3	3	0	2	0	1,25	1,25	1,29903811	1,29903811
197	-	cDNA FLJ90373 fis, h	TIMP1_HUMAN (+3)	23 kDa	0	4	0	2	0	4	0	0	0	2,5	0	1,6583124
198	COL4A2	Collagen alpha-2(IV)	CO4A2_HUMAN (+1)	168 kDa	0	3	0	0	0	0	0	4	0	1,75	0	1,78535711
199	Sep-11	Septin-11	D6RER5_HUMAN (+2)	50 kDa	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2	0	2
200	HNRNPK	Heterogeneous nucle	HNRPK_HUMAN (+2)	51 kDa	0	0	0	0	3	0	5	4	2	1	2,12132034	1,73205081
201	MYH10	Myosin-10	MYH10_HUMAN	229 kDa	0	15	0	0	0	0	0	11	0	6,5	0	6,65206735
202	PLS3	Plastin-3	PLST_HUMAN (+2)	71 kDa	0	3	0	0	0	2	0	6	0	2,75	0	2,16506351
203	CLEC3B	Tetranectin	TETN_HUMAN (+2)	23 kDa	0	0	0	2	2	0	0	0	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
204	RBP4	Retinol binding prote	Q5VY30_HUMAN (+1)	23 kDa	4	0	0	0	0	0	3	0	1,75	0	1,78535711	0
205	FST	Follistatin, isoform CI	A0A024QZU6_HUMAN (+2)	38 kDa	2	2	0	4	0	0	0	3	0,5	2,25	0,8660254	1,47901995
206	RPL23	60S ribosomal protei	RL23_HUMAN (+4)	15 kDa	0	2	0	0	4	3	0	3	1	2	1,73205081	1,22474487
207	RPS18	40S ribosomal protei	RS18_HUMAN	18 kDa	0	0	0	0	2	0	5	4	1,75	1	2,04633819	1,73205081
208	-	cDNA FLJ53573, high	MYO1C_HUMAN (+2)	119 kDa	0	3	0	0	0	0	0	6	0	2,25	0	2,48746859
209	RPL18A	60S ribosomal protei	RL18A_HUMAN (+5)	21 kDa	0	4	0	2	0	2	0	4	0	3	0	1
210	RPL30	60S ribosomal protei	RL30_HUMAN (+2)	13 kDa	4	2	0	0	0	2	0	2	1	1,5	1,73205081	0,8660254
211	PRG4	Proteoglycan 4	A0A0U1RR20_HUMAN	146 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
212	HABP2	Hyaluronan-binding	HABP2_HUMAN	63 kDa	2	0	0	5	0	0	0	0	0,5	1,25	0,8660254	2,16506351
213	FBLN1	Fibulin-1	FBLN1_HUMAN	77 kDa	3	0	3	0	2	0	2	0	2,5	0	0,5	0
214	ANGPTL4	Angiopoietin-related	ANGL4_HUMAN	45 kDa	0	2	0	5	0	2	0	4	0	3,25	0	1,29903811
215	KRT16	Keratin, type I cytosk	K1C16_HUMAN	51 kDa	0	0	0	0	17	0	0	0	4,25	0	7,36121593	0
216	PDLIM5	PDZ and LIM domain	A0A024RDE8_HUMAN (+1)	64 kDa	0	3	0	0	0	3	0	4	0	2,5	0	1,5
217	LOC392748	40S ribosomal protei	H0YMV8_HUMAN (+3)	17 kDa	0	2	0	2	2	0	0	3	0,5	1,75	0,8660254	1,08972474
218	RPL13	60S ribosomal protei	RL13_HUMAN (+2)	24 kDa	0	2	0	2	0	2	2	2	0,5	2	0,8660254	0
219	DDX39B	Spliceosome RNA hel	A0A140T9X3_HUMAN (+1)	38 kDa	0	0	0	2	0	0	2	2	0,5	1	0,8660254	1
220	HBB	Beta-globin	C8C504_HUMAN	16 kDa	2	0	0	3	0	0	0	2	0,5	1,25	0,8660254	1,29903811
221	RPL4	60S ribosomal protei	RL4_HUMAN (+2)	48 kDa	0	0	0	2	2	0	0	2	0,5	1	0,8660254	1
222	RHOC	Rho-related GTP-bin	RHOC_HUMAN (+2)	22 kDa	0	2	0	2	2	0	0	3	0,5	1,75	0,8660254	1,08972474
223	SERPIND1	Heparin cofactor 2	HEP2_HUMAN (+1)	57 kDa	2	0	0	2	0	0	0	0	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
224	hCG_24487	HCG24487, isoform	A0A024R261_HUMAN (+10)	21 kDa	0	2	0	3	0	0	0	2	0	1,75	0	1,08972474
225	LASP1	LIM and SH3 domain	LASP1_HUMAN (+1)	30 kDa	0	3	0	0	0	0	0	4	0	1,75	0	1,78535711
226	ACLY	ACLY variant protein	Q4LE36_HUMAN	125 kDa	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1,25	0	2,16506351
227	HNRNPA1	Heterogeneous nucle	ROA1_HUMAN (+4)	39 kDa	0	0	0	0	0	0	4	3	1	0,75	1,73205081	1,29903811
228	RPS16	40S ribosomal protei	RS16_HUMAN	16 kDa	0	2	0	0	0	0	4	0	1	0,5	1,73205081	0,8660254
229	GDF15	Growth/differentiatic	GDF15_HUMAN	34 kDa	0	0	2	3	2	0	0	0	1	0,75	1	1,29903811
230	PTBP1	Polypyrimidine tract-	A0A0U1RRM4_HUMAN (+2)	62 kDa	0	0	0	0	3	0	2	5	1,25	1,25	1,29903811	2,16506351
231	PFKP	ATP-dependent 6-ph	PFKAP_HUMAN	86 kDa	0	3	0	4	0	0	0	2	0	2,25	0	1,47901995
232	UBA1	Ubiquitin-like modifi	UBA1_HUMAN (+1)	118 kDa	0	0	0	0	0	0	4	2	1	0,5	1,73205081	0,8660254
233	KRT17	Keratin, type I cytosk	K1C17_HUMAN	48 kDa	0	0	0	0	9	0	4	0	3,25	0	3,69966215	0
234	MYOF	Myoferlin	MYOF_HUMAN	235 kDa	0	3	0	0	0	0	0	6	0	2,25	0	2,48746859
235	LUZP1	Leucine zipper protei	LUZP1_HUMAN (+1)	120 kDa	0	5	0	0	0	0	0	3	0	2	0	2,12132034
236	RAP1B	Ras-related protein R	RAP1B_HUMAN (+2)	21 kDa	0	2	0	2	2	0	2	2	1	1,5	1	0,8660254
237	RPL12	60S ribosomal protei	RL12_HUMAN	18 kDa	0	0	2	0	2	0	3	2	1,75	0,5	1,08972474	0,8660254
238	RPS7	40S ribosomal protei	RS7_HUMAN	22 kDa	0	0	0	0	2	0	0	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
239	LAMC2	Laminin subunit gam	LAMC2_HUMAN	131 kDa	0	2	0	0	2	0	0	0	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
240	SNRPD1	Small nuclear ribonu	SMD1_HUMAN	13 kDa	2	0	3	0	0	0	2	0	1,75	0	1,08972474	0
241	RPL36	60S ribosomal protei	RL36_HUMAN	12 kDa	2	0	0	0	2	2	2	0	1,5	0,5	0,8660254	0,8660254
242	RPS4X	40S ribosomal protei	RS4X_HUMAN (+3)	30 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811
243	RPL15	60S ribosomal protei	RL15_HUMAN (+2)	24 kDa	0	0	0	2	0	0	0	3	0	1,25	0	1,29903811
244	RPS13	40S ribosomal protei	RS13_HUMAN	17 kDa	0	3	0	0	2	0	2	2	1	1,25	1	1,29903811
245	-	cDNA, FLJ94436, higl	PDGFC_HUMAN (+2)	39 kDa	0	0	3	2	0	0	3	0	1,5	0,5	1,5	0,8660254
246	ITIH4	Inter-alpha (Globulin	B2RMS9_HUMAN (+3)	103 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
247	MATN2	Matrilin 2, isoform C	A0A024R9B9_HUMAN (+3)	103 kDa	0	0	2	0	2	0	2	0	1,5	0	0,8660254	0

248	MYL12A	Myosin regulatory lig	ML12A_HUMAN (+3)	20 kDa	0	4	0	0	0	3	0	4	0	2,75	0	1,63935963
249	Sep-09	Septin-9	SEPT9_HUMAN (+2)	65 kDa	0	3	0	0	0	0	0	4	0	1,75	0	1,78535711
250	ARPC4	Actin-related protein	ARPC4_HUMAN	20 kDa	0	2	0	0	0	2	2	2	0,5	1,5	0,8660254	0,8660254
251	CDC42	Cell division control p	CDC42_HUMAN (+4)	21 kDa	0	0	2	3	2	0	0	2	1	1,25	1	1,29903811
252	CRISPLD1	Cysteine-rich secreto	B7Z8V9_HUMAN (+1)	35 kDa	3	0	0	0	3	0	0	0	1,5	0	1,5	0
253	KRT6A	Keratin, type II cytosk	K2C6A_HUMAN (+3)	60 kDa	0	0	0	0	13	0	0	0	3,25	0	5,62916513	0
254	H2AFY	Histone H2A	B4DJC3_HUMAN (+1)	22 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
255	ARF3	ADP-ribosylation fact	A0A024R0Y6_HUMAN (+3)	21 kDa	0	0	0	3	2	0	0	0	0,5	0,75	0,8660254	1,29903811
256	CCT8	T-complex protein 1	TCPQ_HUMAN (+1)	60 kDa	0	2	0	0	0	0	0	6	0	2	0	2,44948974
257	LDHB	L-lactate dehydrogen	LDHB_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	0	3	0	4	4	1,75	1	1,78535711	1,73205081
258	-	Rab GDP dissociation	GDIB_HUMAN (+2)	51 kDa	0	0	0	0	2	0	3	0	1,25	0	1,29903811	0
259	-	Testicular tissue prot	A0A140VJM0_HUMAN (+1)	117 kDa	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,5	0	1,6583124
260	PDLIM7	PDZ and LIM domain	PDLI7_HUMAN	50 kDa	0	4	0	0	0	0	0	6	0	2,5	0	2,59807621
261	S100A7	Protein S100-A7	S10A7_HUMAN	11 kDa	0	0	0	0	8	0	0	0	2	0	3,46410162	0
262	-	cDNA FLJ78037, high	E3UN46_HUMAN (+2)	20 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	0,75	0	1,29903811	0
263	COL6A1	Collagen alpha-1(VI)	A0A087X0S5_HUMAN (+2)	108 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
264	MIF	Macrophage migratic	MIF_HUMAN (+1)	12 kDa	0	2	0	0	0	0	2	2	0,5	1	0,8660254	1
265	RPS2	40S ribosomal protei	RS2_HUMAN (+2)	31 kDa	0	2	0	0	0	0	3	0	0,75	0,5	1,29903811	0,8660254
266	ANOS1	Anosmin-1	KALM_HUMAN (+1)	76 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1,73205081	0
267	-	cDNA FLJ60461, high	PRDX2_HUMAN (+2)	20 kDa	0	3	0	0	0	0	3	3	0,75	1,5	1,29903811	1,5
268	ANXA6	Annexin (Fragment)	A0A0S2Z2Z6_HUMAN (+3)	76 kDa	0	0	0	0	0	0	3	2	0,75	0,5	1,29903811	0,8660254
269	RNH1	Ribonuclease inhibitc	RINI_HUMAN (+2)	50 kDa	0	3	0	0	0	0	0	5	0	2	0	2,12132034
270	PDLIM1	PDZ and LIM domain	PDLI1_HUMAN (+1)	36 kDa	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2	0	2
271	HAL	Histidine ammonia-ly	HUTH_HUMAN	73 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
272	RPL21	60S ribosomal protei	RL21_HUMAN (+2)	19 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
273	-	cDNA FLJ75881, high	A8K6Q8_HUMAN (+1)	85 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
274	F10	Coagulation factor X	FA10_HUMAN (+1)	55 kDa	2	0	2	2	2	0	0	0	1,5	0,5	0,8660254	0,8660254
275	HIST1H2BJ	Histone H2B	A0A024RCJ2_HUMAN (+2)	14 kDa	0	0	0	13	0	0	0	0	0	3,25	0	5,62916513
276	HNRNPC	Heterogeneous nucle	HNRPC_HUMAN (+16)	34 kDa	0	0	0	0	0	0	3	3	0,75	0,75	1,29903811	1,29903811
277	SND1	Staphylococcal nuclea	A0A140VK49_HUMAN (+5)	102 kDa	0	2	0	0	2	0	0	3	0,5	1,25	0,8660254	1,29903811
278	PGAM1	Phosphoglycerate mu	PGAM1_HUMAN (+4)	29 kDa	0	2	0	0	0	0	3	2	0,75	1	1,29903811	1
279	DPYSL2	Dihydropyrimidinase	DPYL2_HUMAN (+2)	74 kDa	0	2	0	0	0	2	0	3	0	1,75	0	1,08972474
280	-	T-complex protein 1	B3KX11_HUMAN (+3)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
281	Sep-02	Septin-2	SEPT2_HUMAN	41 kDa	0	2	0	0	2	0	0	4	0,5	1,5	0,8660254	1,6583124
282	LAMC1	Laminin subunit gam	LAMC1_HUMAN (+1)	178 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	0
283	HSPA4	Heat shock 70 kDa pr	A0A087WTS8_HUMAN (+6)	53 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
284	CNN3	Calponin-3	CNN3_HUMAN	36 kDa	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,5	0	1,6583124
285	RPL9	NPC-A-16	Q53Z07_HUMAN (+3)	22 kDa	0	3	0	2	0	0	0	2	0	1,75	0	1,08972474
286	SNRPD2	Small nuclear ribonu	SMD2_HUMAN	14 kDa	0	0	2	0	2	0	0	0	1	0	1	0
287	PRIC295	Peroxisome prolifera	GCN1_HUMAN (+2)	293 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811
288	HSPH1	Heat shock 105kDa/1	A0A024RDQ0_HUMAN (+2)	92 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
289	EIF5A	Eukaryotic translatio	IF5A1_HUMAN (+2)	17 kDa	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1,25	0	2,16506351
290	PDIA6	Protein disulfide-isor	PDIA6_HUMAN	48 kDa	0	0	0	0	0	0	3	6	0,75	1,5	1,29903811	2,59807621
291	HGFAC	Hepatocyte growth fa	D6RAR4_HUMAN (+1)	71 kDa	2	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
292	RPS14	40S ribosomal protei	RS14_HUMAN	16 kDa	0	2	0	0	0	2	2	0	0,5	1	0,8660254	1
293	RPL3	60S ribosomal protei	RL3_HUMAN (+7)	46 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
294	TUBA1C	Tubulin alpha-1C cha	TBA1C_HUMAN (+2)	50 kDa	0	0	0	0	16	0	0	29	4	7,25	6,92820323	12,5573684
295	C9	Complement compor	A0A024R035_HUMAN (+1)	63 kDa	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811	0
296	RPS3A	40S ribosomal protei	A8K4W0_HUMAN (+3)	30 kDa	0	0	0	0	0	0	2	3	0,5	0,75	0,8660254	1,29903811
297	HSP90B1	Endoplasmin	ENPL_HUMAN (+2)	92 kDa	0	0	0	0	2	0	3	4	1,25	1	1,29903811	1,73205081
298	KPNB1	Importin subunit bet	IMB1_HUMAN (+1)	97 kDa	0	3	0	0	0	0	0	3	0	1,5	0	1,5
299	ZYX	Zyxin	ZYX_HUMAN	61 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811
300	-	T-complex protein 1	TCPD_HUMAN (+1)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	0
301	ROCK2	Rho-associated prote	ROCK2_HUMAN	161 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
302	CSE1L	Exportin-2	XPO2_HUMAN	110 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081
303	-	cDNA FLJ53357, high	PSMD2_HUMAN (+1)	99 kDa	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1,25	0	2,16506351
304	EIF4G1	Eukaryotic translatio	IF4G1_HUMAN (+8)	175 kDa	0	3	0	0	0	0	0	3	0	1,5	0	1,5
305	LIMA1	LIM domain and actir	LIMA1_HUMAN (+3)	85 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811
306	-	cDNA FLJ58365, wea	B7Z2J4_HUMAN (+9)	103 kDa	0	4	0	0	0	0	0	3	0	1,75	0	1,78535711
307	ATP5B	ATP synthase subuni	ATPB_HUMAN (+2)	57 kDa	0	0	0	0	0	0	3	3	0,75	0,75	1,29903811	1,29903811
308	RANBP5	RAN binding protein	IPO5_HUMAN (+2)	124 kDa	0	2	0	0	0	0	0	5	0	1,75	0	2,04633819
309	-	cDNA FLJ56021, high	SYEP_HUMAN (+4)	111 kDa	0	2	0	0	0	0	0	4	0	1,5	0	1,6583124
310	TMEM33	Transmembrane prot	A0A024R9W7_HUMAN (+2)	28 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811
311	YBX1	Nuclease-sensitive ele	YBOX1_HUMAN (+2)	36 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	0
312	RPL10	60S ribosomal protei	RL10_HUMAN (+6)	25 kDa	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1	0	1
313	NPM1	Nucleophosmin isofo	A0A0S2Z491_HUMAN (+3)	33 kDa	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1	0	1
314	HNRNPU	Heterogeneous nucle	HNRPU_HUMAN (+3)	91 kDa	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	1	0
315	ITIH3	Inter-alpha-trypsin in	A0A087WW43_HUMAN (+3)	75 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811	0
316	RAB10	Ras-related protein R	RAB10_HUMAN	23 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
317	HLA-A	MHC Class I Antigen	A0A0S4XRK4_HUMAN (+3)	41 kDa	0	0	0	0	2	0	2	2	1	0,5	1	0,8660254
318	KANK2	KN motif and ankyrin	KANK2_HUMAN	91 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811
319	SERPINH1	Serpin H1	SERPH_HUMAN (+1)	46 kDa	0	0	0	0	2	0	2	3	1	0,75	1	1,29903811
320	VASP	Vasodilator-stimulate	A0A024R0V4_HUMAN (+3)	40 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811
321	MPO	Myeloperoxidase	PERM_HUMAN	84 kDa	0	0	0	0	3	0	0	3	0,75	0,75	1,29903811	1,29903811
322	AP2A1	AP-2 complex subun	AP2A1_HUMAN	108 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811
323	PRDX6	Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN (+1)	25 kDa	0	0	0	0	0	0	2	3	0,5	0,75	0,8660254	1,29903811
324	CAD	CAD protein	PYR1_HUMAN (+2)	243 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
325	DHX9	ATP-dependent RNA	DHX9_HUMAN	141 kDa	0	0	0	0	0	0	3	2	0,75	0,5	1,29903811	0,8660254
326	DST	Dystonin	DYST_HUMAN (+3)	861 kDa	0	6	0	0	0	0	0	4	0	2,5	0	2,59807621
327	-	Chaperonin containir	TCPH_HUMAN (+1)	59 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
328	S100A6	Protein S100 (Fragm	R4GN98_HUMAN (+1)	10 kDa	0	0	0	0	3	0	3	0	1,5	0	1,5	0
329	PPP1R13L	RelA-associated inhib	IASPP_HUMAN (+1)	89 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
330	-	cDNA FLJ59571, high	D3DQV9_HUMAN (+4)	110 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
331	EEF1D	Elongation factor 1-d	A0A087X1X7_HUMAN (+5)	69 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081
332	YWHAE	14-3-3 protein epsilc	1433E_HUMAN (+3)	29 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811
333	RPSA	40S ribosomal protei	A0A024R2P0_HUMAN (+4)	33 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
334	-	cDNA, FLJ96812, high	SYTC_HUMAN (+5)	82 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
335	DDX3X	ATP-dependent RNA	A0A0D9SF53_HUMAN (+5)	81 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
336	-	SPANX-B	SPNXB_HUMAN (+2)	12 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0,75	0	1,29903811
337	RAB5C	RAB5C, member RAS	A0A024R1U4_HUMAN (+1)	23 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
338	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-tra	PPIB_HUMAN (+1)	24 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	0
339	RPS17	40S ribosomal protei	RS17_HUMAN (+2)	16 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
340	PGD	6-phosphogluconate	6PGD_HUMAN (+1)	53 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
341	ARF4	ADP-ribosylation fact	ARF4_HUMAN	21 kDa	0	2	0	0	0	0	2	0	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
342	RPS25	40S ribosomal protei	RS25_HUMAN	14 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
343	PTK2	Focal adhesion kinase	H0YBP1_HUMAN (+6)	116 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
344	GOT2	Aspartate aminotran	A0A024R6W0_HUMAN (+2)	47 kDa	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	1	0
345	EIF3A	Eukaryotic translatio	EIF3A_HUMAN (+6)	167 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
346	MDH2	Malate dehydrogena	A0A024R4K3_HUMAN (+4)	36 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	0
347	APOB	Apolipoprotein B-10	APOB_HUMAN (+2)	516 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
348	ILK	Integrin-linked prote	A0A0A0MTH3_HUMAN (+2)	55 kDa	0	3	0	0	0	0	0	3	0	1,5	0	1,5
349	PALLD	Palladin	PALLD_HUMAN	151 kDa	0	3	0	0	0	0	0	3	0	1,5	0	1,5
350	EGFR	Epidermal growth fac	EGFR_HUMAN (+4)	134 kDa	0	2	0	0	0	0	0	3	0	1,25	0	1,29903811
351	C9orf19	Chromosome 9 open	D3DRP5_HUMAN	38 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
352	SFPQ	Splicing factor prolin	Q86VG2_HUMAN (+2)	76 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
353	ELAVL1	ELAV-like protein 1	ELAV1_HUMAN	36 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
354	PIP4K2A	Phosphatidylinositol	PI42A_HUMAN	46 kDa	0	0	0	0	2	0	0	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254

355	PRAG1	Tyrosine-protein kin	PRAG1_HUMAN	150 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
356	VDAC2	Voltage-dependent a	A0A024QZN9_HUMAN (+4)	34 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
357	ANGPTL2	Angiopoietin-like 2, i	A0A024R868_HUMAN (+2)	57 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
358	YWHAG	14-3-3 protein gamm	1433G_HUMAN	28 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081
359	TUBB1	Tubulin beta-1 chain	TBB1_HUMAN	50 kDa	0	0	0	0	6	0	0	0	1,5	0	2,59807621	0
360	C3orf58	Deleted in autism pro	DIA1_HUMAN (+1)	49 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0,75	0	1,29903811
361	-	Methylenetetrahydro	A0A024R652_HUMAN (+3)	102 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
362	CORO1B	Coronin	A0A024R5K1_HUMAN (+2)	54 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811
363	HYOU1	Hypoxia up-regulate	A0A087X054_HUMAN (+3)	105 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
364	TUBB3	Tubulin beta-3 chain	TBB3_HUMAN	50 kDa	0	0	0	0	0	0	0	25	0	6,25	0	10,8253176
365	DBN1	Drebrin	DREB_HUMAN	71 kDa	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1,25	0	1,29903811
366	TAGLN2	Transgelin-2	TAGL2_HUMAN	22 kDa	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	1	0
367	PTX3	Pentraxin-related pro	PTX3_HUMAN	42 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	0,75	0	1,29903811	0
368	GSTP1	Glutathione S-transfe	GSTP1_HUMAN (+1)	23 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
369	-	Uncharacterized prot	H7C469_HUMAN	36 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
370	-	Importin subunit alpl	IMA1_HUMAN (+2)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
371	-	cDNA FLJ54333, high	B4DDU6_HUMAN (+11)	57 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
372	-	cDNA FLJ61290, high	GANAB_HUMAN (+2)	113 kDa	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081	0
373	TNPO1	Transportin 1, isofor	A0A024RAM0_HUMAN (+1)	102 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
374	CAPZB	Capping protein (Act	B1AK87_HUMAN (+4)	29 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
375	MFGE8	Milk fat globule-EGF	A0A024RC55_HUMAN (+6)	43 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0,5	0	0,8660254
376	RPL10A	60S ribosomal protei	RL10A_HUMAN	25 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
377	GPI	Glucose-6-phosphate	A0A0A0MTS2_HUMAN (+4)	65 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
378	ATP5A1	ATP synthase subuni	ATPA_HUMAN (+1)	60 kDa	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5	0,5	0,8660254	0,8660254
379	FHL2	Four and a half LIM c	FHL2_HUMAN (+6)	32 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
380	SCRIB	Protein scribble hom	A0A0G2JMS7_HUMAN (+3)	165 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
381	-	cDNA FLJ60713, high	D6RBZ0_HUMAN (+5)	35 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
382	SVIL	Supervillin	SVIL_HUMAN	248 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
383	ANXA3	Annexin A3	ANXA3_HUMAN (+1)	36 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
384	DKFZp686F1	Uncharacterized prot	A8K3D0_HUMAN (+8)	50 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1,73205081
385	EIF3I	Eukaryotic translatio	EIF3I_HUMAN (+2)	37 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
386	MDH1	Malate dehydrogena	B9A041_HUMAN (+3)	23 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
387	RTCB	tRNA-splicing ligase F	RTCB_HUMAN	55 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
388	ARPC1B	Actin-related protein	ARC1B_HUMAN (+1)	41 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
389	TCP1	T-complex protein 1	TCPA_HUMAN	60 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
390	-	cDNA FLJ76863, high	STIP1_HUMAN (+2)	63 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
391	DSP	Desmoplakin	DESP_HUMAN	332 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
392	VCP	Transitional endopla	TERA_HUMAN (+2)	89 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811	0
393	GARS	Glycyl-tRNA syntheta	A0A090N8G0_HUMAN (+1)	78 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
394	PDCD6IP	Programmed cell dea	PDC6I_HUMAN (+1)	96 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
395	NAP1L1	Nucleosome assembl	A0A024RBB7_HUMAN (+14)	45 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
396	-	Stathmin	A0A140VJW2_HUMAN (+3)	20 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
397	ALYREF	THO complex subuni	E9PB61_HUMAN (+1)	28 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
398	-	Protein disulfide-isor	PDIA3_HUMAN (+3)	55 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
399	RUVBL1	RuvB-like helicase (Fr	B5BUB1_HUMAN (+1)	50 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
400	CTNNA1	Catenin alpha-1	CTNA1_HUMAN (+4)	100 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
401	IPO4	Importin-4	IPO4_HUMAN (+6)	119 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
402	UNC45A	Protein unc-45 homo	UN45A_HUMAN (+1)	118 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
403	PSMA2	Proteasome subunit	A0A024RA52_HUMAN (+1)	26 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
404	ARPC3	Actin-related protein	ARPC3_HUMAN (+3)	21 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
405	ITGA6	Integrin alpha-6	ITA6_HUMAN	127 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
406	RANGAP1	Ran GTPase activating	A0A024R1U0_HUMAN (+3)	64 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
407	UTRN	Utrophin	UTRO_HUMAN	394 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
408	TXNRD1	Thioredoxin reductas	A0A024RBK9_HUMAN (+11)	68 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
409	RUVBL2	RuvB-like 2	RUVB2_HUMAN	51 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
410	-	E3 ubiquitin-protein	ITCH_HUMAN (+2)	93 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
411	KPRP	Keratinocyte proline-	KPRP_HUMAN	64 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254	0
412	PPP1CC	Serine/threonine-pro	A0A024RBP2_HUMAN (+12)	37 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
413	SYNCRIP	Heterogeneous nucle	B7Z645_HUMAN (+4)	52 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
414	TGM2	Protein-glutamine ga	TGM2_HUMAN (+3)	77 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,75	0	1,29903811
415	PLEKHC1	Pleckstrin homology	A0A024R687_HUMAN (+4)	78 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
416	CCT6A	Chaperonin containi	A0A024RDL1_HUMAN (+5)	58 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
417	CAPNS1	Calpain small subunit	A0A075B7C0_HUMAN (+5)	22 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
418	-	Perilipin	A0A140VJN8_HUMAN (+2)	47 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
419	ATXN10	Ataxin-10	ATX10_HUMAN	53 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
420	CSDE1	Cold shock domain-c	CSDE1_HUMAN (+4)	89 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,8660254
421	KHSRP	Far upstream elemen	FUBP2_HUMAN (+1)	73 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
422	PSMB6	Proteasome subunit	PSB6_HUMAN (+1)	25 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
423	RARS	Arginine--tRNA ligase	SYRC_HUMAN (+1)	75 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
424	CYTSA	CYTSA protein	B2RMV2_HUMAN (+3)	125 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254
425	RPS19	40S ribosomal protei	B0ZBD0_HUMAN (+2)	16 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254	0
426	G3BP1	Ras GTPase-activating	G3BP1_HUMAN (+4)	52 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0,5	0	0,8660254

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Proteini koji vežu nesmotane proteine	A0A024RDL1_HUMAN	Šaperonin koji sadrži podjedinicu TCP1
	GRP75_HUMAN	Član 9 obitelji A *heat shock* proteina (HSPA9)
	HSP7C_HUMAN	Član 8 obitelji A *heat shock* proteina (HSPA8)
Koeficijent obogaćenja: 13,81		
Skupina	**Pristupni broj (UniProt)**	**Protein**
Inhibitori serinskih proteaza (serpini)	PEDF_HUMAN	Član 1 obitelji F serpina (SERPINF1)
	PAI1_HUMAN	Član 1 obitelji E serpina (SERPINE1)
	A0A024R498_HUMAN	Član 2 obitelji E serpina (SERPINE2)
Koeficijent obogoćenja: 12,45		
Skupina	**Pristupni broj (UniProt)**	**Protein**
Strukturni proteini izvanstaničnog matriksa	CO8A1_HUMAN	Lanac α1 kolagena tipa VIII
	CO4A2_HUMAN	Lanac α2 kolagena tipa IV
	A0A087X0S5_HUMAN	Lanac α1 kolagena tipa VI
Koeficijent obogaćenja: 10,92		
Skupina	**Pristupni broj (UniProt)**	**Protein**
Proteini intermedijarnih filamenata	H6VRF8_HUMAN	Keratin 1
	LMNA_HUMAN	Lamin A/C
	VIME_HUMAN	Vimentin
Koeficijent obogćenja: 10,62		
Skupina	**Pristupni broj (UniProt)**	**Protein**
Proteini koji sudjeluju u organizaciji izvanstaničnog matriksa	A0A0S2Z4Q2_HUMAN	Inducirani transformirajući faktor rasta β (TGFBI)
	POSTN_HUMAN	Periostin
	VTNC_HUMAN	Vitronektin
Koeficijent obogaćenja: 9,94		
Skupina	**Pristpuni broj (UniProt)**	**Protein**

Proteini koji sudjeluju u posttranslacijskim modifikacijama (hidroksilacija aspartata i asparagina)	LTBP4_HUMAN	Protein koji veže latentni transformirajući faktor rasta β
	EDIL3_HUMAN	Ponavljanja slična epidermalnom faktoru rasta
	FBLN1_HUMAN	Fibulin 1
	A0A024R9B9_HUMAN	Matrilin 2
Koeficijent obogaćenja: 8,20		
Skupina	**Pristpuni broj (UniProt)**	**Protein**
Proteini bazalne lamine	LAMC1_HUMAN	γ1 podjedinica laminina
	LAMB2_HUMAN	β2 podjedinica laminina
	LAMA5_HUMAN	α5 podjedinica laminina
Koeficijient obogaćenja: 7,42		
Skupina	**Pristupni broj (UniProt)**	**Protein**
Proteini koji vežu RNA	Q86VG2_HUMAN	*Splicing* faktor bogat prolinom i glutaminom
	A0A087X0X3_HUMAN	Heterogeni ribonukleoprotein M
	HNRPU_HUMAN	Heterogeni ribonukleoprotein U
	HNRPK_HUMAN	Heterogeni ribonukleoprotein K
Koeficijent obogaćenja: 6,25		
Skupina	**Pristupni broj (UniProt)**	**Protein**
Proteini citoskeleta	TBB4B_HUMAN	Tubulin-β 4B
	Q5SU16_HUMAN	Tubulin-β
Koeficijent obogaćenja: 5,54		
Skupina	**Pristupni broj (UniProt)**	**Protein**
Inhibitori metalopeptidaza	TIMP3_HUMAN	TIMP inhibitor metalopeptidaze 3
	TIMP2_HUMAN	TIMP inhibitor metalopeptidaze 2
Koeficijent obogaćenja: 5,20		

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

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

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

Pristupni broj (UniProt)	Protein
ARF4_HUMAN	Faktor ribozilacije ADP-a 4
HTRA1_HUMAN	Serinska peptidaza 1 HtrA
AGRIN_HUMAN	Agrin
A0A024R5Z7_HUMAN	Aneksin A2
CLH1_HUMAN	Teški lanac klatrina
COF1_HUMAN	Kofilin
CYR61_HUMAN	Protein koji inducira angiogenezu bogat cisteinom 61
DYHC1_HUMAN	Teški lanac dineina 1
IF4A1_HUMAN	Eukariotski faktor inicijacije translacije 4A
LEG1_HUMAN	Galektin 1
GANAB_HUMAN	Glukozidaza II, α podjedinica
G3P_HUMAN	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH)
HS90A_HUMAN	Član 1 obitelji A *heat shock* proteina 90α
ENPL_HUMAN	Član 1 obitelji *heat shock* proteina 90β
B2R4R0_HUMAN	Klaster histona 4 H4
A0A0A0MTH3_HUMAN	Kinaza povezana s integrinima
A0A024RC55_HUMAN	EGF faktor 8
MYH9_HUMAN	Teški lanac miozina-9
B7Z6Z4_HUMAN	Laki lanac miozina-6
PXDN_HUMAN	Peroksidazin
PRDX1_HUMAN	Peroksiredoksin 1
TPA_HUMAN	Aktivator plazminogena
RAC1_HUMAN	Rac1
ADT2_HUMAN	Član 5 obitelji 25 obitelji SLC (engl. *solute carrier*)
TSP1_HUMAN	Trombospondin 1
THSD4_HUMAN	Trombospondin 1, domena 4
TFPI2_HUMAN	TFPI2
TGFB2_HUMAN	Transformirajući faktor rasta β2
TGM2_HUMAN	Transglutaminaza 2

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Zrinka Vitković

Datum rođenja: 28. prosinac 1993.

Mjesto rođenja: Vinkovci

Obrazovanje

2000. – 2008.	Osnovna škola Vladimira Nazora, Vinkovci
2008. – 2010.	Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci
2010. – 2012.	St Leonards-Mayfield School, Mayfiel, East Sussex, UK
2012. – 2016.	Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2016. – 2018.	Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane Analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2019. -	Doktorski studij biokemije, School of Chemical and Biological Sciences, Queen Mary University of London, UK

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013. – 2017.	Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2012. – 2018.	Znanstvene čarolije

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

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